



HAL
open science

Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux : première rencontre du groupe de la Sainte-Catherine

M. Verger, Céline Le Pichon, Hervé H. Le Bouler

► **To cite this version:**

M. Verger, Céline Le Pichon, Hervé H. Le Bouler. Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux : première rencontre du groupe de la Sainte-Catherine. Cemagref Editions, pp.216, 1998, : 2-85362-505-2. hal-02577646

HAL Id: hal-02577646

<https://hal.inrae.fr/hal-02577646v1>

Submitted on 13 Jun 2023

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

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

PUB 00004914

ACTES DE
COLLOQUE



Angers
25-26 novembre 1997

Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux

Première rencontre

du groupe de la Sainte Catherine

CENA 33

Cemagref
EDITIONS

CEMAGREF
DOCUMENTATION
CLERMONT-FERRAND

Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux

Première rencontre du groupe
de la Sainte Catherine

Angers - 25-26 novembre 1997



Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux.

Première rencontre du groupe de la **Sainte Catherine**. 24-26 novembre 1997.

Coordination de l'édition : Céline Le Pichon, Michel Verger. Secrétariat : Sylvie Bourgeois.

Mise en page : Sylvie Bourgeois, Céline Le Pichon.

Impression et façonnage : Ateliers Cemagref-Dicova. Vente par correspondance : Publi-

Trans, BP 22, 91167 Longjumeau Cedex 9, Tél. 01.69.10.85.85. Diffusion aux libraires :

Tec et Doc Lavoisier, 14 rue de Provigny - 94236 Cachan Cedex. © Cemagref,
ISBN 2-85362-505-2, dépôt légal 4^{ème} trimestre 1998. Prix de vente : 195 F TTC

Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux

Première rencontre du groupe de la Sainte Catherine

Angers - 25-26 novembre 1997

Coordinateurs scientifiques :

Michel Verger - INRA Orléans
Céline Le Pichon - Cemagref Nogent/Vernisson
Hervé Le Bouler - Pépinière Forestière expérimentale
de Guémené-Penfao

Comité de lecture :

Hélène Bertrand - INH Angers
Daniel Cornu - INRA Orléans
Bernard Héois - Cemagref Nogent/Vernisson
Michel Verger - INRA Orléans

Comité d'organisation :

Michel Verger - INRA Orléans
Céline Le Pichon - Cemagref Nogent/Vernisson
Virginie Pellicer - Cemagref Nogent/Vernisson
Hervé Le Bouler - Pépinière Forestière Expérimentale
de Guémené-Penfao



Avant-propos

"A la Sainte Catherine, tout bois prend racine "

C'est en faisant référence à ce proverbe qu'un peu plus de 90 personnes se sont réunies, les 25 et 26 novembre 1997, à l'Institut National de l'Horticulture (INH) d'Angers, pour suivre un colloque sur la multiplication végétative des ligneux.

Le groupe de la Sainte Catherine a été créé à l'initiative de l'INRA d'Orléans, du Cemagref de Nogent/vernisson et de la pépinière forestière expérimentale de Guémené-Penfao. C'est un groupe informel qui a pour but de créer une dynamique autour du thème "multiplication végétative des ligneux", de valoriser et diffuser des acquis récents de la recherche sur ce thème, de profiter des compétences éclatées dans différents organismes ou structures sur des essences ligneuses diverses. Son ambition est donc de favoriser les échanges et les collaborations entre chercheurs, enseignants et praticiens (pépiniéristes et laboratoires de culture in vitro) de la multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux.

Le colloque s'est déroulé en deux temps: une journée consacrée aux exposés en salle (17 au total dont 16 sont reproduits dans cet ouvrage) et une journée de visite de terrain: les pépinières Minier à La Ménitré et André Briant à Saint-Barthélémy d'Anjou.

La réalisation d'un colloque fait toujours appel à de nombreuses bonnes volontés qui apportent leurs pierres à l'édifice. Qu'elles soient ici toutes sincèrement remerciées. Outre les intervenants et les comités d'organisation et de lecture, nous tenons à remercier plus particulièrement :

- Monsieur Nil, Directeur de l'INH, qui a mis gracieusement à notre disposition le grand amphithéâtre de son établissement ;
- les pépinières Minier et André Briant qui nous ont accueillis avec professionnalisme lors des visites de terrain ;
- le secrétariat de la pépinière forestière expérimentale de Guémené-Penfao pour l'accueil des participants ;
- Monsieur Viémont de l'Université d'Angers qui nous a communiqué l'agenda prestigieux du Groupe d'Etude de l'Arbre ;
- Monsieur Bonnet-Masimbert de l'INRA d'Orléans qui a accepté de financer ce projet sur les fonds de la station d'amélioration des arbres forestiers ;
- Monsieur Terrasson, chef du département Gestion des territoires du Cemagref, qui a soutenu le projet d'édition de ces comptes-rendus ;
- Mademoiselle Launay, documentaliste au groupement du Cemagref de Nogent/Vernisson pour ses renseignements précieux ;
- Madame Bourgeois, secrétaire au Cemagref de Nogent/Vernisson pour la mise en page de ce document ;
- Madame Moore, professeur d'anglais, pour la relecture de tous les résumés anglais.

Sommaire

Evolution des glucides dans les boutures de Mélèze hybride9 (<i>Larix x eurolepis</i> Henry) V. Pellicer, Cemagref Nogent	
Consommation des réserves glucidiques au cours des différentes étapes du développement d'une bouture de vigne 17 (<i>Vitis vinifera</i> L.) J.-C. Fournioux, Laboratoire Sciences de la Vigne, Dijon	
La greffe bouture herbacée des plantes ligneuses, application aux <i>Citrus</i>37 J.-P. Thermo, INRA San Giuliano	
Nouvelles perspectives pour la multiplication <i>in vivo</i> de végétaux ligneux d'ornement45 G. Galopin, INH Angers - F. Beaujard, INRA Angers	
Mycorhizes et multiplication végétative du Douglas.....63 D. Bouchard, F. Le Tacon, INRA Nancy - C. Karabaghli, ENGREF Nancy	
Etude de différentes méthodes de conduite du verger porte-boutures de Julio ® et Torinel ®79 P. Michelot, CEPEM Montfavet	
Le bouturage traditionnel du poirier89 J. Lemoine, J.-C. Michelesi, G. Allard, INRA Angers	
Action de la position (topophysie) des boutures de rosier sur le développement de la ramification 101 M. Le Bris, A. Champéroux, P. Bearez, INRA Biot	
La multiplication par boutures dans le genre <i>Protea</i> 113 M. Montarone, D. Savignac, C. Maricot, INRA Biot	
Etude de quelques facteurs d'enracinement et de développement des boutures de chêne (<i>Quercus petraea</i>) en vue de multiplication végétative en vrac 135 C. Le Pichon, V. Bourlon, Cemagref Nogent	

Problèmes pathologiques rencontrés en multiplication végétative de ligneux forestiers : Etude de la "fonte de boutures" sur merisier	145
<i>C. Delsol, H. Le Bouler, Pépinière forestière de Guémené</i>	
Humidité de l'air et enracinement des boutures de chêne sessile	159
<i>H. Le Bouler, C. Clément, Pépinière forestière de Guémené</i>	
L'horticulture et la culture <i>in vitro</i> font-elles bon ménage à l'aube du troisième millénaire ?	171
<i>C. Jay-Allemand, P. Capelli, INRA Orléans</i>	
Influence de la position <i>in situ</i> de la bouture sur son enracinement et son développement ultérieur : synthèse de travaux publiés	183
<i>O. Monteuis, Cirad-Forêt Montpellier</i>	
Souvent clone interagit avec les paramètres contrôlant la réussite de la multiplication végétative.....	193
<i>M. Verger, INRA Orléans</i>	
Hortis : un outil pédagogique pour l'enseignement des techniques de multiplication des plantes horticoles	209
<i>A. Lafay, LEGTA Dardilly</i>	

Evolution des glucides dans les boutures de Mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry)

Carbohydrates concentration in cuttings of hybrid larch (Larix x eurolepis Henry)

V. Pellicer

Cemagref, RGPF - Domaine des Barres
45290 Nogent sur Verriçon
Tel : 02 38 95 03 30 - Fax 02 38 95 03 59
E-mail : greta.cahors.lot@wanadoo.fr
Ou celine.lepichon@cemagref.fr

Résumé : La multiplication végétative par bouturage est utilisée dans le cas du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) afin d'augmenter le nombre de plants produits à partir de lots de graines disponibles en faible quantité. Des taux de multiplication de plus de cent boutures enracinées par plant-mère ont été obtenus. Cependant, l'espèce témoigne d'une aptitude aléatoire à l'enracinement dans laquelle les glucides, en tant qu'éléments constitutifs et en tant qu'énergie ont un rôle déterminant à jouer. La présente étude montre que l'enracinement est d'autant plus important que les réserves accumulées dans le plant-mère étaient importantes. L'émission des racines fait suite à une augmentation de la concentration en saccharose à la base des boutures, alors que l'amidon a également tendance à s'accumuler. L'étude met par ailleurs en évidence que seules les boutures qui avaient repris leur croissance végétative, s'enracinent. Il en résulte l'importance de l'activité photosynthétique des boutures pour le succès de l'enracinement.

Abstract : *Vegetative propagation through rooted cuttings is a way to enhance the number of plants produced from seeds of valuable progeny of hybrid larch (Larix x eurolepis Henry). On previous experiments, more than hundred rooted cuttings per stock plant have been obtain. Nevertheless wide variability occur between clones on years. Carbohydrates as building components and as energy have been investigated. The higher initial carbohydrate level of stock plant, the better cuttings root. Roots stand out after sucrose level in the bottom of cutting has increased up, beside starch tends to be stored. Furthermore, the study shows that only vegetative growing cuttings root. Present results highlight importance of photosynthetic activity in rooting success.*

Introduction

La multiplication végétative par bouturage est utilisée dans le cas du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) afin d'augmenter le nombre de plants produits à partir de lots de graines disponibles en faible quantité. Si de bons résultats ont été obtenus, (taux d'enracinement supérieurs à 90%, Verger et Paques, 1993, Pellicer et al, 1998), les échecs, également rencontrés, ont motivé la recherche de facteurs déterminant l'aptitude à l'enracinement des boutures. Convaincus de la nécessité de la présence d'énergie et de matériaux de base pour l'édification de nouveaux tissus, nous avons, à l'instar de nombreuses études réalisées sur le sujet, cherché à établir des relations entre la concentration en glucides des boutures et leur enracinement. Les glucides en tant que composants des différentes voies biochimiques et en tant qu'éléments structuraux de base ont effectivement un rôle important à jouer dans l'élaboration de racines adventives.

1- Matériel et méthodes

Les clones ont été choisis en fonction de leur aptitude à l'enracinement, déterminée sur trois années consécutives. Quatre lots ont été établis : boutures du clone 1 et du clone 2, à bonne aptitude à l'enracinement et boutures du clone 4 et du clone 8 à mauvaise aptitude.

Les boutures ont été prélevées au mois d'avril 1996, au moment où les bourgeons étaient débouffés et où les rosettes d'aiguilles venaient de s'étaler. Il est important de signaler que le débouffement des quatre clones n'est pas synchrone. Les dates de prélèvement ont dû être échelonnées pour que chaque clone soit à un stade comparable de débouffement (dates de prélèvement : le 9 avril pour les clones 1 et 2 et le 22 avril pour les clones 4 et 8). Les boutures prélevées sont des portions ligneuses des rameaux de l'année précédente, d'une taille égale à 10 cm. Elles ont été ébourgeonnées à la base sur 2 à 3 cm et trempées 15 secondes dans une solution d'AIB liquide à la concentration de 1000 ppm. Puis, elles ont été mises en place dans un tunnel polyéthylène installé sous toile climatique à l'extérieur. L'humidité relative atmosphérique est maintenue au-dessus de 70 % par confinement. Le dispositif expérimental est un factoriel à quatre répétitions de parcelles de 91 boutures de chaque clone.

L'évolution quantitative et la distribution des réserves glucidiques dans les boutures ont été mesurées sur des lots de 9 individus représentant chacun des clones choisis pour leur aptitude à l'enracinement. Les réserves glucidiques ont été suivies depuis le prélèvement des boutures sur les plants-mères jusqu'à l'enracinement. Les concentrations en glucose, fructose, saccharose et amidon ont été déterminées lors du prélèvement des boutures sur les plants-mères (soit le 9 avril pour les clones 1 et 2 et le 22 avril pour les clones 4 et 8), puis les 7 et 21 mai pour chacun des clones, avant l'apparition des premières racines. Les concentrations ont été déterminées dans la partie ligneuse des boutures divisées en deux parties : la partie inférieure = 3 cm de la base et la partie supérieure restante. Les glucides ont été extraits par un mélange ternaire méthanol/eau/chloroforme, puis dosés par voie enzymatique.

2- Résultats

2-1 Résultats d'enracinement

Parmi les clones choisis pour leur bonne aptitude à l'enracinement, le clone 2 donne un taux satisfaisant de 84% , et le clone 1 donne un taux de 33%. Parmi les clones choisis pour leur mauvaise aptitude, le clone 8 confirme cette caractéristique, avec 0 % d'enracinement, alors que l'enracinement du clone 4 dépasse les 50%.

2-2 Etat des réserves glucidiques

2-2-1 Etat initial

Lors du prélèvement des boutures sur le plant-mère, la concentration en sucres solubles totaux dosés (glucose + fructose + saccharose) du clone 8 est significativement inférieure à celles des autres clones (tableau n° 1). La concentration de chacun des trois sucres est la plus basse pour ce clone que pour les autres clones.

Les clones 1, 2 et 4 ont une concentration égale en sucres solubles totaux, mais pas en sucre soluble individuel : ainsi, le clone 2 a la plus forte concentration en glucose alors qu'il a la plus faible en saccharose.

La concentration en amidon des boutures du clone 8 est également significativement inférieure à celle des autres clones. Pour l'ensemble des clones cette concentration reste faible, inférieure ou égale à 2 mg/g de matière sèche.

	Glucose		Fructose		Saccharose		Sucres solubles	Amidon
Clone 1	7.8	c	6.6	a	5.1	a	19.5	1.3
Clone 2	11.9	a	6.2	a	1.6	b	19.7	2.0
Clone 4	9.5	b	3.1	b	6.9	a	19.6	1.6
Clone 8	8.1	c	2.5	b	2.7	b	13.3	0.7
ANOVA F	21,86		19,51		19,78		13,15	5,97
p =	0,0001		0,0001		0,0001		0,0001	0,006

Tableau n° 1 : Concentrations de la partie ligneuse de la bouture en glucose, fructose, saccharose, sucres solubles (= glucose + fructose + saccharose) et amidon lors du prélèvement sur le plant-mère.

N.B. : Dans une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %, d'après le test de Tukey.

2-2-2 Evolution au cours du temps

La concentration en sucres solubles totaux de la partie inférieure des boutures du clone 8 diminue progressivement au cours du temps, alors que celle de la partie supérieure augmente pour chacun des sucres dosés (figure 1). La concentration en amidon ne varie pas de façon significative dans aucune des deux parties de la bouture (figure 2).

Pour les clones 1 et 4, on met en évidence une augmentation significative du saccharose dans la partie inférieure des boutures. L'augmentation de saccharose a lieu pour chacun des deux clones dans une fourchette comprise entre 15 et 29 jours après le prélèvement des boutures. La partie supérieure des boutures ne présente pas d'évolution significative ni en saccharose, ni en sucres solubles totaux.

La concentration en sucres solubles totaux dans les boutures du clone 2 présente une baisse significative dans la partie supérieure. Elle se maintient dans la partie inférieure, où on peut noter une augmentation de la concentration en saccharose, toutefois moins marquée que celle des boutures des clones 1 et 4.

Chacun de ces trois clones 1, 2 et 4 présente une tendance à l'accumulation de l'amidon dans les parties inférieures des boutures.

3- Conclusion - Discussion

L'exemple du clone 8 montre que les réserves de la base de la bouture qui ne s'enracine pas sont progressivement consommées ou exportées vers la partie supérieure. Alors que les exemples des clones 1 et 4 et dans une moindre proportion du clone 2 montrent que la partie inférieure des boutures d'où sont émises des racines représente un puits pour le saccharose, comme l'a observé Haissig (1982, 1984) pour des boutures de pin gris (*Pinus banksiana*). Comme dans le même temps, il n'y a pas appauvrissement, ni en sucres solubles dans la partie supérieure, ni en amidon dans les deux parties, le saccharose accumulé à la base provient donc des aiguilles. Cette accumulation témoigne de l'activité photosynthétique de la bouture.

La quantité de sucres accumulée à la base n'est pas proportionnelle à l'enracinement des boutures : le clone 2, qui présente la plus faible accumulation est celui qui a donné les meilleurs taux d'enracinement. D'autre part, l'accumulation d'amidon à la base de la bouture, mise en évidence également chez l'avocat (*Persea americana*) par Reuveni et Raviv (1981) et chez le pin gris (*Pinus banksiana*) par Haissig (1982, 1984), semble indiquer que la disponibilité en sucres est suffisante pour qu'il y ait mise en réserve.

L'observation de coupes histologiques transversales réalisées cinq semaines après prélèvement des boutures, dans le premier demi-centimètre de la base de la bouture, a par ailleurs permis de visualiser cette accumulation d'amidon. De nombreux grains d'amidon sont présents dans les parenchymes et les rayons ligneux des clones 1 et 4 à bon enracinement, alors qu'ils sont absents chez le clone 8 à mauvais enracinement (figure 3).

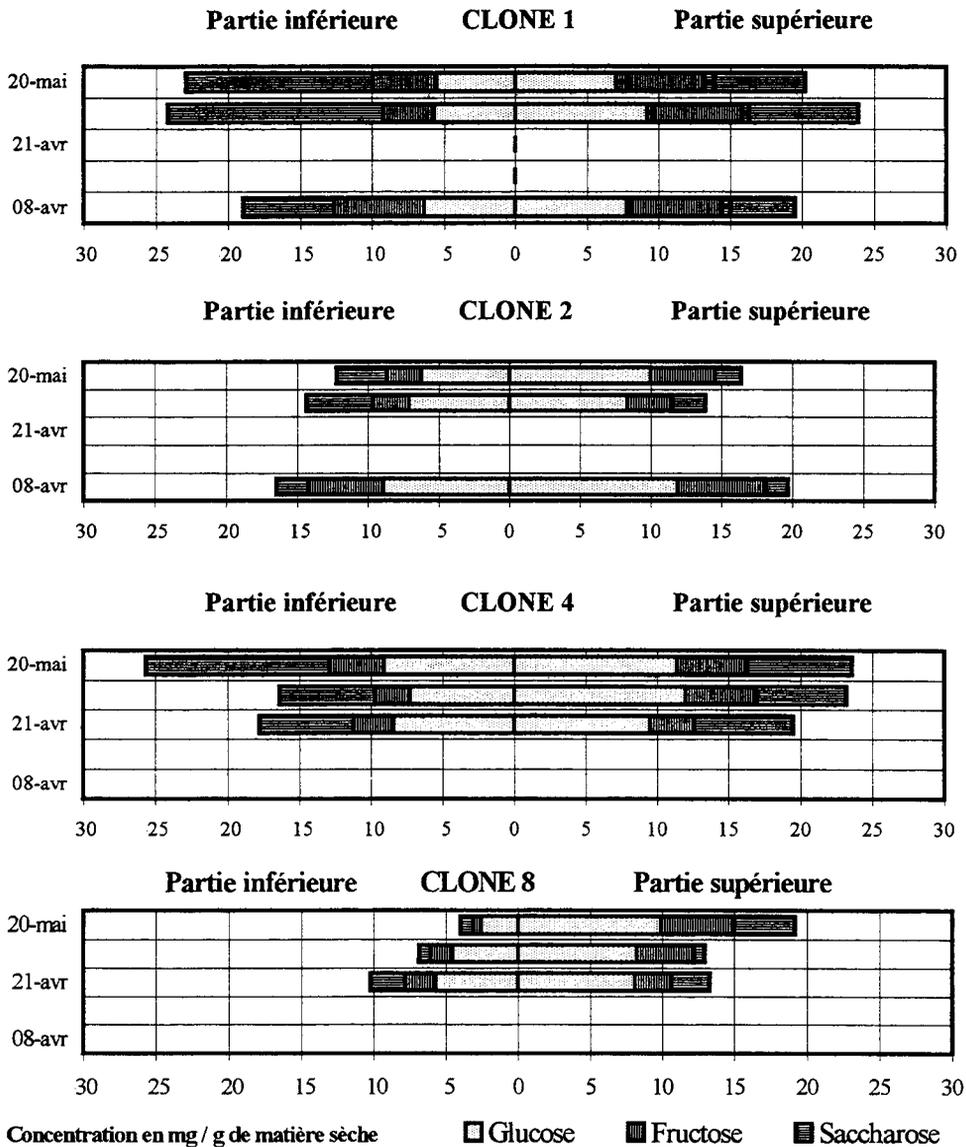


Figure 1 : Concentration en glucides dans les boutures au cours du temps à droite : partie supérieure de la bouture, à gauche : partie inférieure de la bouture.

Des lettres majuscules différentes indiquent, pour une même partie de la bouture, une différence significative entre deux dates, de la concentration en sucres solubles totaux ou en amidon. Des lettres minuscules différentes indiquent une différence significative entre deux dates, de la concentration en saccharose.

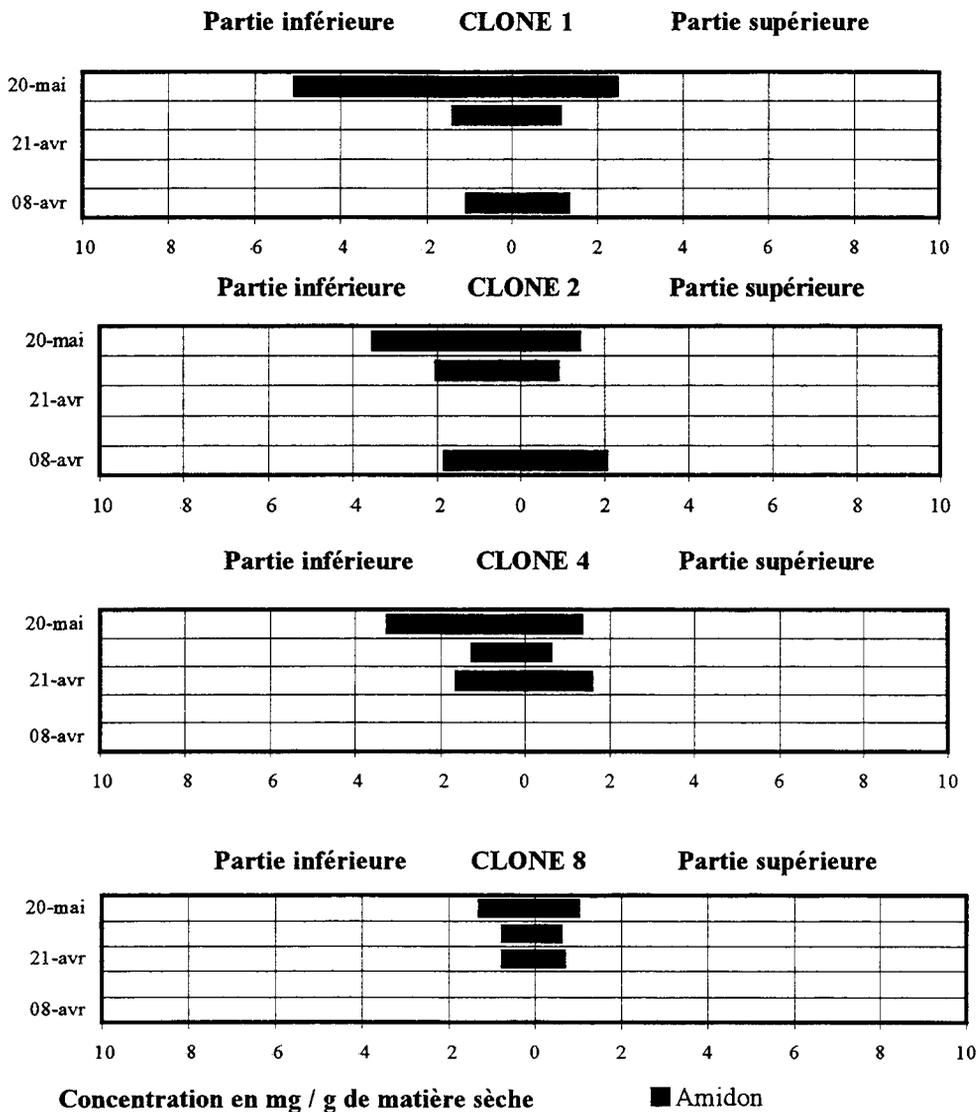


Figure 2 : Concentration en amidon dans les boutures au cours du temps à droite : partie supérieure de la bouture, à gauche, partie inférieure de la bouture

Des lettres majuscules différentes indiquent, pour une même partie de la bouture, une différence significative entre deux dates, de la concentration en sucres solubles totaux ou en amidon. Des lettres minuscules différentes indiquent une différence significative entre deux dates, de la concentration en saccharose.

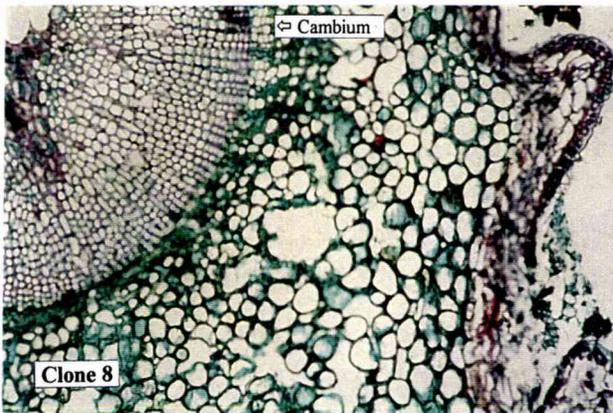
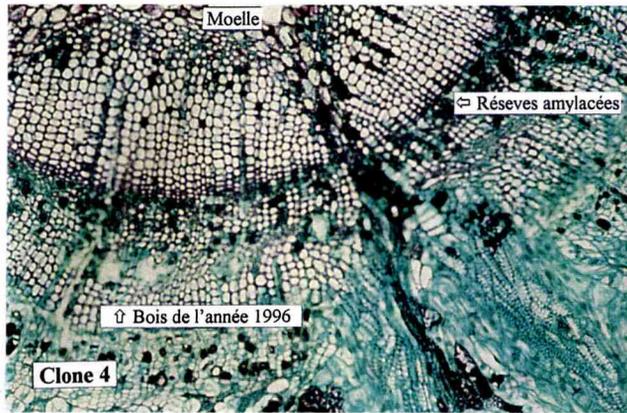
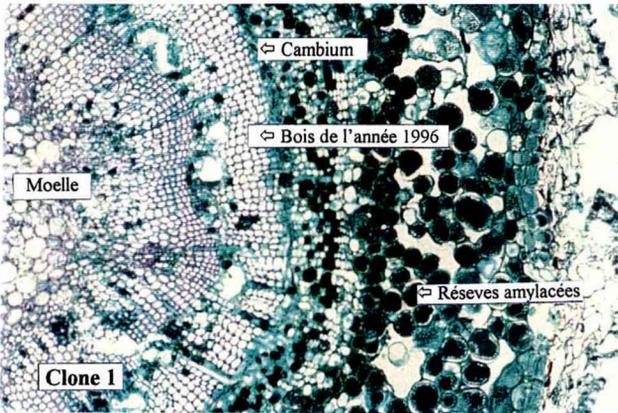


Figure 3 : Coupes histologiques transversales, réalisées le 28 mai 1996 (clone 1) et le 3 juin (clone 4 et 8), dans les 5 mn de la base de la bouture

Ces coupes ont également permis de constater que les boutures qui ont initié des *primordia* racinaires présentent une reprise de croissance des tissus conducteurs alors que le clone qui ne s'est pas enraciné ne présente aucune activité. Les données dont nous disposons ne nous permettent pas d'affirmer que cette reprise de croissance a eu lieu avant le prélèvement des boutures. Cependant, elles nous incitent à penser que le clone qui ne s'est pas enraciné a été prélevé à un stade de débourrement trop précoce. La faible concentration en glucides mesurée chez ce clone ne serait pas une cause directe du non enracinement mais une cause induite liée au fait que les aiguilles n'avaient pas atteint, lors du prélèvement, un développement suffisant, d'une part pour être autotrophes et d'autre part, pour produire les signaux de la reprise de l'activité cambiale. Une expérimentation menée parallèlement, pour laquelle les réserves carbonées du plant-mère avaient été enrichies en isotopes stables de manière à les repérer dans les boutures en enracinement, a mis en évidence que les nouvelles racines sont élaborées essentiellement à partir de nouveaux assimilats.

Ces résultats insistent sur l'importance de la photosynthèse pour l'enracinement des boutures. Ils ouvrent sur l'intérêt de relier l'état des réserves glucidiques, avec l'état d'activité cambiale et d'activité photosynthétique.

Bibliographie

Haissig B.E., 1982 - Activity of some glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes during the development of adventitious roots. *Physiol. Plant.* 55 p 261-272.

Haissig B.E., 1984 - Carbohydrate accumulation and partitioning in *Pinus banksiana* seedlings and seedling cuttings. *Physiol. Plant.* 61 p 13-19.

Pellicer V., Cazet M., Verger M., Rivière L.M., 1998 - Effect of stock plant lighting on bulk vegetative propagation of hybrid larch. *For. Eco. Manag.* 102 p 323-332.

Reuveni O., Raviv M., 1981 - Importance of leaf retention of rooting of avogado cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99 (2), 127-130.

Verger M., Paques L.E., 1993 - Multiplication végétative du Mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) par bouturage en vrac. *Ann. Sci. For.* 50 p 205-215.

Consommation des réserves glucidiques au cours des différentes étapes du développement d'une bouture de vigne (*Vitis vinifera* L.)

*Use of carbohydrate reserves during the different developmental stages of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cuttings*

J.-C. Fournioux

Laboratoire des Sciences de la Vigne - Institut Jules GUYOT
Université de Bourgogne - B.P. 138 - 21004 Dijon cedex
Tél. 03 80 39 62 63
Fax 03 80 39 62 65
E-mail : jean-claude.fournioux@u-bourgogne.fr

Résumé : L'étude de l'évolution des réserves glucidiques au cours des différentes étapes du développement d'une bouture de vigne montre que la diminution de la vitesse de croissance de la pousse après sa première phase d'extension rapide n'est pas due à l'épuisement de ces réserves car cet état n'est atteint qu'à la fin de la période de croissance lente. Ce travail démontre aussi que les réserves sont mobilisées par le rameau en croissance et non par les racines. Chez des boutures de poids variables, la même quantité relative de réserves est consommée et la cinétique de cette mobilisation est la même. Cela suggère l'existence d'un processus de régulation dans la consommation de ces réserves.

Mots clés : *Vitis vinifera*, boutures, réserves glucidiques.

Abstract : *The study of the amount of variation in carbohydrate reserves during the different developmental stages of grapevine cuttings shows that the slow-growth period of the shoot which follows the first fast-extension phase of the bud is not due to the total use of these reserves. In fact, this state of exhaustion is reached only at the end of the slow-growth period. This work also demonstrates that carbohydrate reserves are used by the shoot and not by the roots. In cuttings of various weight, the same relative quantity of reserves is used and the kinetics of their mobilization is identical. These results suggest that the consumption of carbohydrate reserves is regulated.*

Keywords : *Vitis vinifera*, cuttings, carbohydrate reserves.

Introduction

L'évolution des réserves au cours de l'édification d'une bouture de vigne n'avait jusqu'alors été étudiée que par un seul auteur (BUTTROSE, 1966 -1969). Ceci explique que les connaissances sur ce sujet soient restées très incomplètes, ces imprécisions ouvrant la voie à un certain nombre d'idées préconçues non argumentées par des faits scientifiques.

Dans le cadre général d'une étude des processus morphogénétiques qui président à l'édification du rameau de vigne (FOURNIOUX, 1995), nous avons été amené à envisager le cas du développement caulinaire sur une jeune bouture. Parmi les facteurs qui contrôlent la croissance de la pousse, nous avons pris en considération le rôle joué par les réserves glucidiques du bois.

La croissance de la pousse passe par 4 phases successives: Phase I - Période de croissance rapide classiquement considérée comme correspondant à l'étalement des parties préformées dans le bourgeon. Phase II - Réduction importante de la vitesse de croissance due à une diminution de l'activité du bourgeon terminal. C'est pendant cette phase que s'édifient les racines. Phase III - Reprise de croissance du rameau qui s'accélère progressivement. Phase VI - Elle débute quand la vitesse de croissance atteint sa valeur maximale.

Concernant les réserves glucidiques, les trois questions majeures auxquelles nous avons cherché à répondre sont les suivantes: i/ Quelles sont les relations entre ces 4 phases de l'extension du rameau et la cinétique de la consommation des réserves et, en particulier, la phase II est-elle due, comme cela est souvent évoqué, à un épuisement des réserves? ii/ Ces réserves sont-elles mobilisées par le rameau ou par les racines? Autrement dit, ces réserves sont-elles essentielles pour la formation des racines? iii/ Comment les réserves évoluent-elles chez des boutures de poids variables?

1- Matériel et Méthodes

1-1 Matériel végétal

1-1-1 Nature et récolte du matériel.

Toutes ces expériences ont été réalisées sur le cépage Pinot noir. Les sarments destinés à la confection des boutures sont récoltés au vignoble pendant l'hiver au fur et à mesure des besoins. Ils n'ont jamais été stockés au froid avant bouturage.

1-1-2 Confection et conformation des boutures.

Elles sont réalisées dans la partie moyenne des sarments (entre le 5ème et le 15ème nœuds comptés depuis la base) et mises en culture le jour même de la récolte des bois.

A l'exception des expériences réalisées avec des boutures de poids variables, le modèle "standard" utilisé pour toutes les autres expériences répond aux caractéristiques suivantes: bouture à 1 œil, de 7 cm de longueur et 10 ± 1 mm de diamètre. Leur poids varie entre 5 et 7g.

Les boutures de poids variables ont le même diamètre et des longueurs différentes. Le plus grand soin est apporté, là aussi, à la standardisation du matériel.

1-2 Modalités de culture

1-2-1 Culture "standard"

Les boutures sont cultivées en pots sur un mélange 50/50 de gravier siliceux (granulométrie 0/4) et de tourbe neutre.

1-2-2 Culture sur "circuit d'eau sous pression".

Ce procédé n'a été employé que pour une expérience ayant pour but d'obtenir le développement caulinaire des boutures sans formation de racines. Les boutures sont emmanchées dans un petit tube souple pour être raccordées à des tubulures en T inversé reliées les unes aux autres par un tuyau en chlorure de polyvinyle. L'ensemble, fixé sur un support métallique, est disposé au-dessus d'un bac qui contient la réserve d'eau dans laquelle plongent les conduits d'alimentation du circuit et de retour de l'eau au bac. Une pompe électrique placée en amont de la rampe qui porte les boutures assure la circulation de l'eau en continu et sa mise sous pression est obtenue par simple surélévation du tuyau de retour en aval. La figure 1 rend compte de ce dispositif. L'eau ainsi apportée aux boutures reste sous pression dans les vaisseaux du bois comme en témoigne le fait qu'on la voit perler en permanence à leur extrémité supérieure.

1-2-3 Culture sur eau en flacons de verre.

Cet artifice a été utilisé pour le lot témoin de la condition précédente. Ces boutures ne devaient être, elles aussi, alimentées qu'en eau tout en pouvant former des racines. Pour cela, nous avons utilisé des flacons en verre de 250 ml remplis d'eau de ville. Les boutures sont maintenues par un bouchon en plastique fendu qui repose seulement sur le rebord de l'ouverture du flacon, ce qui permet de le retirer aisément pour compléter ou renouveler l'eau aussi souvent que nécessaire.

1-3 Conditions ambiantes de culture.

Les boutures sont cultivées dans une pièce climatisée : température de 26°C/jour et 22°C/nuit ($\pm 2^\circ\text{C}$) - éclairement de 13000 lux fourni par des tubes fluorescents PHILIPS 33 "Blanc industrie" - photopériode de 16 h - hygrométrie de 80%. Les boutures sont arrosées deux fois par semaine avec une solution nutritive (FOURNIOUX, 1996).

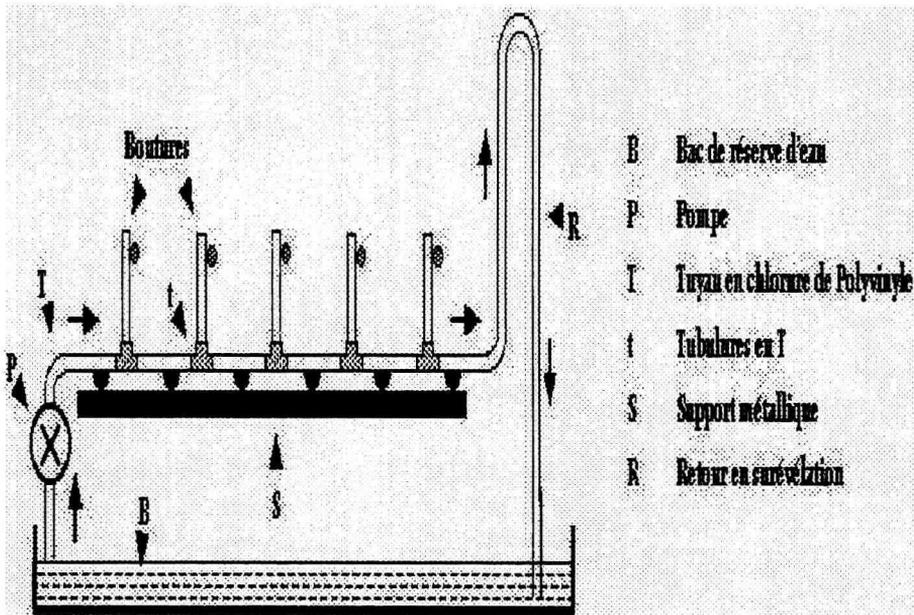


Figure 1 : Schéma du dispositif de culture des boutures sur "circuit d'eau sous pression"

1-4 Méthodes d'évaluation de l'évolution des réserves du bois.

1-4-1 Evolution du poids sec des boutures.

Les poids secs sont toujours mesurés sur des échantillons de 30 boutures aux différents stades de développement. Les plants sont soigneusement choisis sur la base d'un état de développement de leur pousse aussi voisin que possible. Pour pouvoir réaliser cette sélection, nous mettons en culture un nombre de boutures supérieur aux besoins de l'expérience.

Pour estimer le poids sec initial des boutures qui ne seront prélevées qu'après "n" jours de culture nous déterminons, sur un échantillon de 30 boutures identiques à celles mises en culture, le pourcentage de matière sèche. Une fois ce pourcentage moyen de x% établi, en prenant les x% du poids frais de chaque bouture mise en culture, nous pouvons faire une évaluation assez précise de leur extrait sec initial. Les poids secs sont déterminés après séchage au four Pasteur à 110°C jusqu'à poids constant.

1-4-2 Dosages des glucides du bois.

A chaque échantillonnage, 10 boutures, dont l'état de développement est, là aussi équivalent, sont prélevées et aussitôt congelées à - 22°C. Trois tronçons de bois de 1 cm sont découpés dans la partie médiane et lyophilisés puis broyés au broyeur à bille Danguomeau pour obtenir une poudre très fine et très homogène. Les particules de cette poudre ont des dimensions qui varient de 0,20 à 0,25 mm, conformes aux préconisations de STOEV (1952) pour la réalisation de dosages de glucides dans des sarments.

L'amidon est dosé par la méthode colorimétrique de CARLES (1962) déjà testée avec succès sur des bois de vigne par DEL CANIZO ORTIZ (1978) et TRINTIN (1981).

Les 3 principaux glucides solubles d'un sarment : saccharose, glucose et lévulose, sont dosés par les méthodes enzymatique et spectrophotométrique U.V. proposées par Boehringer-Mannheim. La technique d'extraction est celle employée par TRINTIN (1981).

Chaque analyse est répétée 3 fois pour les dosages d'amidon et 2 fois pour les glucides solubles.

1-5 Protocoles expérimentaux.

1-5-1 Essai n°1.

Sur une population de boutures parfaitement standardisées, nous avons suivi l'évolution de la matière sèche et des teneurs en amidon et en sucres solubles au cours des 4 phases de développement. Cet essai comporte, d'une part, 30 boutures maintenues en culture jusqu'à la fin de l'expérience pour établir la courbe d'élongation de la pousse en fonction du temps et, d'autre part, 4 lots de 50 boutures destinés aux échantillonnages. Chacune bouture est pesée avant plantation et affectée d'un numéro.

Par référence avec la courbe d'élongation, les 4 lots sont prélevés respectivement, à la fin de la phase I (P1), pendant la phase II (P2), à la fin de cette phase (P3) et 3 semaines plus tard (P4). A chaque prélèvement, 40 plants sont choisis sur la base d'un même état de développement de leur rameau commun avec celui atteint par les boutures de référence. Pour établir un lien entre l'état d'enracinement et l'évolution des réserves, les racines sont détachées et comptées. Trente boutures sont séchées et ensuite pesées individuellement. La moyenne des écarts par rapport aux poids secs estimés à l'origine permet de juger de l'évolution de la matière sèche. Les 10 autres boutures, débarrassées de leur pousse et de leurs racines sont stockées au congélateur pour analyses des glucides.

1-5-2 Essai n°2.

Le but est de comparer l'évolution des réserves glucidiques de boutures dont la pousse subit 4 types de traitements: 3 modalités d'effeuillage et un écimage.

- Effeuillage total qui consiste en une défoliation complète et régulière de la pousse par ablation renouvelée des jeunes feuilles néoformées dès leur séparation de l'apex ("E.tot.").

- Effeuilage régulier épargnant 2 jeunes feuilles à l'extrémité de la pousse ("E.j.").
- Effeuilage régulier épargnant 2 feuilles adultes à la base de la pousse ("E.ad.").
- Ecimage au-dessus de 2 feuilles adultes maintenues sur la base de la pousse ("-Ap.").

Tous ces traitements sont appliqués dès que les boutures sont parvenues au terme de la phase I de leur développement.

Cette expérience comprend un premier ensemble de 5 lots de 30 boutures (témoin + 4 traitements) qui servent à évaluer, d'une part, les effets des effeuillages sur la croissance du rameau (mesures régulières de la longueur de la pousse) et, d'autre part, les effets des 4 traitements sur la rhizogenèse (mesure, en fin d'expérience, du nombre et du poids moyen de racines par bouture).

Un second ensemble de 5 lots de 40 boutures identiques aux précédents sert aux prélèvements pour le suivi de l'évolution des réserves. Dans cette expérience, nous avons seulement dosé l'amidon et les glucides solubles. Nous réalisons ainsi 4 prélèvements de 10 boutures homogènes. Le premier est fait le jour des premières mutilations soit, référence faite au témoin, un peu avant l'achèvement de la phase I. Les 2 prélèvements suivants sont effectués 20 et 40 jours plus tard. Le dernier prélèvement est réalisé au terme de l'expérience, 65 jours après l'application des traitements, juste avant que les effeuillages les plus sévères ("E.tot." et "E.j.") ne provoquent la mort des boutures.

1-5-3 Essai n°3.

Son objectif est de comparer l'évolution des glucides chez des boutures qui édifient ou non des racines. C'est pour obtenir ces boutures sans racines que nous avons fait usage du dispositif de bouturage sur circuit d'eau sous pression décrit ci-dessus; le témoin consistant en 30 boutures cultivées sur eau en flacons de verre. Là encore, 2 ensembles de boutures sont réalisés, l'un pour établir les courbes de croissance caulinaire et l'évolution du nombre de racines (sur les boutures en flacons) en fonction du temps et l'autre pour effectuer 4 prélèvements des 2 catégories de plants à des stades de plus en plus avancés de leur évolution pour analyses des glucides.

1-5-4 Essai n° 4

Nous utilisons des boutures de même diamètre (compris entre 9 et 11 mm) mais de 3 longueurs différentes: 5-15 et 30 cm. Pour chacune de ces 3 catégories, 30 sont mises en culture pour suivre l'élongation de la pousse ; 30 servent à l'estimation du poids sec initial et 10 aux dosages de la teneur initiale en amidon. Pour les prélèvements ultérieurs, 200 boutures de chaque longueur sont cultivées dans les mêmes conditions. Les valeurs présentées résultent de pesées effectuées sur 20 boutures pour les pourcentages de perte en matière sèche et 10 pour les concentrations en amidon.

2- Résultats

2-1 Evolution des réserves glucidiques au cours des étapes successives de développement d'une bouture standard.

La figure 2-a permet de vérifier l'existence de 4 phases dans le développement caulinaire des boutures avec, durant la phase II, un très net ralentissement de la croissance et la concordance entre cette période de croissance lente et la formation des racines. Elle permet aussi de situer les 4 prélèvements pour analyses en fonction de l'état d'évolution des boutures.

Les résultats des analyses (figure 2-b) révèlent que les teneurs en glucose et en lévulose chutent rapidement. Dès la fin de la phase I (P1), elles atteignent leur niveau le plus bas. La consommation du saccharose s'étale sur une période plus longue. Au terme de la phase I (P1), sa teneur est encore égale à la moitié de sa valeur initiale. Il continue ensuite à décroître avec la même vitesse durant la première période de la phase II (jusqu'au 2ème prélèvement) pour atteindre alors une concentration proche de son niveau le plus faible qui n'est toutefois observé qu'à la fin de cette phase (P3). L'évolution de l'amidon est comparable à celle du saccharose. Il diminue environ de moitié au cours de la première phase d'extension du rameau (P1) et sa mobilisation se poursuit pendant la phase II jusqu'à ne plus représenter que moins de 1% de la matière sèche à la fin de cette phase (P3).

La matière sèche (MS) progresse de la même façon que l'amidon et le saccharose. Elle n'atteint son minimum qu'au troisième prélèvement quand, dans le même temps, l'amidon et le saccharose sont à leur plus faible concentration. Ceci coïncide avec la fin de la phase II (voir figure 2-a). C'est donc seulement à la fin de cette phase que les réserves glucidiques des boutures sont épuisées.

A ce moment, le poids sec moyen des boutures a subi une diminution de 21,3 %. Or les teneurs cumulées de l'amidon (14,5%), du saccharose (4,5%), du glucose (1,3%) et du lévulose (2,2%) représentent au départ environ 22,5% de la matière sèche. L'épuisement de ces sucres semble donc être la cause principale de cette diminution.

Considérons enfin les résultats du quatrième prélèvement (P4) réalisé après la reprise de croissance de la tige. Les teneurs en glucose et en lévulose sont en légère augmentation. Celle en saccharose est curieusement encore un peu plus faible qu'au prélèvement précédent. Par contre l'amidon présente une augmentation très nette, puisque de moins de 1% de la matière sèche, il remonte à plus de 3% ce qui explique la même tendance observée pour le poids sec des boutures.

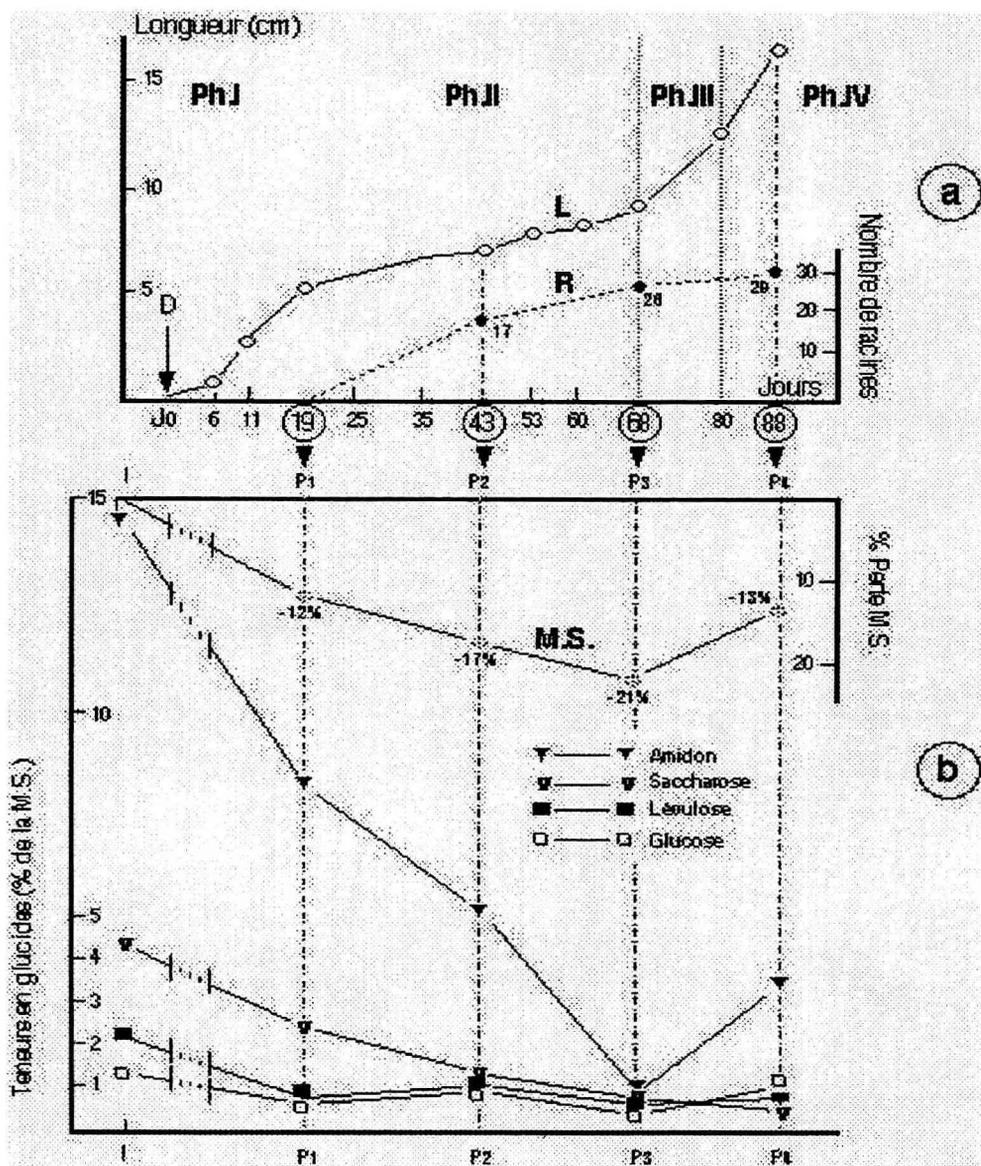


Figure 2 : Evolution des réserves glucidiques au cours des étapes successives du développement d'une bouture.

-a : Courbe L : longueur moyenne cumulée, en fonction du temps, de la pousse de 30 boutures (Ph I, II, III et IV désignent les 4 phases du développement caulinaire). Courbe R : nombre moyen de racines présentes sur les boutures prélevées à 19, 43, 68 et 88 jours. Jo : jour de sélection des boutures, toutes avec bourgeon débourré (D).

-b : Pertes en matière sèche (M.S.) et évolutions des teneurs en glucides.

2-2 Evolution comparée des réserves chez des boutures effeuillées ou écimées.

2-2-1 Effets des effeuillages sur le développement caulinaire

On note sur la figure 3-a que la date d'application des premières défoliations coïncide avec le début de la phase II. En comparant les courbes d'élongation des pousses des 3 lots effeuillés à celle du lot témoin, il ressort que :

- l'effeuillage total ("E.tot.") et celui qui épargne 2 feuilles adultes ("E.ad") conduisent à un allongement des rameaux supérieur au témoin pendant toute la durée de la phase II.

- l'effeuillage avec conservation de 2 feuilles jeunes sous l'apex ("E.j.") ne change rien à la croissance caulinaire durant toute cette même phase II.

- au terme de cette phase, seules les pousses du lot "E.ad." poursuivent une croissance. Elle s'arrête chez les boutures traitées, selon les modalités "E.tot." et "E.j." dont les apex caulinaires finissent par se dessécher.

Parmi les effets de l'effeuillage sur le développement de la pousse, le plus remarquable réside dans le fait que le fort ralentissement de l'extension caulinaire caractéristique de la phase II est beaucoup moins marqué, voire inapparent avec les traitements "E.tot." et "E.ad." qui ont en commun de supprimer les jeunes feuilles. Nous avons démontré (Fournioux, 1995) que ce résultat était dû au fait que la moindre activité du bourgeon apical pendant cette période résultait d'une "inhibition par carence" en cytokinines, elle même consécutive à un pouvoir attractif privilégié des jeunes feuilles vis à vis de ces phytohormones.

2-2-2 Effets des effeuillages et de l'écimage sur l'enracinement des boutures

Ces résultats ont déjà été publiés (Fournioux, 1997). L'effeuillage "E.ad." et l'écimage au-dessus de 2 feuilles adultes n'empêchent pas la formation d'un système racinaire correctement développé (tableau n° 1). Par contre les effeuillages "E.j." et surtout "E.tot." ont des effets très dépressifs sur la rhizogenèse. On peut en conclure que, chez une bouture de vigne, les feuilles adultes de la pousse jouent un rôle non négligeable dans la stimulation de la rhizogenèse adventive.

	T	"E.tot."	"E.j."	"E.ad."	"-Ap"
Nombre moyen de racines	42	5	10	38	36
Poids moyen de racines (g)	1,8	0,2	0,3	1,9	1,5

Tableau n° 1 : Effets des effeuillages "E.tot.", "E.j." et "E.ad." et d'un écimage au-dessus de deux feuilles adultes ("-Ap") sur la rhizogenèse. Valeurs enregistrées en fin d'expérience.

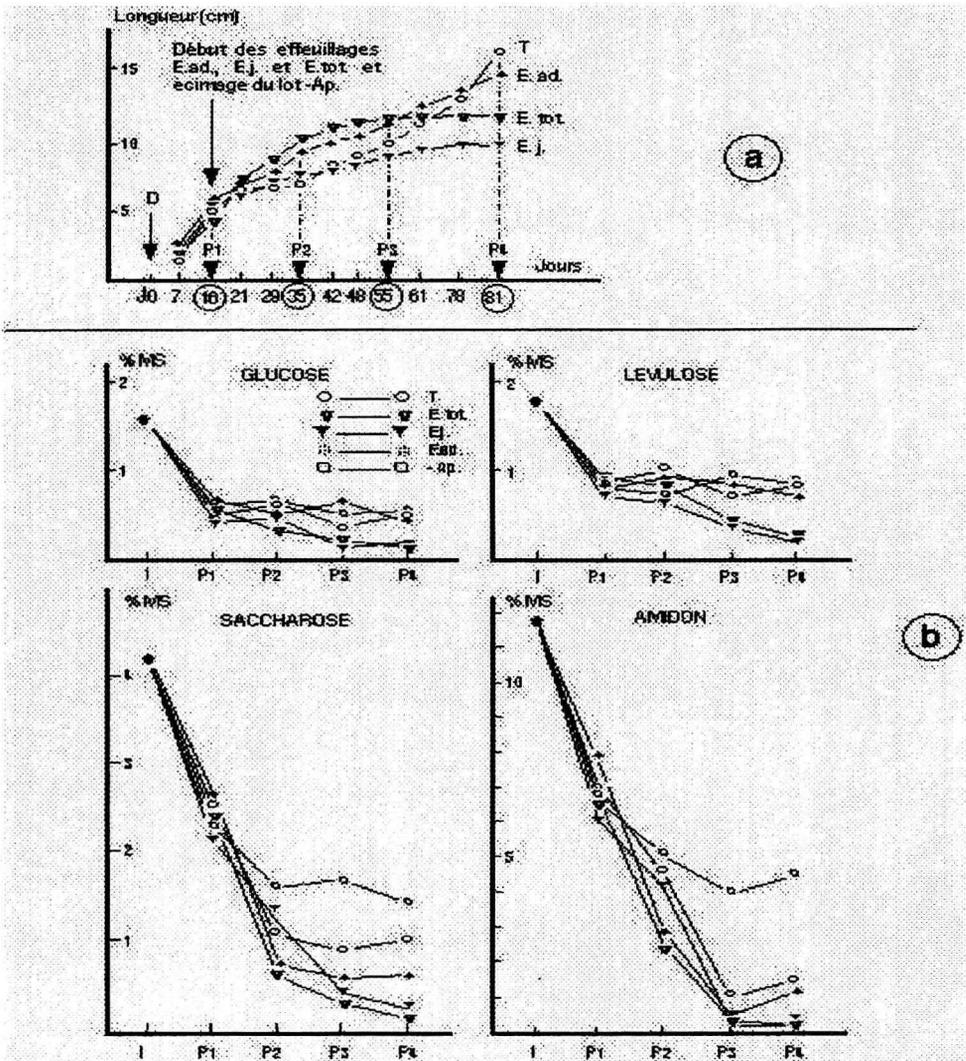


Figure 3 : Evolution des réserves chez des boutures effeuillées selon les modalités "E. tot.", "E. ad." et "E. j." (voir texte) ou écimées au-dessus de 2 feuilles de la base ("-Ap") et chez des boutures non traitées (T).

- a : Longueurs moyennes cumulées des pousses. P1 à P4 : prélèvements pour analyses. Jo : jour de la constitution des lots.
- b : Evolution des teneurs en glucides (en % de la matière sèche, M.S.) pour les 4 prélèvements successifs (P1 à P4).

2-3 Evolutions des réserves glucidiques.

Les résultats sont présentés dans la figure 3-b. Nous commenterons d'abord ceux obtenus chez les 3 lots effeuillés.

Glucose et lévulose - Les teneurs enregistrées pour le premier prélèvement (P1) confirment la diminution rapide de ces sucres dès le début de développement du rameau. Leur évolution ultérieure se différencie ensuite selon les modalités d'effeuillage mises en œuvre le jour même de cette première prise d'échantillons. Chez les boutures "E.ad", le niveau de ces glucides reste identique à celui du premier prélèvement tout au long de la culture. Par contre, chez les boutures effeuillées selon les modalités "E.tot" et "E.j.", les teneurs en glucose et en lévulose continuent de diminuer jusqu'au dernier prélèvement (P4) où elles atteignent des niveaux très faibles.

Saccharose et amidon - Remarquons tout d'abord que, jusqu'au 3ème prélèvement (P3), soit jusqu'à la fin de la phase II, leur évolution n'est pas fondamentalement modifiée par les effeuillages. On constate notamment que, pendant toute cette période, chez les 3 lots effeuillés, comme chez le témoin, saccharose et amidon sont en constante diminution.

Les résultats obtenus 20 jours après le début des effeuillages (P2) témoignent d'une diminution plus importante de ces 2 éléments chez les boutures "E.tot" et "E.ad." par rapport au témoin. Dans le même temps, les boutures "E.j." ont une évolution similaire aux boutures non traitées. Durant les 20 jours qui suivent (P2 et P3), soit jusqu'au terme de la phase II, la consommation du saccharose continue d'être plus importante chez les boutures "E.tot." que chez le témoin, au contraire des boutures "E.ad" pour lesquelles on note une stabilisation de son évolution devenue parallèle à celle du témoin. L'amidon s'est ainsi encore fortement amenuisé chez le lot "E.tot." mais aussi chez le lot "E.ad." pour ne plus représenter qu'environ 0,5% de la matière sèche contre 1,2% chez le témoin. C'est dans ce même laps de temps, compris entre le 20ème et le 40ème jours, que le traitement "E.j." commence seulement à avoir des effets sur la mobilisation du saccharose et de l'amidon se traduisant comme avec un effeuillage total, par une surconsommation.

Au-delà de cette première période où il y a, dans tous les cas, une forte diminution du saccharose et de l'amidon, la variation de ces 2 sucres se différencie nettement en fonction des modalités d'effeuillage (P3 à P4). Chez les lots "E.tot." et "E.j.", ils continuent d'être en légère diminution de telle sorte que, quand la pousse de ces boutures a cessé de croître, ils ne se trouvent plus qu'à des concentrations très faibles. Chez les boutures "E.ad.", le saccharose se maintient à la même teneur que celle relevée à l'avant dernier prélèvement et l'amidon est en réaugmentation comme chez le témoin.

Les résultats obtenus chez le lot de boutures décapitées ("-Ap.") montre que l'écimage est sans incidence sur les taux de glucose et de lévulose relevés 20, 40 et 66 jours après l'application de ce traitement. Il en est tout autrement pour le saccharose et l'amidon. On constate en effet que, pour l'un comme pour l'autre, si entre le prélèvement réalisé le jour de la décapitation (P1) et le suivant (P2), il y a diminution, celle-ci est moins importante que chez les autres lots et, en particulier, que chez le témoin. Par la suite, la teneur en saccharose se stabilise à des un niveau de l'ordre de 1,5% de la matière sèche contre 1% pour les boutures témoins. L'amidon, quant à lui, ne descend pas au-dessous de 4% (P3) quand il ne représente plus que 1,2% chez le témoin pour remonter ensuite à 4,5% de la matière sèche au moment de la dernière analyse où l'on enregistre qu'une teneur de 1,5% dans le bois des boutures de référence.

3- Evolution comparée des réserves chez des boutures qui édifient ou non un système racinaire.

Les courbes d'élongation caulinaire (figure 4-a) montrent que, chez des boutures seulement alimentées en eau, la pousse ne réalise que les 2 premières phases d'extension après quoi, au bout de deux mois de culture environ, il y a arrêt complet de la croissance. Ces courbes révèlent en outre un tracé très voisin pour les deux modalités de culture (boutures sur circuit d'eau sous pression et boutures en flacons de verre). La seule variable entre ces deux ensembles de boutures ne concerne donc que l'édification ou non d'un système racinaire ce qui va nous permettre d'apprécier les incidences de la rhizogenèse sur l'évolution des glucides de réserves.

Pour cela, il convient d'examiner les courbes de la figure 4-b. On constate alors que, jusqu'à l'avant dernier prélèvement P3, soit sur une période qui couvre la phase I et la presque totalité de la phase suivante, les boutures s'appauvrissent de la même façon en amidon et en sucres solubles, qu'elles édifient ou non un système racinaire. Les écarts enregistrés pour les teneurs en saccharose ou en amidon qui n'excèdent jamais 1% de la matière sèche au prélèvement P3 ne sauraient être considérés comme significatifs. Ceci signifie que c'est la pousse qui, dans son premier développement, consomme les substances de réserves et non les racines. Pour le dernier échantillon (P4) on note, sur les boutures sans racines, une réélévation des taux d'amidon et de saccharose. On a vu que la réaccumulation notamment de l'amidon ne se produit, chez un plant normal, qu'après la reprise de la croissance du rameau (revoir figure 2). Celle-ci est due, selon toute vraisemblance, à une migration descendante des sucres photosynthétisés.

Or si, comme la preuve en est faite ici, les racines ne puisent pas ou peu dans les réserves du bois, elles font nécessairement appel aux premiers assimilats exportés par les feuilles. Un mouvement basipète des produits de la photosynthèse doit donc commencer dès le début de la rhizogenèse mais ne peut se concrétiser par un nouveau stockage de glucides dans le bois que quand leur production devient excédentaire par rapport aux besoins de la croissance racinaire.

Si, comme c'est le cas pour les boutures sur circuit d'eau de cette expérience, cette croissance racinaire est supprimée, il est normal que nous observions une reconstitution anticipée des réserves.

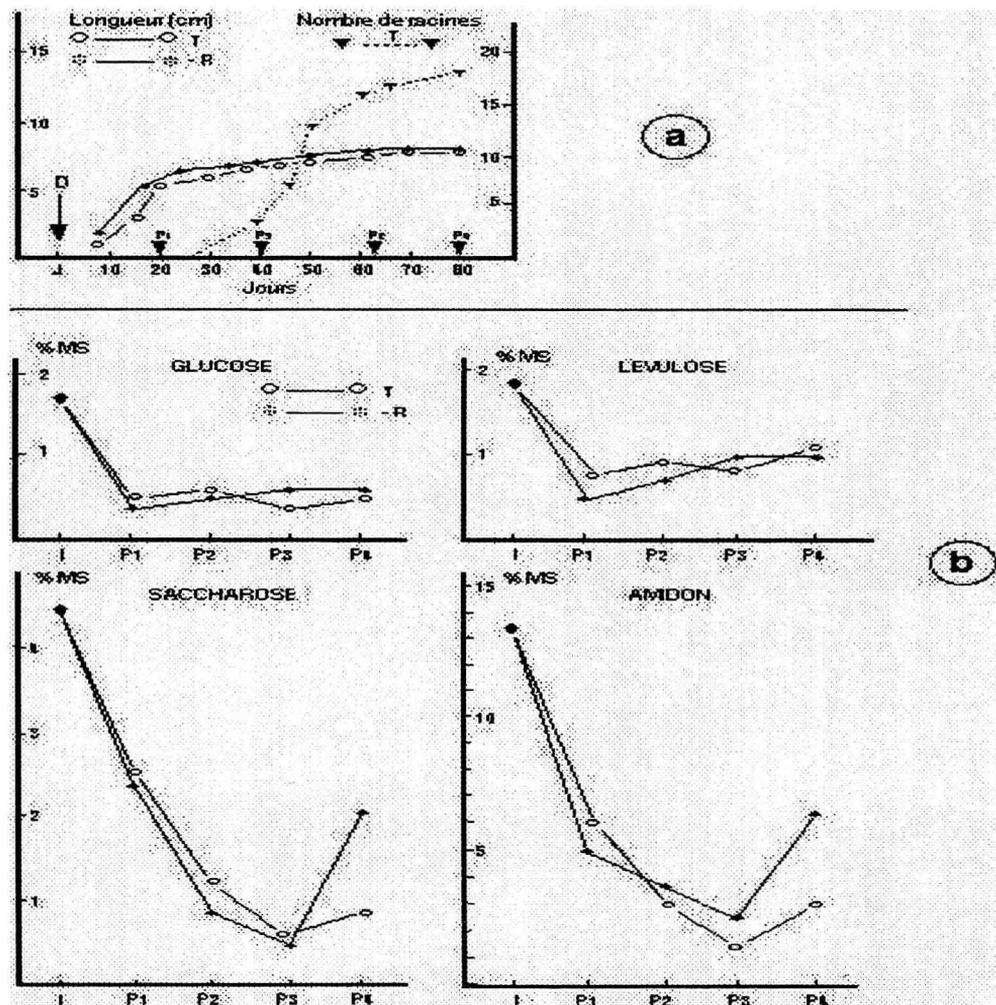


Figure 4 : Etude de l'évolution des réserves chez des boutures avec ou sans racines.

-a : Courbes en trait plein : longueur moyenne cumulée des pousses de 30 boutures témoins (T) cultivées sur eau, en flacons et de 30 autres sans racines (-R) cultivées sur "circuit d'eau sous pression". Courbe en pointillé : nombre moyen cumulé de racines néoformées sur le témoin (T) P1 à P4 : dates de prélèvements.

-b : Evolution des teneurs en glucides (en % de la matière sèche, M.S.)

4- Evolution des réserves chez des boutures de poids variables.

La date d'entrée en croissance des bourgeons est indépendante de la longueur des boutures (figure 5). Champagnol (1981) remarque la même chose. Par contre, les courbes de croissance présentent des profils différents selon la taille des boutures. Le fait le plus important est que le fléchissement de la vitesse de croissance caractéristique de la phase II pour une bouture de dimension modeste (5 cm) est déjà moins prononcé pour les boutures de 15 cm et n'apparaît plus du tout chez les boutures les plus volumineuses de 30 cm.

La cinétique d'évolution de la matière sèche et de l'amidon chez les 3 catégories de boutures est présentée figure 6. On constate que, malgré des cinétiques de développement caulinaire assez profondément différents, les profils d'évolution des réserves ne sont pas très différenciés. On note seulement qu'au début de leur développement, les boutures de petite taille (5 cm) consomment une quantité relative de leurs réserves plus importante que les autres (P1 : pourcentage de perte en matière sèche le plus élevé et teneur en amidon la plus basse pour ces petites boutures).

Pour les trois prélèvements suivants, cette différence n'apparaît plus. Les pourcentages de perte en matière sèche et les teneurs en amidon sont très voisins pour les 3 catégories de boutures. La cinétique de consommation des réserves est ainsi très comparable de telle sorte que leur épuisement est atteint en même temps, à la date du 4^{ème} prélèvement.

Comme l'indique les courbes de la figure 5, ce 4^{ème} prélèvement coïncide avec la fin de la phase II pour les boutures de 5 et 15 cm. On retrouve là un résultat convergent avec la première étude de l'évolution des réserves chez une bouture standard, à savoir que l'épuisement des réserves n'est atteint qu'à la fin de la phase II.

Curieusement, alors même que cette seconde phase d'extension caulinaire ne se manifeste pas chez les boutures de 30 cm, pour autant elles parviennent, elles aussi, à ce même état d'épuisement en même temps que celles de 5 et 15 cm. La 5^{ème} série d'analyses montre une augmentation des réserves dans le bois des boutures aussitôt après la réactivation du bourgeon terminal des boutures de 5 et 15 cm.

C'est là un autre point de convergence avec l'étude sur boutures standard. Cette augmentation a lieu aussi chez les plants de 30 cm où elle est même nettement plus importante.

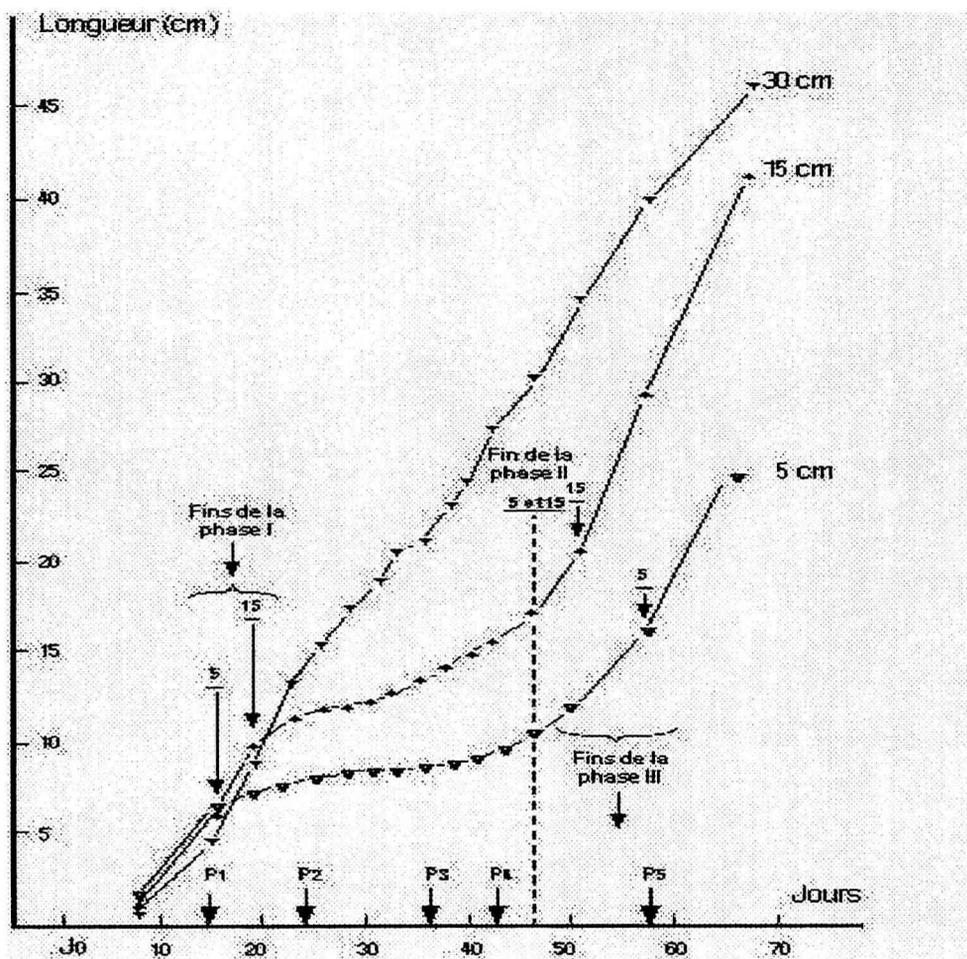


Figure 5 : Longueur moyenne cumulée du rameau de boutures de même calibre et de longueurs variables : 5 - 15 et 30 cm. J0 : jour de constitution des lots.
P1 à P5 : prélèvements pour analyses.

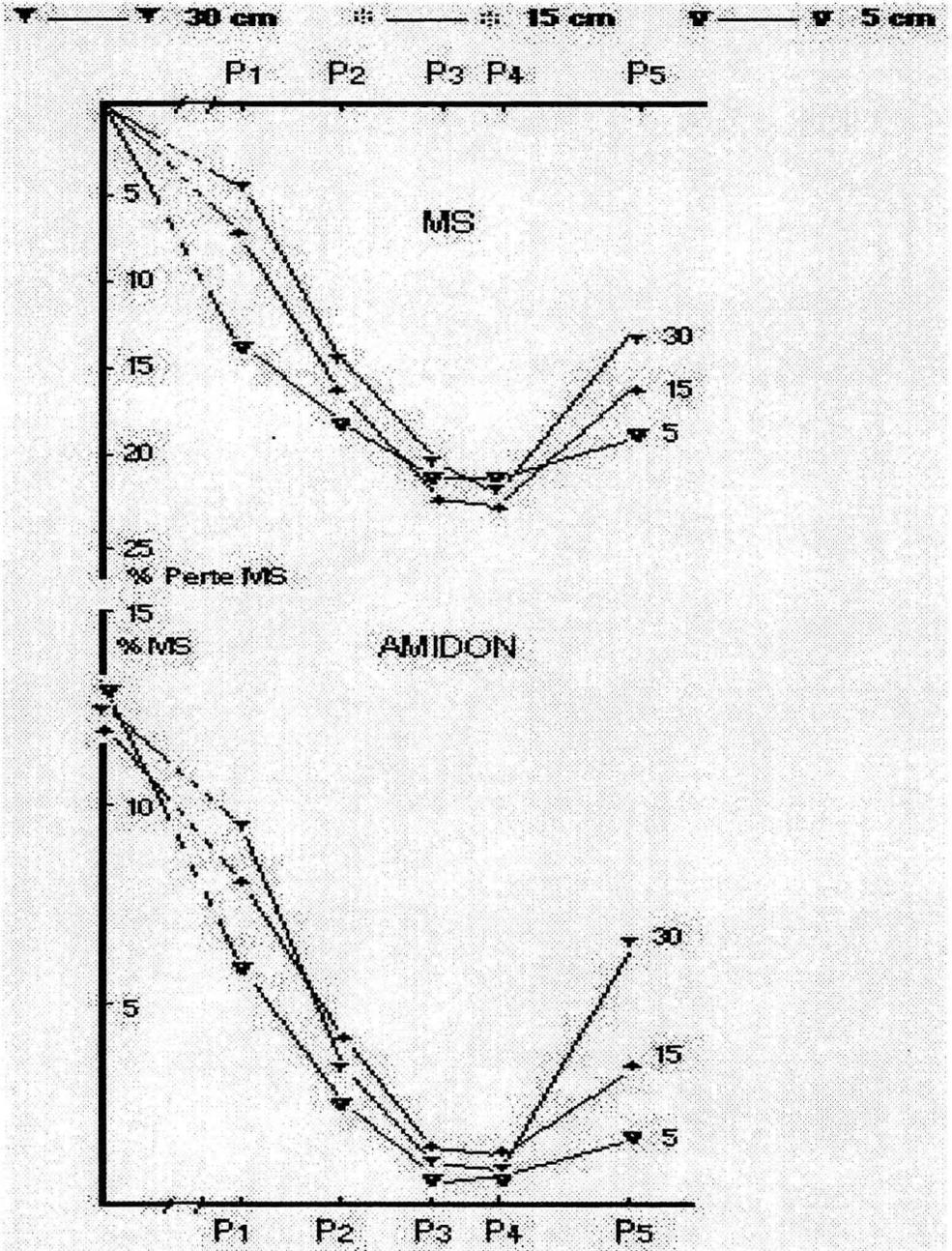


Figure 6 : Evolutions des réserves au cours du développement des boutures de 5 - 15 et 30 cm. Variations des pourcentages de pertes en matière sèche (MS) et des teneurs en amidon. P1 à P5 : prélèvements successifs.

Conclusions et discussion

Concernant les résultats obtenus dans le premier essai on notera tout d'abord que les courbes d'évolution de la matière sèche et de l'amidon obtenues sont très comparables à celles produites par Buttrose (1966-1969).

De plus, ces résultats montrent que:

- A la fin de la phase I, la perte en matière sèche est déjà assez importante et le glucose et le lévulose sont déjà à leur niveau le plus bas. L'amidon et le saccharose sont à moitié consommés. Dans la mesure où, à ce moment, aucune racine ne s'est encore formée, l'amenuisement de ces glucides incombe obligatoirement à la première extension de la pousse.

- La poursuite de la décroissance des poids secs et des teneurs en saccharose ainsi qu'en amidon jusqu'à la fin de la phase II indique que la mobilisation de la fraction épargnée après la première étape s'étale sur toute la durée de la seconde phase. Etant donné que les racines commencent alors à s'édifier, nous ne pouvons juger de l'utilisation des réserves consommées pendant cette période (tige ou racines ou les 2 à la fois ?). Nous pouvons uniquement dire que, dans l'hypothèse où cette mobilisation serait toujours au bénéfice exclusif de la croissance caulinaire, le fort ralentissement de la croissance qui se produit alors ne peut être dû à un épuisement des réserves, comme cela est souvent formulé, mais seulement à leur raréfaction.

- C'est paradoxalement quand ces réserves sont totalement consommées que l'activité de croissance des pousses redevient plus intense (phase III). Aussi, les assimilats photosynthétiques doivent-ils être nécessairement sollicités au moment de la phase III pour assurer cette réactivation.

- Une exportation basipète des assimilats élaborés par les feuilles dont le nombre augmente sur le rameau en pleine croissance est sans doute à l'origine de la nouvelle accumulation de l'amidon dès le début de la phase IV et de l'élévation concomitante de l'extrait sec. Nous ne faisons là que reprendre à notre compte une conclusion que Buttrose (1966) avait déjà tirée de résultats similaires.

Les résultats des essais 2 et 3 apportent la démonstration d'une mobilisation des réserves glucidiques par la partie caulinaire et non par les racines.

Voyons d'abord comment les expériences d'effeuillages et d'écimage nous amène à cette conclusion.

Deux faits peuvent déjà être tenus pour certains.

Dans les traitements "E.tot." et "E.ad.", les glucides sont obligatoirement consommés par le rameau étant donné qu'ils ne peuvent avoir à la fois ni d'autre origine (absence de feuilles suffisamment âgées pour être exportatrices d'assimilats) ni d'autre destinée (système racinaire très réduit).

La surconsommation prématurée du saccharose et de l'amidon constatée avec les traitements "E.tot." et "E.ad." est à relier à l'amplification de la croissance caulinaire pendant la phase II que ces 2 modes d'effeuillage provoquent. Sur ce point précis, ce résultat montre un lien étroit entre extension de la tige et régression des réserves.

Pour le reste, la relation entre les modes de variation des glucides chez les boutures diversement traitées et le développement relatif de leur tige et de leurs racines peut s'envisager de deux façons.

Selon qu'il y a présence ou non de feuilles exportatrices d'assimilats, les réserves seraient dirigées vers la pousse ("E.tot." - "E.j.") ou vers les racines ("E.ad." - Témoin), ces mobilisations se faisant, dans un cas comme dans l'autre sur une période d'une durée équivalente. La migration ascendante qui se produit nécessairement vers l'axe dépourvu de toute feuille assimilatrice ("E. tot." - "E.j.") serait particulière à cette situation de déficience quasi-totale de la photosynthèse. La décroissance anticipée du saccharose et de l'amidon observée chez les boutures "E.ad." correspondrait, elle aussi, à une mobilisation inhabituelle des réserves par la tige, due, à la fois à la supériorité de sa croissance et à la réduction de son appareil foliaire par rapport à la normale.

Une autre façon d'interpréter ces données est de considérer, qu'en toutes circonstances, les réserves sont toujours mobilisées par le rameau; l'édification des racines faisant appel aux glucides élaborés par les premières feuilles de la bouture. Il serait en effet alors compréhensible que, malgré des effets très différents sur la rhizogenèse, les traitements "E.tot." et "E.ad." conduisent à des profils d'évolution des glucides très voisins dans la mesure où les caractères du développement caulinaire consécutifs à ces deux modes d'effeuillage sont rigoureusement les mêmes jusqu'à la fin de la phase II. Le même raisonnement peut s'appliquer à une bouture "E.j." comparée à un plant témoin.

Ces deux conceptions diffèrent sur le point de la consommation ou non des réserves par les racines. Les résultats obtenus sur le lot de boutures décapitées nous permettent déjà de trancher. Ils montrent clairement que, chez une bouture dont le développement caulinaire est interrompu, mais dont celui de l'appareil racinaire se poursuit, la consommation des réserves est d'abord freinée puis stoppée. Ce résultat s'interprète parfaitement si l'on admet que les réserves sont mobilisées par la pousse et non par les racines, ce qui est totalement cohérent avec les faits démontrés par l'essai numéro 3, à savoir que des boutures qui n'édifient pas de racines consomment leurs réserves comme celles qui en initient.

Dés lors, l'origine et la direction des flux trophiques pendant les premières étapes du développement d'une bouture se résument à ceci :

La diminution importante des glucides qui accompagne la phase initiale de la croissance caulinaire (Phase I) pendant laquelle il ne se forme aucune racine montre qu'il y a migration ascendante de ces glucides en direction du rameau. Pendant la seconde phase, bien que l'activité de croissance de la tige soit fortement ralentie, elle continue d'être mobilisatrice des réserves, au point que c'est au terme de cette période que l'on enregistre la plus forte perte en matière sèche du bois et les plus faibles teneurs en glucides. Dans le même temps, les nutriments carbonés nécessaires à l'élaboration du système racinaire sont fournis par les premiers assimilats élaborés sur le rameau et exportés de manière basipète. Au moment de la phase III, la migration des assimilats devient bidirectionnelle. En direction acropète, elle prend le relais des réserves épuisées en fournissant les glucides indispensables à la réactivation du développement caulinaire.

Elle se poursuit en direction basipète et va même en s'amplifiant dès le début de la phase IV avec l'accroissement du nombre de feuilles alors édifiées sur la tige si bien que, tout en continuant d'alimenter les racines, un excédent de métabolites commence à s'accumuler dans le bois.

Bouard (1966) a déjà développé divers arguments qui le conduisent à considérer que les réserves ne sont pas indispensables à la rhizogenèse. Nous ne pouvons qu'abonder dans le même sens.

Les principaux enseignements apportés par les expériences réalisées sur les boutures de poids variables sont les suivants:

Quelles que soient les dimensions d'une bouture la consommation de ses réserves présente deux constantes : i/ la quantité relative de réserves mobilisées pendant les deux premières phases de développement est la même. Buttrose (1966) avait déjà constaté ce fait. ii/ le temps mis par la bouture pour épuiser ses réserves est identique, quelle que soit la grandeur de leur quantité initiale.

En résumé, quel que soit le volume d'une bouture, elle consomme la même quantité relative de réserves sur un même temps. Ce résultat semble être une preuve indiscutable qu'un processus régulateur intervient dans la mobilisation de ces réserves. Le fait qu'une bouture courte les "économise" d'une façon telle qu'elles n'y sont pas plus vite consommées que chez une autre beaucoup plus longue ne peut guère se concevoir autrement qu'à travers une telle régulation.

Remerciements

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Sylvain DEBORD pour l'aide qu'il nous a apportée pour la réalisation de cet article.

Bibliographie

Bouard J., 1966 - Recherches physiologiques sur la vigne et en particulier sur l'aouûtement des sarments. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Bordeaux, 345 pages.

Buttrose M.S., 1966 - Use of carbohydrate reserves during growth from cuttings of grape vine. *Aust. J. biol. Sci.*, 19, p. 247-256.

Buttrose M.S., 1969 - The dissolution and reaccumulation of starch granules in grape vine cane. *Aust. J. biol. Sci.*, 22, p. 1297-1303.

Carles J., 1962 - Dosage colorimétrique de l'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 36, p. 705-709.

Champagnol F., 1981 - Relation entre la formation de pousses et de racines par une bouture de vigne et la quantité d'amidon initialement présente. *C.R. Acad. agr. France*, Paris, p. 1398-1405.

Del Canizo Ortiz A., 1978 - Les glucides de la tige de vigne et l'aptitude à la multiplication. Thèse, Université de Toulouse, 52 pages.

Fournioux J.C., 1995 - Facteurs de l'édification de la tige de *Vitis vinifera* L. dans différentes conditions de culture. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Bourgogne, 2 volumes, 555 pages (texte).

Fournioux J.C., 1996 - Mise en évidence et analyse des caractères du phénomène de "croissance compensatoire" foliaire chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 30, p. 53-65.

Fournioux J.C., 1997 - Adult leaves of grapevine cuttings stimulate rhizogenesis. *Vitis*, 36, p. 49-50.

Stoev K.D., 1952 - Analyse biochimique de la plante de vigne durant le cycle annuel de développement. *Vinodel. vinograd.*, 12, p. 42-49.

Trintin P.L., 1981 - Recherches sur l'évolution des glucides solubles et insolubles dans les bois et plants de vigne. Thèse, Université de Montpellier, 121 pages.

La greffe bouture herbacée des plantes ligneuses, application aux *Citrus*

The herbaceous grafted cutting of woody plants, application to Citrus

J.-P. Thermo

INRA Centre de Corse
Domaine expérimental - 20230 - San Giuliano
Tel. 33 4 95 59 59 59
Fax 33 4 95 59 59 05
E mail domaine@corse.inra.fr

Résumé : La technique de greffe bouture herbacée des plantes ligneuses associe la simplicité des techniques *in vivo* aux avantages du travail sur des organes jeunes. Elle permet de produire rapidement et en continu des plants greffés, et constitue la seule méthode d'application industrielle. Protégée par un brevet, elle est développée sur vigne et peut s'appliquer aux agrumes et à d'autres plantes ligneuses.

Mots-clés : Agrumes, bouture, *Citrus*, greffage, herbacé, multiplication végétative.

Abstract: *The technique of herbaceous grafted cutting combines the simplicity of in vivo techniques with the advantages of working on young organs. Grafted plants can then be produced quickly and continuously making this method the only one suitable for industrial production. Protected by patent, the method is now in use on grape vines but can also be applied to Citrus and other woody plants.*

Keywords: *Citrus, cutting, grafting, herbaceous, vegetative propagation.*

Introduction

La greffe bouture herbacée des plantes ligneuses est une technique de multiplication permettant la production de plants greffés sur des cycles très courts, avec des taux de multiplication importants. Le travail en continu, la mécanisation du greffage, la simplicité et la rapidité des opérations en font un procédé applicable à une échelle industrielle.

1- Choix du stade herbacé

Le travail au niveau herbacé permet d'intervenir à un stade précoce du développement des organes, tout en restant dans un cadre *in vivo*. On évite ainsi la lourdeur des techniques *in vitro* (mise au point complexe, conditions de stérilité, acclimatation) tout en conservant les avantages liés à la jeunesse du matériel (facilité d'enracinement, bonne soudure au greffage, cycle court, taux de multiplication élevé). Les pratiques restent celles du monde horticole traditionnel : bouturage, greffage, élevage de plants (Martin, 1987 ; Martin, 1992).

2- Comparaison de la greffe bouture herbacée avec les techniques voisines

2-1 Le bouturage herbacé de plantes ligneuses

Applicable à de nombreuses espèces, ce procédé ne produit que des plantes simples (non greffées).

2-2 Le greffage herbacé sur un porte-greffe raciné

Cette méthode exige deux étapes, l'établissement du porte-greffe puis le greffage ; elle est donc plus longue que la greffe bouture herbacée. D'autre part, la présence du système racinaire rend le porte-greffe peu maniable et la mécanisation du greffage serait difficile.

2-3 La greffe bouture ligneuse

Elle présente une similarité apparente avec la greffe bouture herbacée, mais ne permet pas une production en continu (seulement un cycle par an). Elle n'est pas mécanisée.

2-4 Méthode classique sur agrumes

Obtenu par semis, le porte-greffe est greffé après un ou deux ans d'élevage. La durée totale du cycle de production d'un plant fruitier est de deux à trois ans en région méditerranéenne.

2-5 La greffe bouture herbacée

Elle présente des avantages liés à la possibilité d'industrialisation de la technique. Le travail en continu optimise l'outil de production et l'organisation du travail en limitant les pointes saisonnières. La mécanisation du greffage permet de réaliser environ 300 greffes par heure (Collard, 1991). Le taux de multiplication est très élevé (environ 300 boutures ou greffons par an par pied-mère élevé en pot de cinq litres). Pour les porte greffe des agrumes les plus courants, les taux de réussite sont supérieurs à 90 %.

L'absence de période d'élevage du porte-greffe raccourcit le cycle de production d'un plant à 18 mois.

La méthode classique nécessite la polyembryonie des porte-greffe. La multiplication végétative permet de s'affranchir de cette barrière.

3- Inconvénients et contraintes

La greffe bouture herbacée nécessite des équipements lourds : serres chauffées et éclairées pour maintenir les pieds-mères en croissance continue, chambre de culture pour la réalisation de la greffe bouture.

L'utilisation du procédé dans un cadre commercial ne se justifie donc qu'en conditions industrielles, assurant l'amortissement des structures.

4- Applications du procédé

La greffe bouture herbacée des plantes ligneuses a été mise au point en collaboration entre le Groupement Champenois d'Exploitation Viticole et l'Institut National de la Recherche Agronomique. C'est un procédé protégé par un brevet (Vesselle, 1992). Elle est développée sur vigne chez des pépiniéristes licenciés (Collard, 1992), et fait l'objet de travaux de recherche-développement sur agrumes (Rancillac, 1997). Le procédé est extrapolable à d'autres plantes ligneuses.

5- Description de la méthode

La production des boutures et des greffons est assurée en serre chauffée et éclairée (Figure 1). Après quatre à cinq semaines, les pousses herbacées sont prélevées.



*Figure 1 : Un pied-mère porteur de greffons herbacés
(Photo Jean-Pierre Thermo).*

Celles des porte-greffe sont préparées comme boutures, coupées à la base sous un nœud (« talon »), et au sommet à l'extrémité d'un entre-nœud. Elles ont au minimum deux à trois entre-nœuds, ou plus pour un greffage haut. Les pousses des variétés font les greffons, sectionnées à la base d'un entre-nœud. Une feuille ou partie de feuille est conservée, sur les boutures comme sur les greffons.

La greffe en fente en tête de la bouture est maintenue par une petite pince (Figure 2).

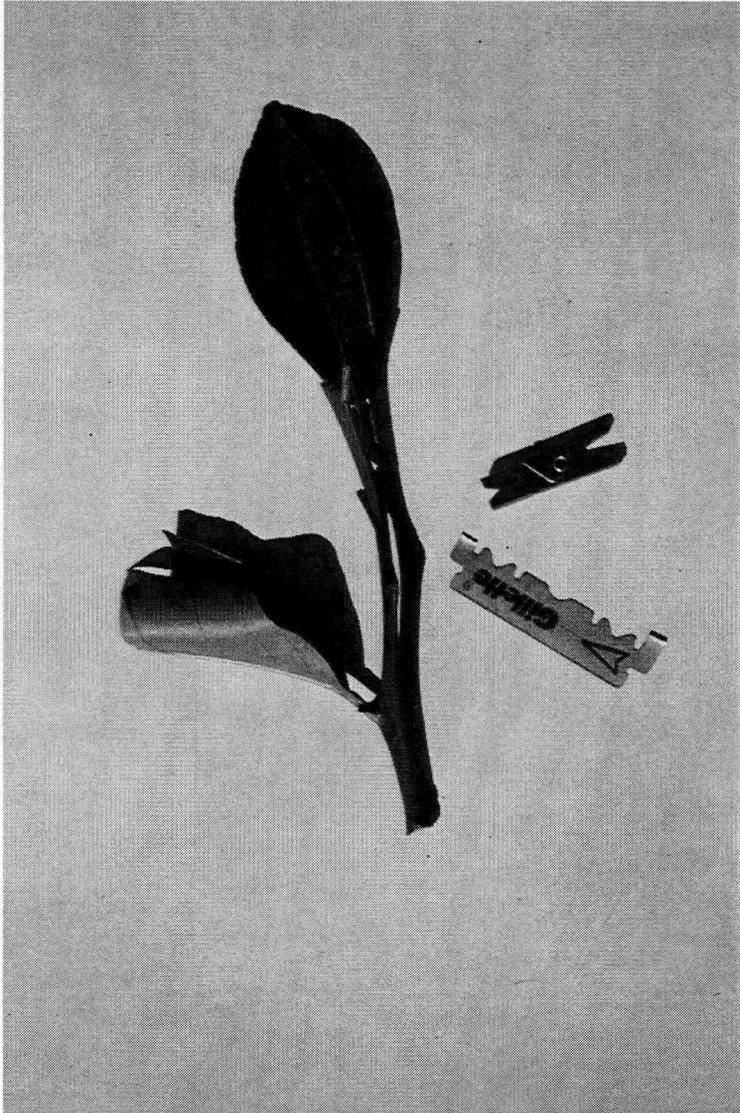


Figure 2 : L'assemblage du greffon et de la bouture (Photo Jean-Pierre Thermo).

Après application d'une hormone de bouturage, l'assemblage est inséré dans un substrat de laine de roche, puis placé en chambre de culture pendant quatre semaines.

Les jeunes plants soudés et enracinés sont conduits en élevage classique (Figures 3 et 4).

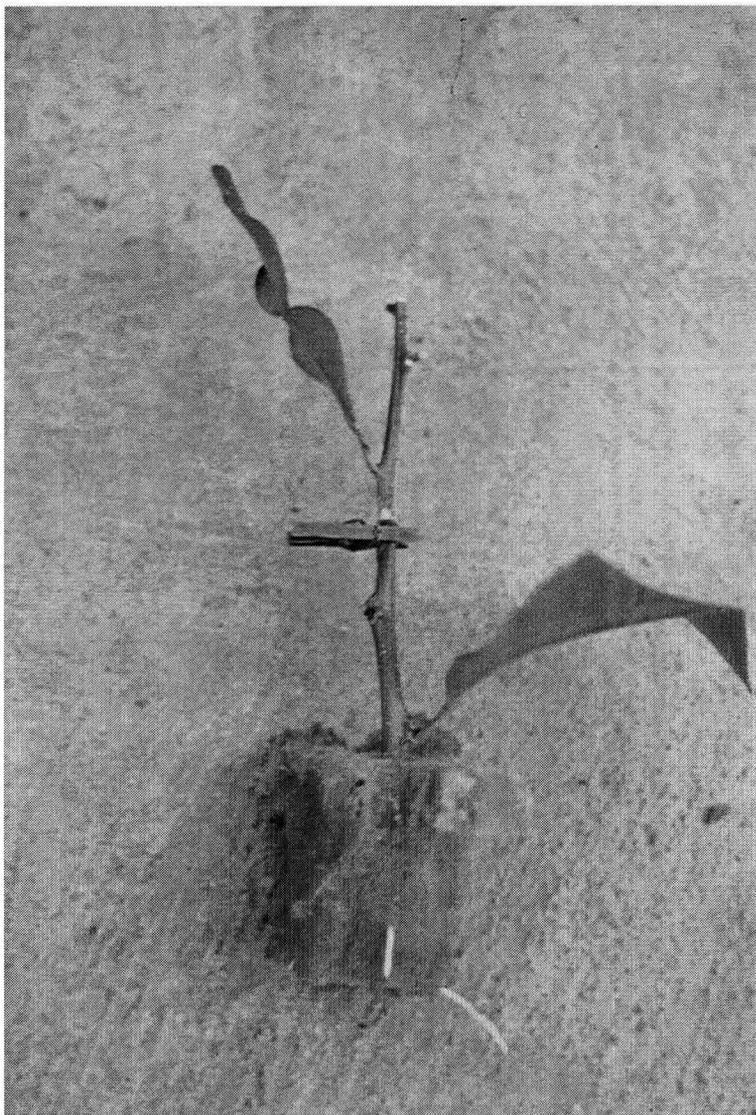


Figure 3 : Un plant greffé un mois après bouturage (Photo Jean-Pierre Thermoz).



*Figure 4 : Un plant greffé trois mois et demi après bouturage
(Photo Jean-Pierre Thermo).*

L'espace alors libéré dans la chambre de culture peut recevoir la génération suivante, issue des mêmes pieds-mères.

Bibliographie

Collard B., 1991 - Greffe en vert : c'est au point. *La vigne*, 14, p. 26-27.

Collard B., 1992 - Des pépiniéristes se lancent dans le greffage en vert. *La vigne*, 26, p. 28-29.

Martin C., Collas A., 1992 - De la culture *in vitro* à la production de greffés-soudés issus du greffage herbacé de la vigne. *Progrès agricole et viticole*, 109 (3), p.61-62.

Martin C., Vernoy R., Carré M., Vesselle G., Collas A., Bougerey C., 1987 - Vigne et techniques de cultures «*in vitro*» quelques résultats d'une collaboration entre recherche publique et entreprise privée. *Bulletin de l'O.I.V.*, 60 (675-676), p. 447-458.

Nozeran R., Grenan S., Truel P., Favre JM., 1983 - Morphogenèse à partir du stade juvénile de *Vitis vinifera* L. issu de graine ou de culture *in vitro*. *Agronomie*, 3 (7), p. 681-684.

Rancillac M., Vernoy R., Thermoz JP., Bouhot D., 1997 - The herbaceous grafted cutting : an one-step new method applied to Citrus species. *Proceedings of 5th International Congress of Citrus Nurserymen*, (sous presse).

Vesselle G., Collas A., Brun O., Martin C., Vernoy R., 1992 - Procédé de production de plants de végétaux ligneux ou semi-ligneux pour l'obtention de plants, notamment de vigne. *Office européen des brevets*, 92/04, p. 1-10.

Walter B., Bass P., Legin R., Martin C., Vernoy R., Collas A., Vesselle G., 1990 - The use of a green-grafting technique for the detection of virus-like diseases of the Grapevine. *J. Phytopathology*, 128, p. 137-145.

Nouvelles perspectives pour la multiplication *in vivo* de végétaux ligneux d'ornement

New perspectives in in vivo propagation of woody ornamental plants

G. Galopin, F. Beaujard*

INH, 2 rue Le-Nôtre
49045 Angers Cedex
E-mail : galopin@angers.inra.fr
*Station d'agronomie INRA Centre d'Angers
49071 Beaucouzé Cedex
E-mail : beaujard@angers.inra.fr

Résumé : La multiplication végétative des végétaux ligneux est souvent difficile et donne des résultats hétérogènes. En intégrant quelques données sur l'architecture des végétaux ligneux et en appliquant *in vivo* des recépages sur des plantes différenciées, il est montré que l'on peut construire et entretenir des formations végétales particulières et propices à la production massive de boutures juvéniles. L'origine, la construction de micropieds-mères, leur longévité, les méthodes culturales et la qualité des boutures qu'ils produisent sont présentées pour *Hydrangea macrophylla* L. et *Myrtus communis* L. La notion de juvénilité dans la structure et le programme de différenciation du végétal est rediscutée dans une perspective de multiplication végétative contrôlée *in vivo*.

Mots clés : multiplication végétative *in vivo*, plantes ligneuses, *Hydrangea macrophylla*, *Myrtus communis*, morphogenèse, différenciation, juvénilité, micropied-mère.

Abstract: *Vegetative multiplication of woody plants is often difficult and results are variable. By applying our knowledge of the architecture of woody plants and the cutting back of mature plants, we have shown that it is possible to develop and maintain special vegetative plant forms which favour the mass production of juvenile cuttings. Results are presented for the production of mother microplants, their length provenence, level of production, and quality of cuttings obtained for Hydrangea macrophylla L. and Myrtus communis L. Juvenility and plant development programs are discussed in the context of controlled vegetative propagation.*

Keywords: *in vitro* végétative propagation, woody plants, *Hydrangea macrophylla*, *Myrtus communis*, morphogenesis, differentiation, juvenility, mother microplant.

Introduction

En horticulture, la finalité de la multiplication végétative est de produire à l'identique de nouvelles plantes depuis un végétal d'intérêt commercial que l'on a génétiquement sélectionné et retenu en partie pour ses caractéristiques phénologiques.

De façon un peu plus indépendante des caractères génotypiques, l'intérêt esthétique d'une plante ligneuse d'ornement peut aussi être en rapport avec son niveau de différenciation. Il est alors nécessaire de restituer cet état ou même de le conserver lors des phases de multiplication végétative et d'élevage.

Toutefois et selon Nozeran et al (1982), un haut niveau de différenciation du végétal, opposé à l'état primaire de la différenciation chez l'embryon, correspond à la phase mature du cycle de développement de la plante.

Les organes ayant atteint ces stades ontogénétiques ont alors des potentialités de rhizogenèse réduites (Schmidt et al, 1995) et variables selon les génotypes ; les explants ayant des âges ontogéniques moins avancés s'enracinent plus facilement. De ce point de vue, les tissus proches des organes reproducteurs bénéficient de l'influence de la rejuvénilisation brutale liée à la formation des gamètes, cette propriété étant par ailleurs largement utilisée pour initier des cultures *in vitro* (Duhoux, 1988).

En pépinière, la multiplication végétative des plantes ligneuses se fait principalement par bouturage de rameaux dont la première difficulté est bien souvent de récupérer les caractéristiques de juvénilité en rapport avec le potentiel de rhizogenèse.

Sous certaines conditions d'environnement et de pratiques culturales, les plantes ont la particularité de pouvoir différencier certains de leurs tissus et de les engager dans un processus de rejuvénilisation. Cette propriété est largement exploitée pour obtenir des organes d'âge ontogénique plus jeune (Francllet, 1991) et elle est nécessaire pour produire végétativement et de façon intensive des plants jeunes, vigoureux et homogènes.

In vitro, le développement de pousses juvéniles est favorisé par les substances de croissance présentes dans le milieu de culture.

In vivo, le recépage donne accès à des pousses issues du débourrement des bougeons latents qui sont proches du système racinaire et qui ont conservé des propriétés de juvénilité. Il a permis de restituer des propriétés de rhizogenèse pour la multiplication au XXème siècle du platane "historique" de Buffon (*Platanus acerifolia*), planté en 1785 (Francllet, 1980). Toutefois, pratiqué de façon aléatoire chez *Eucalyptus gunnii*, il peut conduire à la mort de la plante (Cauvin et Marien, 1978).

Ces approches de la multiplication végétative *in vivo*, bien que suffisantes dans nombre de besoins, présentent toutefois un aspect éphémère et inachevé dans la mesure où la pérennité du système de production des pousses juvéniles n'est pas pleinement assurée et maîtrisée. On a ainsi pensé pendant longtemps que la stabilité de l'état juvénile n'était pas accessible *in vivo*.

En s'appuyant sur les connaissances relatives à la différenciation et la dédifférenciation des végétaux ligneux, nous allons montrer à l'aide des modèles *Hydrangea macrophylla* L. (Saxifragacées) (Galopin et al., 1996) et *Myrtus communis* (Myrtacées) impliqués dans la formation et l'exploitation de micropieds-mères qu'il peut en être autrement.

1- Matériel et Méthodes

1-1 Origine du matériel végétal :

Hydrangea macrophylla (hortensia) et *Myrtus communis* sp sont des plantes de familles différentes à feuilles opposées décussées. Les quatre cultivars d'hortensias ('Leuchtfeuer', 'Rosita', 'Adria' et 'Merveille') introduits dans les essais ont été prélevés dans une unité de production commerciale (Maine et Loire, France) alors que les myrtes viennent du maquis Corse et ont d'abord été bouturés.

Pour initier les essais, les plantes rempotées en conteneur (2 l) avec un mélange de 50 % de tourbe blonde neutralisée (pH 6.7) et 50 % d'écorce, sont cultivées sous serre ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) et alimentées en goutte à goutte avec une solution nutritive (en moles.M⁻³ : 4.8 NO₃⁻ ; 1.08 H₂PO₄⁻ ; 0.12 HPO₄⁻ ; 0.3 SO₄⁻ ; 0.32 Cl⁻ ; 2.4 K⁺ ; 0.08 Na⁺ ; 1.04 Ca⁺⁺ ; 0.44 Mg⁺⁺ ; 0.8 NH₄⁺ ; en Millimoles.M⁻³ : 39,63 B⁻ ; 0,94 Cu⁺⁺ ; 21,50 EDTA-Fe ; 21,13 Mn⁺⁺ ; 0,54 Mo⁺⁺ ; 5,35 Zn⁺⁺ ; pH 6,5). La culture réalisée sous luminosité naturelle comprend une période d'acclimatation de quelques semaines. Les plantes sont ensuite recépées et les rejets sont taillés lorsqu'ils ont atteint un stade de 3 à 4 paires de feuilles. Par cette pratique et après plusieurs coupes, la morphologie des jeunes pousses reprend un aspect juvénile (Galopin et al., 1996). Ces explants issus de la rejuvenilisation constituent le point de départ de la formation des micropieds-mères (Figure 1).

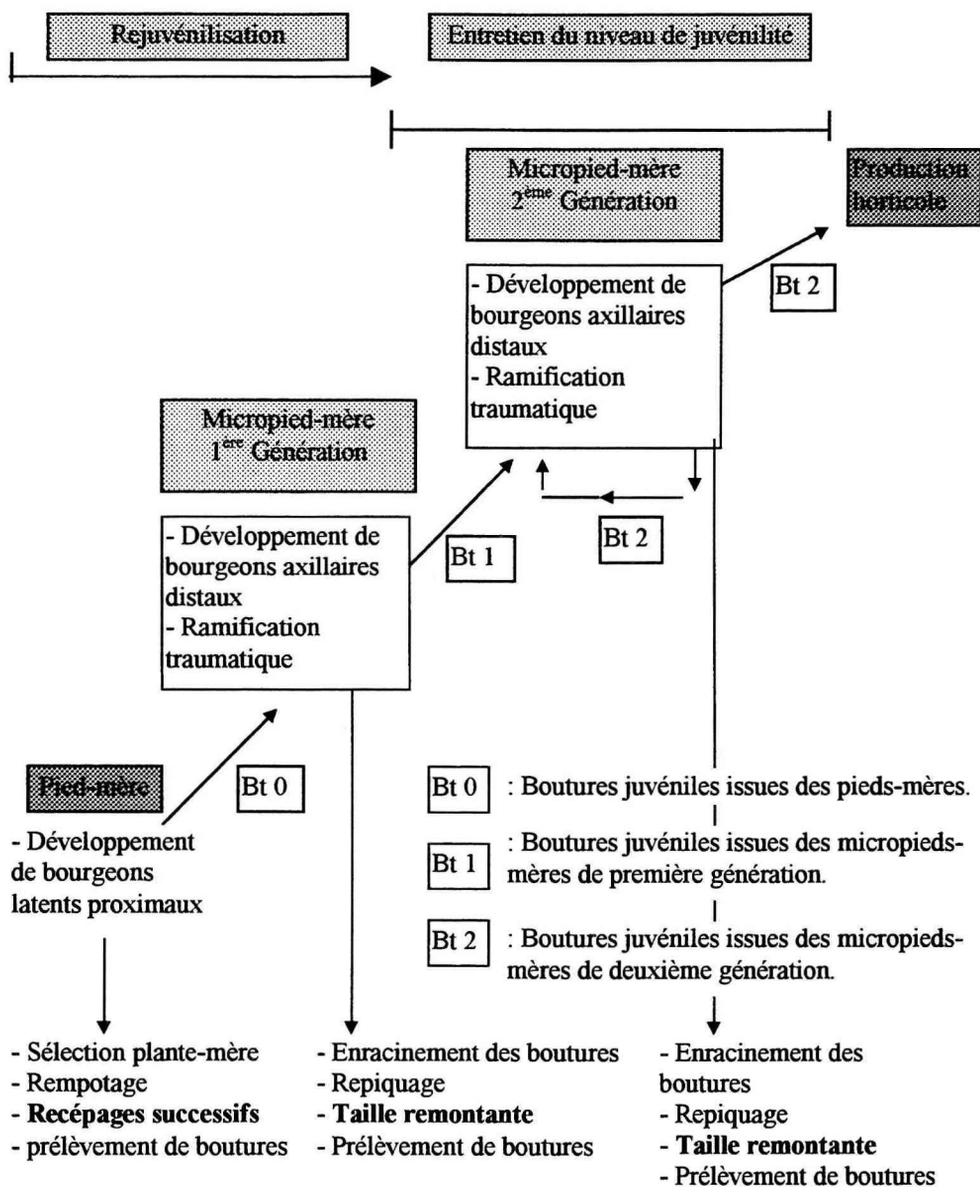


Figure 1 : Organigramme de production de jeunes plants par la formation et la culture de micropieds-mères.

1-2 Initiation et culture des micropieds-mères :

Les boutures à caractéristiques juvéniles issues des plantes cultivées en conteneur sont mises à enraciner dans des plaques alvéolées (PVC 57,5 x 36,5 cm, 140 trous Ø 33 mm) remplies de perlite préalablement humidifiée et placées sur un système de table de subirrigation (Beaujard et Dénéchère, 1987). Les tables (1000 x 2500 mm) sont installées sous serre et équipées d'un tunnel plastique ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, HR > 85%, brumisation à l'eau déionisée).

Les boutures sont alimentées en solution nutritive (4 fois par jour pendant 30 minutes). L'émission des premières racines a lieu après 10 à 20 jours pour *Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfeuer' et 20 à 30 jours pour *Myrtus communis*.

Les jeunes plants issus de cette première génération servent à la constitution des premiers micropieds-mères. Ils sont repiqués en pots plastique (600 ml) remplis de perlite préalablement humidifiée. Le substrat est ensuite recouvert d'une couche de silex hydrofugé (0,5 cm d'épaisseur, granulométrie 2 à 3 mm, hydrofugeant commercial Mursain®) dont le rôle est d'éviter la prolifération de micro-organismes et de limiter l'évaporation.

Les pots sont alors disposés pour la durée des essais sur de petites tables de culture placées en serre ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, 16/8h, luminosité naturelle et apports complémentaires de lumière en hiver, $136 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, lampe à vapeur de sodium basse pression).

Chaque table est composée de 4 bacs (400 x 600 x 100 mm) acceptant 8 pots et de 2 réservoirs (70 l) de solution nutritive renouvelée tous les 7 jours pendant toute la durée de la culture (Fustec, 1993). Les plantes sont aussi recouvertes par un petit tunnel plastique (1600 x 600 x 700 mm) assurant un taux élevé d'humidité atmosphérique (HR > 85%).

Au départ de la culture et au moment du repiquage, les jeunes plants d'*Hydrangea macrophylla* sont pincés au-dessus de la première paire de feuilles. Le débourement des deux bourgeons axillaires résidants assure ensuite la formation de deux nouvelles pousses que l'on prélèvera après qu'elles aient dégagé un minimum de trois paires de feuilles. La première paire de feuilles ou préfeuilles de chaque pousse est toujours conservée sur le micropied-mère (Figure 2).

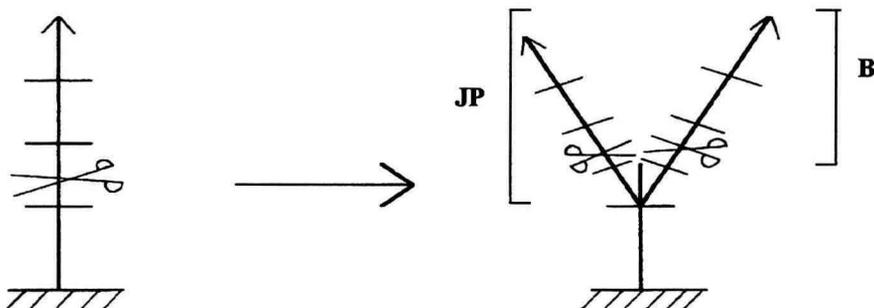


Figure 2 : Taille remontante appliquée chez *Hydrangea macrophylla* pour la conduite du micropied-mère. Prélèvement d'une bouture de deux paires de feuilles sur une jeune pousse de trois paires de feuilles. ✂, taille ; JP, jeune pousse ; B, bouture.

Les boutures sont alors constituées de deux paires de feuilles dégagées de l'apex. La méthode d'initiation des micropieds-mères appliquée à *Myrtus communis* est la même à l'exception des boutures qui possèdent au minimum 3 paires de feuilles. Ces règles de taille des jeunes pousses sont à la base de la formation et de l'exploitation des micropieds-mères. Les caractéristiques morphologiques de chacun des explants sont ainsi privilégiés par rapport au temps écoulé entre deux coupes.

1-3 Productions de boutures, variabilité intraspécifique et variabilité intraclonale :

Afin d'évaluer dans la durée la production du système de propagation en fonction de la plante et de son origine dans le processus de multiplication végétative, trois expérimentations de formation et d'exploitation des micropieds-mères ont été mises en place (tableau ci-dessous). Le premier essai (1) concerne *H. macrophylla* cv 'Leuchtfeuer' ; il est réalisé avec des boutures juvéniles issues de micropieds-mères de première génération (Bt 1). Le deuxième (2) concerne les quatre cultivars d'hortensia ; il est réalisé avec des boutures juvéniles issues de pieds-mères (Bt 0) pour les quatre cultivars et des boutures issues de micropieds-mères de première génération (Bt 1) pour le cultivar 'Leuchtfeuer'. Le troisième essai (3) est réalisé avec des boutures juvéniles de *Myrtus communis* issues de pieds-mères (Bt 0).

Expérimentation	Début	Fin	Effectif
1 - (hortensia, Bt 1)	16/02/1993	20/10/1994	8 micropieds-mères
2 - (hortensia, Bt 0 et Bt 1)	05/01/1994	03/03/1995	8 micropieds-mères
3 - (myrte, Bt 0)	05/02/1997	30/06/1997	87 micropieds-mères

La production de boutures juvéniles de chaque essai est évaluée en sommant le nombre de boutures prélevées à chaque passage dans les cultures (production moyenne cumulée). L'analyse statistique est effectuée par le calcul de la moyenne et de l'intervalle de confiance (5%).

Pour compléter ces essais et rendre compte de la juvénilité du matériel produit par les micropieds-mères, 386 microboutures d'*Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfleur' de l'essai 1 ont été comparées à la morphologie de 165 boutures de deux paires de feuilles produites de façon traditionnelle (récolte en juillet dans une unité de production sur des végétaux d'un an destinés à la production). Chaque bouture des deux origines est caractérisée par sa longueur, la longueur des limbes et le rapport des longueurs des entre-nœuds. L'analyse statistique est effectuée par calcul de la moyenne et du coefficient de variation.

2- Résultats

2-1 Organisation du micropied-mère et morphologie des boutures chez *Hydrangea macrophylla* :

Chaque prélèvement d'une bouture sur un micropied-mère donne un axe comportant deux paires de feuilles et laisse sur le pied les deux préfeuilles. Cette première paire de feuilles, conservée sur la plante, présente une morphologie particulière. Les limbes sont petits, entiers, épais et de forme arrondie. Ils sont analogues aux cotylédons de la germination épigée de l'hortensia (Figure 3).

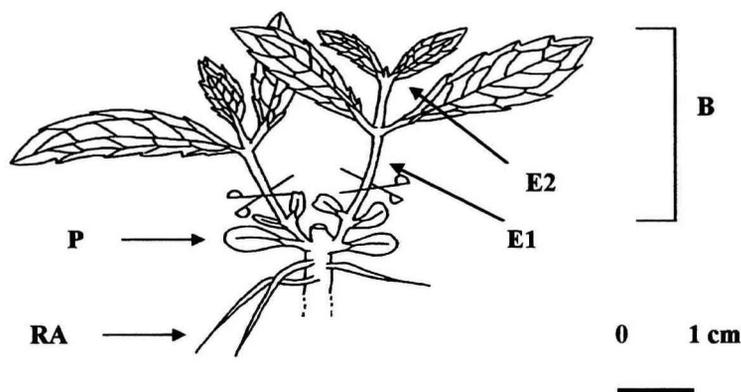


Figure 3 : Structure d'un micropied-mère d'*Hydrangea macrophylla*. Développement de jeunes pousses sur le micropied-mère depuis les bourgeons axillés par les préfeuilles ; B, bouture ; E1, premier entre noeud de la bouture ; E2; deuxième entre noeud de la bouture ; P, préfeuille ; RA, racines adventives.

Toutefois, la morphologie de ces feuilles évolue au cours du développement du micropied-mère. Elles ressemblent tout d'abord aux cotylédons puis deviennent dentées entre le 3^{ème} et le 4^{ème} prélèvements. Avec les tailles suivantes, les préfeuilles redeviennent d'aspect cotylédonnaire. Cette caractéristique foliaire est en corrélation avec le niveau de juvénilité. On observe ainsi un vieillissement morphologique suivi d'un retour et d'une stabilisation de la juvénilité.

Sur les nouvelles pousses, des racines aériennes adventives peuvent se développer jusqu'au niveau du deuxième nœud. Au moment d'un prélèvement, certaines sont prélevées avec la bouture tandis que les autres restent sur le micropied-mère. Leur accumulation constitue au cours du temps un véritable chevelu racinaire qui reste aérien.

Les boutures prélevées sur les pieds-mères comportent 2 paires de feuilles dentelées et dégagées de l'apex. Les feuilles du premier nœud ont des longueurs (2,57 cm) supérieures à celles du deuxième nœud (1,84 cm). L'entre-nœud de la base est également plus long que le suivant. Le métamère proximal (entre-nœud / feuilles) a atteint une taille quasi définitive alors que le deuxième est encore en croissance. Les boutures produites par les micropieds-mères ont des dimensions très inférieures à celles des boutures traditionnelles issues du surbouturage effectué en production (tableau n°1).

	surbouturage	micropieds-mères
Nombre de boutures étudiées	165	386
Longueur (cm)	3,98 ± 0,10 cv 17 %	1,72 ± 0,05 cv 29 %
Longueur des limbes de la 1 ^{ère} paire de feuilles (cm)	7,03 ± 0,12 cv 16 %	2,57 ± 0,06 cv 31 %
Longueur des limbes de la 2 ^{ème} paire de feuilles (cm)	4,13 ± 0,10 cv 23 %	1,84 ± 0,05 cv 38 %
Rapport des entre-nœuds (en1/en2)	1,73 ± 0,11 cv 42 %	2,97 ± 0,13 cv 44 %

Tableau n° 1: Caractéristiques morphologiques des boutures d'Hydrangea macrophylla 'Leuchtfeuer' issues de surbouturage et de multiplication par micropieds-mères.

2-2 Production de boutures chez *Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfeuer' (Essai 1):

Après 611 jours de culture, la production moyenne cumulée de boutures par micropied-mère est de 2037 ± 251 (Figure 4 et 5). Jusqu'au 350^{ème} jour, la production moyenne de boutures par jour évolue de manière exponentielle. Au delà, cette production se stabilise aux alentours d'une valeur moyenne de 7 boutures par jour.

La première phase de la culture correspond au développement du micropied-mère et à l'élaboration d'une structure ramifiée encore organisée. La deuxième phase correspond davantage à un équilibre entre le fonctionnement de la plante, son environnement et l'action de l'opérateur.

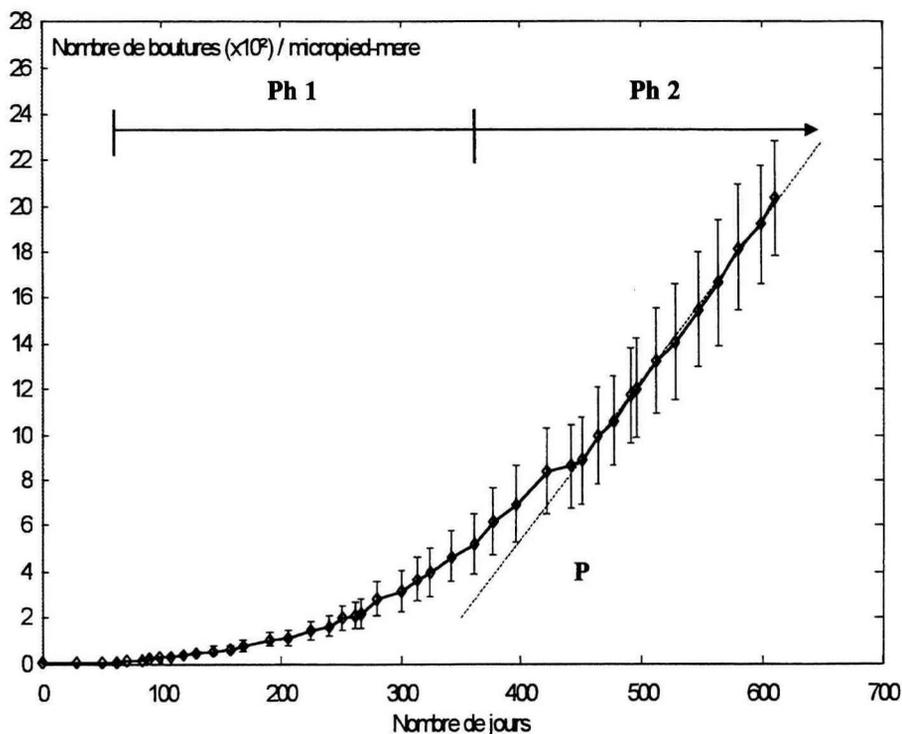


Figure 4 : Production cumulée de boutures chez *Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfeuer'. Moyenne et intervalle de confiance calculés sur huit micropieds-mères. **Ph1**, phase exponentielle de production ; **Ph2**, phase linéaire de production ; **P**, pente de la phase linéaire de production (6,9 boutures par jour).



*Figure 5 : Aspect d'un micropied-mère d'*Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfeuer' avant le prélèvement de boutures, après 547 (18 mois) jours de culture et la production de 1381 boutures.*

On peut facilement montrer que le nombre de bourgeons présents à l'aisselle des feuilles d'un micropied-mère est égal au nombre de pousses récoltées depuis le départ de la culture plus une. Cette propriété est indépendante du débourrement des bourgeons ; elle montre que le pied-mère ne peut pas épuiser son potentiel de production par cette voie. Après quelques coupes, le développement des pousses est relativement désynchronisé au point qu'une récolte ne correspond pas à une taille généralisée. La présence permanente de pousses en croissance est ainsi une des sources de l'alimentation trophique du micropied-mère.

2-3 Variabilité dans la production de boutures chez quatre cultivars d'*Hydrangea macrophylla* (Essai 2) :

Conduit avec des micropieds-mères de première génération et après 422 jours de culture, les productions moyennes cumulées de boutures varient de 142 pour le cultivar 'Merveille' à 409 pour le cultivar 'Leuchtfeuer' (Figure 6). Les productions du cultivar 'Adria' (231 boutures) et du cultivar 'Rosita' (380 boutures) sont intermédiaires. Ces micropieds-mères de première génération présentent une forte variabilité entre les cultivars. La phase linéaire de production n'étant atteinte qu'après 422^{ème} jour de culture, le phénomène est encore amplifié. La production des micropieds-mères du cultivar 'Leuchtfeuer' de première génération est aussi inférieure à celle des micropieds-mères de deuxième génération.

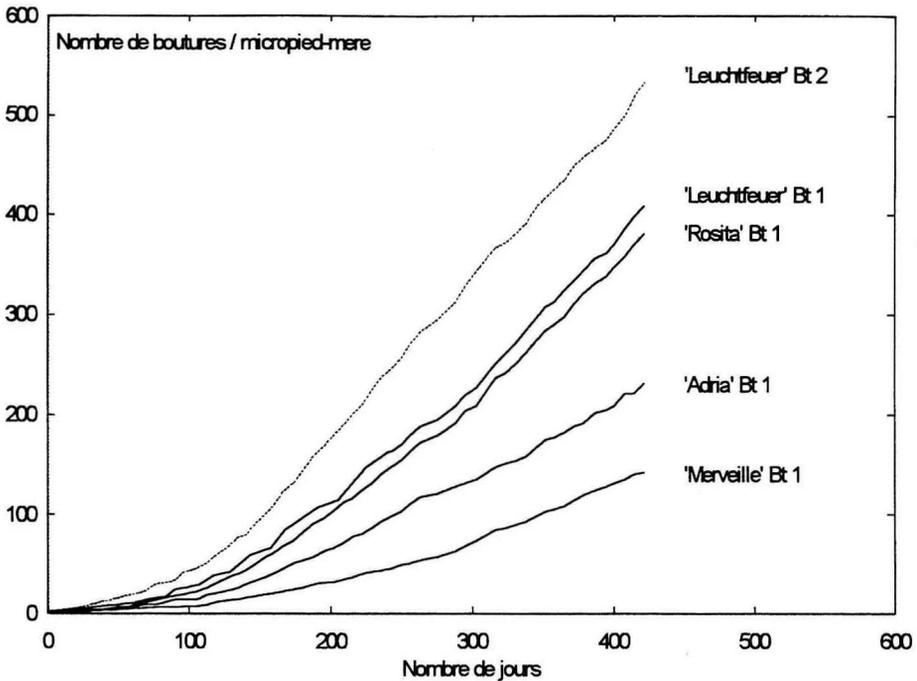


Figure 6 : Production cumulée de boutures chez quatre cultivars d'*Hydrangea macrophylla*. Bt 1, boutures issues de micropieds-mères de première génération ; Bt 2, boutures issues de micropieds-mères de deuxième génération.

2-4 Production de boutures de *Myrtus communis* (Essai 3) :

A la fin de l'essai 3 correspondant à la mise en place de micropieds-mères d'un clone de myrte et Après 145 jours de culture, la production moyenne cumulée est de 58 boutures (Figure 7 et 8). Ces plantes de première génération présentent des productions très variables comprises en fin d'essai entre 30 et 94 boutures. La morphologie des préfeuilles des jeunes axes évolue aussi de façon parallèle à celle de l'*Hydrangea macrophylla*. La première paire de feuilles conservée sur le micropied-mère au moment du prélèvement reste petite (5 à 15 mm), de forme oblongue et sans 'pointe' à son extrémité.

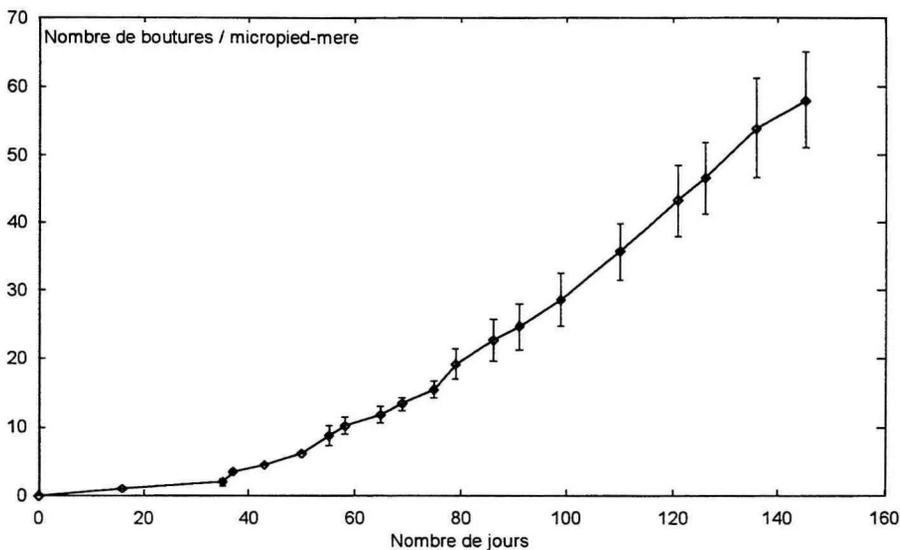


Figure 7 : Production cumulée de boutures chez *Myrtus communis*. Moyenne et intervalle de confiance calculés sur 83 micropieds-mères de première génération.

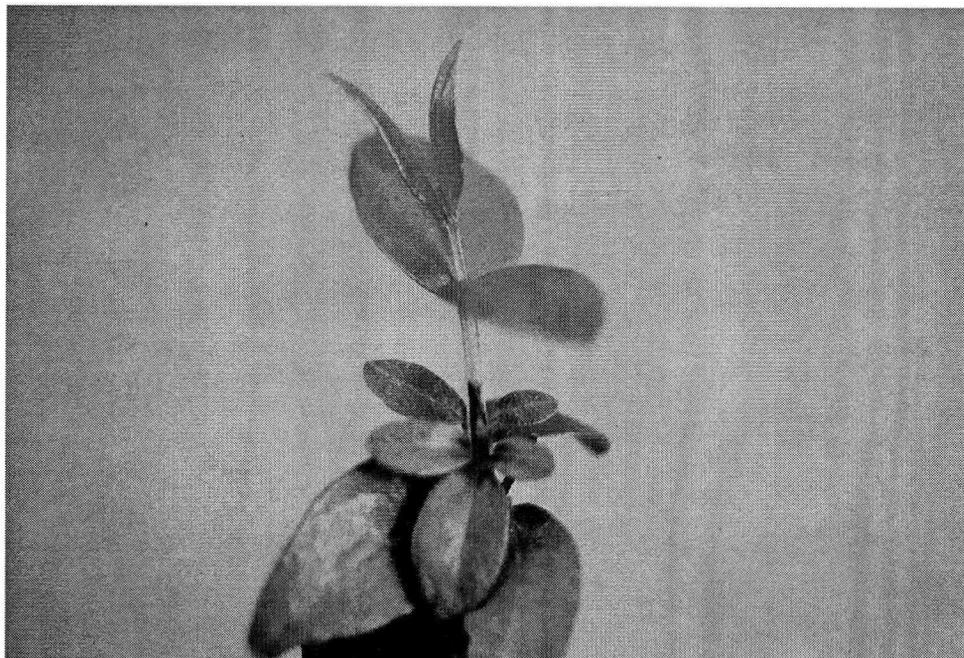


Figure 8 : Aspect de la ramification d'un micropied mère de *Myrtus communis*. Présence des préfeuilles à la base de la jeune pousse, elles sont conservées sur la plante après le prélèvement de la bouture.

3- Discussion

3-1 Multiplication par formation et exploitation de micropieds-mères:

La méthode de multiplication végétative de plantes ligneuses par la construction et l'exploitation de micropieds-mères permet la production massive de boutures juvéniles et homogènes. Elle consiste à restituer la juvénilité à partir d'une plante mature et à élaborer par des tailles remontantes des structures végétales capables de la maintenir stable *in vivo*. Les essais que nous avons conduits montrent que cette situation est accessible si l'on tient compte de l'intégralité du système biologique et qu'elle mérite d'être interprétée.

Chez une plante développée, l'importance du système racinaire est en rapport avec les dimensions du système aérien. Un recépage rompt les relations entre les tiges et les racines et le déséquilibre trophique, hydrique et hormonale qui s'en suit conduit au développement rapide et conséquent de bourgeons proximaux préexistants. Les stades ontogéniques de ces nouvelles pousses, envisagés dans le parcours de différenciation illustrant les passages de la graine à la floraison et décrits par le concept du mouvement morphogénétique de Nozeran (Bancilhon-Rossignol et al, 1995), sont plus jeunes que ceux des axes supprimés. Les tailles successives de ces rejets contribuent à entretenir le déséquilibre tiges/racines, à provoquer une réorganisation du système racinaire et à engendrer la juvénilité des nouvelles pousses caulinaires. La répétition des coupes conduit finalement à un nouvel équilibre stable et maintenu. La conservation de l'état juvénile peut alors prendre deux voies, soit directement au niveau du pied-mère en lui appliquant les interventions de taille déjà décrites, soit en utilisant les explants comme boutures et en régénérant alors une petite plante entière soumise à un programme de taille adapté à la formation d'un micropied-mère. La stabilité de cet état ontogénique est toutefois plus précaire chez une plante recépée.

Il est plus facile de caler et d'entretenir l'état de juvénilité désiré en formant un micropied-mère. Un jeune plant de 4 à 5 paires de feuilles voué à la formation d'un micropied-mère comporte un système racinaire réduit. Avec une culture contrôlée (alimentation hydrique et minérale, humidité atmosphérique, lumière et température), ses systèmes racinaire et caulaire se développent simultanément. L'application des tailles remontantes altère régulièrement l'action des parties aériennes dans le système plante entière. Elle provoque le débourement croissant de bourgeons axillaires, conduit à augmenter le nombre d'apex en croissance et interfère probablement avec le développement des racines. Dans ce contexte, les corrélations physiologiques à l'échelle de la plante (racines, tiges, feuilles, bourgeons) s'organisent pas-à-pas, deviennent favorables à la pérennité de la structure végétale et assurent l'auto-entretien de la production de pousses d'un état ontogénique déterminé.

3-2 Evolutions du niveau d'organisation du matériel végétal :

Le niveau de complexité d'une plante est en rapport avec les potentialités de développement de ses organes. Selon Borchert (1976), l'élaboration et le grandissement de la structure caulinare s'accompagne de sa complexification qui devient alors une source de vieillissement agissant sur la différenciation des organes. On retrouve ces spécificités à différents niveaux d'organisation du végétal dans l'aptitude d'explants à l'enracinement, dans la vigueur, la croissance continue ou rythmique, la dominance apicale, la floraison, la sensibilité à la transformation florale. Lorsque l'on pratique des interventions traumatiques, les équilibres internes de la plante établis en relation avec son environnement (climat et nutrition) sont rompus et le niveau de complexité est modifié. Selon la nature des interventions, les conséquences peuvent être variées. L'une d'entre elles est la production de réitérations dites traumatiques qui caractérisent la reprise totale ou partielle du programme de différenciation du végétal (Edelin, 1986).

La morphologie foliaire et sa variation donnée par l'hétéroblastie est souvent prise comme critère de différenciation des organes (Clark, 1981) et plus globalement du végétal. Elle varie dans le temps et dans l'espace avec le développement de la plante et permet assez souvent de repérer dans une structure arborée des formations réitérées. On peut ainsi retrouver des expressions de la juvénilité à différents niveaux dans la plante. Dans l'exemple *Hedysarum coronarium* (Papilionacées), des organes juvéniles peuvent se développer depuis les bourgeons de la base de l'axe orthotope et à proximité des racines, mais également de plus en plus haut dans la plante lorsque la période de latence des bourgeons axillaires est longue (Figier, 1980). Pour des bourgeons de la base, la proximité du système racinaire et la durée de repos apparent sont des facteurs de conservation de la juvénilité (Mullins et al., 1979). Dans le cas de plantes multipliées par voie végétative et depuis des explants présentant un certain niveau de différenciation, les composantes 'proximité racinaire et latence' pourraient être deux acteurs puissants de la rejuvenilisation, puis de son entretien.

Dans le cas de la recépée de plantes différenciées, hortensia ou myrte pour nos travaux, et en vue de la restitution de la juvénilité, l'ablation du système caulinare permet le débourrement des bourgeons proximaux naturellement maintenus en repos par inhibition corrélative. La pratique récursive des coupes conduit alors à la formation de plus en plus rapide de nouvelles pousses dont les caractéristiques morphologiques sont de plus en plus proches de l'état primaire de juvénilité. Dans le cas de l'exploitation d'un micropied-mère, l'analyse de l'hétéroblastie constitue un repère pour piloter le niveau de juvénilité. Chez *Hydrangea macrophylla*, nous observons très clairement lors des premiers pincements, une évolution de la morphologie de la première paire de feuilles (préfeuilles) vers une forme adulte. Ces feuilles grandissent rapidement, atteignent une taille importante et une forte capacité photosynthétique. Dans certains cas leur ablation devient nécessaire à la conservation de l'état juvénile. Il en est de même pour le prélèvement des boutures qui doit impérativement être effectué dès que la pousse possède trois paires de feuilles. Ce stade de construction des micropieds-mères est délicat.

L'opérateur doit intervenir pour conserver le niveau de juvénilité souhaité tout en évitant l'épuisement et la mort de la plante. A un stade de développement plus avancé et correspondant à la phase de production linéaire, la stabilité du niveau ontogénétique des jeunes pousses est moins dépendante de la nature des interventions traumatiques et des conditions d'environnement. Les préfeuilles sont alors très généralement de forme cotylédonnaire. Notons aussi que l'application stricte des règles de coupe permet de laisser le plus souvent des pousses en croissance qui prennent un rôle dans la pérennité du système.

Les différentes performances, en qualité et en quantité, que l'on observe entre les micropieds-mères d'hortensia 'Leuchtfeuer' de première et de deuxième génération sont en rapport avec la stabilisation de la juvénilité. Chez les premiers, les boutures sont plus hétérogènes et la production en phase linéaire moins importante. On retrouve aussi ces résultats avec les différents cultivars d'hortensia et le myrte. La variabilité de comportement des plantes vis à vis de la construction des micropieds-mères s'exprime aussi à l'intérieur d'un même clone. Cette observation pose le problème de différentiels dans les relations ontogéniques au sein de la plante.

Finalement la définition architecturale que l'on pourrait donner à un micropied-mère, avec la production répétée et asynchrone de pousses juvéniles, serait celle d'une souche à structure polyarchique (Edelin, 1991) édiflée par la permanence du processus de réitération.

Conclusion

Perspectives d'application pour la multiplication des végétaux ligneux d'ornement :

La méthode de multiplication *in vivo* par culture de micropieds-mères a été bien étudiée chez *Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfeuer' (Galopin et al, 1996) et a été étendue à d'autres cultivars d'hortensia et d'autres espèces ligneuses telles que *Myrtus communis* (Oléacées), *Forsythia X intermedia* 'Spring glory' (Oléacées) et *Weigela japonica* sp (Caprifoliacées) (Beaujard, communication personnelle). Le taux de multiplication de l'hortensia est proche de celui obtenu en culture *in vitro* (Stolz, 1984). Les techniques de mises en œuvre sont simples, peu onéreuses et évitent la phase d'acclimatation caractéristique du transfert des productions réalisées *in vitro*. Les boutures issues de micropieds-mères sont homogènes et juvéniles. La maîtrise de cet état initial dans un processus de culture de plantes ligneuses offre une alternative aux méthodes déjà connues de multiplication végétative. Elle permet aussi de modifier des itinéraires culturels et d'ouvrir des perspectives nouvelles pour la diversification et la mise à fleur des produits ornementaux (Galopin, 1995).

Remerciements

Nous tenons à remercier Monsieur G. Céril pour son assistance technique lors du déroulement expérimental de ces travaux conduits à la Station d'Agronomie du Centre INRA d'Angers et pour la réalisation des photographies.

Bibliographie

Bancilhon-Rossignol L., Bompar J.L., Combes D., Ducreux G., Espagnac H., Favre J.M., Neville P., Roux J., 1995 - Regards sur la morphogenèse végétale au travers de l'œuvre de René Nozeran. Corlet, Condé-sur-Noireau, France, 119 p.

Beaujard F., Dénéchère J.L., 1987 - Matériel pour l'étude de la nutrition minérale des vitro-plants lors de la phase d'acclimatation. L'exemple des Rhododendrons ornementaux. *Plant micropropagation in Horticultural Industries*. Arlon, Belgium, p. 170-175.

Borchet R., 1976 - Differences in shoot growth patterns between juvenile and adult trees and their interpretation based on systems analysis of tree. *Acta Horticulturae*, 56, p. 123-130.

Cauvin B., Marien J.N., 1978 - La multiplication végétative des *Eucalyptus* en France. Quelques aspects de la juvénilité et de la rejuvenilisation. *Annales de Recherches Sylvicoles, AFOCEL*, p. 141-175.

Clark J.R., 1981 - Juvenility and plant propagation. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*, 3, p. 449-453.

Duhoux E., 1988 - Organogenèse et multiplication végétative chez les arbres. In Zryd J.P. (ed) *Culture de cellules, tissus et organes végétaux*, Presses Polytechniques Romandes, p. 59-67.

Edelin C., 1986 - Stratégie de réitération et édification de la cime chez les conifères. In : *L'Arbre, Naturalia monspeliensia*, h.s., p. 139-158.

Edelin C., 1991.- Nouvelles données sur l'architecture des arbres sympodiaux : Le concept de plan d'organisation. In *L'arbre, Biologie et développement, Naturalia monspeliensi*, h.s., p. 127-154.

Figier J., 1980 - Période "juvénile" du développement des axes aériens de *Hedysarum coronarium* L. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 127, *Actual. Bot.*, 2, p. 113-115.

Francllet A., 1980 - Rajeunissement et propagation végétative des ligneux forestiers et fruitiers. *Annales de Recherches Sylvicoles, AFOCEL*, p. 277-291.

Francllet A., 1991 - Biotechnology in « rejuvenilisation » : hope for the micropropagation of difficult woody plants. *Acta Horticulturae*, 289, p. 273-282.

Fustec J., 1993 - Etude du fonctionnement du bourgeon chez *Rhododendron* lors du développement contrôlé de la structure végétative. Thèse Univ. Angers, 199p

Galopin G., 1995 - Biologie du développement d'*Hydrangea macrophylla*. Caractérisation du potentiel morphogénétique et maîtrise de ses expressions par les conditions de culture. Thèse, Univ. Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, 97p.

Galopin G., Beaujard F. et Gendraud M, 1996 - Intensive production of juvenile cuttings by mother microplant culture. In *Hydrangea macrophylla* 'Leuchtfeuer'. *Can. J. Bot.*, 74, p. 561-567.

Mullins M.G., Nair Y., Sampet P., 1979 - Rejuvenilisation *in vitro* : induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. *Ann. Bot.*, 44, p. 623-627.

Nozeran R., Ducreux G., Rossignol-Bancilhon L., 1982 - Réflexion sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 129, *Lettre Bot.*, 2, p. 107-130.

Schmidt G., Mata K., Pal J., 1995 - Effect of age of micropopagated and cutting-propagated stockplants on the rooting of 3 *Sorbus* hybrids. *Horticultural Science*, 27 (1-2), p. 76-79.

Stolz L.P., 1984 - *In vitro* propagation and grow of *Hydrangea*. *Horticultural Science*, 19, p. 717-719.



Mycorhizes et multiplication végétative du Douglas

Mycorrhizas and vegetative propagation of Douglas-fir

D. Bouchard, C. Karabaghli*, F. Le Tacon

INRA Nancy
BP 35 - 54280 Champenoux
Tél. 03 83 39 40 41
Fax 03 83 39 40 69
E-mail : bouchard@nancy.inra.fr

*ENGREF
14, rue Girardet - 54000 Nancy
Tél. 03 83 39 68 00
Fax 03 83 32 73 81

Résumé : La mycorhization contrôlée des semis de Douglas en pépinière est maintenant bien maîtrisée en France, en particulier avec la souche d'origine américaine *Laccaria bicolor* S238N. Les gains de croissance obtenus en pépinière peuvent se maintenir après transplantation en forêt si un certain nombre de conditions sont réunies. L'objectif du travail décrit ici est d'associer un champignon ectomycorhizien performant (*Laccaria bicolor*, *Rhizopogon sp*, *Melanogaster sp*) à du Douglas génétiquement sélectionné pour son potentiel de croissance et multiplié par voie végétative. L'inoculation des boutures de Douglas peut se faire pendant la phase d'enracinement ou après transplantation en pépinière des boutures enracinées. L'inoculation pendant la phase d'enracinement est possible, les meilleurs résultats sont obtenus avec *Laccaria bicolor* S238N. Il n'y a pas d'effet de l'inoculation mycorhizienne pendant la phase d'enracinement sur le nombre de racines longues ou courtes formées, ni sur le développement de la nouvelle pousse. Des essais sont en cours pour déterminer si la mycorhization pendant la phase d'enracinement confère aux boutures un avantage au moment de la transplantation en pépinière. Des essais précédents avaient montré que l'inoculation mycorhizienne de boutures enracinées de Douglas ou d'Épicéa au moment de la transplantation en pépinière avaient des effets bénéfiques sur le taux de survie et la croissance des boutures pendant la phase d'élevage en pépinière (Génére et al 1994, Di Battista 1997).

Mots-Clés : Mycorhizes; Boutures; Inoculum; Douglas

Abstract: *The mycorrhizal inoculation of Douglas fir seedlings in nursery beds is well under control, especially with the ectomycorrhizal strain Laccaria bicolor S238N of american origin. The growth gains obtained in nurseries can be maintained even after outplanting the seedlings in forests if requirements are fulfilled. The aim of the present experiment is to associate Douglas-fir seedlings with an efficient ectomycorrhizal fungus (Laccaria bicolor, Rhizopogon sp or Melanogaster sp) genetically selected for its growth potential and vegetatively propagated. The inoculation of Douglas fir cuttings can be carried out during the rooting stage or after transplantation of the rooted cuttings in nursery beds. The best results are obtained with Laccaria bicolor S238N. The inoculation of the ectomycorrhizal fungus during the rooting stage has no effect either on the number of roots (long or short), or on the shoot growth. Experiments are being carried out to establish whether mycorrhization during the rooting stage can benefit the cuttings when they are outplanted in nursery beds. Former experiments had shown that inoculation of the ectomycorrhizal fungus had beneficial effects on both survival and growth of rooted cuttings in Douglas-fir and Norway spruce.*

Keywords: *Mycorrhizas, Cuttings, Inoculum, Douglas-fir*

Introduction

La symbiose mycorhizienne

La symbiose mycorhizienne est une association à bénéfice réciproque entre une racine et un champignon. Les champignons mycorhiziens, qui ont en général une capacité saprophytique réduite, reçoivent de la plante les composés carbonés indispensables à leur survie, à leur croissance et à leur fructification. En échange, les hyphes qui explorent un grand volume de sol à distance des racines, transfèrent à la plante l'eau et les éléments minéraux qui sont essentiels à sa croissance.

La symbiose à ectomycorhizes concerne la majorité des arbres forestiers des régions tempérées et boréales. Elle est établie sur les racines courtes de ces arbres par des champignons supérieurs, Basidiomycètes et Ascomycètes. Les racines ainsi colonisées subissent de profondes modifications morphologiques et deviennent un nouvel organe dépourvu de poils absorbants, dont le méristème apical s'arrondit et dont la croissance est arrêtée ou fortement ralentie.

Avantages de la mycorhization contrôlée

L'association des racines avec des champignons mycorhiziens est indispensable à la survie de la plante. Certaines souches de champignons sont particulièrement performantes et stimulent significativement la croissance de leur plante hôte. L'intérêt de la mycorhization contrôlée est d'associer artificiellement une souche performante avec un hôte déterminé. Cet avantage peut être renforcé en associant ces symbiotes avec un matériel végétal de qualité, parce que sélectionné, comme c'est le cas avec les boutures.

L'objectif est alors d'obtenir le plus précocement possible la symbiose des deux partenaires, c'est à dire dès la phase d'enracinement. La présence du champignon mycorhizien au cours de cette phase pourrait d'ailleurs favoriser la formation des racines adventives.

En effet de nombreuses études ont montré que les champignons ectomycorhiziens avaient la capacité de synthétiser l'acide indole-3-acétique (AIA) et pourraient être utilisés pour provoquer l'enracinement de boutures. Linderman et Call (1977) ont réussi à enracciner des boutures d'*Arctostaphylos uva-ursi* et de *Vaccinium ovatum*, deux plantes difficiles à propager végétativement, en inoculant le substrat de culture avec des champignons ectomycorhiziens. Des résultats analogues ont été obtenus par Navratil et Rochon (1981) avec des boutures de peuplier inoculées par *Pisolithus tinctorius* et par Stein *et al.* (1990) qui ont montré que l'inoculation du substrat de culture de boutures de *Picea mariana* avec deux champignons ectomycorhiziens augmentait le taux d'enracinement, le nombre de racines formées ainsi que la longueur de ces racines.

Les champignons ectomycorhiziens peuvent aussi stimuler la rhizogénèse adventive de boutures cultivées *in vitro*. En effet, Stein et Fortin (1990), Gay (1990) et Karabaghli (1994) ont stimulé la formation de racines adventives sur des hypocotyles excisés de Mélèze, de Pin d'Alep et d'Epicéa, en les cultivant en présence de champignons ectomycorhiziens sur un milieu contenant un précurseur de l'auxine, le tryptophane.

En l'absence de ce précurseur, les quantités d'AIA synthétisées n'étaient pas suffisantes pour stimuler de façon significative la rhizogénèse. De même, David *et al.* (1983) constatent que des micro-boutures de Pin maritime forment plus de racines latérales courtes *in vitro* en présence de *Pisolithus tinctorius* ou d'*Hebeloma cylindrosporum*. Ils soulignent que la qualité de l'enracinement ainsi obtenu favorise l'acclimatation des boutures aux conditions de culture *ex vitro*.

Objectif

Le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) a été introduit en Angleterre en 1827 puis sur le continent. L'aire naturelle du Douglas s'étend en Amérique du Nord sur toute la côte ouest. Sa plasticité et sa forte croissance dès la plantation ont fait du Douglas la première essence de reboisement en France, en plaine et en moyenne montagne (Riou-Nivert 1996). C'est actuellement la cinquième essence résineuse en France (Riou-Nivert 1996).

L'objectif de ce travail est appliqué : il s'agit d'utiliser l'aptitude des champignons ectomycorhiziens à produire de l'AIA pour tenter de favoriser l'enracinement et la mycorhization précoce de boutures de Douglas.

Cette étude s'insère dans un programme européen de recherche intitulé "Improvement of the growth performances of forest trees (*Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies*, *Picea sitchensis*, *Pinus pinaster*, *Quercus robur*) and fruit trees (*Castanea sativa*) by microbial inoculation of cuttings".

Ce programme a pour objectif, dans un contexte de reboisement des terres agricoles abandonnées par l'agriculture, de produire des boutures d'arbres forestiers sélectionnés mycorhizés avec des symbiotes performants pour augmenter leur taux de survie et améliorer leur croissance au moment de la transplantation de la serre vers la pépinière forestière.

Deux expériences d'enracinement et de mycorhization de boutures de Douglas en serre ont été réalisées, l'une en 1995, l'autre en 1996, en association avec trois champignons ectomycorhiziens : *Laccaria bicolor*, *Rhizopogon subareolatus* et *Melanogaster ambigua*.

1- Matériel et méthodes

1-1 Les boutures de Douglas

Les boutures de Douglas ont été prélevées sur 200 pieds-mères de trois ans élevés à la pépinière du Cemagref de Nogent-sur-Vernisson. Ces pieds-mères proviennent eux-mêmes du verger à graines 24 de Bout, dans l'Allier. Le bouturage a été effectué en février 1995 et en février 1996 sur les pousses de l'année précédente. Les boutures, mélangées de façon homogène, ont été conservées à 4°C pendant cinq semaines avant leur installation.

Chaque traitement comprenait quatre blocs de 40 boutures pour chaque inoculation. Un traitement témoin a par ailleurs été constitué. En fin d'expérience, après 33 semaines pour la première expérience et après 29 semaines pour la deuxième, les mesures ont été effectuées sur cinq boutures enracinées par traitement et par bloc.

1-2 Souches fongiques

La souche *Laccaria bicolor* S238N (Homobasidiomycète Agaricomycète) a été isolée en 1976 dans l'aire naturelle du Douglas, aux USA, à partir d'un carpophore prélevé sous *Tsuga mertensiana*.

La distribution géographique de *Laccaria bicolor* est très large et il peut s'associer avec de nombreuses essences. D'autre part, cette espèce se prête bien à la culture *in vitro* et supporte des niveaux de fertilité élevés, ce qui a permis son introduction et son utilisation dans les pépinières forestières.

Laccaria bicolor S238 N s'est révélé très performant pour stimuler la croissance des semis de Douglas et d'Epicéa en pépinière forestière (Sampangi *et al.* 1985 ; Le Tacon et Bouchard 1986). Cet effet positif peut se maintenir également après la plantation (Le Tacon *et al.* 1988).

Rhizopogon subareolatus Smith. et *Melanogaster ambiguus* (Vitt.) Tul. & Tul. sont des Homobasidiomycètes Gastéromycètes. Leur fructification est hypogée. Les sporocarpes à partir desquels nous avons travaillé ont été récoltés au cours des automnes 94 et 1995 dans le Nord Est de l'Espagne où ils sont produits régulièrement, permettant un approvisionnement abondant en spores.

La mycorhization des plants à partir de mycélium végétatif n'a pas été possible jusqu'à présent (Parladé *et al.* 1997). Par contre, l'inoculation des plants avec des suspensions de spores s'est avérée très performante et c'est donc cette technique que nous avons utilisée. Le genre *Rhizopogon* a été utilisé avec succès comme inoculum ectomycorhizien. La plupart des espèces de ce genre sont surtout associées au genre *Pinus*, mais *Rhizopogon subareolatus* est spécifique de *Pseudotsuga menziesii* (Parladé *et al.* 1997). Quant au genre *Melanogaster*, il est encore très peu utilisé en mycorhization contrôlée. *Melanogaster ambiguus* et *Rhizopogon subareolatus* stimulent la croissance de semis de Douglas après la transplantation (Parladé *et al.* 1992).

1-3 Inoculation des boutures de Douglas en serre

L'inoculum de *Laccaria bicolor* S238 N utilisé dans les expériences d'enracinement et de mycorhization des boutures de Douglas a été formulé sous forme d'un mélange de tourbe et de vermiculite et incubé à l'obscurité, pendant deux mois. Au moment de l'inoculation, le mélange tourbe-vermiculite colonisé par le champignon est homogénéisé puis mélangé au substrat de culture des boutures de Douglas (1/20, v/v, inoculum/substrat). Des boutures ont été inoculées avec *Laccaria bicolor* S238 N dès l'installation dans le substrat de culture. Des suspensions de spores de *Rhizopogon subareolatus* et de *Melanogaster ambiguus* ont servi à inoculer les boutures de Douglas en serre. Le protocole a été décrit par Parladé. Les sporocarpes récoltés à l'automne et séchés sont réhydratés et broyés dans de l'eau distillée pour permettre la libération des spores. La suspension de spores obtenue est diluée de façon à obtenir 10^5 spores par ml. Les concentrations en spores de la suspension initiale et de ses dilutions sont comptées avec un hématimètre (Parladé *et al.* 1997). Chaque bouture reçoit 10 ml de la suspension ajustée, soit 10^6 spores. Les boutures témoins n'ont pas été inoculées.

1-4 Substrat de culture et désinfection

Le substrat de culture des boutures est un mélange de tourbe blonde et de vermiculite expansée (1/1, v/v). Une première expérience a été réalisée en 1995 et a permis de tester l'effet de la désinfection du substrat de culture sur la croissance des boutures et l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Le substrat a été désinfecté au bromure de méthyle. Dans ce cas, le mélange tourbe-vermiculite, étalé sur 40 cm d'épaisseur et bâché, a reçu une dose de 500 g/m^3 de bromure de méthyle. Après deux jours, les bâches ont été retirées et le substrat aéré pendant six jours avant d'être utilisé. Une deuxième expérience a été réalisée en 1996 sur substrat désinfecté uniquement, la désinfection a été réalisée à la vapeur. Deux applications de vapeur (90°C) d'une heure ont été faites. Elles ont été séparées de 24 heures.

1-5 Conditions de culture

Dans le cas de l'expérience de 1995, des godets de polyéthylène noirs de 90 cm^3 ont été remplis avec le substrat. Ces godets sont regroupés par 40 et constituent une plaque HIKO. Dans le cas de l'expérience de 1996, des godets de 200 cm^3 ont été choisis et chaque plaque HIKO ne comprenait que 25 godets. Ces conteneurs permettent le drainage de l'eau d'arrosage. L'inoculation de *Laccaria bicolor* S238 N, formulé sous forme d'un mélange de tourbe-vermiculite, a été réalisée au moment de la mise en place du substrat dans les godets, à la dose de 1/20 (v/v, inoculum/substrat). Les suspensions de spores de *Melanogaster ambiguus* et *Rhizopogon subareolatus* ont été apportées après huit semaines de culture des boutures, à raison de 10^6 spores par godet.

Les boutures de Douglas ont été mises en place en mars 1995 et en mars 1996. Leur base a été tout d'abord trempée pendant 24 heures dans une solution aqueuse d'AIB (Rhône-Poulenc) à 4 g.l^{-1} (20 mM). Nous avons choisi de compléter l'effet de l'inoculation des champignons mycorhiziens sur l'enracinement des boutures par un traitement auxinique car il a été montré *in vitro* que *Laccaria bicolor* S238 N stimulait l'enracinement des boutures d'hypocotyles uniquement lorsque le milieu de culture contenait du tryptophane (Karabaghli 1997). Or il n'était pas réaliste, dans des conditions réelles de production de boutures, d'envisager des apports de tryptophane dans le substrat de culture. D'autre part, Stein *et al.* (1990) ont montré que si des champignons ectomycorhiziens comme *Laccaria bicolor* ou *Suillus cavipes* peuvent stimuler la rhizogénèse adventive de boutures de *Picea mariana* en l'absence de tryptophane exogène, ils n'ont en revanche aucun effet significatif sur l'enracinement de boutures de *Larix decidua*. Ces auteurs ont de plus souligné que des apports exogènes d'AIB ont dans tous les cas permis de meilleurs taux d'enracinement et un plus grand nombre de racines par boutures. Il semblait donc plus judicieux dans nos expériences d'induire les racines adventives par un traitement auxinique puis d'étudier l'effet des champignons ectomycorhiziens sur la croissance de ces racines et leur ramification. Les boutures ont ensuite été installées en serre dans les plaques HIKO, à raison d'une bouture par godet. Elles ont été disposées sous un abri plastique destiné à maintenir un taux d'humidité élevé au niveau des feuilles. L'arrosage automatique des boutures à l'eau osmosée a été réalisé à l'aide d'un système de brouillard ("mist") pendant la phase d'éclaircissement. L'importance de l'arrosage a varié au cours de la période de culture ; elle est donnée pour les deux expériences dans le tableau n° 1.

	Durée d'arrosage (en min. /jour)	Durée d'application (en semaines)
Expérience de 1995	30	15
	21	6
	12	5
	2	7
Expérience de 1996	24	10
	12	8
	4	11

Tableau n° 1 : Variation de l'arrosage des boutures de Douglas au cours de la période de culture.

La quantité d'eau apportée aux boutures a été beaucoup plus importante au début de la phase d'enracinement, de façon à toujours maintenir le feuillage dans une atmosphère saturée en eau. La photopériode était de 17 heures ; un éclairage artificiel a complété la lumière du jour lorsque cela a été nécessaire. La température était de 23°C pendant la phase d'éclaircissement et de 16°C pendant la nuit. Quatre mois après l'installation des boutures, une fertilisation NPK 20-20-20 (Plant Prod ; Plants Products Co. Ltd. Bramalea, Ontario, Canada) a été apportée à raison d'une pulvérisation foliaire hebdomadaire ($1,5 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$).

1-6 Variables mesurées et analyses statistiques

Les mesures ont été effectuées sur cinq boutures enracinées par traitement et par bloc. Les paramètres suivants ont été mesurés : pourcentage de boutures enracinées, taux de mortalité, hauteur des boutures, accroissement de la tige principale, diamètre à la base de la tige, nombre de racines adventives, nombre total de racines courtes et nombre de racines courtes non mycorhizées, taux de racines courtes mycorhizées par les différents champignons ectomycorhiziens inoculés et biomasses des racines et des parties aériennes. Les résultats ont été analysés par analyse de variance et le test de Bonferroni au seuil de 5 %. Les pourcentages ont été transformés par la fonction Arcsinus(\square) avant l'analyse de variance (Snedecor et Cochran 1980).

2- Résultats

2-1 Effet de la désinfection du substrat de culture

L'expérience de 1995 n'a montré aucun effet significatif de la désinfection du substrat de culture sur la plupart des caractéristiques morphologiques des boutures (croissance aérienne, nombre de racines adventives, diamètre au collet) ni sur le taux de mortalité. En revanche, la désinfection du substrat augmente significativement le nombre de racines courtes formées par les boutures (669 en moyenne dans le substrat désinfecté contre 558 dans le substrat non désinfecté) ainsi que le taux de mycorhization. Celui-ci est défini par le rapport entre le nombre de racines courtes mycorhizées et le nombre total de racines courtes. Il passe de 0 % dans le substrat non désinfecté à 8 % dans le substrat désinfecté pour les boutures inoculées avec *Laccaria bicolor* S238 N et de 10,3 à 33 % pour celles qui ont été inoculées avec *Rhizopogon subareolatus*. C'est pourquoi en 1996, l'expérience n'a été renouvelée qu'avec un substrat désinfecté de façon à favoriser la formation des mycorhizes.

2-2 Effet de l'inoculation sur l'enracinement et la morphologie des boutures

L'expérience de 1996 a donné de meilleurs résultats que celle de 1995. L'enracinement des boutures a en effet été globalement meilleure, de même que le taux de mycorhization obtenu en présence de *Laccaria bicolor* S238 N (figure 1).

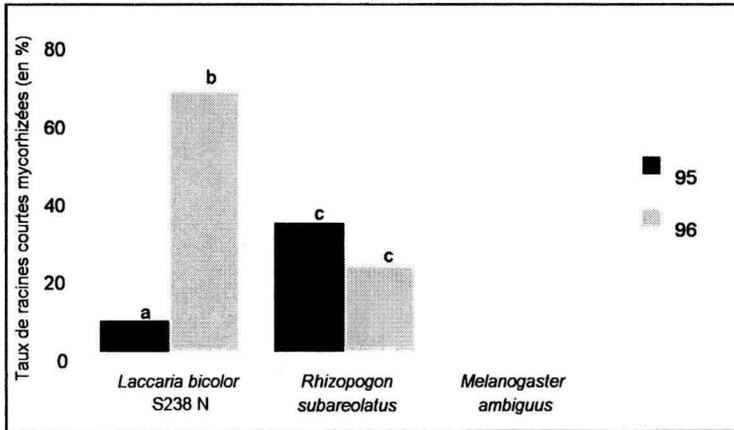


Figure 1 : Taux de mycorhization des boutures de Douglas au cours des expériences en serre de 1995 et 1996.

Les boutures de Douglas ont été inoculées avec du mycélium de *Laccaria bicolor* S238 N, des spores de *Rhizopogon subareolatus* ou des spores de *Melanogaster ambiguus*. Le taux de mycorhization est défini par le rapport du nombre moyen de racines courtes mycorhizées sur le nombre total de racines courtes. Il a été mesuré après 33 semaines de culture en 1995 et après 29 semaines de culture en 1996 sur quatre groupes de cinq boutures par traitement. Les moyennes annotées de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après une analyse de variance à deux facteurs (années - inoculation) suivie du test de Bonferroni au seuil de 5 %.

L'inoculation des boutures n'a eu aucun effet significatif sur leur taux de mortalité qui est en moyenne de 12,2 %.

Le pourcentage de boutures enracinées n'est pas significativement modifié par l'inoculation avec un champignon ectomycorhizien, que ce soit *Laccaria bicolor* S238 N, *Rhizopogon subareolatus* ou *Melanogaster ambiguus* (figure 2 A). De même, le nombre moyen de racines adventives par bouture est identique pour tous les traitements (figure 2 B). La formation des racines adventives a essentiellement été induite par le traitement auxinique initial et n'a pas été modifiée par l'inoculation des boutures.

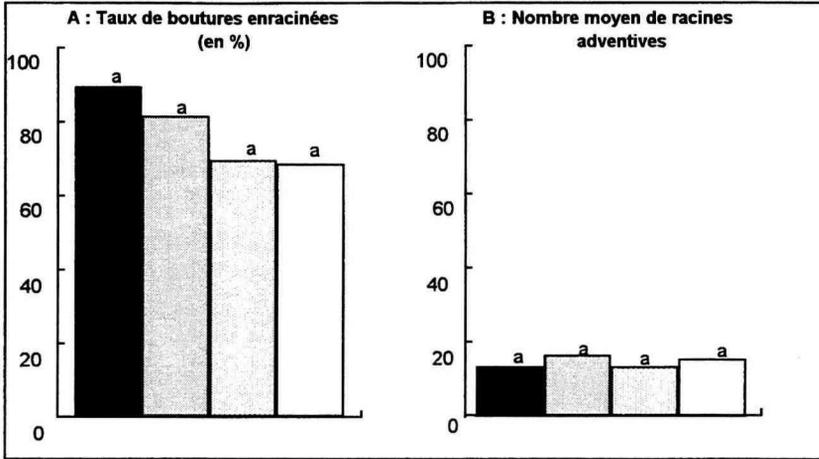


Figure 2 : Enracinement des boutures de Douglas en serre de 1996.

Les boutures de Douglas ont été inoculées avec du mycélium de *Laccaria bicolor* S238 N (▨), des spores de *Rhizopogon subareolatus* (▩) ou des spores de *Melanogaster ambiguus* (□). Les témoins (■) n'ont pas été inoculés.

Le taux d'enracinement (A) et le nombre moyen de racines adventives par bouture (B) ont été mesurés après 29 semaines de culture sur quatre groupes de cinq boutures par traitement. Pour chaque paramètre, les moyennes annotées de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après une analyse de variance à un facteur. L'inoculation des boutures de Douglas avec *Rhizopogon subareolatus*, *Melanogaster ambiguus* ou *Laccaria bicolor* S238 N n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de racines courtes formées 29 semaines après l'installation (figure 3) ni sur la masse totale de matière sèche des racines (figure 4 A).

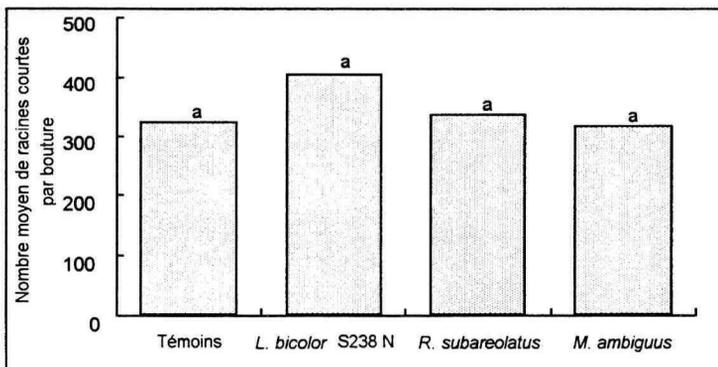


Figure 3 : Nombre de racines courtes formées par les boutures de Douglas au cours de l'expérience en serre de 1996.

Les boutures de Douglas ont été inoculées avec du mycélium de *Laccaria bicolor* S238 N ou des spores de *Rhizopogon subareolatus* ou de *Melanogaster ambiguus*. Les témoins n'ont pas été inoculés. Le nombre moyen de racines courtes par bouture a été mesuré après 29 semaines de culture sur quatre groupes de cinq boutures par traitement. Les moyennes annotées de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après une analyse de variance à un facteur.

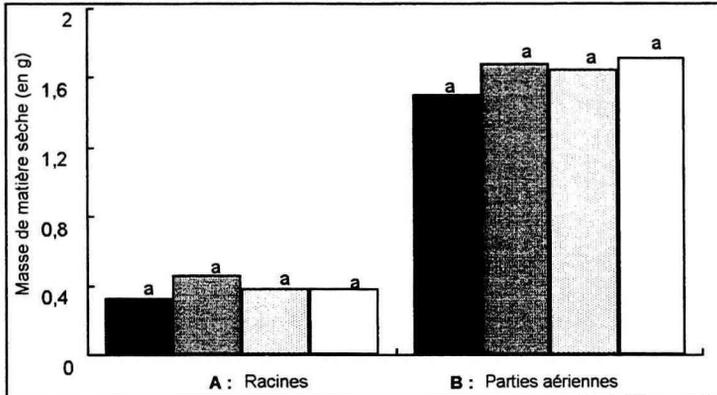


Figure 4 : Masse de matière sèche des boutures de Douglas après 29 semaines de culture (expérience en serre de 1996).

Les boutures de Douglas ont été inoculées avec du mycélium de *Laccaria bicolor* S238 N (■), des spores de *Rhizopogon subareolatus* (□) ou des spores de *Melanogaster ambiguus* (□). Les témoins (■) n'ont pas été inoculés.

Les masses de matière sèche des racines (A) et des parties aériennes (B) ont été mesurées sur quatre groupes de cinq boutures par traitement. Pour chaque paramètre, les moyennes annotées de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après une analyse de variance à un facteur.

2-3 Croissance aérienne

La croissance aérienne des boutures de Douglas n'a pas été influencée par l'inoculation avec *Rhizopogon subareolatus*, *Melanogaster ambiguus* ou *Laccaria bicolor* S238 N. Les boutures ont en effet la même hauteur moyenne en fin d'expérience ($18,1 \pm 0,6$ cm) et leur allongement au cours des 29 semaines de culture a été le même ($7,3 \pm 0,6$ cm). D'autre part, la masse de matière sèche des parties aériennes n'est pas significativement différente d'un traitement à l'autre (figure 4 B).

2-4 Mycorhization des boutures au cours de la phase d'enracinement

En 1995, le taux de mycorhization des boutures par *Laccaria bicolor* S238 N était faible : 8 % sur le substrat désinfecté. Au contraire, en 1996, ce taux a atteint 67,1 % (figure 1). Le taux de mycorhization par *Rhizopogon subareolatus* n'a pas varié de façon significative d'une expérience à l'autre. D'autre part, aucune mycorhize de *Melanogaster ambiguus* n'a été obtenue dans l'une et l'autre des deux expériences (figure 1).

3- Discussion

Au cours de l'expérience en serre de 1995, la désinfection du substrat favorise l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne ainsi que la ramification des racines. Le bromure de méthyle est un produit très utilisé pour désinfecter les sols mais son utilisation sera prochainement interdite car les radicaux Br^o qu'il libère altèrent la couche d'ozone. Dans ces circonstances, la désinfection à la vapeur que nous avons utilisée pour l'expérience de 1996, constitue une alternative efficace. Nous avons montré qu'il était possible de mycorhizer des boutures de Douglas dès la phase d'enracinement en serre. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec *Laccaria bicolor* S238 N. En revanche, l'inoculation avec *Melanogaster ambiguus* a été un échec. Ce champignon est un des partenaires ectomycorhiziens du Douglas et Parladé et al. en 1997 ont montré qu'il améliore la croissance des semis de Douglas en pépinière et après transplantation sur le terrain. D'autre part, Alvarez et Parladé en Espagne (IRTA¹ à Cabriels) qui ont mené des expériences parallèles aux nôtres avec le même matériel végétal et le même inoculum fongique, ont obtenu 31% de racines courtes de Douglas mycorhizées par *Melanogaster ambiguus* en serre.

L'inoculation des boutures de Douglas avec *Laccaria bicolor* S238 N ou avec *Rhizopogon subareolatus* n'a pas eu d'effet sur le taux d'enracinement des boutures. En fait, le traitement auxinique initial a homogénéisé l'enracinement et gommé d'éventuels effets de l'inoculation fongique sur l'initiation des racines adventives. Parladé et Alvarez ont toutefois mis en évidence un effet bénéfique de l'inoculation des boutures de Douglas avec *Laccaria bicolor* S238 N et *R. subareolatus* sur le taux d'enracinement. Il semble donc que les résultats puissent être très variables d'une expérience à l'autre et soient très sensibles à toute variation des conditions de culture.

L'inoculation fongique n'a pas eu d'effet sur la croissance ni sur la formation des racines latérales. De plus, la croissance aérienne des boutures n'a pas été stimulée contrairement aux semis d'un an inoculés en serre ou en pépinière. Comme il s'agit de boutures, il est peut-être prématuré de chercher à observer des différences de croissance dès l'année du bouturage et de l'inoculation.

¹ IRTA : Institut de Recerca i Tecnològica Agroalimentàries. Centro de Cabriels, 08348 Cabriels - Barcelona

Ritchie *et al.* (1993) ont montré que la survie et la croissance de boutures de Douglas étaient principalement corrélées à leur nombre de racines adventives et au diamètre de leur tige. Or dans notre cas, les boutures de Douglas proviennent d'un matériel végétal homogène et elles ont formé en moyenne le même nombre de racines adventives qu'elles aient ou non été inoculées avec un champignon ectomycorhizien. Dans ces conditions, la croissance des boutures lors de la saison de végétation qui suit le bouturage doit être essentiellement déterminée par les réserves accumulées dans le bois par le pied-mère à l'année n-1. D'autre part, dans nos conditions de culture, la symbiose ectomycorhizienne ne favorise sans doute pas de façon significative la nutrition minérale des boutures puisque les éléments minéraux sont essentiellement en solution et que le volume de substrat est limité. Les boutures de l'expérience de 1995 ont été transplantées en pépinière forestière au printemps 1996 à Peyrat-le-Château dans le Limousin, celles de l'expérience de 1996 y ont été transplantées au printemps 1997. Après cette phase transitoire d'élevage en pépinière d'environ un an, les plants seront suffisamment grands pour être installés sur le terrain. La croissance de leur partie aérienne et de leurs racines vont être suivies en pépinière puis sur le terrain afin de déterminer si la symbiose ectomycorhizienne s'avère bénéfique à l'une des différentes étapes de la production des boutures.

Conclusion

Dans nos conditions de culture *Laccaria bicolor* S238 N n'a pas d'effet bénéfique sur les croissances des parties aériennes et des racines de boutures de Douglas. Toutefois, la mycorhization des boutures de Douglas en serre a pu être obtenue dès la phase d'enracinement mais cette pratique doit être améliorée pour homogénéiser leur qualité et la réussite de l'inoculation mycorhizienne. Comme pour la production de plants de Douglas issus de semis inoculés par mycorhization contrôlée avec *Laccaria bicolor* S238 N (Genere *et al* 1997), il reste à déterminer si l'association ectomycorhizienne confère des avantages aux boutures pendant leur phase d'élevage en pépinière forestière et surtout après leur transplantation en forêt. Par ailleurs, des boutures d'arbres sélectionnés présentent des avantages génétiques qui laissent espérer l'obtention de peuplements de qualité. Mais avant d'envisager une production commerciale de ces boutures, elles devront impérativement avoir retrouvé une dominance apicale et croître de façon orthotrope. Coulaud et Verger (1993) ont montré que 60 % des boutures d'*Epicéa* produites en serre ont un port rampant ou buissonnant caractéristique de la plagiotropie en première année de repiquage en pépinière. Selon les clones, ce taux diminue après la plantation sur le terrain. Même si ce défaut de croissance tend à se résorber avec le temps, il est important de le prendre en compte car il peut entraîner des retards de croissance pendant les premières années de plantation et impliquer des investissements supplémentaires pour le dégagement des jeunes peuplements. Ces expériences ont donc donné des résultats préliminaires encourageants sur la possibilité de produire des boutures d'arbres forestiers mycorhizés mais de nombreux éléments techniques restent à maîtriser ou à améliorer avant d'envisager une production commerciale de variétés polyclonales de Douglas à grande échelle.

Bibliographie

Coulaud S., Verger M., 1993 - Production d'une variété multiclonale d'Epicéa commun. *Informations techniques du CEMAGREF* n°89.

David A., Faye M, Rancillac M., 1983 - Influence of auxin and mycorrhizal fungi on the in vitro formation and growth of *Pinus pinaster* roots *Plant and soil* 71, p. 501-505

Di Battista C., 1997 - Comportement en pépinière et en plantation d'un champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N inoculé sur Epicéa (*Picea abies*) et Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Typage moléculaire de la souche introduite - Nancy : Université Nancy I 1997, 90p. (thèse)

Gay G., 1990 - Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in de-rooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Canadian Journal of Botany* 68 : p. 1265-1270.

Génére B., Le Tacon F., Amirault JM., Bouchard D., - 1997. Itinéraire technique en pépinière pour le Douglas de type 1+1 mycorhizé par *Laccaria bicolor* S238N Numéro spécial Champignon et Mycorhizes en Forêt. *Revue Forestière Française.*, p. 155-162

Génére B., Bouchard D., Amirault JM., 1994 - La mycorhization contrôlée de boutures d'Epicéa (*Picea abies*) en pépinière. *Revue Forestière Française* XXXVI p. 49-58.

Karabaghli C., 1994 - Effet de trois souches de champignons ectomycorhiziens et d'une Bactérie Auxiliaire de la Mycorhization sur la rhizogénèse adventive d'hypocotyles d'Epicéa (*Picea abies* (L.) Karst.). Mémoire de DEA de Biologie forestière de l'Université de Nancy I.

Karabaghli C., 1997 - Rôle de l'AIA produit par *Laccaria bicolor* S238N sur la rhizogénèse de semis d'Epicea. Application à l'enracinement de boutures d'Epicéa et de Douglas. Thèse ENGREF Sciences forestières.

Le Tacon F., Bouchard D., 1986 - Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecologica / Oecologia Applicata* 7 : p. 389-407.

Le Tacon F., Garbaye J., Bouchard D., Chevalier G., Olivier JM., Guimberteau J., Poitou N., Frochet H., 1988 - Field results from ectomycorrhizal inoculation in France. In : *Canadian Workshop on mycorrhizae in forestry*. Eds. M. Lalonde et Y. Piché, p. 51-74.

Le Tacon F., Alvarez IF., Bouchard D., Henrion B., Jackson RM., Luff S., Parladé JI., Pera J., Stenström E., Villeneuve N., Walker C., 1992 - Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. *In : Mycorrhizas in Ecosystems*. Eds. D.J. Read, D.H. Lewis, A. Fitter, I. Alexander. Wallingford : C.A.B. International, p. 119-134.

Linderman RG., Call CA., 1977 - Enhanced rooting of woody plant cuttings by mycorrhizal fungi. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102 : p. 629-632.

Navratil S., Rochon GC., 1981 - Enhanced root and shoot development of poplar cuttings induced by *Pisolithus* inoculum. *Canadian Journal of Forest Research* 11 : p. 844-848.

Parladé J., Pera J., Alvarez IF., 1996 - Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6 : p. 237-245.

Parladé J., Pera J., Alvarez IF., 1997 - La mycorhization contrôlée du Douglas dans le Nord de l'Espagne : Premiers résultats en plantation. Numéro spécial Champignon et Mycorhizes en Forêt. *Revue Forestière Française*, p. 163-173

Riou-Nivert P., 1996 - *Les résineux. Tome I. Connaissance et reconnaissance*. Institut pour le Développement Forestier.

Ritchie GA., Tanaka Y., Meade R., Duke SD., 1993 - Field survival and early height growth of Douglas-fir rooted cuttings: relationship to stem diameter and root system quality. *Forest Ecology and Management* 60 : p. 237-256.

Sampangi R., Perrin R., Le Tacon F., 1985 - Disease suppression and growth promotion of Norway spruce and Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forest nurseries. *In : Mycorrhizae : physiology and genetics*. Publications INRA, Paris, p. 799-806.

Snedecor GW., Cochran WG., 1980 - *Statistical methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Stein A., Fortin JA., Vallée G., 1990 - Enhanced rooting of *Picea mariana* cuttings by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 68 : p. 468-470.



Etude de différentes méthodes de conduite du verger porte - boutures de Julior ® et Torinel ®

P. Michelot

CEPEM

Domaine de la Durette

84 140 Montfavet

Tél. 04 90 88 04 61

Fax 04 90 87 75 28

Résumé : Parmi les nouveaux porte-greffe de *Prunus* issus de l'INRA, Julior ® Ferdor et Torinel ® Avifel s'avèrent difficiles à bouturer.

Nous avons donc cherché à tester l'influence que peuvent avoir différentes modalités de conduite du verger donneur de boutures, sur la production de boutures de bois sec.

Il apparaît ainsi que la fertilisation du verger donneur de bouture à l'aide de la solution nutritive la plus riche en azote (14-6-24-3) donne les meilleurs résultats, et que la culture sous ombrière augmente le nombre de boutures produites par plant.

Après une période de conservation hivernale en chambre froide, les boutures ainsi produites seront repiquées en godet, sous serre froide, pour tester leur faculté d'enracinement.

Mot clés : bouturage / porte-greffe / fertilisation / ombrage / *Prunus*

Introduction

Parmi les nouveaux porte-greffe du genre *Prunus* issus de l'INRA, deux s'avèrent difficiles à multiplier dans des conditions économiques satisfaisantes par les méthodes de bouturage classiquement utilisées pour ce type de plants (boutures de bois sec) : Julior ® Ferdor et Torinel ® Avifel.

De plus, ces porte-greffes de *Prunus* ont naturellement tendance à être très ramifiés et épineux, ce qui rend difficile le prélèvement des boutures.

De ce fait, ils sont aujourd'hui essentiellement produits par multiplication *in vitro*, ce qui conduit à des coûts de production élevés.

C'est pourquoi il nous a été demandé d'étudier l'influence que peuvent avoir différentes techniques de conduite du verger porte-boutures sur la production de boutures et sur leur taux d'enracinement.

Différents travaux, portant sur d'autres genres que les *Prunus*, ont montré l'influence de la fertilisation des pieds-mères sur l'enracinement des boutures (Wiebel et al, 1990 ; Henry et al, 1992). D'autres ont montré, sur différentes espèces de feuillus, que l'étiollement peut être utilisé avec succès dans la préparation des boutures (Maynard et Bassuk, 1997).

Nous avons donc cherché, en fonction du matériel dont nous disposons, à tester l'influence de deux équilibres minéraux, ainsi que l'effet d'une culture sous ombrière ou d'une application de gibbérélines, sur la production de boutures dans un premier temps, puis sur leur enracinement.

1- Matériel et Méthodes

1-1 Matériel végétal

Julior ® Ferdor, hybride St Julien d'Orléans x Pershore, porte-greffe du Pêcher, Torinel ® Avifel, hybride Reine Claude x Reine Claude de Bavay, porte-greffe de l'Abricotier.

1-2 Modalités expérimentales

Les plants de chaque variété ont été repotés le 23 Avril 1996, en conteneurs de 15 litres, dans un substrat composé de 75 % de tourbe blonde et de 25 % de tourbe brune.

Au cours de la première saison de végétation, tous les plants ont été conduits de la même façon, l'objectif de cette première année de culture étant d'obtenir des plants homogènes, bien enracinés et ayant une vigueur optimale.

En 1997, les plants ont été laissés en conteneurs de 15 litres et ont été pincés le 11 Avril de façon à amplifier leur ramification. Ils ont ensuite été soumis aux différentes modalités ci-dessous :

Culture en extérieur ou sous ombrière (Ombrage 30 %)

Les plants cultivés sous l'ombrière l'ont été à partir du 27 Mai, les autres plants restant sur une aire à conteneur en extérieur.

Fertilisation.

Apport d'une solution nutritive préparée à l'aide d'un engrais soluble d'équilibre 8 - 12 - 24 - 4 , une fois par jour, (FERTI 1),

Apport d'une solution nutritive préparée à l'aide d'un engrais soluble d'équilibre 14 - 6 - 24 - 3, une fois par jour, (FERTI 2),

Pour les deux solutions nutritives, la conductivité électrique et le pH adoptés sont de :

1,8 mS / cm, et pH 5,8 du déclenchement de la fertirrigation, le 17 Juin, jusqu'au 18 Juillet

puis 2 mS / cm, et pH 5,8, jusqu'au 30 Septembre

et enfin 1 mS / cm, et pH 5,8, jusqu'à l'arrêt de la fertirrigation, le 15 Octobre.

Traitement à l'aide de Gibbéréline.

Pulvérisation à goutte pendante d'une bouillie dosée à raison de 1 comprimé de BERELEX (0,92 g de GA₃ / comprimé), dans 100 litres d'eau (GIBB 1).

Pulvérisation à goutte pendante d'une bouillie dosée à raison de 2 comprimés de BERELEX (0,92 g de GA₃ / comprimé), dans 100 litres d'eau (GIBB 2).

La pulvérisation a été effectuée le 26 Juin à l'aide d'un appareil à dos (Vermorel électrique) équipé d'une buse à turbulence, en un passage de part et d'autre du rang, ce qui conduit à utiliser 80 ml de bouillie par plant.

Le tableau 1 récapitule l'ensemble des modalités expérimentales.

JULIOR ® Ferdor ET TORINEL ® Avifel									
OMBRIERE				EXTERIEUR					
FERTI 1		FERTI 2		FERTI 1			FERTI 2		
TEM	GIBB	TEM	GIBB	TEM	GIBB	GIBB	TEM	GIBB	GIBB
	1		1		1	2		1	2

Tableau n° 1 : Modalités expérimentales

1-3. Dispositif expérimental

Extérieur :

3 blocs,

2 variétés,

6 modalités,

Ombrière :

2 blocs,

2 variétés,

4 modalités,

8 ou 10 plants par parcelle élémentaire, 9 ou 12 plants par parcelle élémentaire,
soit un total de 492 conteneurs.

2- Résultats

2-1 Production de bois de taille en fin de saison

Lors de la coupe du bois, qui a eu lieu le 13 Novembre 1997, le bois de taille a été pesé. Au cours de cette opération, ont été prélevées toutes les branches suffisamment fortes pour permettre la préparation de boutures.

Julior ® Ferdor

Les résultats des pesées sont présentés sur les figures n° 1 et 2. L'analyse de variance effectuée sur ces résultats au seuil α de 5% permet de constater que, pour la culture en extérieur, la fertilisation n° 2, réalisée avec la solution nutritive d'équilibre 14-6-24-3, donne une production de bois supérieure à celle réalisée avec l'engrais moins dosé en azote.

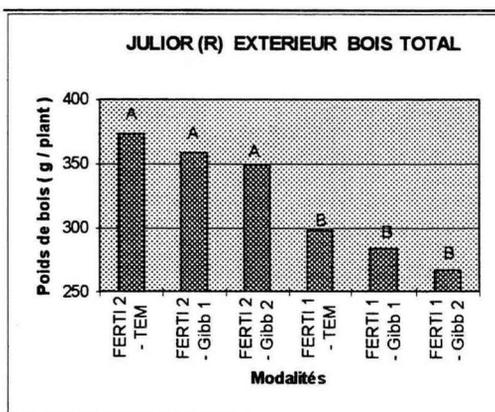


Figure 1 : Production totale de bois d'une culture en extérieur.

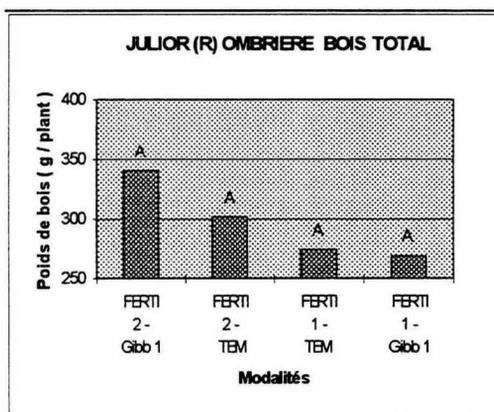


Figure 2 : Production totale de bois d'une culture sous ombrière

Torinel ® Avifel

Les résultats des pesées sont présentés sur les figures n° 3 et 4. L'analyse de variance indique que Torinel ® Avifel a le même comportement que Julior ® Ferdor, vis à vis de la fertilisation.

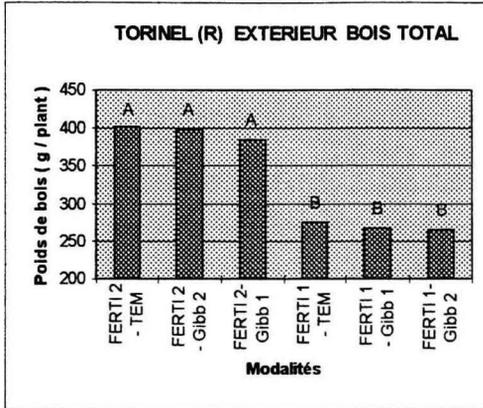


Figure 3 : Production totale de bois d'une culture en extérieur

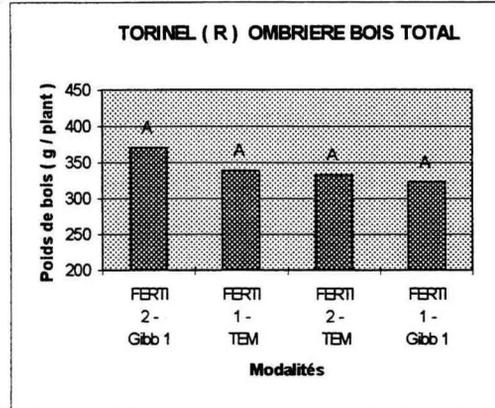


Figure 4 : Production totale de bois d'une culture sous ombrière

2-2 Production de bois utilisable

Une fois le bois de taille prélevé, il est préparé. Pour cela, toutes les ramifications trop courtes, qui sont souvent transformées en épines chez les Pruniers, ou trop fines pour constituer une bouture, sont enlevées. Il reste alors le bois effectivement utilisable, appelé bois « chicoté », qui sera ultérieurement tronçonné en boutures.

Julior ® Ferdor

Les résultats des pesées sont présentés sur les figures n° 5 et 6. L'analyse de variance confirme pour la culture en extérieur l'influence positive de la solution la plus riche en azote sur la production de bois chicoté

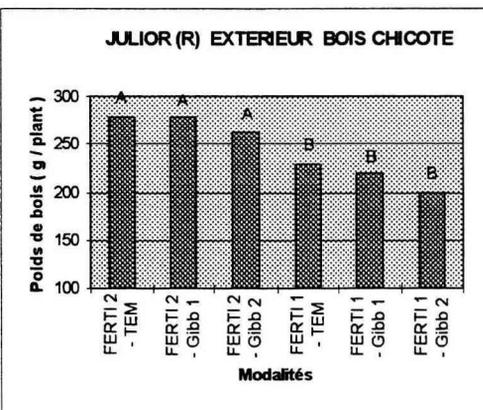


Figure 5 : Production de bois utilisable d'une culture en extérieur

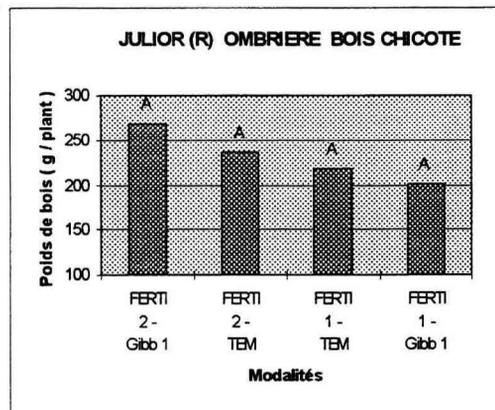


Figure 6 : Production de bois utilisable d'une culture sous ombrière

Torinel ® Avifel

Les résultats des pesées sont présentés sur les figures n° 7 et 8. Ils confirment sur Torinel ® Avifel les résultats trouvés pour Julior ®.

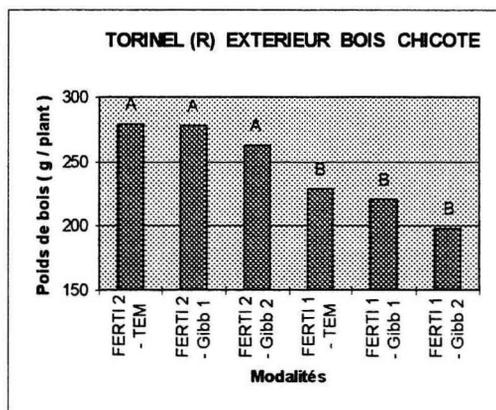


Figure 7 : Production de bois utilisable d'une culture en extérieur

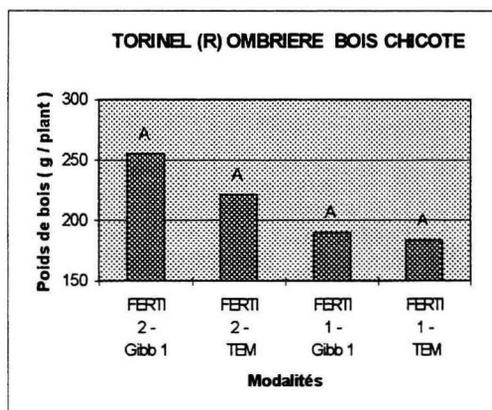


Figure 8 : Production de bois utilisable d'une culture sous ombrière

2-3 Production de boutures

Une fois le bois préparé, il a été réparti en trois lots de même poids, chaque lot étant confié à un pépiniériste. Chacun des trois pépiniéristes a donc préparé ses boutures, selon ses habitudes, et le nombre de boutures réalisées par chacun a été compté, en fonction des différentes modalités de culture.

Julior ® Ferdor

L'analyse de variance effectuée sur les quantités de boutures produites, au seuil α de 5%, ne permet pas de mettre en évidence une éventuelle différence entre les deux modalités de fertilisation

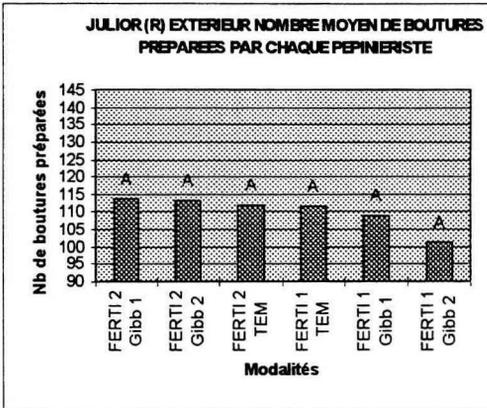


Figure 9 : Production de boutures d'une culture en extérieur

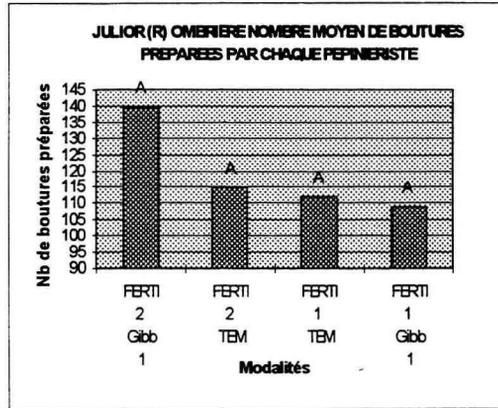


Figure 10 : Production de boutures d'une culture sous ombrière

Torinel ® Avifel

Sur Torinel ® Avifel l'analyse de variance montre que le nombre de boutures produites sous ombrière et à l'extérieur dépend des modalités expérimentées (figures n° 11 et 12).

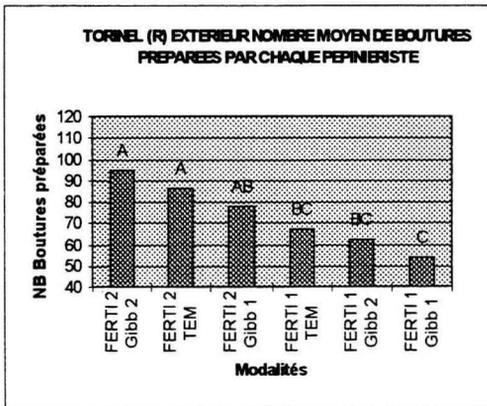


Figure 11 : Production de boutures d'une culture en extérieur

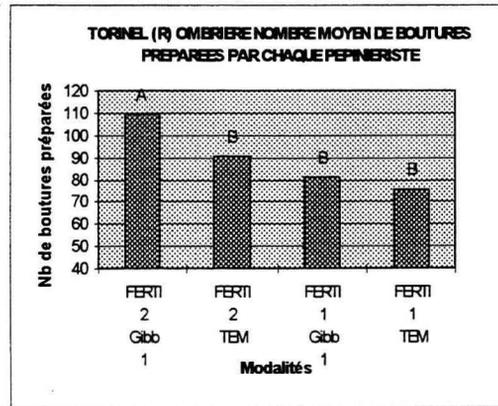


Figure 12 : Production de boutures d'une culture sous ombrière

3- Discussion

Il apparaît que, pour la culture en extérieur, la fertilisation la plus riche en azote (équilibre 14-6-24-3) donne les meilleurs résultats en terme de production de bois et de bois chicoté pour Julior ® Ferdor et pour Torinel ® Avifel. Pour la production de boutures, il n'apparaît de différences significatives entre les modalités que pour Torinel ® Avifel.

Sous ombrière, avec aucun des deux porte-greffe il n'apparaît de différence significative entre les modalités pour la production de bois et de bois « chicoté ». Pour la production de boutures, la modalité FERTI 2 - Gibb 1 se détache des autres (significativement uniquement pour Torinel ®).

Si l'on s'en tient à cette modalité, le nombre de boutures produites pour chaque variété est illustré par les figures n° 13 et 14, qui permettent de comparer le nombre de boutures produites en extérieur et sous ombrière.

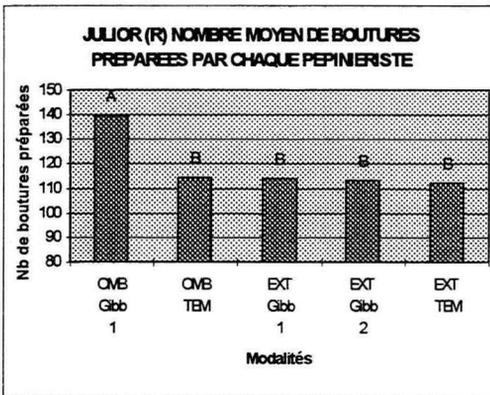


Figure 13 : Production de boutures avec la solution fertilisante d'équilibre 14-6-24-3

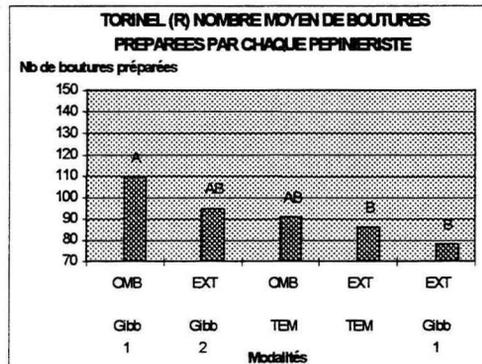


Figure 14 : Production de boutures avec la solution fertilisante d'équilibre 14-6-24-3

Ainsi pour la fertilisation avec la solution nutritive d'équilibre 14-6-24-3, la modalité « culture sous ombrière et plants traités à l'aide de gibbéréline dose 1 » donne les meilleurs résultats quelque soit le porte-greffe.

Conclusion

Il apparaît que des deux équilibres de fertilisation utilisés, le plus riche en azote donne les meilleurs résultats.

De toutes les modalités testées dans cet essai, c'est la culture sous ombrière, avec une fertilisation à l'aide d'une solution nutritive d'équilibre 14-6-24-3, et traitement des plants à l'aide de gibbérélines, qui permet d'obtenir le plus grand nombre de boutures.

Il reste cependant à vérifier l'influence de ces différentes modalités de conduite du verger, sur la faculté d'enracinement des boutures.

Bibliographie

Henry P.H., Blazich F.A., Hinesley L.E., 1992- Nitrogen nutrition of containerized eastern redcedar II. Influence of stock plant fertility on adventitious rooting of stem cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117 (4) : pp 568-570.

Maynard B.K, Bassuk N.L., 1997- Stockplant etiolation and blanching of woody plants prior cutting propagation, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112(2), pp 273-276.

Wiebel J., Kupper W., Ludders P., 1990- Influence of the nutritional status of the stock plant on rooting of Mango cuttings (*Mangifera indica* L.), *Gartenbauwissenschaft*, 55 (5), pp 213-216.

Le bouturage traditionnel du poirier

Rooting of pear by cutting

J. Lemoine, J.C. Michelesi, G. Allard

INRA - Unité d'Amélioration des Espèces Fruitières et Ornementales

BP 57 49071 BEAUCOUZÉ Cedex

Tél. 02 41 22 57 52

Fax 02 41 22 57 55

E-mail : lemoine@angers.inra.fr

Résumé : Le poirier peut se bouturer à trois époques de l'année : au printemps en vert, en été en semi-ligneux et en hiver en ligneux. Les trois techniques sont évoquées avec leurs avantages et leurs inconvénients et les conditions les plus favorables à la multiplication sont données. Le bouturage semi-ligneux semble être la technique qui s'adapte la mieux à cette espèce.

Mots-clés : poirier, bouturage ligneux, bouturage herbacé, bouturage semi-ligneux

Abstract: *Rooting a pear tree is possible by softwood cutting in the spring, semi-hardwood cutting in summer or hardwood cutting in winter. The advantages and disadvantages as well as the best conditions for rooting are described for every technique. Semi-hardwood cuttings seem to be the best solution for this species.*

Keywords: *pear, cutting, softwood cutting, hardwood cutting, semi hardwood cutting*

Introduction

Un poirier cultivé se compose de deux voire trois partenaires : le porte-greffe, le cognassier *Cydonia oblonga* ou le franc *Pyrus communis*, la variété et parfois un intermédiaire entre la variété et le porte-greffe. La multiplication traditionnelle du cognassier est le marcottage avec des taux d'enracinement très élevés. Le franc est obtenu par semis avec des taux de germination de l'ordre de 98 à 100%.

La multiplication des variétés (et de l'intermédiaire) se fait par greffage sur l'un ou l'autre des porte-greffe.

L'association variété-porte-greffe pose quelques problèmes. Les arbres greffés sur franc sont sensibles au dépérissement du poirier (Pear decline), maladie à phytoplasme, qui induit une nécrose au point de greffe entraînant la mortalité plus ou moins rapide des arbres.

Les variétés cultivées sont sensibles au feu bactérien (*Erwinia amylovora*), maladie qui détruit la partie aérienne de l'arbre. Aussi pour lutter indirectement contre les effets du feu bactérien la technique, préconisée aux USA dans les années cinquante, était de greffer la variété résistante 'Old Home' pour assurer la charpente des arbres et de greffer au-dessus la variété commerciale en l'occurrence 'William's'.

Pour réaliser de nouvelles combinaisons porte-greffe-greffon qui résistent mieux à ces maladies, des travaux de bouturage ont débuté en Californie (Hartmann et Hensen 1957). Ces travaux portent d'une part sur la multiplication de la variété 'Old Home' pour l'utiliser directement comme porte-greffe (lutte indirecte contre le feu bactérien) et d'autre part sur la multiplication de la variété 'William's', pour lutter contre le "Pear decline".

L'association poirier-cognassier n'est pas toujours parfaite et de nombreuses variétés ont des problèmes de compatibilité au greffage qui entraînent une casse au niveau de l'union plus ou moins précoce. De plus l'association se comporte assez mal dans les terrains calcaires. Pour essayer de résoudre ces problèmes, la multiplication des variétés par bouturage a été entreprise à l'Unité d'Amélioration des Espèces Fruitières et Ornementales d'Angers dans les années soixante, principalement avec la variété 'William's' qui pose le plus de problèmes en culture.

D'autre part, l'étude des cognassiers porte-greffe a montré une faible variabilité dans la vigueur conférée aux variétés. Aussi, l'Unité d'amélioration d'Angers et des stations de recherches étrangères ont entrepris des travaux pour la création de porte-greffe dans la genre *pyrus* en clonant des francs. Les candidats à faire un porte-greffe ne se multiplient pas par marcottage. Au début, vu le nombre important de clones présélectionnés, seul le bouturage traditionnel est utilisé. Par la suite pour les clones sélectionnés la multiplication *in vitro* est envisagée.

Le bouturage qui consiste à prélever des rameaux en hiver, à les mettre dans du sable au nord et à les planter au printemps, ne donne aucun résultat avec le poirier. C'est grâce à l'utilisation des hormones tel que l'acide naphthalène acétique (ANA) ou l'acide indol-butérique (AIB) et à la brumisation ("Mist" ou "Fog" system) que le bouturage du poirier a pu être réalisé.

Pour réussir un bon bouturage de nombreux facteurs sont à prendre en considération: le substrat de culture, le type de bouture et l'époque de prélèvement, l'aptitude variétale à bouturer, l'état des pieds-mères, les facteurs climatiques, le développement des boutures, la survie des plants enracinés au cours de l'hiver, la reprise en pépinière, le comportement en verger...

Il sera fait état ici de quelques conclusions d'essais qui ont été réalisés soit avec la variété William's en bouturage de printemps et d'hiver soit sur une gamme de porte-greffe en bouturage de printemps et d'été.

1- Bouturage de printemps ou bouturage herbacé ou bouturage en vert

Les boutures herbacées sont prélevées dès que les pousses de l'année ont atteint environ 20 à 25 cm de longueur, ce qui se situe en Anjou en fonction de l'année entre le 15 mai et le 15 juin, soit environ 40 à 50 jours après la pleine floraison du poirier. Le feuillage doit être particulièrement sain (pas de déchirures par le vent, pas d'attaque parasitaire). Le prélèvement doit se faire tôt le matin afin d'éviter tout flétrissement. Pour cela les boutures seront bassinées régulièrement à l'aide d'un pulvérisateur. Si les boutures flétrissent, elles se déforment plus sous l'effet de l'hormone et les feuilles se nécrosent rapidement au niveau de la pointe .

Une fois prélevées les boutures sont préparées rapidement. Elles ont environ 15 à 20 cm de longueur (la partie basale est éliminée), la coupe pratiquée au-dessus d'un oeil est légèrement biseautée. Deux à trois feuilles bien développées sont gardées en plus des petites feuilles d'extrémité.

La base des boutures est traitée par une hormone de croissance. Dans nos essais de multiplication de la variété William's deux hormones ont été testées, l'acide naphthalène acétique (ANA) et l'acide indol-butérique (AIB). Elles ont été appliquées à la base des boutures sur environ 4 cm. Trois modes d'application ont été essayés : le poudrage, le trempage rapide (3 à 4 secondes), le trempage lent (18 heures). Les concentrations sont variable en fonction du mode d'application, 10 000 et 8000 ppm en poudrage, 8000 et 4000 ppm en trempage rapide, 100 et 50 ppm en trempage lent. Les résultats sont donnés dans le tableau n° 1.

Mode d'application	Dose en ppm	A I B	A N A	Moyenne
Poudrage	10 000	93	85	90
	8 000	90	92	
Trempage rapide	8 000	66	65	68
	4 000	82	60	
Trempage lent	100	26	51	34
	50	28	30	

Tableau n° 1 : Mode d'application et concentration des hormones : pourcentage de boutures enracinées

Il apparaît que le poudrage donne les meilleurs résultats puisque en moyenne, toute concentration et type d'hormone confondus, le taux d'enracinement ⁽¹⁾ est de 90 avec un maximum pour l'AIB à la dose de 10 000 ppm. Par la suite pour des raisons de coût et de difficulté de mélange l'ANA a été abandonné.

La dose de 10 000 ppm d'AIB est favorable à l'enracinement mais la partie aérienne se déforme sous l'effet de l'hormone ce qui rend difficile l'utilisation de ces boutures pour faire de beaux plants.

Pour la multiplication des porte-greffe, des doses plus réduites ont été utilisées pour essayer d'éviter le problème de déformation. Les doses en poudrage ont été de 8 000, 5 000 et 2 500 ppm et en trempage rapide de 4 000 ppm (utilisation d'une solution commerciale : exuberone liquide). Le trempage rapide à 4 000 ppm a permis d'obtenir un taux d'enracinement moyen pour l'ensemble des 38 porte-greffe testés (tableau n° 2). Ce taux est de 70 à 90% avec une fluctuation propre à chaque porte-greffe pour le groupe qui racine le mieux et pour les autres aux environs de 50%.

	Poudrage			Trempage
	2500	5000	8000	4000
OHF 333	93	81	70	90
Moyenne des 38 porte-greffe	39	51	65	73

Tableau n° 2 : Taux d'enracinement en fonction de la dose d'IBA et du mode d'application.

Deux types de boutures ont été testés : des boutures de tête et des boutures de base. Celles qui se comportent le mieux et qui se déforment le moins sous l'effet de l'hormone sont les boutures de base. Cependant il n'existe pas une constante annuelle dans les résultats. Ils dépendent du stade physiologique des boutures au moment du prélèvement et du début de lignification de la partie basale des pousses.

Le taux d'enracinement peut être modifié par le milieu de culture. Plusieurs milieux ont été essayés pour la multiplication de la variété William's : substrats de culture à base de tourbe pure ou mélangée avec du sable dans les proportions 75%, 50 %, 25 % et à base de vermiculite n° 2 pure ou mélangée avec du sable dans les mêmes proportions. Le sable pur servait de témoin. Le tableau n° 3 montre que le mélange tourbe 75%- sable 25% donne les meilleurs résultats. C'est le même milieu qui a donné de bons résultats pour la multiplication des porte-greffe.

(1) Le taux d'enracinement = nombre de boutures enracinées / nombre de boutures mises en place x 100

Substrat :	Proportion en %			
	100	75 + 25 sable	50 + 50 sable	25 + 75 sable
Tourbe	65	80	74	69
Vermiculite	68	64	54	65
Sable	58	-	-	-

Tableau n° 3 : Substrats, pourcentage de boutures enracinées (moyenne de 3 années)

Au début de nos expérimentations, les boutures de William's étaient placées dans des bâches composées d'un sous sol de terreau de feuilles recouvert du substrat de multiplication. Les boutures une fois enracinées restaient en place une année avant d'être plantées en verger. Cette technique n'est pas satisfaisante pour la production de porte-greffe. Aussi, pour leur multiplication, nous utilisons des pots individuels de type "Jiffy'pot".

Le bouturage est réalisé sous tunnel plastique, avec une brumisation de type "Mist" ou de type "Fog". Le milieu est humidifié 48 heures avant la mise en place des boutures et l'ambiance saturée en humidité. Le sol est chauffé par des résistances électriques et maintenu à la température de 18°C.

Dès que les boutures sont installées, elles sont traitées le soir même avec un fongicide. Ce traitement est renouvelé tous les trois jours pendant la période d'arrosage.

- Sous "Mist" le temps d'arrosage est de 30 secondes toutes les 4 minutes la première semaine, puis de 40 secondes toutes les 10 minutes la deuxième semaine et au cours des 2 ou 3 semaines suivantes 30 secondes le matin avec un arrêt de 2 heures puis reprise de la fréquence de 40 secondes toutes les 10 minutes. Le tunnel est ombré.

- Sous "Fog" l'humidité est maintenue à saturation grâce à un hygromètre pendant une quinzaine de jours puis diminuée progressivement. Du fait de l'opacité du brouillard, aucun ombrage n'est nécessaire.

Un apport de solution nutritive est effectué toutes les semaines dès l'apparition des premières racines.

Diverses variétés et porte-greffe ont été multipliés par bouturage dans les mêmes conditions de culture (AIB 8000 ppm, substrat tourbe 75% - sable 25%) et de grandes différences dans le taux de multiplication ont été observées. L'aptitude à la rhizogénèse est aussi fonction du génotype. Ainsi le taux de multiplication varie pour de 60 à 100% 'William's', de 70 à 80% pour 'Old home' et 'Alexandrine Douillard' alors que pour 'Passe Crassane' ou 'Beurré d'Anjou' le taux varie de 0 à 20%. Il en est de même pour les porte-greffe (tableau n° 4).

semis de Old Home x Farmingdale (OHF)													
%	69*	51	266	40	87	230	217	288	226	34	333	18	282
enracinement	43	57	58	61	63	64	68	74	77	83	88	97	98
	a (1)	a	a	ab	ab	ab	b	b	bc	c	c	d	d

* ces chiffres correspondent à des sélections parmi la descendance Old Home x Farmingdale

(1) les valeurs affectées de la même lettre ne diffèrent pas entre elles significativement au seuil d'erreur de 5%

Tableau n° 4 : Taux d'enracinement de quelques porte-greffe issus du croisement contrôlé Old Home x Farmingdale

Il est à noter que le matériel difficile à multiplier par bouturage l'est aussi *in vitro*. Le taux d'enracinement est très influencé par les conditions météorologiques au cours du bouturage et plus particulièrement par l'ensoleillement. En effet plus la durée d'ensoleillement est importante, plus le taux d'enracinement est élevé. Les boutures herbacées avant d'être plantées en verger ou en pépinière doivent passer la période hivernale. Pour que le taux de survie⁽²⁾ soit élevé, il faut que les boutures aient une croissance au cours de l'été et que les racines soient lignifiées. Cette reprise de croissance après l'enracinement est souvent difficile à obtenir avec le poirier. Aussi pour supprimer la dominance apicale, des boutures ont été étêtées au moment du bouturage. Le taux d'enracinement a été accru et les boutures ont fait une petite croissance ce qui s'est traduit par un accroissement du taux de multiplication⁽³⁾ (tableau n° 5). Les boutures qui n'ont pas eu de croissance ont des difficultés à survivre au cours de l'hiver. Au printemps, on observe une mortalité de la partie aérienne. Les racines sont en général encore vivantes et une nécrose non parasitaire s'observe juste au-dessus des racines

	Taux		
	d'enracinement	de survie	de multiplication
Boutures avec apex	90	89*	72*
Boutures sans apex	91	93	84

*différent significativement au seuil d'erreur de 5% (test de Duncan)

Tableau n° 5 : Comparaison des taux d'enracinement, de survie et de multiplication des boutures de la variété William's avec ou sans apex

(2) Taux de survie = nombre de boutures enracinées vivantes après l'hiver / le nombre total de boutures enracinées x 100

(3) Taux de multiplication = nombre de boutures plantables / le nombre de boutures mises en place x 100

L'état sanitaire du matériel vis-à-vis des maladies de dégénérescence est un autre facteur qui modifie le taux de multiplication. Le tableau n° 6 montre que le matériel contaminé par la maladie à virus de la Jaunisse des nervures (vein yellows) réduit le taux d'enracinement, à l'exception de la variété Comice. Elle augmente la mortalité des plants en hiver et de ce fait réduit le taux de multiplication.

Variété	Etat sanitaire	Taux		
		enracinement	survie	multiplication
William's	sain	99	83	82
	<i>Vein yellows</i>	88	71 *	71 *
Comice	sain	89	49	44
	<i>Vein yellows</i>	92	23 *	21 *
Conférence	sain	82	29	23
	<i>Vein yellows</i>	48 *	31	15**
Guyot	sain	96	30	29
	<i>Vein yellows</i>	82	19 *	16**
Moyenne	sain	92	48	45
	<i>Vein yellows</i>	78 *	36 *	30 *

* significatif au seuil d'erreur de 5% (test de Duncan)

** significatif au seuil d'erreur de 1%

Tableau n° 6: Incidence de la maladie du vein yellows sur le taux d'enracinement, de survie et de multiplication de quelques variétés de poirier.

2- Bouturage d'été ou bouturage semi-ligneux

Les boutures semi-ligneuses sont prélevées courant Août lorsque les pousses commencent leur arrêt de croissance. Cette date est difficile à déterminer avec précision et varie d'une année à l'autre. Son déterminisme est sous la dépendance des conditions climatiques et des conditions de culture. Toutefois des essais effectués sur quatre porte-greffe (2 difficiles à bouturer et 2 plus faciles) ont montré que la période favorable se situe en Anjou entre le 10 et le 25 août (tableau n° 7).

Porte-greffe	périodes de bouturage		
	10-12 Août	24 - 26 Août	8-10 Septembre
OHF 333	84	97	49
OH 11	91	88	47
OHF 51	77	56	31
OH 20	57	68	27
MOYENNE	77	78	38

Tableau n° 7 : taux d'enracinement en fonction de la date de bouturage

Un autre avantage est que le système racinaire des boutures prélevées au mois d'août est plus important. De plus il est lignifié au moment de l'arrachage en novembre, ce qui améliore fortement la reprise en pépinière.

Les boutures mises en place ont environ 30 cm de long. La coupe de leur base réalisée au-dessus d'un oeil est légèrement biseautée et les 3 à 4 feuilles de la partie basse sont supprimées. A la base des boutures un traitement hormonal est appliqué soit en poudrage soit en trempage rapide. Les doses suivantes ont été testées: AIB en poudrage à la dose de 5 000 et 10 000 ppm et AIB 4 000 ppm en trempage dans une solution "d'exubérone liquide".

Le tableau n° 8 montre que le trempage rapide à 4000 pmm donne de bons résultats quelle que soit l'aptitude à bouturer des porte-greffe. C'est cette dose qui a été utilisée par la suite pour ce type de bouturage.

	poudrage		trempage
	AIB 5000	AIB 10000	Exubérone 4000
OHF 333	90	86	98
OH 11	86	90	92
OHF 51	60	52	88
OH 20	70	66	72
MOYENNE	76,5	73,5	87,5

Tableau n° 8: taux d'enracinement en fonction de la dose et du mode d'application de l'hormone

Les boutures sont placées sous 'Fog', avec des fréquences d'arrosage identiques à celles des boutures herbacées. Quarante huit heures avant la mise en place des boutures, la brumisation est mise au maximum et l'hygrométrie sera maintenue au taux le plus élevé toute la première semaine. Par la suite, il sera réduit progressivement. Dès que les boutures ont enraciné un apport hebdomadaire de solution nutritive est appliqué. Tout au long de la multiplication les boutures reçoivent tous les 2 jours un traitement fongique.

Nous avons testé divers milieux de bouturage à base de perlite, tourbe et sable dans des proportions variables et un mélange composé de 1/3 de terreau de feuilles, 1/3 de terre franche et 1/3 de sable. En moyenne, sur 30 porte-greffe testés, c'est dans le mélange 1/3 sable- 1/3 tourbe- 1/3 sable que le taux d'enracinement a été le plus élevé (tableau n° 9) .

	OHF 333	OHF 51	Moyenne 30 PG
Perlite 50%-tourbe 50 %	40		53
Perlite 50%-sable 50%	28		41
Tourbe 50%-sable 50%	84		53
Tourbe 75%- sable 25%	100		49
1/3 tourbe-1/3 sable-1/3 perlite	90		76
Mélange rempotage	60		57

Tableau n° 9 : Taux d'enracinement en fonction du substrat

Pour faciliter la transplantation divers supports ont été essayé à savoir des "Jiffy" des "Melfert" et des caisses de polystyrène. Le taux d'enracinement en "Melfert" est bon (tableau n° 10) mais les racines apparaissent au-dessus du support de culture. La base des boutures pourrit dans ce support, ce qui réduit considérablement le taux de multiplication.

	Caisse	Jiffy	Melfert
OHF 333	80	95	98
OH 11	84	100	98
OHF 51	76	70	76
OH 20	56	55	58
Moyenne	74	80	83

Tableau n° 10 : taux d'enracinement et support de culture

Avec ce type de bouture, il y a peu de mortalité au cours de l'hiver et ce d'autant plus que les boutures sont faites tôt. Par contre si le bouturage est tardif, le taux de multiplication peut être diminué par une difficulté de survie en pépinière liée principalement à la mauvaise lignification des racines et à leur faible nombre.

3- Bouturage d'hiver ou bouturage ligneux.

Il se pratique au cours du repos végétatif de novembre à février. Les boutures sont prélevées sur des rameaux de 40 cm de longueur et deux types de boutures peuvent être utilisés

- les boutures de tête qui comportent l'oeil terminal du rameau,
- les boutures de base (sans talon) prélevées vers la base des rameaux et dont la coupe supérieure est faite au-dessus d'un oeil.

La longueur des boutures est comprise entre 20 et 25 cm. Elles seront mises en paquets de 25. Comme pour les bouturages précédent, la date de prélèvement est importante. Des prélèvements ont été effectués tous les 10 jours entre le 4 novembre et le 17 février pendant deux années consécutives.

A la base des boutures, l'hormone est appliquée sous trois formes : le trempage lent (15 heures), le trempage rapide (3-4 secondes) et le poudrage à des doses de 100, 500 et 1 000 ppm en trempage lent, 3 000, 5 000 et 7 000 ppm en trempage rapide et à 10 000 ppm en poudrage.

La dose 500 ppm en trempage lent et 3000 ppm en trempage rapide sont les concentrations optimales (tableau n° 11).

Taux d'enracinement en							
	Trempage lent à			Trempage rapide à			Poudrage
	100	500	1000	3000	5000	7000	10 000
Tête	5	46	46	55	25	1	28
Base	27	62	33	62	48	0	8

Tableau n° 11: Taux d'enracinement en fonction de la concentration et du mode d'application de l'hormone sur les boutures de tête et de base

Après l'hormonage, ce type de bouture doit être stratifié avant transplantation. La stratification est effectuée en paquet de 25 boutures posées verticalement dans le substrat (en général du sable) pendant que le 1/3 supérieur de la bouture est maintenue à l'air libre afin que les bourgeons puissent recevoir une quantité suffisante de froid. La température du substrat est maintenue à 18-20°C. Dans un essai nous avons fait varier la durée de stratification de 13, 17, 21, 25, et 29 jours. Les boutures étaient traitées à l' AIB 3000 ppm en trempage rapide.

L'enracinement est quasiment nul la première quinzaine de décembre ce qui correspond à la dormance des arbres. Encadrant cette période sur une dizaine de jours le taux d'enracinement est peu élevé. Il devient plus élevé à partir de la 3^{ème} décennie de décembre. Il est à noter une grande divergence entre les boutures de base et les boutures de tête en novembre phénomène qui s'inverse en décembre et février .

Il apparaît que 21 jours est la durée optimale de stratification pour avoir un taux d'enracinement qui avoisine les 63% en bouture de tête et avoir des boutures saines (tableau n ° 12).

		durée de stratification				
		13	17	21	25	29
Tête	% enraciné	0	4	63	57	51
	% de pourrie	0	0	0	20	22
Base	% enraciné	0	0	20	11	27
	% pourrie	0	0	0	22	25

Tableau n° 12: Taux d'enracinement et état sanitaire après la stratification

Par contre deux mois après la plantation, ce sont les boutures stratifiées pendant 17 jours qui ont eu le meilleur comportement en bouture de tête (tableau n° 13).

		durée de stratification				
		13	17	21	25	29
Tête	% enraciné	65	85	65	45	15
	% pourrie	80	35	50	100	95
Base	% enraciné	10	35	60	11	13
	% pourrie	90	90	85	100	100

Tableau n° 13 : durée de stratification , pourcentage de boutures enracinées et pourcentage de boutures pourries 2 mois après transplantation

Pour essayer de limiter les pourritures, une adjonction de fongicide après le traitement auxinique a été effectuée avec du Captane (50% de matière active), du Thirame (80% de matière active), du Zirame (90% de matière active). Le taux d'enracinement est diminué en présence de Zirame, et le Thirame inhibe la rhizogénèse dans des proportions importantes. Par contre le Captane ne modifie pas le taux d'enracinement (tableau n° 14).

		Témoin	Captane	Zirame	Thirame
Tête	% enraciné	36	35	26	12
	% pourrie	12	0	0	0
Base	% enraciné	43	34	24	1
	% pourrie	3	0	0	0

Tableau n° 14 : traitements fongiques et taux d'enracinement et de pourriture

Conclusion

Le bouturage traditionnel du poirier permet de multiplier un grand nombre de variétés et de porte-greffe mais les résultats ne sont pas constants d'une année sur l'autre. Ce fait est à relier avec l'absence de point de repères physiologiques pour déclencher le bouturage. A cela vient s'ajouter l'aptitude particulière de chaque génotype à émettre des racines et à reprendre en transplantation.

- Le bouturage ligneux qui serait le moins onéreux (pas besoin d'installation particulière, de brumisation...) est celui qui donne les moins bons taux de multiplication malgré un taux d'enracinement moyen. Les boutures pourrissent et le départ des bourgeons entre en concurrence avec le développement des racines; ce déséquilibre entraîne la mortalité.

- Le bouturage herbacé est le plus coûteux puisque les plants obtenus en fin de saison ne sont pas assez développés pour être plantés et doivent donc être mis en pépinière de grossissement. Ces boutures ont en général un très bon taux d'enracinement et le taux de multiplication est fonction de la reprise de végétation après l'enracinement, ce qui n'est pas toujours possible d'obtenir. De plus, elles sont très sensibles à la mortalité durant l'hiver.

- Le bouturage 1/2 ligneux est un bon compromis pour l'obtention de plants. Le taux de multiplication est en général assez élevé, si les boutures sont faites assez tôt. Par contre le taux d'enracinement diminue au fur et à mesure que les pieds-mères vieillissent. Ces derniers doivent être taillés très sévèrement pour essayer de conserver un "pseudo état juvénile" et être rabattus assez bas pour rapprocher les rameaux du système racinaire.

Dans l'ensemble ce matériel demande un suivi régulier pour assurer la reprise en pépinière. En verger ce matériel est sensible aux conditions de cultures (nature du sol, stress hydrique...) ce que l'on retrouve aussi avec du matériel provenant de la culture *in vitro*.

Bibliographie

Hartmann H.T. et Hansen C. J., 1957 - Tree fruit cutting propagated. *California Agric.*, p. 11 (7) 3-4, 16

Lemoine J., Michelesi J.C. et Allard G., 1995 - Bouturage herbacé et semi ligneux de quelques porte-greffe *Pyrus* pour le poirier(1ère partie). *L'arboriculture fruitière* n° 489, p. 18-22.

Lemoine J., Michelesi J.C. et Allard G., 1995 - Bouturage herbacé et semi ligneux de quelques porte-greffe *Pyrus* pour le poirier(2ème partie). *L'arboriculture fruitière* n° 490, p. 24-29.

Thibault B. et Hermann L., 1966 - Essais de bouturage herbacé de la variété William's (*Pyrus communis* L.). *Ann. Amélior. Plantes*, 16(3), p. 273-298.

Thibault B. et Hermann L., 1971 - Essais de bouturage ligneux de la variété William's (*Pyrus communis* L.). *Ann. Amélior. Plantes*, 21(4), p. 423-443.

Action de la position (topophysie) des boutures de rosier sur le développement de la ramification

Influence of cutting position (topophysis) on subsequent development of ramification in rose

M. Le Bris, A. Champéroux, P. Bearez

I.N.R.A. – Unité de Recherches Intégrées en Horticulture
Route des Colles, Sophia Antipolis, 06410 BIOT
Tél. 04 92 96 26 50
Fax. 04 93 65 33 18
E-mail : lebris@antibes.inra.fr

Résumé : L'action de la position (topophysie) des bourgeons axillaires sur leurs potentialités de croissance et de développement a été étudiée le long de tiges de rosiers (*Rosa hybrida* L.) 'Ruidriko' Vivaldi® et 'Meikalis' Grand Gala®. Cette étude a été réalisée par multiplication de bouture de nœud en serre et sur bourgeon isolé *in vitro*. Le temps de latence et le pourcentage de débourrement (exprimés en Σ_{150}) des bourgeons, la vitesse de croissance et la séquence foliaire des tiges principales, la ramification des jeunes plants et la croissance des bourgeons isolés *in vitro* ont été mesurés sur 8 positions de chaque cultivar. Dans le cas du modèle bouture simple nœud, les bourgeons axillaires ont exprimé des Σ_{150} de plus en plus faibles en direction basipète. Le développement des tiges principales, notamment le nombre de feuilles foliolées a été étroitement corrélé au temps de latence des bourgeons axillaires. Après arcure de la tige principale, la ramification stipulaire des jeunes plants a été fonction de la position d'origine de l'explant. Plus la position de la bouture était proximale, plus faible était le taux de ramification stipulaire. La topophysie a donc généré de grandes variations de potentialités de ramification entre plants multipliés végétativement à partir d'un même clone. Dans le cas du modèle bourgeon isolé *in vitro*, la vitesse de croissance des bourgeons axillaires a été d'autant plus faible que la position était plus proximale. L'effet topophysie aurait donc une origine intrinsèque au bourgeon. Par ailleurs, la comparaison des 2 cultivars a permis de mettre en évidence de grandes variations d'amplitude de réponse.

Mots-clés : bourgeon axillaire, ramification stipulaire, bouture, développement, croissance, topophysie, inhibition corrélative, *Rosa hybrida* L.

Abstract: The influence of axillary bud position on bud growth and development potentials was studied along rose stems (*Rosa hybrida* L.) 'Ruidriko' Vivaldi® et 'Meikalis' Grand Gala®. This study was carried out by propagating single internode cuttings in a green house and by culturing isolated buds *in vitro*. The bud lag time and the rate of bud outgrowth (expressed as Σ_{150}), the growth rate and the leaf sequence of primary shoots, the branching of young plants and the growth of isolated buds *in vitro* were recorded for 8 bud positions from each cultivar. In the case of single internode cutting, axillary buds exhibited lower and lower Σ_{150} in a basipetal direction. The development of primary shoots, mainly leaflet leaf number, correlated highly with bud lag time. After bending the primary shoot, the number of branches originating from collateral buds depends on cutting position as well. The more proximal the cutting, the lower the branching rate. Topophysis effect led to wide variations in branching potential within a same clone. For the *in vitro* isolated bud model, axillary bud growth rate was all the lower as axillary bud position was proximal. Therefore, the topophysis effect was intrinsic to the bud. Further more, the comparison between the 2 cultivars highlighted large variations in amplitude of response.

Keywords: axillary bud, basal shoot, cutting, development, growth, topophysis, correlative inhibition, *Rosa hybrida* L.

Introduction

Le rosier (*Rosa hybrida* L.) est une plante pérenne, ligneuse, à floraison terminale autoinduite. En condition de culture hors sol sous serre, il présente plusieurs cycles de floraison chaque année. A ce titre, il constitue donc un modèle intéressant d'étude du développement des plantes ligneuses. Par ailleurs, cette culture florale, qui s'étend sur environ 450 ha en France dont 300 ha en bordure méditerranéenne notamment dans le Var et les Alpes-Maritimes, représente la première production française de fleurs coupées. L'intensification de cette production se manifeste par une amélioration constante des rendements associée à une meilleure maîtrise de la qualité. Cela requiert de la part des roséristes une compréhension et une maîtrise tant des paramètres climatiques et culturaux que des modes de croissance et de développement du matériel végétal.

Les bourgeons axillaires constituent le matériel de multiplication (bouturage, greffage). Ils donnent naissance à l'architecture des plants et sont à l'origine des tiges florales récoltées. Cependant, aussi bien en multiplication qu'en production florale, différentes potentialités de croissance et de développement conduisent à une grande variabilité entre plants et entre tiges pour un même clone. Afin de limiter cette hétérogénéité, les facteurs exogènes susceptibles d'affecter l'aptitude des bourgeons axillaires à débourrer et à croître en tige florale ont été largement étudiés: les méthodes de multiplication, les principes de taille et de récolte, l'application exogène de régulateurs de croissance et le contrôle des paramètres climatiques (température, traitement au froid, humidité relative, éclairage d'appoint, spectre lumineux...) contribuent au débourrement des bourgeons axillaires. Néanmoins, les mécanismes endogènes régulant ce débourrement n'ont pas encore été clairement élucidés.

Toutes nos études appréhendent le plant de rosier comme une population de méristèmes (Métastructure). La présente étude montre l'influence de la topophysie sur les potentialités de croissance et de développement des bourgeons axillaires multipliés par bouture de nœud. Les prélèvements ont été réalisés à différentes positions le long de la tige et sur deux cultivars.

1- Matériel et Méthodes

1-1 Expérimentation en serre

1-1-1 Matériel végétal

L'étude a été menée sur deux cultivars de rosier (*Rosa hybrida* L.) 'Ruidriko' Vivaldi® et 'Meikalis' Grand Gala®. Ces deux cultivars se différencient notamment par un degré d'acrotonie respectivement fort et faible. Ils présentent un polymorphisme foliaire très prononcé le long de la tige qui nous a permis de diviser la séquence morphologique foliaire en quatre zones successives (Figure 1): de l'apex à la base, la zone distale avec des feuilles à 1, 3 ou 5 folioles, la zone médiane avec des feuilles à 7 folioles et plus, la zone proximale avec des feuilles à 5, 3 ou 1 folioles et la zone composée d'écailles et de cicatrices foliaires.

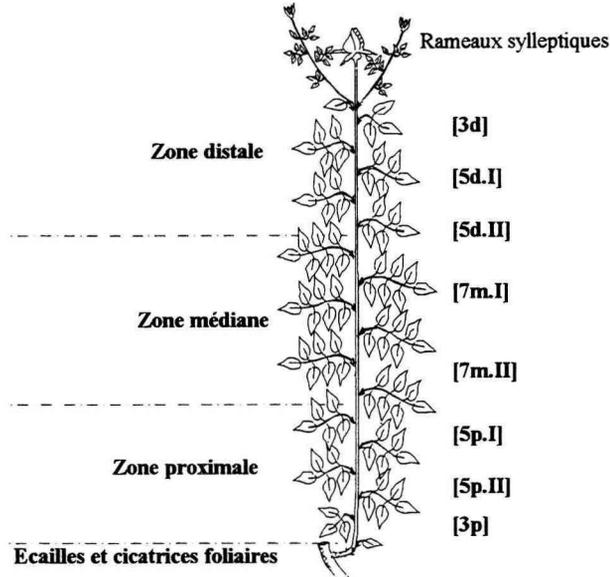


Figure 1 : Représentation schématique d'une tige de rosier, zonation et localisation des différents bourgeons axillaires prélevés.

En se référant à la zonation précédemment décrite, des boutures de nœud ont été prélevées à différentes positions le long de 48 tiges au stade anthèse (Figure 1): de la zone distale, 3 boutures notées [3d], [5d.I], [5d.II] portant une feuille à 3, 5 et 5 folioles respectivement; de la zone médiane, 2 boutures [7m.I] et [7m.II] portant une feuille à 7 folioles et de la zone proximale 3 boutures [5p.II], [5p.I] et [3p] portant une feuille à 5, 5 et 3 folioles respectivement.

Les boutures ont été excisées environ 0.5 cm au-dessus du bourgeon axillaire et 5 cm en-dessous. La base des boutures a été trempée dans une solution d'acide indol-butérique (500 ppm) pendant 30 s. et les boutures ont été traitées avec une solution fongicide (Benlate 1 g.l⁻¹). Les boutures ont été plantées dans des cubes de laine de roche saturée avec de la solution nutritive. La rhizogenèse s'est déroulée dans un tunnel plastique où régnaient des températures jour/nuit de 23 / 18°C et une hygrométrie relative de 88 / 95%. Après 3 semaines, les boutures racinées ont été placées en serre à faible densité (5.6 plants.m⁻²). Suite au débourrement du bourgeon principal et à sa croissance en tige florale, le rameau principal a été décapité au niveau du pédoncule floral et arqué afin de favoriser la croissance des 2 bourgeons stipulaires *i.e.* les 2 bourgeons secondaires les plus proximaux.

1-1-2 Conditions agroclimatiques en serre

Les plants ont été cultivés sur des pains individuels de laine de roche (15 x 15 x 7.5 cm) pour éviter toute interaction trophique entre plants. La solution nutritive avait un pH de 5.8 et une électroconductivité de 1.6 mS.cm⁻¹. La composition en macroéléments était (mmol.l⁻¹): NO₃⁻, 11; NH₄⁺, 2; HPO₄²⁻, 1; K⁺, 5; Ca²⁺, 4; Mg²⁺, 1; SO₄²⁻, 2.

La fréquence des arrosages était modulée par un ordinateur de serre en fonction du cumul de rayonnement reçu par la culture (tous les 125 J.cm⁻²). La durée des arrosages a été déterminée afin d'éviter toute variation de conductivité de la solution nutritive au drainage (V apporté / V drainé supérieur à 50%). Les températures jour/nuit moyennes durant la période de l'expérimentation étaient 23.5 / 17.5°C et l'humidité relative a toujours excédé 60% par un système de brumisation. Le rayonnement moyen dans la serre au niveau du feuillage était de 690 J.cm⁻².j⁻¹ P.A.R.

1-1-3 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental était un dispositif en blocs randomisés avec 8 positions de bouture et 2 cultivars par bloc, et 48 blocs. L'unité expérimentale était la bouture. Le dispositif était entouré de plants de bordure.

1-1-4 Mesures

Les débourrements ont été notés au stade 1 de Berninger (1994) *i.e.* quand le bourgeon atteint 1 cm. Les données de débourrement sont exprimées en activité des bourgeons, Σ_{150} (Timson, 1965). La longueur des tiges principales a été mesurée tous les 2 à 3 jours afin de construire une cinétique de croissance. Au stade anthèse, la séquence foliaire des tiges principales a été décrite (nombre et type de feuilles foliolées). Suite à l'arcure de la tige principale qui a favorisé le débourrement des axes stipulaires, la structure des plants a été décrite.

1-2 Expérimentation *in vitro*

Vingt bourgeons axillaires des 8 positions précédemment sélectionnées ont été excisés. Des segments de tige florale au stade anthèse portant ces bourgeons axillaires ont été sectionnés et stérilisés. Les bourgeons ont été ensuite isolés et placés individuellement dans des tubes contenant 10 ml de milieu semi-solide MS. Les cultures ont été menées dans une chambre de culture à 23°C avec une photopériode de 16h (PPFD 170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Sylvania BURO 184). La longueur des bourgeons axillaires a été mesurée sous loupe binoculaire tous les 2 jours.

2- Résultats

Les niveaux d'activité des bourgeons axillaires ont été exprimés en Σ_{150} (Figure 2). Cette méthode permet de tenir compte à la fois du temps de latence et du pourcentage de débourrement des bourgeons axillaires. En direction basipète, 'Ruidriko' présente dans la zone distale une décroissance significative du Σ_{150} jusqu'aux premières feuilles à 7 folioles, suivie par des niveaux d'activité voisins dans les zones médiane et proximale. Néanmoins, la position [3p] diffère significativement par un niveau d'activité plus faible correspondant à un taux de débourrement nettement inférieur. 'Meikalis' a un comportement différent: il présente des bourgeons axillaires aux niveaux d'activité similaires dans les zones distale et médiane. Une décroissance significative n'a été observée qu'entre les positions de la zone proximale.

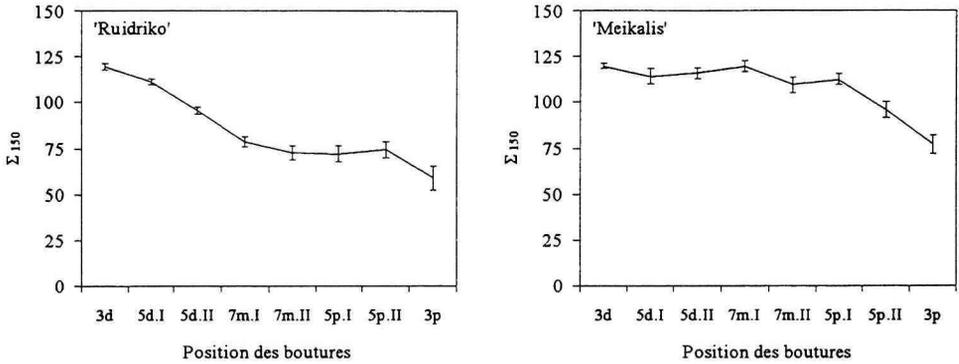


Figure 2 : Σ_{150} des bourgeons axillaires de rosier 'Ruidriko' et 'Meikalis' prélevés le long de la tige. L'étude a été réalisée par multiplication de bouture de nœud. (moyenne \pm erreur standard, $n=48$)

Après le débourrement des bourgeons axillaires, la croissance des tiges principales a été mesurée (Figure 3). Les tiges principales de 'Ruidriko' ont des vitesses de croissance faibles comparé à 'Meikalis' (ca. 22 cm vs. 30 cm après 16 jours). Par ailleurs, une action de la position est observable sur les courbes de régression de Gombertz après 10 jours pour 'Ruidriko'. Cette tendance indique une vitesse de croissance des tiges principales de plus en plus faible en direction basipète.

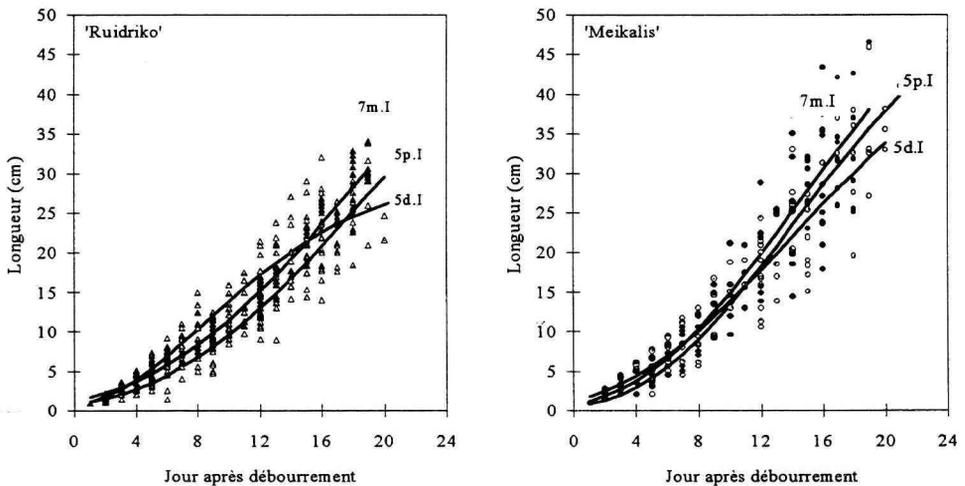


Figure 3 : Cinétiques de croissance des tiges principales de boutures prélevées à différentes positions ([5d.I], [7m.I] et [5p.I]) le long de tige de rosier 'Ruidriko' et 'Meikalis'. Les courbes de régression non linéaire sont de type courbe de Gombertz. (Δ , \circ , — [5d.I] ; \ast , \ast , — [7m.I] ; Δ , \circ , — [5p.I])

Le développement des tiges principales a également révélé des différences significatives entre les positions et entre les deux cultivars (Figure 4). En direction basipète, les tiges principales des boutures prélevées dans la zone distale de 'Ruidriko' sont constituées d'un nombre d'entre-nœuds de plus en plus élevé (de 12 e. [3d] à 18 e. [5d.II]). Les tiges principales des boutures prélevées dans les zones médiane et proximale portent un nombre d'entre-nœuds similaire. La position [3p] a un comportement légèrement différent en présentant un nombre d'entre-nœuds plus faible. Les différences en nombre d'entre-nœuds ont pour origine le nombre d'entre-nœuds des zones médiane et proximale. Le nombre d'entre-nœuds de la zone distale est relativement stable quel que soit la position de la bouture. Les tiges de 'Meikalis' ont un nombre d'entre-nœuds nettement inférieur à 'Ruidriko'. Cependant, avec une amplitude de réponse beaucoup plus faible, le profil du nombre d'entre-nœuds de la tige principale en fonction de la position de prélèvement reste similaire: en direction basipète, le nombre d'entre-nœuds augmente dans la zone distale, ensuite reste stable dans les zones médiane et proximale sauf en [3p]. Les variations du nombre total d'entre-nœuds sont intimement liées au nombre d'entre-nœuds des zones médianes et proximales.

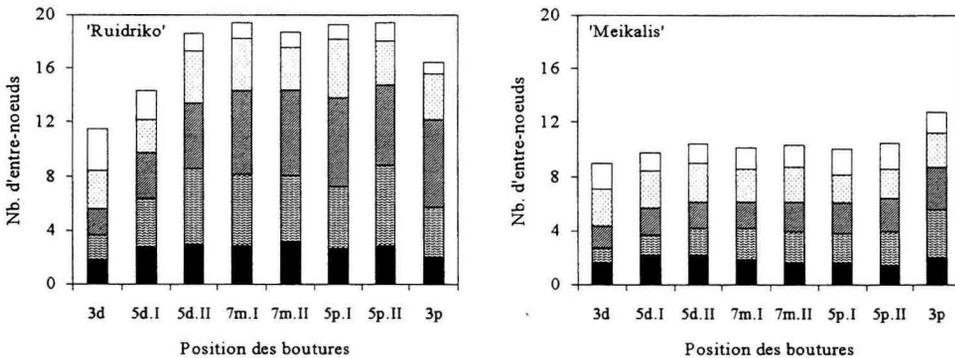


Figure 4 : Nombre d'entre-nœuds portant des feuilles foliolées et séquence foliaire des tiges principales de boutures simple nœud prélevées le long de tiges de rosiers 'Ruidriko' et 'Meikalis'. (moyenne, n=48) □ feuilles en position distale à 1 ou 3 folioles ; □ feuilles en position distale à 5 folioles ; ■ feuilles en position médiane à 7 folioles ; ■ feuilles en position proximale à 5 folioles ; ■ feuilles en position proximale à 1 ou 3 folioles.

L'arcure de la tige principale a favorisé la croissance des 2 axes stipulaires (issus des 2 bourgeons secondaires les plus proximaux du bourgeon principal) situés à la base de la tige principale. L'action de la position de prélèvement de la bouture sur la structure du plant est très nette (Figure 5): aussi bien pour 'Ruidriko' que pour 'Meikalis', le nombre d'axes stipulaires débouffés par plant décroît en direction basipète (de ca. 1.5 à 0.5 axes stipulaires/plant pour 'Ruidriko' et ca. 1.75 à 1 axes stipulaires/plant pour 'Meikalis').

Par ailleurs, le pourcentage de structures de plant à 2 axes stipulaires décroît et le pourcentage de structures ne manifestant pas d'axes stipulaires augmente en direction basipète.

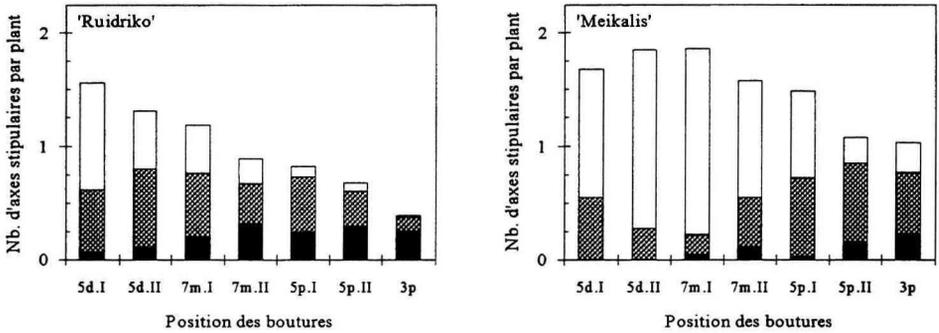


Figure 5 : Nombre moyen d'axes stipulaires par plant en fonction de la position de prélèvement de la bouture le long de la tige de rosier 'Ruidriko' et 'Meikalis' et proportion de plants présentant des structures à 2 (□), 1 (▨) et 0 (■) axes stipulaires.

L'étude *in vitro* a permis d'isoler le bourgeon axillaire des autres organes de la plante. Dans ces conditions, il est à remarquer que la vitesse de croissance du bourgeon axillaire est fonction de la position de prélèvement le long de l'axe fleuri (Figure 6). En effet, quel que soit le cultivar, la vitesse de croissance du bourgeon est d'autant plus faible que le bourgeon est en position plus proximale. La position [3p] ne manifeste presque pas de croissance dans ces conditions. Par ailleurs, les bourgeons axillaires prélevés sur 'Ruidriko' ont des vitesses de croissance nettement plus faibles.

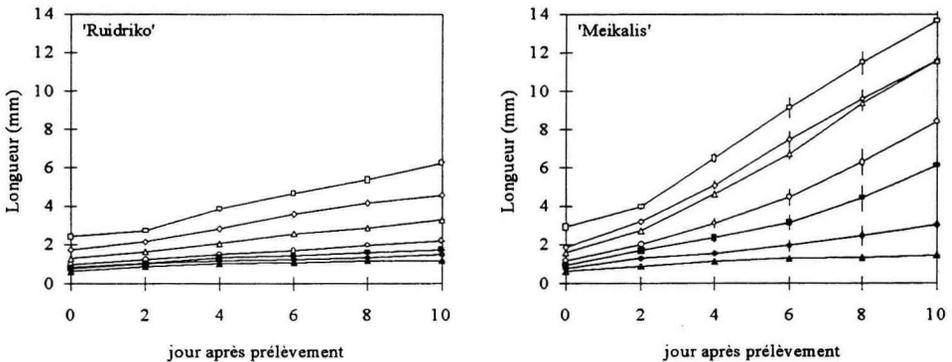


Figure 6 : Cinétiques de croissance des bourgeons axillaires prélevés le long de tige de rosier 'Ruidriko' et 'Meikalis' et isolés *in vitro* (□ [5d.I], ◇ [5p.I], ▲ [7m.I], ○ [7m.II], ◆ [5p.II], ■ [3p]). (moyenne ± erreur standard, n=20)

3- Discussion

3-1 Topophysie et potentialité de croissance des bourgeons axillaires

La dormance est définie comme une suspension temporaire de croissance visible de tout organe contenant un méristème (Lang et al., 1987). Sous ce terme générique, sont rassemblés les phénomènes de paradormance (inhibitions corrélatives), d'écodormance (quiescence) et d'endodormance (dormance vraie). Dans des conditions environnementales favorables, les arrêts de croissance des bourgeons axillaires de rosier sont généralement attribués à de la paradormance (Zieslin et al., 1976). Sur la plante entière, après levée des inhibitions corrélatives à longues distances (taille, pincement), le temps de latence des bourgeons axillaires est d'autant plus long que la position le long de la tige est plus proximale (Byrne et al., 1981). Sur le modèle jeune plant bouturé, le gradient de temps de latence du bourgeon axillaire en fonction de la position de prélèvement a été également mis en évidence (Zieslin et al., 1976 ; Marcelis-Van Acker, 1994a ; Bredmose et al., 1996 ; Le Bris et al., 1998). Exempts de toute inhibition corrélative même à courte distance, les bourgeons axillaires isolés *in vitro* manifestent un gradient de vitesse de croissance. Le gradient de temps de latence des bourgeons axillaires le long de la tige ne serait donc pas uniquement dû à de la paradormance même à courte distance mais aurait une origine intrinsèque au bourgeon. L'hypothèse de connexions vasculaires insuffisamment différenciées à la base du bourgeon a été avancée pour le rosier. Or, une étude anatomique (Marcelis-Van Acker, 1994a) a pu montrer la différenciation complète des bourgeons tout le long de la tige. Par ailleurs, le long de la tige les bourgeons axillaires ont des âges différents. Cependant, cet effet n'a pas de conséquences significatives sur le gradient de temps de latence des bourgeons axillaires (Marcelis-Van Acker, 1994b ; Le Bris et al., 1998). Il semble donc que ce gradient est d'ordre physiologique et intrinsèque au bourgeon. Il est mis en place très précocement, au moins au moment de la mise en place des deux premiers bourgeons secondaires étant donné qu'il est toujours présent sur les bourgeons stipulaires (de moins en moins de structures de plants à 2 axes stipulaires et de plus en plus de structures de plants sans débourrement d'axes stipulaires). Les auteurs suggèrent l'action intrinsèque au bourgeon de régulateurs de croissance, notamment l'acide abscissique (Zieslin et al., 1978 ; Bredmose et al., 1996).

3-2 Topophysie et potentialité de développement des bourgeons axillaires

Le nombre d'entre-nœuds des tiges principales est dépendant de la position du bourgeon axillaire d'origine. En direction basipète, les bourgeons axillaires de la zone distale génèrent des tiges principales portant un nombre d'entre-nœuds de plus en plus élevé et les bourgeons de la zone médiane, des tiges principales dont le nombre d'entre-nœuds est similaire.

Une étude histologique (Zamski et al, 1985) a permis de distinguer, parmi les bourgeons proleptiques de la tige de rosier, des bourgeons distaux présentant une organogenèse continue depuis leur mise en place et des bourgeons proximaux manifestant un arrêt de l'organogenèse. Il semble que l'activité organogène des bourgeons reprenne pendant le temps de latence des bourgeons axillaires (Marcelis-Van Acker, 1994a ; Le Bris et al, 1998). Ceci se vérifie notamment avec les 3 bourgeons sélectionnés de la zone distale de 'Ruidriko' qui génèrent des tiges principales présentant des nombres d'entre-nœuds étroitement corrélés au temps de latence de plus en plus long des bourgeons, de même pour 'Meikalis' en position proximale.

3-3 Topophysie et génotype

A l'instar de certains facteurs environnementaux, susceptibles d'accentuer ou d'atténuer l'amplitude de réponse topophysie de la plante (Van den Berg, 1987 ; Marcelis-Van Acker, 1994a ; Le Bris et al, 1998) mais pas d'effacer cet effet, la comparaison des deux cultivars a révélé des effets topophysie marqués et atténués respectivement pour 'Ruidriko' et pour 'Meikalis'. Ces différences d'ordre génétique ont été également décrites pour le rosier par Marcelis-Van Acker (1994a) et Bredmose et al (1996). Malgré ces variations d'amplitude, l'effet topophysie a toujours été présent quel que soit le génotype de rosier.

Bibliographie

Beminger E., 1992 - Etude du comportement de différents génotypes de rosiers de serre (*Rosa hybrida*) propagés par bouturage. II. Durée des phases de développement de miniplants du cultivar Sonia en conditions artificielles d'éclairage et de température. *Agronomie*, 12, p. 331-340.

Beminger E., 1994 - Development rate of young rose plants (*Rosa hybrida*) rooted from cuttings in relation to temperature and irradiance. *Scientia Horticulturae*, 58, p. 235-251.

Bredmose N., Hansen J., 1996 - Topophysis affects the potential of axillary bud growth, fresh biomass, accumulation and specific fresh weight in single-stem roses (*Rosa hybrida* L.). *Annals of Botany*, 78, p. 215-222.

Byrne T.G., Doss R.P., 1981 - Development time of 'Cara Mia' rose shoots as influenced by pruning position and parent shoot diameter. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 106, p. 98-100.

Lang G.A., Early J.D., Martin G.C., Damell R.L., 1987 - Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*, 22, p. 371-377.

Le Bris M., Champéroux A., Bearez P., Le Page-Degivry M.Th., 1998 - Basipetal gradient of axillary bud inhibition along a rose (*Rosa hybrida* L.) stem: growth potential of primary buds and their two most basal secondary buds as affected by position and age. *Annals of Botany*, 81, p. 301-309.

Marcelis-Van Acker C.A.M., 1994a - Axillary bud development in roses, PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen. The Netherlands, 131p.

Marcelis-Van Acker C.A.M., 1994b - Development and growth potential of axillary buds in roses as affected by bud age. *Annals of Botany*, 74, p. 437-443.

Timson J., 1965 - New method of recording germination data. *Nature*, 207, p. 216-217.

Van Den Berg G.A., 1987 - Influence of temperature on bud break, shoot growth, flower bud atrophy and winter production of glasshouse roses, PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen. The Netherlands, 169p.

Zamski E., Oshri S., Zieslin N., 1985 - Comparative morphology and anatomy of axillary buds along a rose shoot. *Botanical Gazette*, 146, p. 208-212.

Zieslin N., Haaze H., Halevy A.H., 1976 - Components of axillary bud inhibition in rose plants. II. The effect of bud position on degree of inhibition. *Botanical Gazette*, 137, p. 297-300.

Zieslin N., Spiegelstein H., Halevy A.H., 1978 - Components of axillary bud inhibition in rose plants. IV. Inhibitory activity in plant extracts. *Botanical Gazette*, 139, p. 64-68.



La Multiplication par boutures dans le genre *Protea*

Propagation by cuttings in the protea genus

M. Montarone, D. Savignac, C. Maricot

INRA : Unité de Recherche Intégrée en Horticulture
Route des Colles Sophia Antipolis
06410 BIOT
E-mail : montaron@antibes.inra.fr

Résumé : Le genre *Protea* est exploité dans le cadre d'une diversification de la filière des fleurs coupées ; l'objectif de cette étude est dans un premier temps de comprendre l'influence de la position d'une bouture sur son enracinement et les modalités d'application d'hormone (concentration et temps de trempage)

Un certain nombre de boutures de *P. eximia*, et de ses hybrides cv. *Sylvia* et cv. *Cardinal* a été cultivées de l'automne 94 au printemps 95. Il a été mis en évidence une importante corrélation entre le stade physiologique de la tige-mère et la capacité rhizogène de la bouture. De même, l'enracinement de la bouture paraît être lié à sa position sur la tige.

Les résultats les meilleurs ont été observés pour la position médiane d'une tige florale. Une concentration en AIB plus élevée, ou une augmentation du temps de trempage améliore le pourcentage d'enracinement.

Mots-clés : Protéacées, rhizogenèse, bouture, développement, morphogenèse, régulateur de croissance

Abstract : The main aim of this study was to understand the cutting position effect on the rooting and the future development of *Protea* genus plants. Cuttings from *P. eximia* et cv 'Sylvia', cv 'Cardinal' were carried out from Autumn 94 to Spring 95. An important variation of rooting ability depending on stem development state and cutting position was revealed. The best results were achieved for median positions on flower bud stems. In the same way, the effects of different growth regulator concentrations and dipping times were explored. I.B.A. concentration improved the rooting percentage, whereas the increase of dipping time had little effect on the auxin absorption rate. Next, the observation of the rooted cuttings' development showed us that the branching ratio is especially affected by cutting vigour : diameter, weight.

A better choice of propagation material based on plant physiology and the control of cultivation conditions should conciliate growers' requirements with hard-to-root and -cultivate species.

Keywords : Proteacea, rhizogenesis, cutting, development, morphogenesis, growth regulator.

Introduction

L'horticulture ornementale principalement dans le secteur de la fleur coupée et du feuillage, nécessite une innovation continue de manière à conserver une certaine compétitivité et assurer aux producteurs des revenus suffisants. En région méditerranéenne la profession a besoin de dynamiser ce marché pour aider à rétablir une situation économique dégradée par la stagnation des prix de vente face à une augmentation régulière des charges.

Du fait des analogies climatiques de cette région avec les aires naturelles de la famille, la culture des Protéacées pourrait devenir un élément de diversification des cultures ornementales et satisfaire l'attente du consommateur rêvant d'exotisme. Cette famille compte environ 62 genres et 1400 espèces toutes originaires de l'hémisphère Sud. Le nom "Protéacées" dérive de *Protea* premier genre de la famille à avoir reçu un nom : c'est semble-t-il une allusion heureuse au dieu grec Protée capable de changer de forme.

Les exigences thermiques de ces plantes et la nature calcaire inadaptée des sols méditerranéens nécessitent leur culture sous abri et hors sol. Cela suppose l'optimisation de la production par la maîtrise des paramètres climatiques et culturaux.

Les premiers essais ont permis de définir les processus de ramification et de floraison d'espèces différentes et de déduire les modes de conduite les mieux adaptés aux caractères architecturaux de chacune (Allemand, Le Bris, Montarone 1993). Ils ont également permis de mettre au point une fertirrigation adaptée aux besoins spécifiques de ces plantes et d'apprécier son influence sur l'expression du modèle architectural. Cependant, l'hétérogénéité constatée des populations étudiées due à une multiplication par semis s'accorde mal avec les exigences de rapidité d'entrée en production, d'homogénéité du génotype et du développement que recherche la profession. Pour pallier ces inconvénients, nous nous sommes penchés sur la multiplication par voie végétative : dans notre cas le bouturage.

De nombreuses observations effectuées sur les plantes ont permis de mettre en évidence un développement rythmique. Les axes feuillés montraient une orientation orthotrope, une floraison terminale. La plante est monocaule, et les ramifications latérales constituent un sympode. Nos observations ont montré que la plante se construisait par une succession de modules orthotropes à floraison terminale dérivant les uns des autres par des ramifications subterminales ce qui la rapprochait du modèle de Leeuwenberg (Figure 1)

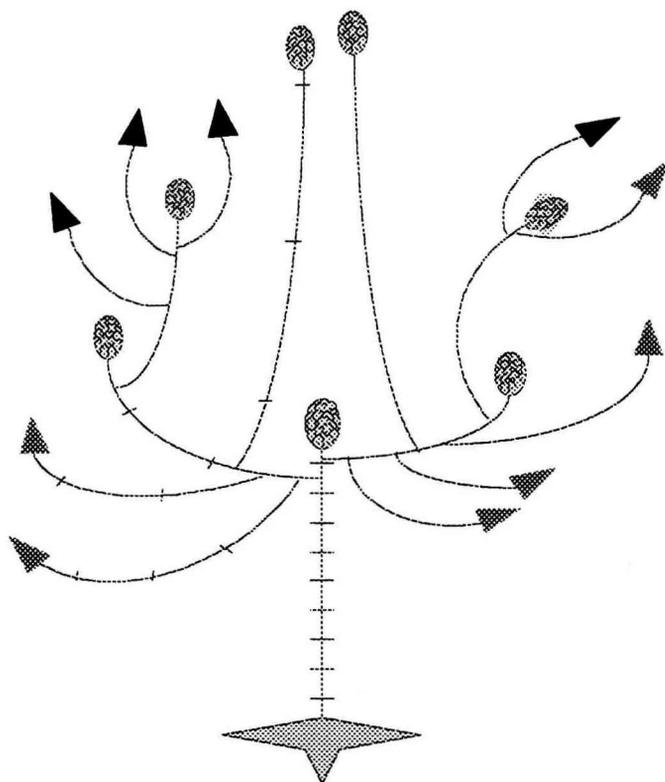


Figure 1 : Modèle architectural de P. eximia analogue au modèle de Leeuwenberg (d'après P. Allemand)

Dans un premier temps, nous avons cherché à préciser l'influence de la position de la bouture sur la rhizogenèse ainsi que son interaction avec quelques facteurs morphophysiologiques.

Les différents degrés de différenciation conférés aux méristèmes axillaires de la tige par le méristème apical induisent une hétérogénéité dans le développement ultérieur des boutures, nous avons donc recherché l'influence de la position de la bouture sur la morphologie de la plante ainsi que les corrélations qui pourraient exister entre rhizogenèse d'une part et développement aérien d'autre part. Ainsi que l'affirmait Margara (1982) : "les progrès de nos connaissances sur la rhizogenèse conditionnent la maîtrise de la multiplication végétative".

Donc une étude fine de la rhizogenèse et des facteurs impliqués chez les espèces étudiées est un préalable indispensable à l'amélioration des techniques de la multiplication végétative. Selon Chadwick, in Jacobs (1981) le succès de la multiplication végétative par bouturage dépend de facteurs internes, anatomiques et physiologiques aussi bien que des facteurs externes, environnementaux.

Dans les conditions naturelles comme dans celles du bouturage, la rhizogenèse est sous la dépendance de corrélations physiologiques entre organes, c'est-à-dire d'influences provenant de sites plus ou moins éloignés du lieu de formation des racines. Une des influences les plus remarquables sont celle exercée par feuilles et bourgeons. D'après Favre (1977), le signal provenant de la feuille ou du bourgeon exerce une influence stimulatrice qui peut se traduire par l'obtention de meilleurs résultats quant au pourcentage de boutures enracinées, de la cinétique d'apparition des racines adventives et de leur nombre.

Cependant avec la sénescence, les feuilles peuvent devenir inhibitrices, ainsi que les bourgeons axillaires situés à proximité de la base de la bouture. Une première hypothèse a attribué la rhizogenèse à l'action d'une substance mobile synthétisée par les feuilles et migrant de façon polarisée vers la base de la tige. Plus récemment, le phénomène de rhizogenèse a été attribué à l'interaction de facteurs regroupés dans un "complexe rhizocalinique" comprenant d'après Margara (1982) un facteur inconnu mobile synthétisé dans les feuilles à la lumière et migrant d'une manière polarisée, l'auxine, et enfin, un facteur cellulaire existant seulement dans certaines cellules, réalisant la fixation et la combinaison des deux premiers.

Il a été établi par des chercheurs sud-africains et australiens qu'il existait des différences importantes entre espèces, cultivars et clones dans la capacité à s'enraciner : Brits (1986) a pu mettre en évidence une différence de 28 % entre l'enracinement de deux cultivars du genre *Leucospermum* 'Caroline' et 'Vlam' ; de même Jacobs (1990) a démontré l'existence d'une hétérogénéité importante dans l'aptitude à l'enracinement de différents clones de *P. repens*. Plusieurs critères pourraient être mis en cause à ce propos : l'âge du pied-mère, sa vigueur, la situation des tiges sur le pied-mère, la position de la bouture sur la tige mère, le type de bouture au moment du prélèvement, le traitement hormonal appliqué, le substrat, les conditions climatiques et phytosanitaires, etc.

Dans le cas des Protéacées, une bouture est constituée par l'unité de croissance ou UC ; celle-ci résulte du fonctionnement rythmique du bourgeon terminal, les phases d'activité et de repos de ce méristème induisant une différenciation morphologique des feuilles ainsi qu'une élongation différente des entre-nœuds.

1- Matériel et méthodes

Nos études de bouturage ont été réalisées à partir de pieds-mères de *P. eximia* âgés de 5 ans, et de deux de ses hybrides *P. eximia* x *P. susannae* "cv. Sylvia" âgé de 2 ans et "cv. Cardinal" âgé de 4 ans.

1-1 Conteneur, substrat, nutrition

Les deux hybrides cv. Sylvia et cv. Cardinal étaient cultivés sur de la pouzzolane de granulométrie comprise entre 6 et 8 mm, dans des conteneurs en plastique d'un volume de 4 l pour le premier et 65 l pour le second.

Les pieds-mères de *P. eximia* étaient installés dans du porphyre de l'Estérel de granulométrie comprise entre 5 et 8 mm, dans des banquettes en polypropylène d'un volume de 470 l, à une densité de 2,2 plants par m². La solution nutritive utilisée apportait par litre : 1me d'azote (NO₃ = 0,6 me + NH₄ = 0,4 me), 0,15 me de phosphore, 1,0 de potassium, 0,75 me de calcium, 0,65 me de magnésium, ces deux derniers éléments étant apportés par de l'eau partiellement déminéralisée. Le fer est apporté sous forme de chélate et les oligo-éléments par une solution du commerce. Dans tous les cas, la solution était distribuée aux plantes par des goutteurs d'un débit de 2 l/h. Les quantités apportées varient d'un nombre minimum (2) à un nombre maximum (8 - 10) d'arrosages d'une durée donnée par jour.

1-2 La bouture : préparation et climat

Les boutures ont été prélevées sur des tiges au stade floral uniquement dans le premier essai, sur des tiges au stade floral et végétatif dans le deuxième et le troisième essai. La bouture est représentée par une unité de croissance.

La technique appliquée diffère de la préparation traditionnelle en ce qui concerne la base de la bouture coupée en biseau dans notre cas. Un habillage sur 5 cm environ est nécessaire de manière à éviter tout pourrissement des feuilles basales (Fig.2). Pour favoriser la rhizogenèse une solution d'acide indole butyrique (AIB) solubilisé dans de l'éthanol à raison de 40 % du volume total. La bouture est ensuite rincée à l'eau osmosée pour éviter l'effet nécrosant de l'alcool sur les tissus caulinaires, et trempée dans une solution fongicide pour prévenir les maladies ; pour la même raison un mastic cicatrisant est appliqué au sommet.

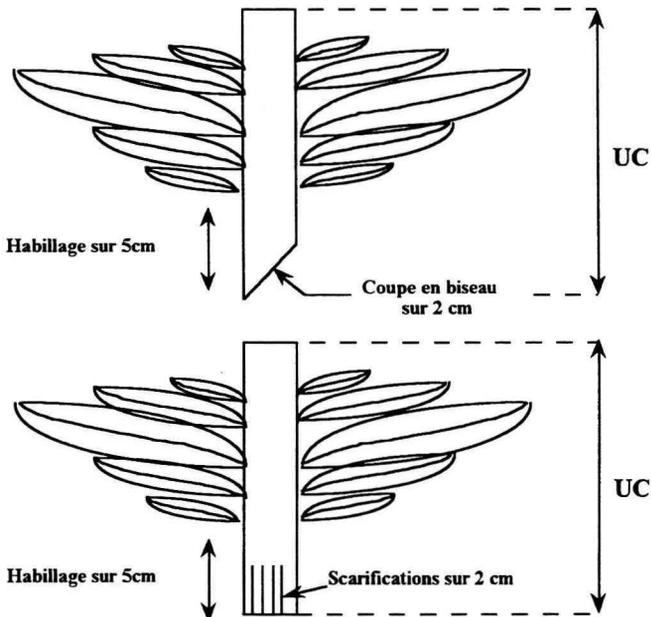


Figure 2 : Préparation d'une bouture de Protea

Les boutures ont été placées sur un tablette de 6 m² de surface aménagée pour recevoir un substrat (mélange utilisé en Afrique du Sud, en Australie en Israël) composé de billes de polystyrène de diamètre compris entre 3 et 5 mm et de tourbe dans un rapport 50/50 humidifié avant plantation. La hauteur du substrat est de 15 cm environ. Un système de brumisation automatique à l'eau osmosée maintenait une humidité relative élevée au niveau de feuilles (75 %) et assurait également l'humidification du substrat. Un ombrage de 70 % a été installé dès que le rayonnement solaire a atteint un seuil de 500 W/m² de manière à éviter les brûlures de feuilles. Le climat de la serre était géré par ordinateur à partir des valeurs de consigne concernant ouvrants, chauffage, écrans thermiques ou d'ombrage (Tableau n° 1).

Température sol de jour	20°C	
Température sol de nuit	20°C	
Température aération jour	25°C	
Température max. chauffage air nuit	15°C	
Température min. chauffage air nuit	15°C	
Température fermeture des écrans thermiques	18°C)
Rayonnement d'ouverture des écrans d'ombrage	8W) commandés
Rayonnement de fermeture des écrans d'ombrage	500W) manuellement
Température fermeture des écrans d'ombrage	25°C]

Tableau n° 1 : Les consignes de la serre de multiplication.

1-3 Mise en place des boutures enracinées - nutrition - climat

Lorsque ses racines mesuraient environ 4 cm la bouture était installée dans des pots en plastique de 4 l remplis de pouzzolane, et transférée dans la serre de culture après avoir subi une phase d'acclimatation de 3 jours dans la serre de multiplication. La solution nutritive appliquée est identique à celle des pieds-mères.

La gestion du climat de la serre de culture était automatisée. Les consignes sont récapitulées dans le Tableau 2

Température sol de jour	5°C	
Température sol de nuit	5°C	
Température aération jour	23°C	
Température max. chauffage air nuit	8°C	
Température min. chauffage air nuit	8°C	
Température fermeture des écrans thermiques	10°C]
Rayonnement d'ouverture des écrans d'ombrage	8W] commandés
Rayonnement de fermeture des écrans d'ombrage	600W] manuellement
Température fermeture des écrans d'ombrage	28°C]

Tableau n° 2 : Les consignes de la serre de culture.

1-4 Protocoles expérimentaux

Notre étude du bouturage de *Protea* se divise en trois essais distincts :

Essai 1 : mesure de l'influence de la position de la bouture sur le potentiel d'enracinement et de développement à partir de tiges de *P. eximia* de stades physiologiques comparables. (Bouturage réalisé en automne).

Essai 2 : mesure de l'influence de la position de la bouture sur la rhizogenèse et la ramification chez *P. eximia* et un de ses hybrides *P. eximia x susannae* cv.Sylvia (Bouturage réalisé au printemps en avril).

Essai 3 : influence de la bouture (caractéristiques morphologiques) et du traitement hormonal sur la rhizogenèse et la ramification d'un autre hybride *P. eximia x susannae* cv.Cardinal (Bouturage de printemps réalisé dans le mois de mai).

1-4-1 Matériel végétal bouturé

La bouture est représentée par une unité de croissance (**UC**) ; chez *Protea* la tige est constituée d'une succession d'UC que nous avons indicées de **1 à X** à partir du bouton floral, soit **UC1, UC2, UC3**.

En ce qui concerne la tige végétative les unités de croissance ont été appelées **UC1*, UC2*, UC3***... dans ce cas nous ne savons pas si l'UC terminale sera effectivement celle qui portera le bouton floral. Chacune des boutures a donc été caractérisée par le stade physiologique de la tige mère et sa position sur cette tige (Figure 3).

Caractérisation du matériel végétal : la bouture

Avant la mise en place, chaque bouture a été caractérisée par six paramètres :

- la position de la tige mère sur la plante
- sa position sur la tige mère
- le poids du bouton floral s'il est présent sur l'UC1
- le nombre de feuilles après habillage
- son poids et son diamètre

Le temps de latence d'apparition des premières racines étant très hétérogène, les notations concernant l'enracinement ont été effectuées tous les quinze jours à partir de la visualisation des premières racines. Les notations étaient relatives au nombre de racines, à la longueur du système racinaire.

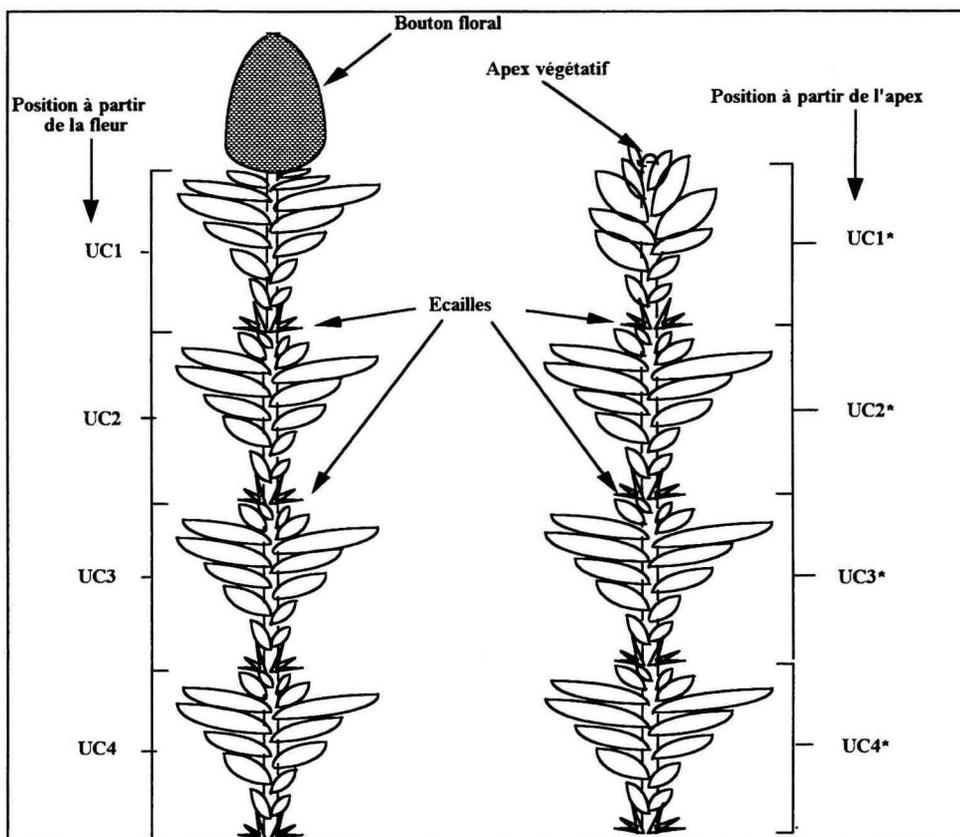


Figure 3 : Caractérisation des boutures en fonction du stade physiologique de la tige-mère

Description des essais

- Essai 1 : P. eximia et Essai 2 : cv Sylvia

Dans ces deux essais nous avons uniquement recherché un effet de position de la bouture sur la tige-mère. La concentration en acide indol-butyrique utilisée était de 4000 ppm avec un temps de trempage de 1 minute sur la hauteur du biseau ($1,5 \text{ cm} < H < 2 \text{ cm}$).

- Essai 3 : cv Cardinal

Nous avons testé trois concentrations d'AIB. : 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm et deux temps de trempage, 30 secondes et 1 minute.

1-4-2 Interprétation des données

Il n'y avait pas de dispositif statistique particulier. Les données recueillies ont été traitées au moyen d'un logiciel Statview® par les méthodes statistiques suivantes :

- analyse de variance et comparaison de moyennes par le Test de Scheffé
- corrélations et régressions

Deux traitements qui ont au moins une lettre (a, b, c.) commune ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur de 5%.

2- Résultats et discussion sur la rhizogenèse

La rhizogenèse a été appréciée par rapport au pied-mère d'origine, par rapport à la tige-mère et aux traitements hormonaux qui étaient associés.

2-1 Influence du pied-mère

Quel que soit le stade physiologique des tiges bouturées pour *P. eximia* et ses deux hybrides le pied-mère paraît avoir une influence significative sur l'aptitude à l'enracinement de la bouture (Figure 4). Les pieds-mères de *P. eximia* étant issus de semis, il n'était pas surprenant de constater une variation d'aptitude à la rhizogenèse, mais elle s'observe également sur ses hybrides cv.Cardinal et cv.Sylvia qui sont des clones.

Pour expliquer ce résultat, on peut proposer deux hypothèses :

- **une variabilité génétique** qui pourrait être importante chez les espèces de *P. eximia* et ses cultivars comme Brits (1986) l'a également constaté dans la réponse à l'enracinement entre des cultivars de *Leucospermum*.
- **une variabilité liée à "l'histoire" du pied-mère** depuis le semis : contraintes d'installation, climatiques, nutritionnelles exprimées de manière différente selon les individus.

C'est un fait, rapporté par Andersen (1992), que les conditions environnementales des pieds-mères ainsi que la nutrition, notamment azotée (Lemaire *et al.* 1989) ont une influence sur la capacité rhizogène des boutures. Dans notre cas, on peut effectivement penser que les deux facteurs de variabilité proposés ont pu se conjuguer et expliquer l'hétérogénéité observée.

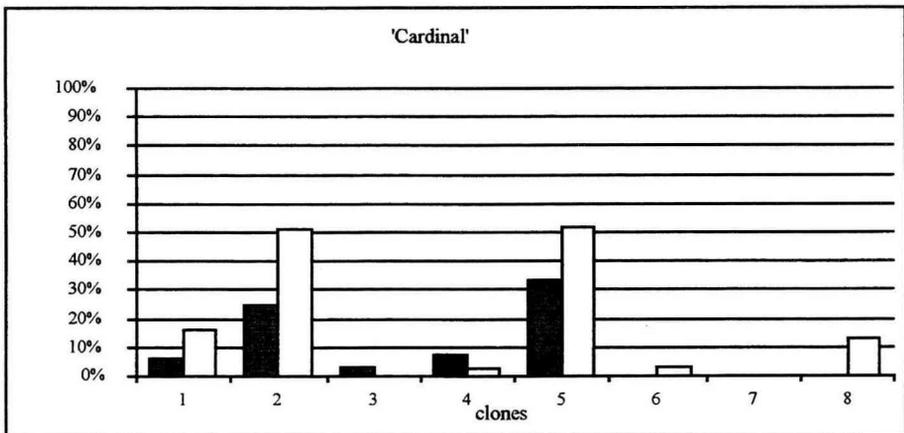
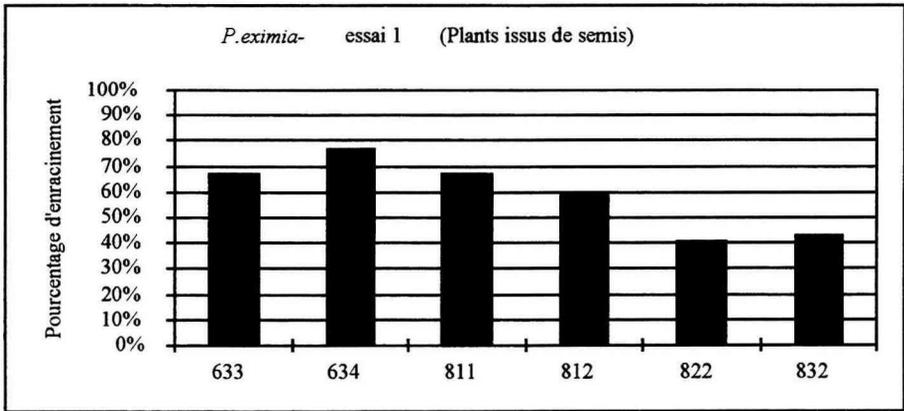
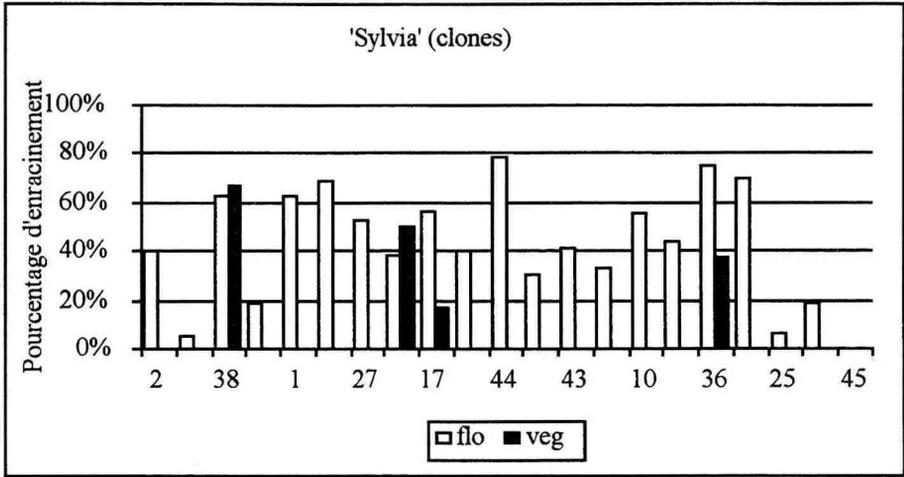


Figure 4 : Influence du pied-mère sur l'aptitude à la rhizogenèse

2-2 Influence du stade physiologique de la tige sur la rhizogénèse

Dans les essais 2 et 3, le bouturage a été réalisé à partir de tiges florales et de tiges végétatives. La capacité rhizogène est de 2 à 3 fois significativement plus élevée pour les tiges florales (Figure 5). Dans le cas des tiges végétatives, l'état de lignification des tissus caulinaires, probablement moins avancé est un frein à l'émission racinaire.

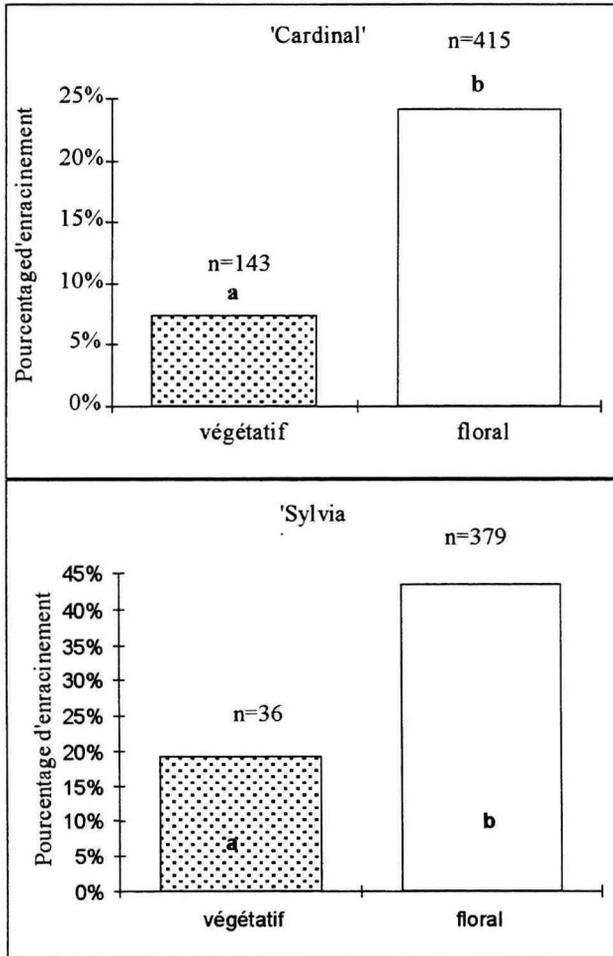


Figure 5 : Stade physiologique de la tige-mère et rhizogénèse

2-2-1 Position de la bouture et rhizogénèse

Les pourcentages d'enracinement sont mis en évidence dans la Figure 6

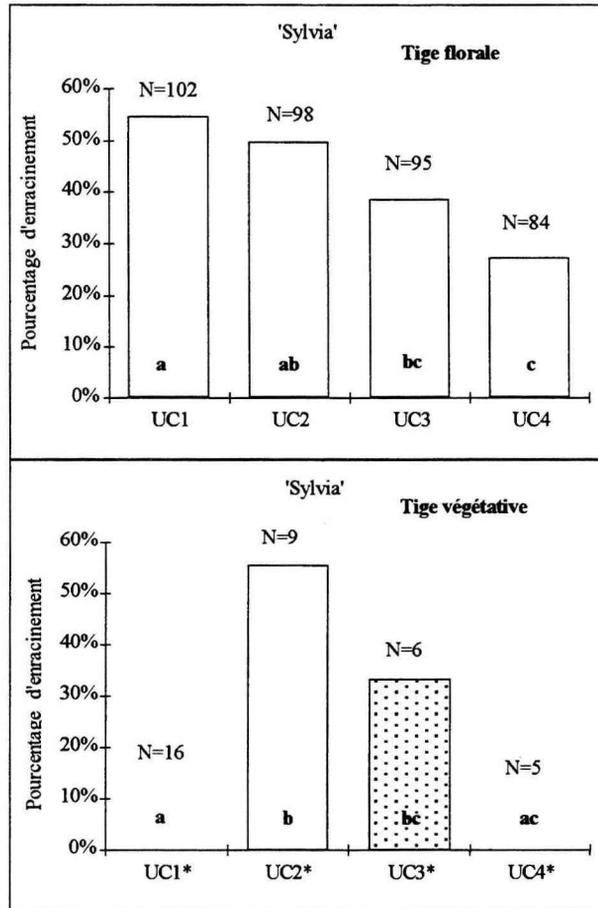


Figure 6 : Position de la bouture et rhizogénèse : exemple cv. *Sylvia*

L'unité de croissance correspondant à la position terminale de la tige ne s'est jamais enracinée. Pour les positions inférieures, il existe un gradient positif acropète de la capacité à l'enracinement quelle que soit la période de bouturage. Sur une tige végétative, le meilleur enracinement est obtenu sur l'UC qui précède l'UC en croissance : elle aurait acquis un état de compétence cambiale lui permettant de s'enraciner avec plus de facilité que les unités de croissance plus basales ce qui pourrait s'expliquer par une transmission de la capacité à l'enracinement liée au rythme de croissance. En ce qui concerne les tiges florales les pourcentages d'enracinement semblent varier avec l'espèce d'une part et la période de bouturage d'autre part. Au printemps, on constate chez le cultivar *Sylvia* un gradient d'enracinement positif acropète net.

Chez 'Cardinal' bouturé six semaines plus tard, on observe un enraccinement de l'UC2 significativement supérieur à l'UC terminale mais il n'y a pas de gradient très marqué. Le comportement de *P. eximia* est différent : le gradient d'enraccinement que l'on observait à l'automne (UC1 > UC2 = UC3) disparaît puisque, au bouturage de printemps, les quatre unités de croissance présentaient le même pourcentage d'enraccinement.

2-2-2 Interaction position bouturée, développement floral et rhizogénèse

Le développement floral a été exprimé par la description morphologique et le poids du bouton floral porté par la tige au moment du bouturage. Quatre stades ont été définis : la figure 7 représente l'enraccinement des 4 unités de croissance selon ces stades pour le cultivar 'Sylvia'.

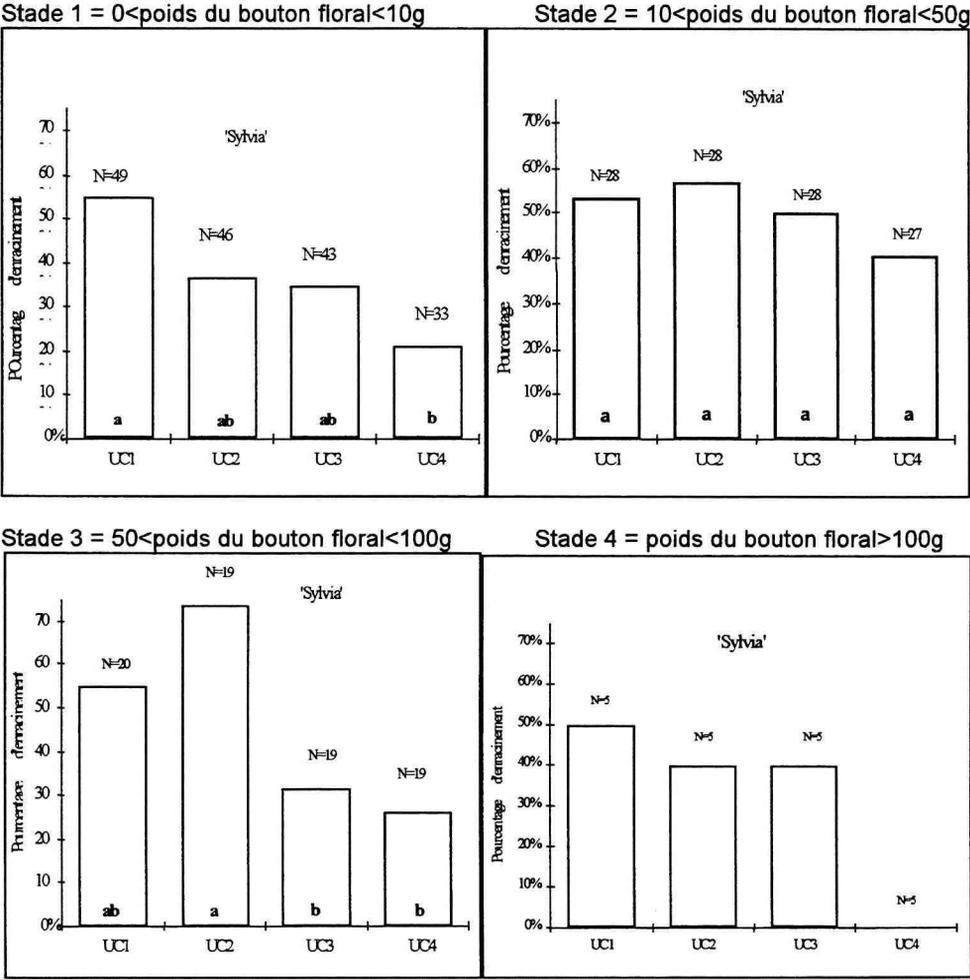


Figure 7 : Développement floral et rhizogénèse

- **le stade 1** correspond à un bouton floral d'aspect globuleux d'un poids inférieur à 10 g.

Dans ce cas l'enracinement s'effectue selon un gradient positif acropète.

- **le stade 2** correspond à un bouton de forme conique compact d'un poids compris entre 10 et 50 g.

L'enracinement s'effectue selon un gradient positif acropète pour les UC2, UC3 et UC4. Le taux d'enracinement de l'UC terminale est à peu près équivalent à celui acquis au stade 1. Les tissus caulinaires des UC2, UC3, UC4 ont acquis une maturité suffisante pour permettre un taux d'enracinement plus élevé que dans le cas précédent.

- **le stade 3** correspond à un bouton floral de forme allongée, les bractées terminales sont bien distinctes et colorées. Le poids est compris entre 50 et 100 g. Les différences entre taux d'enracinement sont beaucoup plus nettes, les positions basales sont en régression par rapport au stade 2 (de 40 % à 20 %). Ainsi il semblerait qu'à un stade floral de plus en plus avancé, les positions basales perdent leur potentiel rhizogène.

- **le stade 4** correspond à la fleur épanouie d'un poids supérieur à 100 g.

Malgré le faible effectif de cette classe, les résultats confirment les observations précédentes ; pour 'Sylvia' et 'Cardinal' nous n'avons pas obtenu d'enracinement de l'UC4.

2-3 Traitement hormonal et rhizogénèse

Deux paramètres ont été étudiés :

- la concentration en hormone rhizogène
- le temps de trempage

2-3-1 La concentration

L'effet de la concentration est mis en évidence dans la Figure 8. Il existe un gradient positif de capacité à l'enracinement en fonction de la concentration hormonale appliquée pour des doses de 500 à 2000 ppm d'A.I.B. Le pourcentage d'enracinement est significativement supérieur à partir de 1000 ppm.

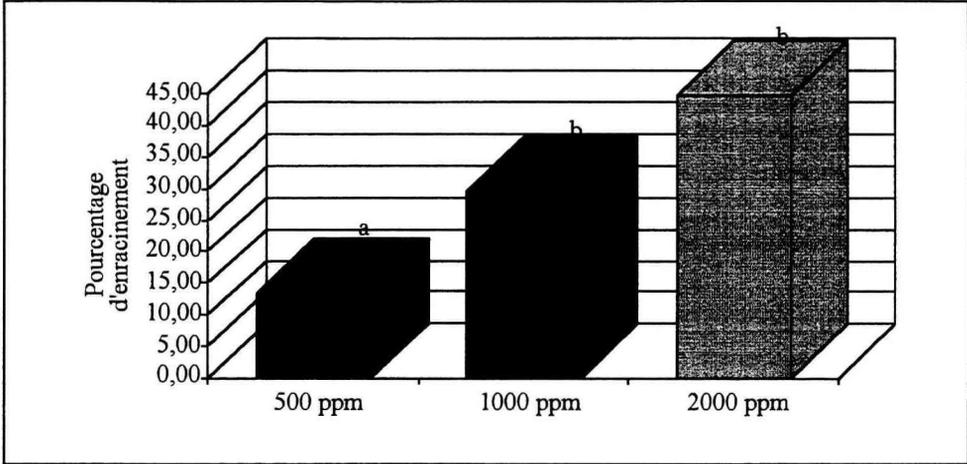


Figure 8 : Concentration en AIB et enracinement

2-3-2 Le temps de trempage

Entre 30 secondes et 1 minute de trempage il n'y a pas d'action significative sur l'enracinement. Cependant, on peut remarquer sur la Figure 9 que le temps de trempage a un effet plus important pour des concentrations en A.I.B. plus faibles. Un temps de trempage augmenté de 30 secondes accroît l'enracinement de 7 % pour 500 ppm, 4 % pour 1000 ppm, 2,7 % pour 2000 ppm. D'après Jacobs (1990) l'action d'un temps de trempage prolongé est due à une absorption très rapide de l'auxine par les tissus caulinaires, mais au-delà d'une courte période l'absorption d'auxine diminue. Le fait qu'il semblait exister une relation concentration temps nous a incité à trouver une représentation intégrant les deux paramètres.

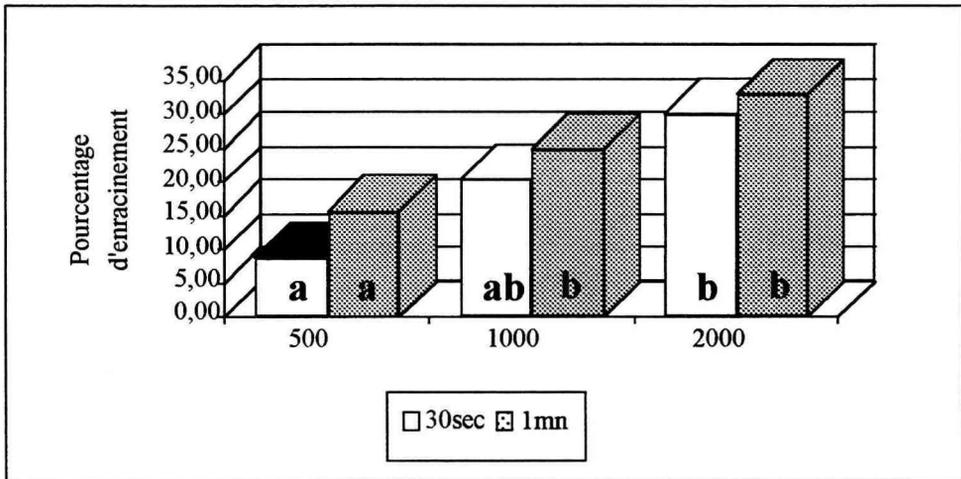


Figure 9 : Effet de la concentration en AIB et du temps de trempage

2-3-3 Interaction concentration x temps

La représentation graphique des résultats suivant la variable concentration x temps donne une courbe de points (Figure 10) dont la forme rappelle celle d'une courbe logarithmique analogue à celle obtenue avec la variation de la vitesse d'une réaction enzymatique. La vitesse de pénétration de l'hormone est très grande au début de l'immersion puis elle se ralentit et devient plus faible.

D'après la courbe, le pourcentage d'enracinement semble atteindre un palier pour une valeur de concentration x temps = 2000 (ppm x mn). Ainsi à partir d'un certain seuil d'auxine, augmenter la concentration n'améliorerait pas l'enracinement si la bouture n'avait pas encore acquis une maturité suffisante au moment de son prélèvement.

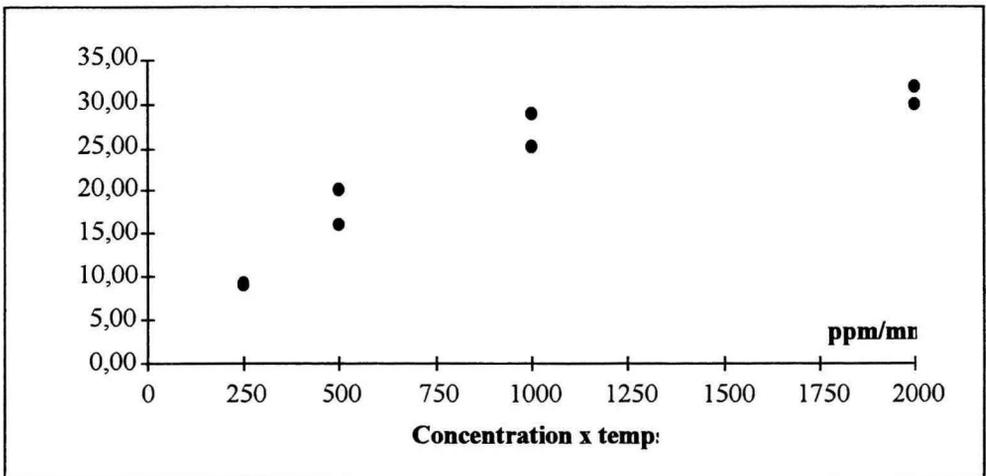


Figure 10 : Représentation de l'influence du traitement hormonal suivant la variable concentration x temps

2-3-4 Interaction traitement hormonal et position de la bouture

D'une manière générale, une augmentation de la concentration et du temps de trempage améliore sensiblement l'enracinement pour l'ensemble des unités de croissance, à l'exception toutefois de l'UC1 pour laquelle il semble exister un palier correspondant à une concentration x temps de 1000 ppm x mn à partir duquel l'enracinement augmente presque linéairement.

2-4 Caractéristiques morphologiques de la bouture et rhizogénèse

Outre l'état physiologique de ses tissus et sa position sur la tige mère, la bouture peut être caractérisée par d'autres paramètres tels que le poids, le diamètre, le nombre de feuilles.

Il existe une action positive du nombre de feuilles sur l'enracinement probablement étroitement liée à l'importance de la surface foliaire développée et donc de l'énergie solaire interceptée. Diamètre et poids sont des critères étroitement liés dans le cas des boutures lignifiées. Les diagrammes d'enracinement en fonction du diamètre de la bouture mettent en évidence une valeur du diamètre pour laquelle l'enracinement serait maximum. Cette valeur varie en fonction de l'espèce bouturée.

2-5 Le temps de latence

La **cinétique d'enracinement** d'une bouture peut se décomposer en deux phases:

- **une phase de latence** pendant laquelle s'effectue l'initiation racinaire et qui se termine avec l'apparition de la première ébauche.
- **une phase de développement** du système racinaire avec élongation des racines et augmentation de leur nombre.

Le suivi d'enracinement des boutures a été réalisé sur les essais 2 et 3, avec un pas de mesure de 15 jours. Le jour de mesure où la première émission de racine a été constatée a été appelée **J**. Les autres mesures sont effectuées au jour **J+15**.

2-5-1 Influence de la position sur le temps de latence moyen.

Chez *P. eximia*, le temps de latence moyen se situe entre 80 et 90 jours pour l'ensemble des positions avec un minimum à 70 jours pour l'UC2, alors que chez 'Sylvia' le temps moyen d'enracinement se situe aux environs de 85 jours pour toutes les positions.

Pour 'Cardinal' dans l'essai 3, le temps de latence pour les UC2, UC3 et UC4 est de 60 jours donc beaucoup plus court ; l'UC1 en revanche garde un temps moyen d'enracinement de 85 jours. Comme pour la capacité à s'enraciner, le temps de latence est peut être lié à la période du bouturage ou plus justement au développement des boutons floraux qui sur 'Cardinal' étaient très avancés par rapport à 'Sylvia' et *P. eximia*. ('Cardinal' rappelons-le a été bouturé la deuxième quinzaine d'avril alors que *P. eximia* et 'Sylvia' avaient été bouturés environ six semaines avant).

Position et précocité

Que l'on s'adresse à *P. eximia* ou à ses hybrides, on constate une précocité d'enracinement de l'UC2 par rapport aux autres positions même si le calcul ne met pas en évidence de différence significative. Les pourcentages cumulés de boutures enracinées sont présentées dans la Figure 11. Avec un décalage dû à la période de bouturage, Sylvia et Cardinal présentent une certaine similitude de comportement avec toutefois pour Cardinal un palier atteint début juin et une reprise en juillet-août. Pour Sylvia la courbe est plus régulière.

Chez *P. eximia* à partir du moment où les premières racines sont apparues le pourcentage de boutures "enracinées" augmente très rapidement ; comme chez le cv. Cardinal on peut observer un palier en juin et une reprise en juillet pour UC1 et UC2.

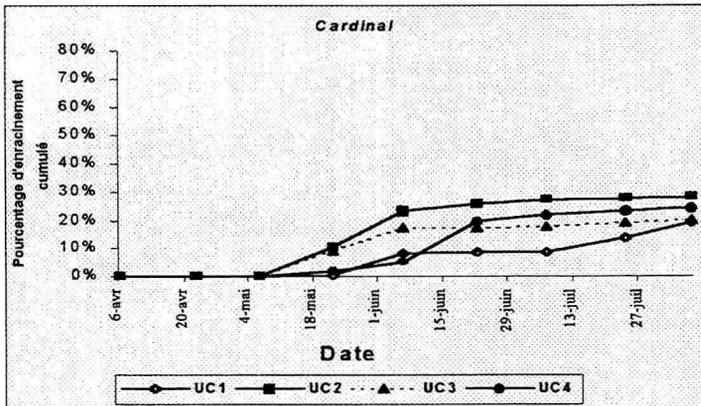
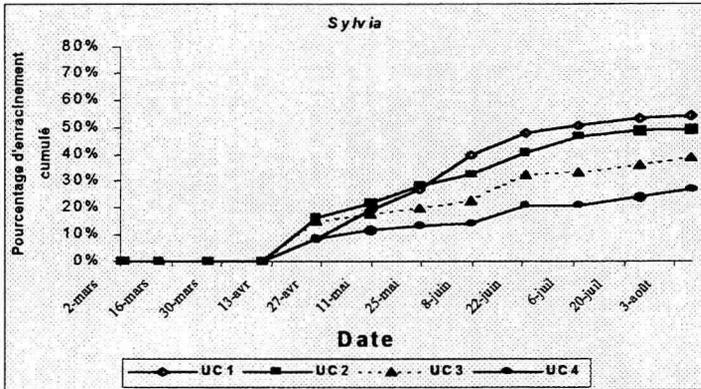
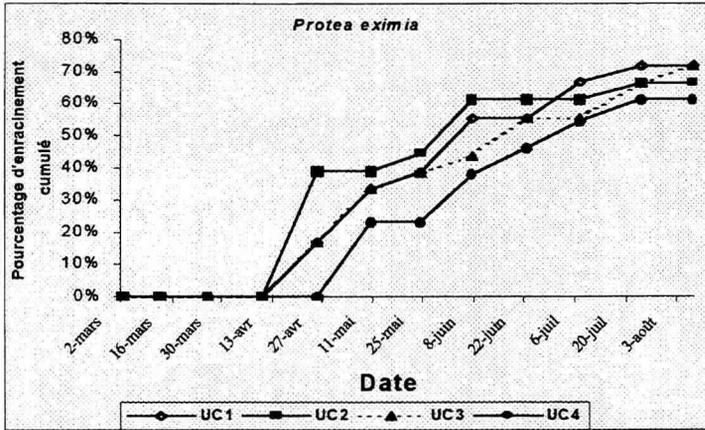


Figure 11 : Evolution de l'enracinement au cours du temps (cumul)

2-5-2 Temps de latence et traitement hormonal

Les résultats sont mis en évidence dans la Figure 12. Les écarts types élevés sont le reflet d'une hétérogénéité des boutures quant à la réponse à l'enracinement. On remarquera cependant que la concentration hormonale et le temps de trempage tendraient à abaisser le nombre de jours nécessaires à l'émission des premières racines.

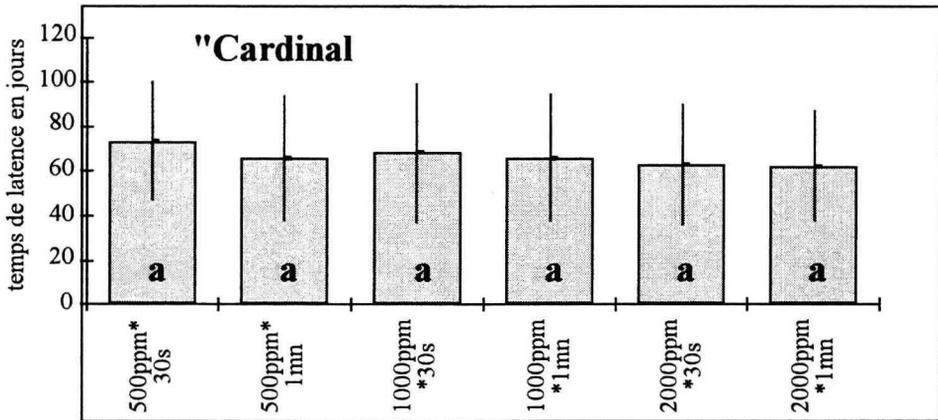


Figure 12 : Absence d'influence du traitement hormonal sur le temps de latence exprimé en nombre de jours

2-5-3 Temps de latence et caractéristiques morphologiques

Parmi les caractéristiques morphologiques de la bouture seul le diamètre a été corrélé positivement avec le temps de latence chez *P. eximia*. Plus le diamètre de la tige est important plus le temps d'émission de la première racine est long.

Conclusion

Nos observations ont permis de mettre en évidence une liaison étroite entre l'état physiologique de la tige mère (végétatif ou floral) et le potentiel rhizogène des boutures produites.

L'analyse des résultats de l'enracinement des boutures prélevées sur des tiges végétatives a révélé l'incapacité de la plupart de ces boutures à néoformer des racines. Nous pouvons raisonnablement penser que ce défaut d'enracinement provient de l'immaturité des tissus caulinaires, principalement des formations secondaires telles que cambium, phloème et liber.

La différenciation du taux d'enracinement suivant la position de la tige a clairement mis en évidence une incapacité totale de l'UC terminale, encore herbacée, à émettre une racine. L'enracinement ne s'effectue que sur la position UC2* sous-jacente, vraisemblablement du fait de l'entrée en activité de la zone cambiale ne survenant qu'après achèvement de la formation de sa propre UC et le début de la croissance de l'UC suivante.

Quand la tige devient florale, son comportement se modifie vis à vis de sa compétence à l'organogenèse. L'aptitude à l'enracinement des différentes unités de croissance s'améliore nettement, alors que sur de nombreuses plantes il a souvent été constaté que le passage à l'état floral pouvait avoir une action inhibitrice sur l'enracinement (antagonisme floraison et rhizogenèse). Néanmoins sur *P. eximia* nous avons obtenu des observations quelque peu contradictoires : nous avons comparé les résultats obtenus avec une tige végétative et ceux obtenus avec une jeune tige florale (stade 1). Dans ce cas précis la différence essentielle a résidé dans l'acquisition du potentiel rhizogène par l'UC terminale, de sorte qu'au stade 1 (jeune bouton) il existe un gradient positif acropète le long de la tige.

La répartition des boutons floraux en quatre classes de poids a permis de mettre en évidence l'évolution du comportement d'une même position de la bouture vis à vis de l'émission racinaire, en fonction de l'état physiologique de la tige-mère. Il semble bien qu'à un stade avancé du bouton floral il y ait perte progressive de compétence rhizogène des positions basales.

Bibliographie

Allemand P, Montarone M, Le Bris M, 1995- Architectural structure of two species of *Protea* grown in soilless cultivation. *Acta Horticulturae* 387, p 63-71.

Andersen A.S., 1992- Physiological basis for stock plants effects on cutting and post propagation growth of propagules. *Acta Horticulturae* 314), p.283-289.

Brits G.J., 1983- Aspects of proteoid root development in four South African *Proteaceae*. 9th Ann. Congress, S. Afr. Assoc. Bot., Johannesburg.

Brits G.J., 1986- The influence of genotype, terminality and auxin formulation on the rooting of *Leucospermum* cuttings. *Acta Horticulturae* 185, p.23-30.

Favre J.M., 1977- Formation et entrée en croissance des racines adventives. *Compte rendu des séminaires du groupe d'étude des racines*, tome 5 (première partie), p.1-45.

Jacobs G., 1981- Vegetative propagation of *Proteas*, recent developments. Growing and marketing of *Proteas*. Ed. *peter Matthews* p. 7-18

Jacobs G., Gouws L., Strydom D.K, 1990- Factors affecting rooting and auxin absorption in stem cuttings of *Protea*. *Journal of horticultural Science*, 65 (1), p 59-63

Le Bris M.,1993-.Modélisation architecturale de *Protea neriifolia* et influence de la fertirrigation sur son expression. Mémoire de fin d'études E.N.I.T.H.P., INRA-URIH, Sophia Antipolis, 43 p

Lemaire F., Dartigues A., Rivière L.M., Charpentier S.,1989- Cultures en pots et conteneurs. Principes agronomiques et applications. *INRA éditions*, Paris, 179 p

Margara J.,1982- Bases de la multiplication végétative. *INRA éditions*, Paris, 262 p

Montarone M., Allemand P.,1995- Growing Proteacea soilless under shelter. *Acta Horticulturae* 387, p 73-83.



Etude de quelques facteurs d'enracinement et de développement des boutures de chêne (*Quercus petraea*) en vue de multiplication végétative en vrac

Rooting factors and cutting development of Oak (Quercus petraea) for bulk propagation

C. Le Pichon, V. Bourlon

Cemagref
Division ressources génétiques et plants forestiers
Domaine des Barres 45290 Nogent sur Vernisson
Tel : 02 38 95 09 65, Fax : 02 38 95 03 46
E-mail : celine.lepichon@rainbow.cemagref.fr

Résumé : L'utilisation de la multiplication végétative en vrac pour le chêne sessile est une possibilité pour pallier aux irrégularités de fructification. Elle consiste à amplifier par bouturage des lots de plants issus de semis, sans identification des génotypes. La stratégie de « furetage » sur planche, choisie depuis 1994, donne un nombre de boutures au m² faible et n'est utilisable qu'une seule année. On s'oriente donc, depuis 1997, sur l'utilisation de planches de pépinière recépées tous les ans. Cette technique semble prometteuse car le rendement en boutures augmente et le rajeunissement des plants améliore la capacité d'enracinement des boutures. En ce qui concerne le type de matériel prélevé, les meilleurs résultats sont obtenus avec des boutures récoltées entre la fin de la première vague de croissance et le début de la seconde vague. A ce stade, les boutures représentent mieux l'ensemble de la population des plants en ce qui concerne la proportion de plants réalisant une pousse, deux pousses, trois pousses ou quatre pousses. De plus, elles s'enracinent mieux et permettent d'obtenir une pousse l'année d'enracinement. Ceci est un gain pour obtenir en deux ans des plants pouvant être installés en forêt.

Mots-clés : *Quercus petraea*, pieds-mères, recépage, bouture, stade morphologique

Abstract: *The bulk propagation is a way to enhance the number of plants produced by acorn. This technique can compensate for the irregular fructification characteristic of oaks. It is aimed at maintaining the genetic diversity of the seed lots. The use of two years old plants gives a low number of cuttings and requires replacing the stock plants every year. So we have changed the strategy and now use stock plants, pruned each year at a height of 15 cm. Both the number of cuttings /m² and the rooting capacity have increased with this technique. As to the development of the cuttings, rooting percentage has increased for cuttings taken during the rest period between the first and the second flush.*

Keywords: *Quercus petraea*, stock plants, cuttings, rooting

Introduction

Avec une production annuelle d'environ 15 millions de plants, les deux grands chênes indigènes (*Quercus petraea* et *Quercus robur*), arrivent en tête des essences utilisées dans les reboisements français. Néanmoins, l'irrégularité des fructifications, notamment dans le quart nord-est de la France est à l'origine de déficits chroniques en glands dans ces régions. Deux alternatives existent: l'utilisation de glands de provenances excédentaires (15 provenances sont actuellement utilisées en France) ou la conservation des glands en chambre froide (ce qui est actuellement possible 2 hivers mais avec des coûts supplémentaires et une baisse du taux de levée).

Dans ce contexte le recourt à la multiplication végétative en vrac peut être une solution envisageable pour régulariser les approvisionnements en plants de certaines provenances déficitaires et permettre le maintien de cette ressource génétique. La technique consiste à amplifier un lot de plants issus de semis sans distinction des génotypes. On a théoriquement la même base génétique dans le lot de plants issus de boutures que dans le lot de plants issus de semis (sauf d'éventuels effets de capacités différentes d'enracinement en fonction des génotypes).

Les contraintes majeures sont qualitatives et économiques. D'une part l'obligation d'obtenir un plant répondant aux normes de qualité du matériel forestier (normes FFN), c'est à dire notamment des aspects de hauteur, de diamètre au collet, de rapport hauteur/diamètre et des critères de forme. D'autre part la nécessité de produire un plant dont le coût est proche de celui d'un plant de deux ans dépivoté (plant dit 1S1). La mise en place d'un itinéraire technique nécessite l'étude des diverses étapes allant du matériel végétal de base jusqu'au plant forestier issu de bouture. Cet itinéraire nécessite des études sur la gestion des pieds-mères, l'enracinement des boutures et l'élevage jusqu'à l'obtention d'un plant pouvant être installé en forêt. Ces travaux font l'objet d'un financement par l'Office National des Forêts depuis 1997.

Le présent article propose de faire état de l'avancement des travaux concernant le rôle de la gestion des pieds-mères et de l'état de la bouture lors du prélèvement sur la capacité d'enracinement et de développement aérien des boutures.

La méthode de bouturage peut intéresser aussi la recherche sur la génétique des chênes en permettant l'amplification de génotypes à tester.

1- Gestion des pieds-mères

De 1993 à 1996, on a utilisé au Cemagref de Nogent, comme à la pépinière forestière expérimentale de Guéméné-Penfao la stratégie du « furetage »¹ sur une planche classique de pépinière (Figure 1). Il a été vérifié, par la pépinière de Guéméné-Penfao, que le prélèvement des boutures n'affecte pas la qualité morphologique des plants utilisés comme pieds-mères. La planche de pépinière peut être vendue pour fournir les plants aptes au reboisement, selon les normes du FFN².

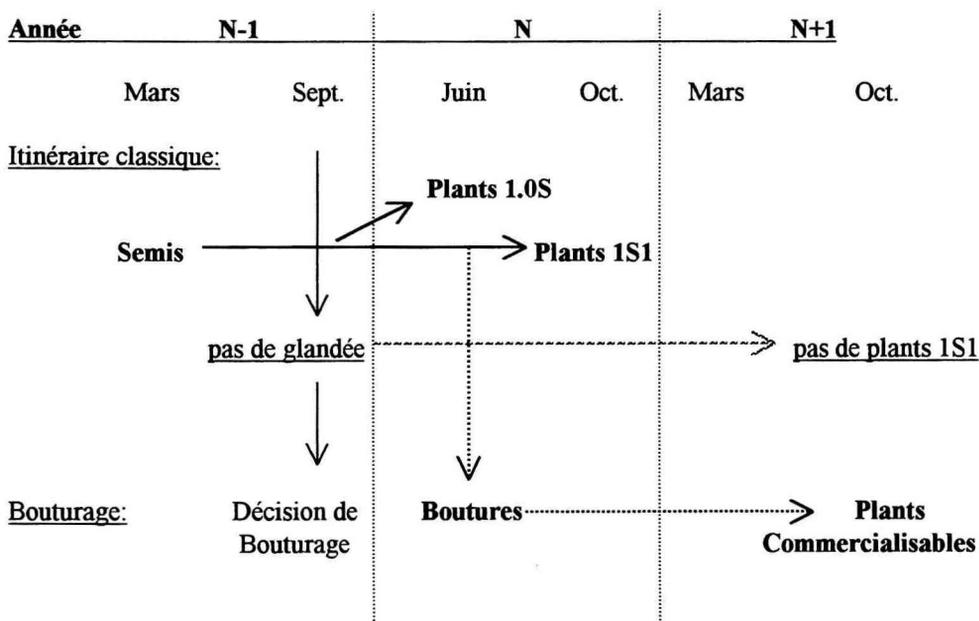


Figure 1: Le furetage sur planche de pépinière

1 Prélèvement au hasard de boutures de caractéristiques données sur des plants dans leur seconde année de végétation, la planche étant commercialisée en fin d'année

2 Fond Forestier National

D'après la figure 1, on constate que le bouturage ne peut être réalisé qu'une seule fois par planche car on ne fait pas de bouturage en cascade. Si on a une seconde année sans glands, cette stratégie n'est pas utilisable. De plus le rendement par plant est faible et les coûts de prélèvements sont importants.

Une autre stratégie consisterait à conserver une planche de pépinière et à la recéper régulièrement afin de pouvoir effectuer des opérations de bouturage les années d'absence de glandée.

Dans cet objectif un essai a été mis en place en 1997 au Cemagref ; il comprend 5 modalités d'élevage des pieds-mères (provenance des glands : forêt de Bercé, zone 01):

- * plants de 2 ans (semis : 10/94) recépés au printemps 1997 à 15 cm
- * plants de 2 ans (semis : 10/94) recépés au printemps 1997 à 30 cm
- * plants de 2 ans (semis : 10/94) non recépés
- * plants de 1 an classique (semis : 3/96)
- * plants de 1 an classique (semis : 3/96), couverts de mars à juin 1997 avec un voile non tissé (P30)

Le nombre de boutures prélevables³ par mètre de planche est comptabilisé. Connaissant la densité en pieds-mères au m², on en déduit le nombre de boutures prélevables pour 100 pieds-mères. L'itinéraire standard de bouturage est présenté dans la figure 2. Le nombre (calculé) de pieds-mères utilisés par modalité et les résultats d'enracinement sont présentés dans le tableau n° 1.

Modalités	Nombre de pieds-mères utilisés	Nombre de boutures récoltées / 100 pieds-mères observés	% boutures enracinées / insérées	% boutures repiquables / insérées	Nombre de boutures repiquables / 100 pieds-mères observés
2 ans recépés à 15 cm	270	86	90,2	84,4	73
2 ans recépés à 30 cm	430	54	68,7	55,8	30
2 ans sans recépage	400	57	69,5	40,4	23
1 an classique	2600	9	84,4	66,5	6
1 an avec non tissé P30	1120	21	76,3	61,6	13

Tableau n° 1: Nombre de boutures récoltés et capacité d'enracinement selon le type de plants donneurs (première vague de croissance)

³ Boutures répondant au standard pour le stade de développement, la longueur et le diamètre.

Année N
Juin

Prélèvement des boutures sur planche de pépinière:
d'un an ou recépée de x ans



(Nombre de boutures prélevées pour
100 pieds-mères visités)

Insertion des boutures:

- ambiance mist⁴ et panier individuel ajouré 225 cm³
- fin 1er cycle de croissance stade Q1 et début second cycle A2 (voir § 2-a)
- bouture terminale de 8-10 cm, diamètre 2-3 mm, deux feuilles coupées
- traitement hormonal : trempage rapide (15s) dans une solution à 2000ppm d'AIB (acide indol butyrique)
- fertilisation foliaire NPK (20-20-20) chaque semaine
- traitements fongicides



Septembre

Sevrage et notation des boutures après 12 semaines



(Taux de boutures enracinées et
repiquables)

Repiquage en pépinière avec protection hivernale



Année N+1
Septembre

Arrachage et tri des plants



(Taux de survie et taux de plants
utilisables en forêt)

Plantation forestière

Figure 2 : itinéraire standard de bouturage à Nogent

⁴ Humidité relative de l'ambiance réalisée avec une rampe de brumisation fine (buses de 70 litres/h)

La comparaison entre la planche de pépinière classique d'un an et celle de deux ans montre nettement la baisse du taux de boutures terminales présentant un système racinaire suffisant. Cette baisse de l'aptitude au bouturage est observée dans la littérature sur Chêne rouvre (Garbaye et al., 1977) et sur *Q. ithaburensis* (Eshed et Riov, 1996). A noter cependant que le nombre de boutures repiquables pour 100 pieds-mères est meilleur pour les plants de deux ans par rapport aux plants d'un an.

La meilleure modalité est le recépage à 15 cm, le pourcentage d'enracinement est très élevé et on a un nombre de bouture au m² de planche important. Ces bons résultats d'enracinement, dus en particulier au rajeunissement des plants, ont déjà été observés notamment sur des plants de chêne de 3 ans pour lesquels les rejets donnent de meilleurs résultats que les rameaux de taille (Cornu et al., 1977). Les résultats du recépage à 30 cm ne sont pas très différents de ceux des plants non recépés.

On constate donc qu'un recépage sévère conduit à la formation d'un plus grand nombre de boutures et à un meilleur enracinement (Tableau n° 1). Ces résultats seront à confirmer en 1998, en particulier les conséquences de recépages successifs.

Note : Nous avons travaillé au sécateur pour les recépages, à la pépinière de Guéméné-Penfao 3 types de recépage ont été comparés : au sécateur, au taille haie thermique et au gyrobroyeur à lame horizontale. Ces divers modes de recépages semblent équivalents sur la production de rejets, ce qui peut avoir un intérêt certain pour réduire les coûts de recépage.

Bilan: La capacité d'enracinement baisse avec l'âge du pied-mère, dès 2 ans pour nos essais sur *Q. petraea*. Le recépage sévère conduit à un rajeunissement des plants et augmente le nombre de boutures prélevables et la capacité d'enracinement. Spethmann nous confirmait des taux d'enracinement allant jusqu'à 90% avec des pieds-mères de chêne de 12 ans recépés tous les ans à 5-15 cm (communication personnelle).

2- Etat de la bouture lors du prélèvement

2-1 Stade de développement lors du prélèvement

Le chêne a une croissance rythmique qui comprend la succession de phases d'activité et de repos. Ce rythme est endogène, selon les travaux de Barnola en 1986, mais n'exclut pas une influence du milieu notamment de la température et de la lumière. L'importance du stade physiologique du rameau sur la capacité d'enracinement a été mise en évidence (Garbaye et Le Tacon, 1978).

La mise en place d'une unité de croissance comprend plusieurs stades morphologiques, nous utiliserons les suivants :

Stade Q : quiescence apparente, le bourgeon est en repos et la lignification augmente.

Stade A : apex gonflé avec un début d'activité.

Stade D : débourrement avec début d'allongement des entre-nœuds

Stade E : allongement des entre-nœuds et croissance des limbes foliaires

Stade F : fin d'allongement des feuilles et arrêt de l'allongement des entre-nœuds

A l'échelle de la population de plants, il est important de connaître la répartition des différents stades à une date donnée afin de déterminer une date optimale de prélèvement. Les travaux de S. Lemerle en 1995 à la pépinière de Guéméné-Penfao ont apporté des éléments de réponse : parmi un ensemble de 100 plants, il existe un sous-groupe de plants qui ne font que deux vagues de croissance, un sous-groupe à 3 vagues et un à 4 vagues de croissance. Ainsi il vaudrait mieux prélever sur la première vague de croissance d'une part pour avoir une meilleure représentation de la population des plants dans la population de boutures mais aussi pour avoir plus de boutures qui présenteront une croissance l'année d'enracinement.

Les travaux sur l'enracinement des boutures en fonction du stade de prélèvement ont été menés en parallèle à Nogent et à la pépinière de Guéméné-Penfao. Le matériel utilisé est constitué de plants de 1 an élevés en planche classique de pépinière forestière. Le bouturage se fait en conteneur dans une ambiance « mist » à Nogent, en conteneur sous « fog⁵ » à Guéméné-Penfao et les boutures sont traitées selon le protocole décrit dans la figure 2. Les résultats correspondent à environ 12 semaines d'enracinement. On distingue les boutures enracinées⁶ des boutures repiquables⁷. Le tableau n° 2 dresse un bilan des résultats sur trois années.

	1 ^{er} cycle	2 ^{ème} cycle					3 ^{ème} cycle				
	Q1	A2	D2	E2	F2	Q2	A3	D3	E3	F3	Q3
Nogent 1995				3	43	37	23			15	9
Nogent 1996					8	23	34				
Nogent 1997	84					60					
Guéméné 1995	95					57	80				47
Guéméné 1996	76	83	84		63	73	72	58			

Tableau n° 2: Pourcentage de boutures enracinées en fonction des stades de prélèvement et des cycles de croissance à Nogent et Guéméné-Penfao

⁵ Humidité relative de l'ambiance réalisée avec une rampe envoyant de l'eau sous pression, on obtient un brouillard très fin non mouillant.

⁶ Boutures dont la base présente un départ de racine.

⁷ Boutures dont les racines sont visibles hors du panier ajouré, utilisé pour l'enracinement.

Bien que les conditions de bouturage ne soient pas exactement les mêmes dans les deux sites, la tendance est en faveur du bouturage aux stades Q1 et A2 (fin de première vague de croissance et début de seconde vague de croissance). L'enracinement est globalement plus élevé à Guéméné-Penfao, certainement grâce à la maîtrise plus fine de l'humidité du substrat et de l'ambiance. La baisse de capacité d'enracinement avec les seconde et troisième vagues est peut être en partie due à un bouturage trop tardif au cours de la saison de végétation, avec diminution de la longueur du jour et des températures.

La nécessité d'obtenir, l'année suivant le bouturage, des plants possédant une hauteur suffisante et une tige dominante pour répondre aux normes de qualité du FFN, nous a conduit à étudier la présence d'une pousse⁸ sur les boutures. La présence d'une pousse terminale ou de pousses latérales a été observée pour chaque modalité de l'essai gestion de pieds-mères (§ 1-). La mise en place d'une pousse terminale sur la bouture donnera sans doute un plant de qualité morphologique meilleure que la mise en place de pousses latérales basses (étude en cours). Les résultats sont présentés dans le tableau n° 3.

Modalités	% boutures enracinées avec pousse/ insérées	% boutures repiquables avec pousse/ insérées	% boutures repiquables avec pousse terminale/ insérées
2 ans recépés à 15 cm	46,9	46,9	34,8
2 ans recépés à 30 cm	34,8	33,5	24,5
2 ans sans recépage	12,9	12,9	8,5
1 an classique	28,1	26,0	20,6
1 an avec non tissé P30	27,7	27,7	19,2

Tableau n° 3: Etat de la partie aérienne selon le type de plants donneurs et l'état d'enracinement (première vague de croissance).

Les deux modalités recépées présentent le pourcentage le plus élevé de boutures enracinées ayant une pousse. En faisant la différence avec la première colonne du tableau 1 on observe une quantité importante de boutures enracinées sans pousse terminale ni latérales. Sur *Q. robur*, il a été observé que l'enracinement induit une dormance du bourgeon terminal, celle-ci pouvant être levée par l'application de gibberellines GA3 ou mieux par l'association de GA3 et de cytokinines BAP (Smith et Schawbe, 1984).

On peut noter que les deux premières colonnes sont peu différentes, ce qui signifie que l'essentiel des boutures enracinées ayant une pousse sont des boutures repiquables. Parmi les boutures repiquables présentant une pousse, 70-80% sont des pousses terminales, les plus intéressantes pour la forme future du plant.

⁸ unité de croissance mise en place pendant l'enracinement à partir des bourgeons latéraux ou du bourgeon terminal de la bouture.

La présence d'une pousse terminale l'année de bouturage augmente les chances d'obtenir un plant de hauteur et de forme correcte en sortie de pépinière (Chalupa, 1993). De plus selon les travaux sur *Acer* et *Hamamelis* (Perkins et Bassuk 1995) et sur *Quercus* (Drew et al., 1993), cette pousse semble aussi être importante pour augmenter la résistance à l'hiver des boutures.

2-2 Diamètre de la bouture

Des essais ont été menés sur les deux sites selon le protocole de la figure 2. A Nogent, les boutures ont été prélevées sur la seconde vague de croissance (Q2-A3) et enracinées sous «mist», quant à Guéméné-Penfao les boutures ont été prélevées sur la première vague de croissance (Q1-A2) et enracinées sous «fog». Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 4.

Année et site	Diamètre de la bouture (mm)			
	0,6-1,5	1,6-2,3	2,4-3,4	3,5-4,5
1994 Nogent		30	20	7
1996 Nogent	30	24	18	
1996 Guéméné	87	89	91	

Tableau n° 4: Pourcentage de boutures enracinées dans les deux sites en fonction du diamètre de la bouture.

Il semble que les boutures de diamètre moyen à 4 mm (de seconde vague de croissance) s'enracinent mal. Pour les autres boutures, on ne met pas en évidence de différences significatives entre les diamètres testés. Sur vigne il semble que des boutures courtes ou de faible diamètre sont plus performantes (poids de racines sur poids total) que des boutures grandes ou de fort diamètre. Cependant on peut aussi se demander quel est le rôle du diamètre de la bouture sur sa capacité à passer l'hiver. Le niveau d'hydrates de carbone présents dans la tige influence la résistance durant l'hiver (Smalley et Dirr, 1986), ce niveau pourrait être lié au diamètre ?

Conclusion

Le passage, pour les pieds-mères, d'une stratégie de « furetage » à une stratégie de recépage permet d'obtenir un nombre élevé de boutures prélevables au m², de maintenir une capacité d'enracinement élevée et pourrait permettre de pallier sur plusieurs années à de mauvaises glandées. Il s'agit d'étudier maintenant l'effet du recépage plusieurs années sur la capacité d'enracinement des boutures.

Le stade optimal de prélèvement des boutures se trouve en fin de première vague de croissance Q1 et début de seconde vague de croissance A2. Il permet d'avoir plus de boutures prélevables ainsi qu'un plus grand nombre de boutures qui feront une pousse pendant l'année de bouturage, d'où gain sur la croissance et peut être une meilleure résistance à l'hiver. Concernant le diamètre, des études complémentaires seront menées en 1998 par l'utilisation de boutures des deux vagues de croissance.

Ce bilan partiel de 4 années d'essais montre l'importance de raisonner un itinéraire de bouturage en intégrant chaque étape et en prenant en compte l'influence des unes sur les autres et non en trouvant l'optimum à chacune. Ainsi on observe un effet bénéfique d'une modalité d'enracinement sur l'élevage: les boutures faites en première vague de croissance s'enracinent le mieux, elles ont aussi le plus fort taux de pousses aériennes, gain de croissance pour la phase d'élevage. Pour le diamètre, on aurait peut être un antagonisme entre l'étape d'enracinement (en faveur des fins diamètres) et celle d'élevage (forts diamètres)

Bibliographie

Chalupa V., 1993 - Vegetative propagation of oak (*Q. robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Annales des sciences forestières*, 50, suppl 1, p. 295-307.

Cornu D., Garbaye J., Laplace J., 1977 - Le bouturage des feuillus divers. *RFF*, 29, 4, p. 279-284.

Drew J.J., Dirr M.A., Armitage A.M., 1993 - Effects of fertiliser and night interruption on overwinter survival of rooted cuttings of *Quercus* L.. *J. Environ. Hort.* 11 (3), p. 97-101.

Eshed Y., Riov J., 1996 - Rooting oak cuttings from gibberellin-treated stock plants. *HortScience*, 31 (5), p. 872-873.

Garbaye J., Kazandjian B., Le Tacon F., 1977 - Développement des boutures enracinées de chêne rouvre (*Q. petraea*) premiers éléments d'une technique de production de plants. *Annales des sciences forestières*, 34, (3), p. 245-260.

Garbaye J., Le Tacon F., 1978 - Production de plants de chêne et de hêtre à partir de boutures herbacées. *PV Académie d'agriculture de France*, p. 962-972.

Lemerle S., 1995 - Croissance rythmique de jeunes plants de chêne sessile (*Q. petraea*) en pépinière et aptitude à l'enracinement de boutures semi-ligneuse en fonction de leur stade de développement, Rapport de MST Biophysiology appliquée aux productions végétales, 50p.

Perkins A., Bassuk N., 1995 - The effect of growth regulators on growth and overwinter survival of rooted cuttings. in *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, vol 45, p. 450-457.

Smalley T. J. et Dirr M. A., 1986 - The over-winter survival problems of rooted cuttings. *The plant propagator*, vol 32, n°3, p10-14.

Smith D.J., Schwabe W.W., 1984 - Acceleration of early growth of seedlings and rooted cuttings of *Q. robur* L., *Forestry*, vol 57, n° 2, p. 143-157.

Problèmes pathologiques rencontrés en multiplication végétative de ligneux forestiers : Etude de la «fonte de boutures» sur merisier

Pathological problems and vegetative propagation of forest trees : cutting decay of Prunus avium

C. Delsol, H. Le Bouler

Pépinière forestière expérimentale de Guémené Penfao
Route de Redon
44290 Guémené Penfao

Résumé : L'efficacité de la multiplication végétative des ligneux forestiers dépend souvent de la maîtrise des infections fongiques. Ainsi, 30% de la production issue de la multiplication végétative du merisier (*Prunus avium*) a été détruite par la «fonte des boutures». Quelque soit l'itinéraire de production choisi, les 4 clones testés ont été atteints à des degrés variables par des *Pythium*. La source de contamination commune à toutes les boutures a été déterminée par un test biologique. Il a été montré que les rameaux ayant servi à la confection des boutures avaient été infectés par le sol du parc à pieds-mères, ce qui a suffi pour contaminer toute la production.

Mots-clés : Multiplication végétative / bouture / pathologie / *Prunus avium* / *Pythium sp.*

Abstract: The vegetative propagation of forest ligneous pose often pathological problems. The *Prunus* cuttings form the subject of root disease caused by *Pythium*. This year, the *Prunus* propagation was decreased about 30% by this pathogen. However, four tested clones have different root disease susceptibility. The source of the disease was in soil where cutting were infected before their insertion.

Keywords: vegetative propagation / cutting / pathology / *Prunus avium* / *Pythium sp.*

Introduction

Le merisier est une espèce forestière très recherchée en ébénisterie. Il ne constitue jamais de peuplements forestiers importants mais se trouve à l'état disséminé aux milieux des chênaies et des hêtraies. Compte tenu de la grande valeur de chaque arbre, on envisage de cultiver en plantation, des merisiers qui feront l'objet de soins intensifs. L'INRA d'Orléans en collaboration avec les forestiers de terrain ont identifié plusieurs centaines d'arbres adultes répartis dans toute la France. Ces arbres ont été clonés et testés en plantation. Après une sélection sévère, huit clones sont actuellement inscrits au catalogue et utilisés par les reboiseurs. Depuis plusieurs années, à la pépinière expérimentale de Guémené-Penfao, les boutures de merisier font l'objet d'attaques d'agents pathogènes entraînant «la fonte des boutures». Les agents susceptibles d'être à l'origine des dégâts sont parmi d'autres: *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Fusarium* ou *Pythium* (Bolton, 1977).

Les *Pythium* sont des phycomycètes, oomycètes (Bigre et al, 1987) qui entraînent d'importants dégâts sur diverses cultures comme les concombres, les petits pois, les carottes et bien d'autres espèces. Ce sont aussi les agents de la fonte de semis sur arbres forestiers comme les Eucalyptus (Sharma et Mohanan, 1992).

Ce champignon se conserve dans le sol sous forme de spores appelées «propagules» qui en germant infectent la plante hôte et forment un mycelium intracellulaire dans celle-ci (Bigre et al, 1987). Ce mycelium donne naissance à des sporocystes qui peuvent évoluer de plusieurs façon (figure 1). Ainsi, les *Pythium* peuvent se multiplier par reproduction sexuée (① fig 1) en formant des oospores dans les racines des plantes infectées (Johnson et al, 1990) qui germent en milieu humide. Sur des boutures, les premiers symptômes apparaissent lors de la phase d'enracinement même en absence de racine ; les boutures montrent à leur base une pourriture brune qui progresse vers le haut de la tige. Ainsi, ces parasites entraînent, des nécroses au niveau de la tige allant jusqu'à la mort des plants (Hodges et Campbell, 1994) (Smith et Neely, 1981).

Le pouvoir pathogène de ces champignons dépend de divers facteurs comme la sensibilité des plantes hôtes (Ginoux et Messiaen, 1993) ou la densité de l'inoculum dans le sol (Mathre et al, 1994). L'importance des attaques augmente avec la densité des plants (Sharma et Mohanan, 1992). Pour lutter contre ces parasites, l'alternance de fongicides peut être une solution. Cependant, étant donné les conditions de bouturage, l'humidité et les températures qui règnent dans les serres (Hodges et Campbell, 1994) favorisent la multiplication des *Pythium* sp.

Ainsi, cette étude a pour objet de (i) définir les différentes sensibilités des clones de merisier à l'attaque des *Pythium* et de (ii) proposer un itinéraire de culture à suivre pour lutter contre ces parasites.

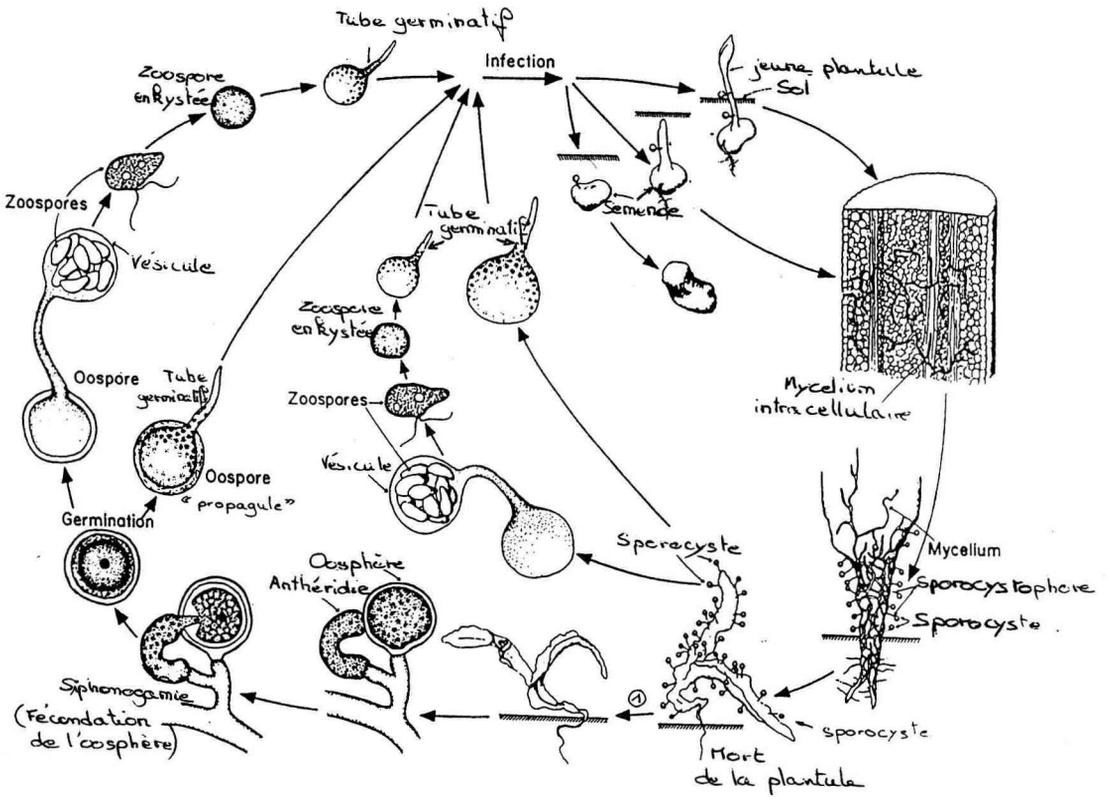


Figure 1 : Cycle de la "fonte de bouture" causée par *Pythium*
 (dessin de George N. AGRIOS, 1969) PLANT PATHOLOGY

1- Matériel et Méthode

1-1 Matériel végétal

1-1-1 Le merisier

Les boutures ont été prélevées sur des pieds mère de merisier, âgés de 2 à 4 ans, à l'aide de sécateurs désinfectés à l'alcool à 90°. Quatre clones sur les huit existants ont été choisis: «Monteil», «Ameline», «Gardeline» et «Hautmesnil». Les rameaux ont été mis en sacs plastiques puis amenés sur le lieu de bouturage.

La coupe du côté sommital de la bouture est réalisée à 5 mm des bourgeons extrêmes, en biseau pour faciliter l'évacuation de l'eau du côté opposé au bourgeon terminal. Une demi-feuille a été conservée permettant d'augmenter la densité de boutures au m² en limitant le recouvrement des feuillages. Elle diminue de plus l'évapotranspiration de la bouture. La bouture standard fait entre 10 et 15 cm, pour un diamètre de 3 à 8 mm et comporte 3 bourgeons appelés «yeux».

Après traitement de la base des boutures dans de l'A.I.B. à 4000 ppm (Acide Indole Butyrique) pendant 15 secondes, celles-ci ont été insérées dans les caisses. Un traitement au Decis a été réalisé après installation des boutures (Decis: deltaméthrine, insecticide contre les pucerons observés sur les pieds mère, dose : 0.025g/l). Un complément d'arrosage a été réalisé pour pallier le déficit en eau du substrat observé dans certaines caisses. Un seul substrat a été utilisé, composé de 40% d'écorce de pin compostée, 40% de tourbe blonde, 10% d'hortifibre et 10% de pouzzolane. Suivant les modalités, il a été ou non désinfecté au bromure de méthyle par la firme Falienor.

Les boutures ont été installées sous brumisation ("FOG system) afin d'obtenir une humidité relative de l'air comprise entre 95 et 100 %. Le déclenchement du brouillard était régulé par un thermostat. Une horloge permettait l'ajustement des déclenchements du "FOG system" en fonction des températures externes. Des psychromètres ont permis de suivre régulièrement cette humidité. La serre (15 x 7 m) était munie d'une "ombrière" pour éviter les trop fortes montées de température à cette époque de l'année (mai-juin).

1-1-2 Le concombre

Espèce végétale sensible aux *Pythium*, le concombre a été utilisé pour révéler la présence de cet agent pathogène. Des graines de la variété «Le Généreux» (obtention Vilmorin) ont été semées dans des pots de 3 litres contenant du substrat identique au substrat de bouturage. Préalablement, les graines ont été trempées dans de l'eau distillée pendant 24 heures et mises en pré-germination dans du coton à l'obscurité pendant 48 heures.

Le semis à 2 - 3 cm de profondeur, a été réalisé à l'aide d'une pince désinfectée à l'alcool. Les graines semées avaient une radicule longue de 1.5 à 2 cm. Tous les pots ont été installés sur une même table dans une pièce éclairée. Un sous pot permettait d'éviter les contaminations éventuelles d'un pot à l'autre.

1-2 Dispositifs expérimentaux

Deux itinéraires ont été choisis : un itinéraire considéré comme «propre» pour lequel les boutures ont été installées sur substrat désinfecté et humidifié avec de l'eau de ville supposée indemne de *Pythium* et un autre itinéraire, dit «sale» pour lequel l'installation a été réalisée sur substrat non désinfecté et humidifié avec de l'eau de la réserve de la pépinière susceptible de contenir des propagules de *Pythium*.

Chaque caisse (60 × 40 × 20 cm) contenait 12 boutures de chaque clone disposées sur 8 lignes de 6 dans l'ordre suivant : 6 Monteil, 6 Ameline, 6 Gardeline, 6 Hautmesnil répété deux fois.

Le substrat a été fertilisé au moment de la préparation des caisses avec de l'Osmocote à 1,5 kg/m³ de substrat (composition N-P-K : 15-11-13, engrais retard).

Les modalités expérimentales sont fonction du substrat (désinfecté ou non), de la période et durée de traitement fongicide au cryptonol (oxyquinoléine liquide, dose : 0.21g/m²). Pour chacun des deux itinéraires, 10 niveaux de traitement ont été testés, y compris un témoin jamais traité (80 caisses en tout) (tableau n° 1).

Code modalité	Substrat utilisé	Eau d'arrosage	Période de traitement au cryptonol	
			Début	Fin
Non - 00*	Non désinfecté	Réserve	0	0
Non - 11	Non désinfecté	Réserve	1	1
Non - 12	Non désinfecté	Réserve	1	2
Non - 13	Non désinfecté	Réserve	1	3
Non - 14	Non désinfecté	Réserve	1	4
Non - 15**	Non désinfecté	Réserve	1	5
Non - 25	Non désinfecté	Réserve	2	5
Non - 35	Non désinfecté	Réserve	3	5
Non - 45	Non désinfecté	Réserve	4	5
Non - 55	Non désinfecté	Réserve	5	5
Des - 00*	Désinfecté	Ville	0	0
Des - 11	Désinfecté	Ville	1	1
Des - 12	Désinfecté	Ville	1	2
Des - 13	Désinfecté	Ville	1	3
Des - 14	Désinfecté	Ville	1	4
Des - 15**	Désinfecté	Ville	1	5
Des - 25	Désinfecté	Ville	2	5
Des - 35	Désinfecté	Ville	3	5
Des - 45	Désinfecté	Ville	4	5
Des - 55	Désinfecté	Ville	5	5

* : témoin jamais traité

** : témoin toujours traité

Tableau n° 1 : Modalités expérimentales selon le substrat, l'arrosage et les traitements fongicides au cryptonol.

exemple : 1 = 2 pulvérisations de cryptonol (dose : 0.42g/m²) durant la 1ere quinzaine, 2 = 2 pulvérisations de cryptonol durant la 2ème quinzaine, 5 = 2 pulvérisations de cryptonol durant la 5ème quinzaine après l'insertion des boutures.

Chaque modalité a été répétée quatre fois et placées aléatoirement dans 4 blocs (4 lignes), disposées dans une serre à double paroi désinfectée au préalable au Sernat à 0.4% (désinfectant à base de composés phénoliques et d'un détergeant anionique, qui détruit bactéries et champignons pathogènes, 0.3 l/m²). Des supports ont été installés sous les caisses pour éliminer l'excès d'eau qui pourrait être source de contamination (eau stagnante).

Essai «eau - substrat» sur le concombre

Un test sur l'eau (ville, réserve, eau bouillie) et le substrat (substrat désinfecté ou non) a été réalisé pour vérifier le potentiel infectieux de ces deux facteurs. Chaque pot a reçu 12 graines pré-germées de concombre. Les pots ont été arrosés avec 500 ml d'eau (2 x 250 ml) avant le semis de façon à amener les substrats à un taux d'humidité convenable puis des compléments ont été apportés par la suite.

Chaque modalité (substrat x eau) a été répétée 6 fois : les 36 pots ainsi obtenus ont été disposés de façon aléatoire sur une table.

Nous avons aussi analysé à l'aide du même test (concombre) la terre issue du parc à pieds mère de merisier. Du substrat désinfecté a été mélangé à un même volume de terre et placé dans six pots (6 répétitions). Ces pots étaient arrosés avec de l'eau bouillie.

N.B.: Aucun traitement fongicide n'a été effectué

1-3 Mesures réalisées

1-3-1 Sur les boutures de merisier

Chaque semaine, les boutures présentant des symptômes de «fonte de boutures» (nécrose sur la tige) ont été prélevées après identification de chacune par une étiquette adhésive portant le numéro de la bouture. Une mise en culture, sur milieu gélosé Malt-Agar en boîte de Petri, d'une partie de la bouture a permis de confirmer la présence de *Pythium*. Les prélèvements ont été réalisés sur la base de la tige après désinfection superficielle de la bouture à l'alcool (passage d'un papier filtre imbibé d'alcool sur toute la surface de la tige).

Les prélèvements et mises en cultures ont été effectués près d'une flamme en ambiance non contaminante. L'incubation s'est effectuée à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 2 à 5 jours. Sur les boutures enracinées, nous n'avons pas analysé les racines par manque de moyens techniques (la tige seule a été analysée).

1-3-2 Sur les jeunes plants de concombre

Une surveillance journalière a permis de déceler les fontes de semis dans chacun des pots. Chaque plant de concombre atteint de fonte de semis a été enregistré.

1-4 Analyses statistiques

Tous les essais ont été soumis à une analyse de variance (logiciel STAT ITCF) chaque fois qu'il a été possible de l'appliquer. Les hypothèses de validité de ces tests ont été vérifiées (normalité - écart type). Lorsqu'il apparaît des effets significatifs au seuil d'erreur de 5% pour les facteurs testés, les comparaisons des moyennes (test Newman Keuls) ont été réalisées.

2- Résultats

2-1 Essai sur merisier

Lors des mesures réalisées, nous avons remarqué qu'une bouture attaquée par la «fonte de bouture», perdait la demi-feuille laissée à l'insertion. Ces feuilles présentaient de plus des décolorations comme le montre la figure 2. De plus, toutes les boutures non enracinées ont subi une attaque de *Pythium* (soit les boutures ont été atteintes parce qu'elles n'étaient pas enracinées soit l'attaque les a empêchés de s'enraciner). Plus de 80% des boutures atteintes avaient un développement aérien faible et n'étaient pas enracinées (figure 3 et 4).

Toutes les modalités étudiées ont été touchées par la «fonte»: l'infection a été généralisée. Nous n'avons pas vu de différence entre les divers traitements réalisés (fréquence de cryptonol) ($P > 0.05$). Les témoins «toujours traités» ont été autant atteint que les témoins «jamais traités». Cependant, le substrat désinfecté montre en général des taux de fonte de boutures supérieurs ($P \leq 0.05$) à ceux du substrat non désinfecté (figure 5) (sauf pour Hautmesnil). Il n'y a pas non plus eu d'effet «eau».

L'analyse de variance a de plus permis de montrer les différentes sensibilités des quatre clones de manière très hautement significative ($P \leq 0.001$). Le clone le plus sensible est «Hautmesnil» et le plus résistant «Monteil», «Ameline» et «Gardeline» étant de sensibilité intermédiaire (figure 5).

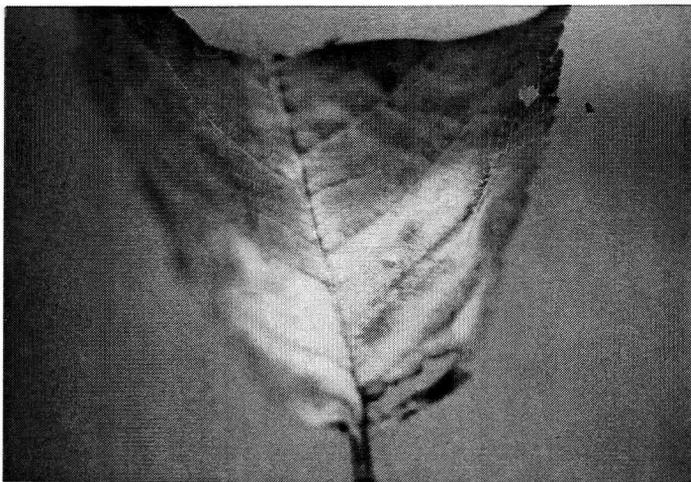


Figure 2 : Décoloration d'une feuille de merisier

N.B.: Les résultats de détermination des *Pythium* sur les boutures malades ont été confirmés par la «Protection des Végétaux» d'Orléans.

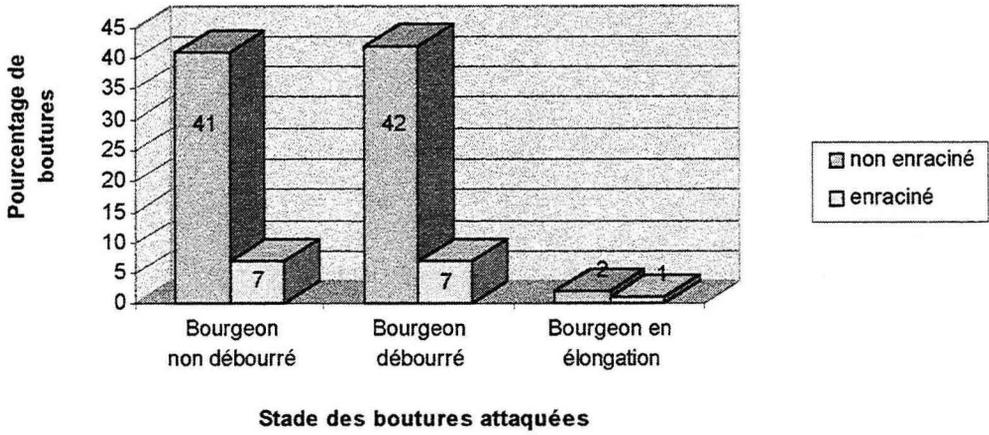


Figure 3 : Stade des boutures atteintes de *Pythium* (répartition en pourcentage)



Figure 4 : Photo d'une bouture au stade bourgeon débourré

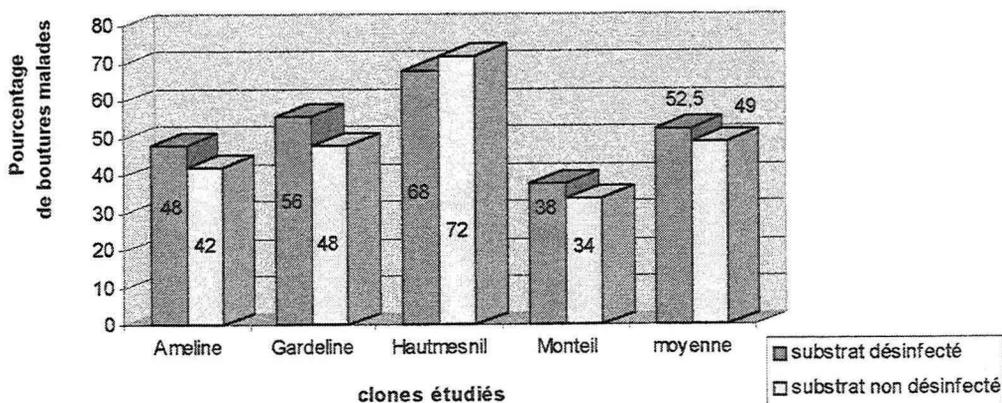


Figure 5 : Pourcentage de boutures attaquées par les *Pythium* suivant les deux substrats et les clones étudiés.

2-2 Essai sur concombre

La propagation de la maladie sur les merisiers étant généralisée à toutes les caisses, nous avons décidé de déterminer la source de la contamination. C'est dans ce but que nous avons réalisé un test sur l'eau et les substrats en utilisant une plante sensible (révélateur de la maladie) : le concombre.

La Protection des Végétaux d'Orléans a analysé l'eau de la réserve de la pépinière. Les résultats ont été négatifs, cependant, les tests conduits sur l'eau étaient peu performants contrairement aux tests biologiques réalisés sur les substrats (culture de concombre). Sur le substrat (désinfecté ou pas), une seule attaque de *Pythium* a été décelée sur substrat non désinfecté.

Ainsi, avons nous décidé de refaire des tests biologiques sur l'eau d'arrosage et les substrats utilisés dans les essais merisier.

Nous avons de plus émis l'hypothèse que les boutures de merisier avaient pu être contaminées peu de temps avant la récolte. En effet, 2 à 3 jours avant celle-ci, une tonte des interbandes enherbées du parc à pieds-mères a été réalisée pour effectuer une récolte en «environnement propre». Les rameaux ont pu être infectés par les déchets et les poussières projetées par la tondeuse.

S'il y a bien eu contamination des rameaux par le sol, toutes les boutures pouvaient donc potentiellement être contaminées au moment de leur installation. En effet, elles ont toutes été traitées avec la même solution d'A.I.B.. C'est pour cette raison que nous avons testé le sol du parc à pieds-mères de merisier pour vérifier le bien - fondé de cette hypothèse.

Les résultats obtenus sur l'eau et les substrats ont été les mêmes que ceux obtenus par la «Protection des Végétaux» d'Orléans : aucune fonte de semis n'est apparue. Les eaux utilisées ainsi que le substrat (désinfecté et non désinfecté) étaient indemnes de *Pythium*.

Par contre, les pots contenant le mélange «substrat désinfecté - terre» ont été touchés par la maladie. Les concombres semés sont morts (25%) après huit jours de culture alors que les autres substrats n'ont révélés aucun *Pythium*. L'effet de la terre du parc à pieds mère est très significatif. Les *Pythium* responsables de ces dégâts ne pouvant pas provenir du substrat désinfecté comme le 1er test l'a montré, c'est donc bien le sol du parc à pieds-mères qui est à l'origine de la contamination des boutures de merisier.

Discussion et Conclusion

Cette année, la production de plants de merisier par multiplication végétative a subi de fortes attaques de *Pythium* qui n'ont pas pu être éradiquées par l'emploi de fongicide tel que le cryptonol. Plus de 30% de la production ont été détruits par la «fonte de boutures». Les résultats ont montré que la source de contamination était le sol du parc à pieds-mères de merisier.

Il faut dire que *Pythium sp.* attaque souvent les tissus jeunes (Hodges et Campbell, 1994). Les boutures de merisier comme toutes les boutures sont des plantes stressées par rapport aux plantes racinées (Smith et Neely, 1981). Les défoliations observées durant les attaques ont été un bon indicateur des symptômes à la base de la bouture (Smith et Neely, 1981). Les nécroses foliaires sont dues à d'autres agents responsables d'antracnoses qui profitent de l'affaiblissement des boutures entraîné par *Pythium*. La contamination de toutes les boutures a probablement eu lieu au moment du traitement à l'A.I.B. où toutes les boutures sont passées dans la même solution.

Une étude concernant les problèmes de *Pythium sp.* en relation avec le climat a été réalisé peu de temps après cet essai. Les premiers résultats ont montré que les zones humides et ombragées favorisent l'expansion des attaques de *Pythium*. La serre ayant servi aux essais sur merisier était ombrée, ce qui peut expliquer l'étendue de la maladie. L'humidité du sol et la température ainsi que l'intensité lumineuse augmentent la gravité de la fonte de boutures. Aux faibles éclaircissements et fortes humidités, le développement de la maladie est encouragé (Sharma et Mohanan, 1992). Les plantes cultivées à hautes températures sont plus susceptibles d'être attaquées par les *Pythium*. Lors de la première semaine après insertion, les températures au sein de la serre ont fortement augmenté (observations faites sur des psychromètres), ce qui a pu fragiliser les boutures face aux parasites, le pouvoir pathogène de certains *Pythium* augmentant avec la température (Hodges et Campbell, 1994).

L'étendue de la maladie a été différente suivant les clones testés montrant ainsi la variabilité de la sensibilité. Le clone «Monteil» est le plus résistant comparé aux trois autres clones testés. Ceci a été confirmé par une autre production de la pépinière où les boutures ont été enracinées en bêche. De plus, les taux d'enracinement de chacun des clones sont quasiment en accord avec les divers degrés de sensibilité: le clone le moins sensible, Monteil, a eu un taux d'enracinement de 72% alors que le clone le plus touché, Hautmesnil, a eu un taux d'enracinement en fin de sevrage de 34% (Gardeline et Ameline ont eu des taux d'enracinement respectivement de 65 et 58%). La sensibilité des clones semble dépendante de l'enracinement du clone et réciproquement.

La désinfection du sol n'a pas été une bonne solution pour lutter contre les *Pythium*. Cette technique détruit la capacité du sol à assurer une protection des plantes contre certaines maladies (Bolton, 1977). C'est dans le sol non désinfecté que le pathogène a eu le moins d'effet sur les boutures. La «fonte de boutures» a été plus sévère dans le substrat désinfecté car le vide microbiologique créé par la désinfection a permis aux *Pythium* de se développer sans être en compétition avec d'autres pathogènes. En effet, le bromure de méthyle a détruit tous les antagonistes potentiels des *Pythium* comme les *Actinomycètes* qui produisent des substances fungitoxiques (Paternotte et Kreij, 1993).

Les symptômes observés ont permis certes de déceler les *Pythium*, mais, ceux-ci étaient souvent associés avec des *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*) ou *Rhizoctonia*. Il n'est pas rare que les *Pythium* interagissent avec d'autres pathogènes formant ainsi un complexe parasitaire (Hodges et Campbell, 1994).

Les traitements fongicides réalisés avec du cryptonol n'ont pas été efficaces, quelles que soient les dates d'applications. Ce fongicide est doté de propriétés systémiques. Il y a peut être eu un problème de lessivage du produit sur les feuilles de merisier traitées. En effet, l'application foliaire de ce produit nécessite une pulvérisation de micro-gouttes sur la végétation, une mauvaise application tend à augmenter la taille des gouttes qui glissent sur le feuillage sans être absorbées. Lessivé, il aurait dû cependant agir dans le substrat.

En conclusion, il a été impossible de définir un itinéraire de production «type» du fait de la contamination générale des essais. Cependant, la source de l'infection a été identifiée et la sensibilité de chacun des clones évaluée. Il serait nécessaire de traiter le parc à pieds-mères pour éviter les problèmes de *Pythium* sur les productions futures.

Le travail restant à effectuer serait de tester la sensibilité des quatre autres clones (Beauvoir, Bonvent, Coulonge et Pierval) et d'étudier leurs développements tant racinaires qu'aériens face à des ambiances de production différentes (hygrométrie et luminosité variables). Il conviendrait de plus d'explorer la voie des antagonistes comme les *Pseudomonas* ou *Trichoderma* pour essayer de neutraliser les *Pythium* de manière biologique.

Bibliographie

Bigre JP, Morand JC, Tharaud M, 1987 - "Pathologie des cultures florales et ornementales". *Agriculture d'Aujourd'hui Sciences Techniques Applications*, Lavoisier Tech. & Doc. JB Baillière

Bolton AT, 1977 - The severity of root rot and persistence of *Pythium splendens* in geranium cuttings grown in soilless mixtures. *Canadian Journal of Plant Science* (Canada), v. 57 (1), p. 87-92

Ginoux JP, Messiaen CM, 1993 - Sensibilité aux *Pythium* et mauvaise germination en sol froid chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* (France), v. 13 (4), p. 283-292

Hodges CF, Campbell DA, 1994 - Infection of adventitious roots of *Agrostis palustris* by *Pythium* species at different temperature regimes. *Canadian journal of botany* (Canada), v. 72(3), p. 378-383

Johnson LF, Qian P, Ferris RS, 1990 - Soil matric potential effects on changes in wall morphology, germination and lysis of oospores of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* (USA), v.80(12), p. 1357-1361

Mathre DE, Callan NW, Johnston RH, Miller JB, Schwend A, 1994 - Factors influencing the control of *Pythium ultimum* induced seed decay by seed treatment with *Pseudomonas aureofaciens* AB254. *Crop Protection* (United Kingdom), v. 13(4), p. 301-307

Patemotte SJ, Kreij C, 1993 - The influence of humic substances and pH on *Pythium* spp in Chrysanthemum. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent (Belgique), v. 58 (3b), p. 1223-1227

Sharma JK, Mohanan C, 1992 - Effects of some nursery practices on incidence and severity of diseases and growth of *Eucalyptus grandis* seedlings. *European Journal of Forest Pathology* (Allemagne), v. 22(2-3), p. 125-135

Smith MAL, Neely D, 1981 - Screening woody ornamental cuttings for propagation diseases. *Plant diseases* (USA), v. 65(11), p. 893-895.

Humidité de l'air et enracinement des boutures de chêne sessile

Air humidity and rooting of oak

H. Le Bouler, C. Clément

Pépinière Forestière Expérimentale
44290 GUÉMÈNE-PENFAO
Ministère de l'Agriculture DRAF-SERFOB Pays de La Loire
Tél. 02 40 79 24 45
Fax 02 40 51 09 14
E-Mail : herve.lebouler@wanadoo.fr

Résumé : Dans cet article, sont présentés les résultats d'un essai étudiant l'effet de l'humidité de l'air sur l'enracinement de boutures de chêne sessile.

Le dispositif expérimental a permis de faire varier géographiquement le climat dans une serre tunnel en contrôlant l'ombrage et l'apport d'eau brumisée. La structuration géographique du climat intérieur de la serre s'en est trouvée affectée. En ce qui concerne le rayonnement, l'effet de l'ombrage a conduit à un taux de transmission allant de 20 à 50 % du rayonnement global extérieur. On n'a pas observé de structuration géographique significative de la température intérieure de la serre. Le déficit local de saturation en vapeur d'eau a été fortement affecté. Le rôle du taux local d'ombrage est particulièrement important.

Le comportement des boutures a été affecté par la position géographique occupée dans la serre. Il a été mis en évidence des relations positives très fortes avec le taux d'ombrage et les flux locaux d'eau brumisée. L'enracinement diminue lorsque l'humidité de l'air baisse et lorsque le rayonnement augmente. En conclusion pratique, on propose de minimiser la transpiration des boutures par un ombrage important et une hygrométrie élevée de l'air (toujours supérieure à 85/90 %). Les difficultés pratiques de mise en œuvre et les inconvénients d'une telle situation climatique sont envisagés.

Mots-clés : *Quercus petraea*, multiplication végétative, serre, climat, hygrométrie, ombrage, transpiration

Introduction

Parmi les facteurs déterminants l'enracinement des boutures de ligneux forestiers, les facteurs climatiques ont été plutôt moins étudiés que les facteurs biologiques liés à la plante elle-même (Frère, 1994 ; Lemerle, 1996 ; Pellicer, 1997).

Dans la plupart de nos travaux récents, le facteur «climat» était un facteur contrôlé empiriquement. Certains résultats plus ou moins cohérents, quelques échecs cuisants et des discussions récurrentes au sein de nos équipes sur les aspects climatiques nous ont conduits à mettre en place en 1997 un essai sur l'influence de l'humidité de l'air sur l'enracinement.

Nos travaux ont porté sur une essence (chêne sessile) bouturée au printemps et au début d'été alors que les plants mères sont en végétation. L'insertion se fait en serre tunnel, avec maintien d'une humidité par fog-système dans des substrats de multiplication horticole classiques de type tourbe/écorce. Cet équipement apporte de l'eau en particules extrêmement fines dans l'air. L'évaporation de cette eau refroidit l'atmosphère ambiante et augmente l'hygrométrie relative.

1- Présentation de l'essai climat/enracinement

1-1 Objectif

Nos pratiques empiriques nous avaient conduits à déterminer que l'on pouvait obtenir de bons pourcentages d'enracinement lorsque le taux d'ombrage était supérieur à 50 % et l'hygrométrie minimale de l'air en pleine journée supérieure à 80 %. Il ne nous avait pas été possible de définir s'il existait une hygrométrie maximale et un taux d'ombrage maximal au-delà desquels le comportement de la bouture se dégradait. Il ne nous a pas été possible non plus d'établir avec précision des climats optimaux adaptés à chaque espèce.

L'objectif de l'essai installé durant la campagne de 1997 était d'étudier le comportement des boutures d'un ligneux forestier en phase d'enracinement, soumises à différents niveaux hygrométrie de l'air.

Pour cela nous avons tenté de faire varier géographiquement l'humidité de l'air dans le tunnel de façon régulière et stable. Nous avons ensuite observé et mesuré le comportement des boutures installées afin d'en déduire une relation entre l'humidité de l'air et l'enracinement.

1-2 Matériel et méthodes

1-2-1 Site

L'expérience a été menée à la pépinière de Guémené dans un tunnel à double paroi gonflable en polyéthylène, orienté EST/OUEST dans sa plus grande longueur. Un double plafond et deux sas en plastique ont été installés pour réduire les effets de bordure et l'hétérogénéité climatique due aux facteurs non contrôlés.

Sur chaque façade du tunnel, des ouvrants à commande manuelle permettaient d'assurer des échanges d'air avec l'extérieur. Ils ont été utilisés uniquement durant la phase de sevrage des boutures.

1-2-2 Facteurs étudiés (figure 1)

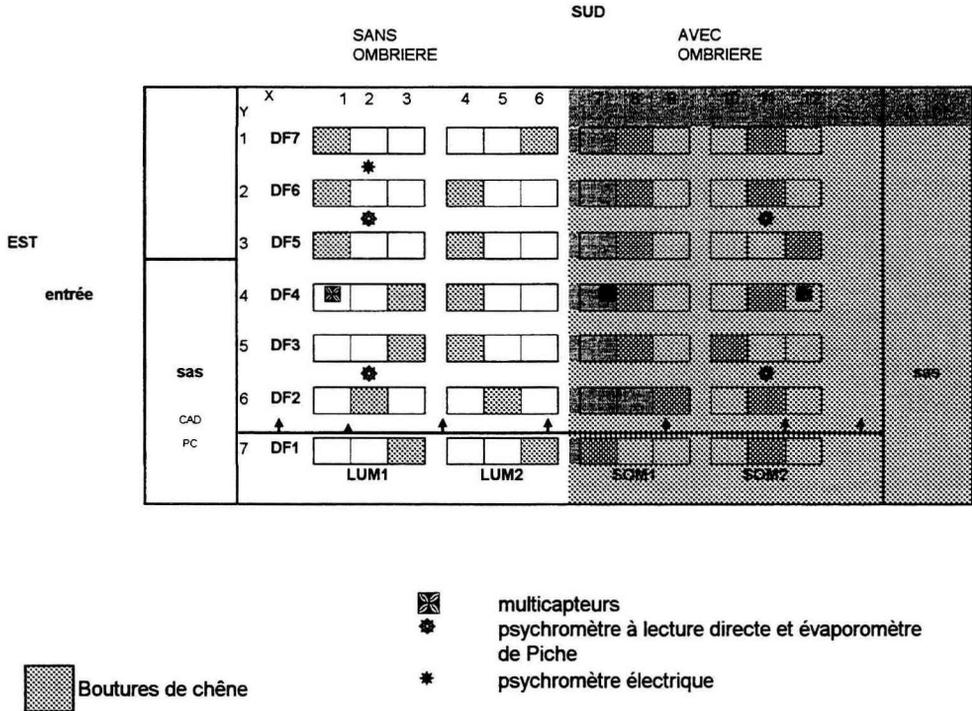
1-2-2-1 Facteurs climatiques

-1) L'ombrage par une toile d'ombrage plastique noire placée à l'extérieur sur toute la moitié ouest de la serre. Cette toile d'ombrage et les effets du déplacement journalier du soleil ont conduit à partager la serre en 4 zones orientées EST / OUEST, qui correspondent aux quatre niveaux du facteur contrôlé " ombrage ". Par la suite ces quatre niveaux seront dénommés LUM1, LUM2, SOM1 et SOM2, de la zone la moins ombrée vers la zone la plus ombrée.

-2) La distance par rapport à la rampe de fog (fog-système Dutrie). Cette rampe était installée le long de la grande longueur nord de la serre à 2 mètres de hauteur avec 7 gicleurs orientés à 45 degrés vers le bas et le centre de la serre. La densité et la position des diffuseurs étant inférieures aux normes du constructeur pour assurer une répartition uniforme de l'eau brumisée, nous espérons un gradient d'humidité de l'air lié à l'hétérogénéité de l'apport local d'eau. Nous avons partagé la serre en sept zones parallèles à la rampe de fog. Ces zones sont orientées NORD/SUD. Par la suite ces sept niveaux seront dénommés DF1 (le plus près de la rampe) à DF7.

Le rythme de fonctionnement du fog était de 1 minute de débit si, au déclenchement théorique (toutes les quatre minutes), l'hygrométrie mesurée dans le point le plus sec de la serre était inférieure à 85 %, suivi de 5 minutes de repos imposé. De cette façon les déclenchements abusifs de nuit et en période humide étaient supprimés. Le cycle était répété indéfiniment tout au long de la journée.

FIGURE 1 : PLAN GEOGRAPHIQUE DES CAISSES DE BOUTURES ET DES APPAREILS DE MESURES DANS LE TUNNEL



1-2-2-2 Matériel végétal

Notre choix s'est porté sur des boutures prélevées sur les pousses de l'année de semis de chêne sessile de 2 ans, élevées en pépinière, sans recépage avant la récolte des boutures.

1-2-3 Dispositif expérimental

Il comporte un facteur " ombrage " à quatre niveaux et un facteur " distance au fog " à sept niveaux. Leur combinaison détermine 28 modalités conduisant à partager la serre en 28 zones.

Dans chacune de ces zones, on a mis en multiplication 54 boutures de chêne.

Les boutures ont été prélevées, préparées et insérées le 5 juin. La bouture est constituée d'une partie de la première pousse de la saison, prélevée à la fin du stade quiescent juste avant le début de la seconde pousse de l'année. Les boutures de 10 cm de long et de 1,5 à 2,5 mm de diamètre sont débarrassées de leurs feuilles sur la moitié basale et hormonées par trempage court (15 secondes) dans une solution d'AIB à 0,2 %. Elles sont insérées dans un substrat composé à parts égales de tourbe blonde et d'écorces compostées.

1-2-4 Variables mesurées

1-2-4-1 Variables climatiques.

- Flux de rayonnement global reçu mesuré en continu (4 mesures par minute) en 3 points de la serre, le long de l'axe central EST / OUEST à distance fixe de la rampe du fog et dans 3 situations d'ombrage différentes.
- Température de l'air et le déficit de saturation en vapeur d'eau mesurée en 4 points de la serre à raison de 6 mesures par jour entre 8 heures et 18 heures.
- Evaporation cumulée mesurée dans les mêmes 4 points avec des évaporomètres de Piche.

De plus, au cours de deux journées ensoleillées en août, sans nébulosité, nous avons procédé à une mesure des variations fines du rayonnement et du déficit de saturation dans la serre en situation stable pour les facteurs climatiques contrôlés.

1-2-4-2 Variables biologiques.

Pour chaque bouture : Evolution hebdomadaire de la survie, du débourrement et du développement aérien.

Le dispositif d'étude a été maintenu de début juin à mi-août jusqu'au sevrage des boutures. A ce moment, le taux d'enracinement réel a été mesuré.

1-3 Résultats et analyses.

Après regroupement et réduction, les données mesurées ont été soumises à des analyses de variances variable par variable. Le tableau 1 regroupe l'analyse de variance de quelques variables très significatives.

FACTEUR	OBJET	VARIABLE	unite	mini	maxi	DL	proba	test F	P	infos test regroupement
ombrage	CHENE	Taux d'enracinement	%	38	81	3	0,0010	13,43	98	augmente avec ombrage
distance au fog	CHENE	Taux d'enracinement	%	42	79	6	0,0118	3,87	91	augmente avec proximité du fog
ombrage	CHENE	debourement 7 sem.	%	2,34	3,03	3	0,0010	12,99	98	augmente avec ombrage
distance au fog	CHENE	debourement 7 sem.	%	2,3	3,1	6	0,0037	4,97	91	augmente avec proximité du fog
ombrage	CLIMAT	température air	°C	24,7	25,6	1	0,0293	4,72	78	diminue avec ombrage
ombrage	CLIMAT	Rayonnement transmis %rel		40	103	3	0,0002	8,53	98	diminue avec ombrage
distance fog	CLIMAT	Rayonnement transmis %rel		54	81	6	0,0000	119,9	99	en fait effet nord sud
ombrage	CLIMAT	Humidité air	%	95,7	96,4	1	0,0000	107,45	99	augmente avec ombrage
distance au fog	CLIMAT	Humidité air	%	96,4	97,6	1	0,0000	21,4	98	diminue avec distance au fog
ombrage	CLIMAT	Déficit saturation	Hpa	0,57	1,54	1	0,0000	94,54	99	diminue avec ombrage
distance au fog	CLIMAT	Déficit saturation	Hpa	0,8	1,3	1	0,0000	29,54	99	augmente avec distance au fog

Tableau n° 1 : Analyse de variance de quelques variables

*Facteur : facteur contrôlé soit : Distance au fog (7 niveaux de 1 à 7)
et Niveau d'ombrage 4 niveaux de 1 à 4.

*DL : degrés de liberté

*P : Puissance de l'analyse de variance

unitaire.

Le rayonnement transmis est en pourcentage par rapport à un point de référence de la serre ou le rayonnement moyen transmis est égal à 50 % du rayonnement solaire extérieur.

L'humidité relative¹ moyenne est calculée sur 24 heures donc, y compris les heures de nuit où elle est égale à 100 %

Le déficit saturation en vapeur d'eau est calculé selon les mêmes conventions.

Il faut noter :

- les niveaux de probabilité hautement significatifs des différences entre traitements.

- la puissance élevée des tests.

- les conséquences pratiques horticoles des différences de moyenne observées. Ainsi sur le critère "Taux d'enracinement", les extrêmes observés vont de 38% à 81 %.

Lors du classement des variables par le test de Newman-Keuls, nous avons observé un très fort taux de recouvrement des groupes homogènes entre zones géographiques et un classement des variables mesurées qui correspondaient à une structuration géographique dans le sens EST/OUEST pour l'ombrage et dans le sens NORD / SUD pour l'effet distance au fog.

En conséquence de cette double structuration, nous avons procédé à une cartographie des valeurs prises par les principales variables selon la position géographique dans la serre.

1-3-1 Rayonnement.

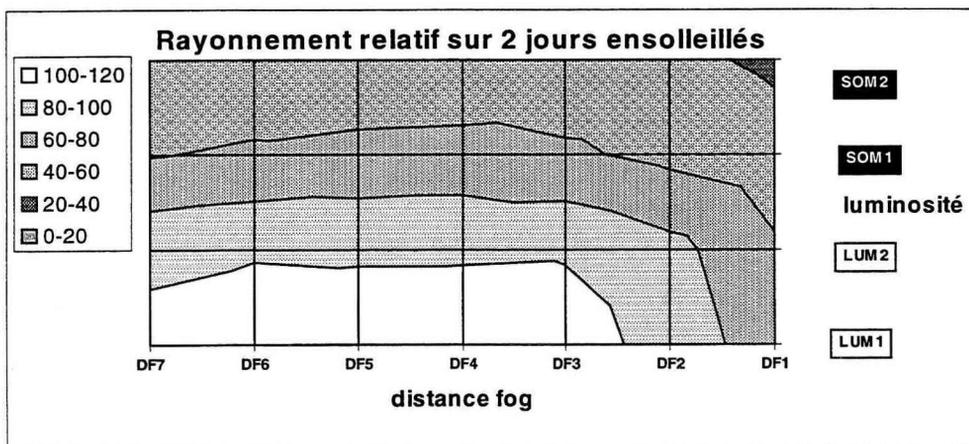


Figure 2 : Structuration géographique du rayonnement

La variable utilisée est le pourcentage relatif de rayonnement reçu en pleine journée par rapport au rayonnement reçu en un point fixe référence de la serre

¹ Humidité relative : Rapport entre la quantité de vapeur d'eau contenue dans l'air et la quantité maximale de vapeur que l'air pourrait contenir exprimée en pourcentage.

La variable utilisée est le pourcentage relatif de rayonnement reçu en pleine journée par rapport au rayonnement reçu en un point fixe référence de la serre (valeur 100). En ce point, le rayonnement reçu est égal à 50 % du rayonnement extérieur (rayonnement global). Les observations concernent des mesures simultanées effectuées en 28 points et lors de 2 journées ensoleillées (figure 2). Les valeurs en continue enregistrées durant toute la durée de l'essai sur 3 points de la serre sont cohérentes avec la structuration observée sur 2 jours ensoleillés. La gamme de transfert dans la serre va de 50 % de transfert du rayonnement solaire à 20 % au point le plus sombre. La structuration NORD/SUD est, semble-t-il, à mettre sur le compte de la forme de la serre et de son orientation par rapport au soleil plutôt que de la distance au fog. Sans surprise, on vérifie que l'ombrage modifie considérablement la transmission du rayonnement.

1-3-2 Déficit de saturation en vapeur d'eau

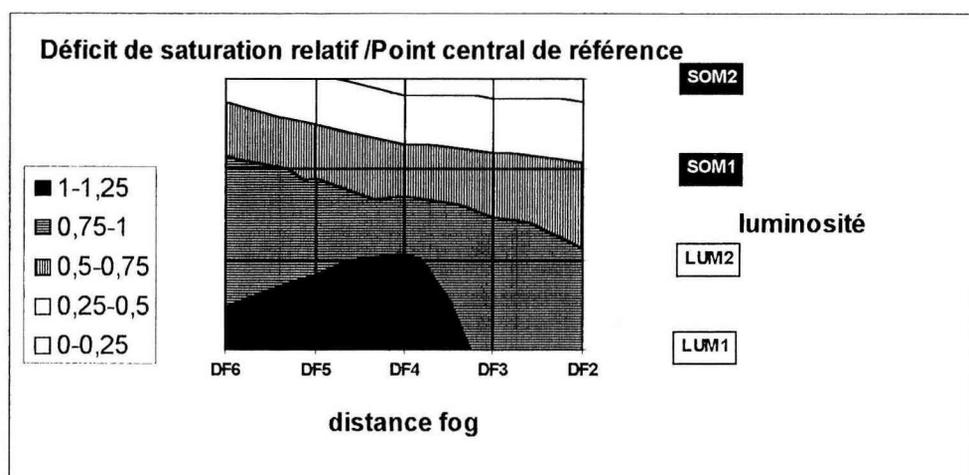


Figure 3 : Structuration géographique du déficit de saturation en vapeur d'eau

Les valeurs fournies concernent la moyenne de sept mesures réalisées chaque jour à heure fixe entre huit heures et vingt heures durant toute la durée de l'essai. L'unité de mesure est un rapport déficit moyen observé en un point de référence moyen de la serre.

Ainsi dans la zone 0.25-0.50, le déficit moyen diurne en saturation en vapeur d'eau est compris entre 25% et 50 % du déficit moyen correspondant au point central de référence.

On a observé qu'au cours de la journée, les différences entre les points de mesure sont d'autant plus fortes que le rayonnement global extérieur est élevé.

En ce qui concerne les températures de l'air, la structuration géographique était très faible, la différence instantanée maximale entre deux points restant inférieure à 2 degrés (cas de rayonnement maximal et de température moyenne intérieure de 35 degrés).

En négligeant le facteur température de l'air, on peut donc donner un ordre de grandeur des humidités relatives moyennes correspondantes et des humidités minimales absolues auxquelles les boutures ont été soumises, c'est-à-dire durant la période 13 h 00 - 17 h 00 en jour clair et juste avant le déclenchement du fog. Dans la zone la plus "humide", cela correspond à une humidité relative minimale de l'air toujours supérieure à 98%. Dans la zone la plus "sèche" à une humidité minimale de 85%. Ainsi, même dans le cas de la zone la plus déshydratée, il s'agit de valeurs relativement élevées par rapport aux pratiques horticoles habituelles. Il faut noter la prépondérance de l'effet ombrage qui induit de fortes différences à distance identique de la rampe de fog. Le rôle essentiel de l'ombrage dans la régulation du déficit de saturation est un enseignement majeur de cette expérience.

1-3-3 Taux d'enracinement pour le chêne.

La structuration met bien en évidence :

- un effet ombrage
- un effet distance au fog
- une interaction entre ces deux effets. Les taux d'enracinement les meilleurs sont obtenus dans la zone la plus sombre et la plus proche du fog. La structuration de l'enracinement du chêne est assez bien corrélée avec la structuration du déficit de saturation de l'air en vapeur d'eau². Plus le déficit de saturation en vapeur d'eau est faible et plus le taux d'enracinement est élevé. Il n'a pas été mis en évidence de seuil maximum d'humidité de l'air pour les facteurs enracinement et comportement des boutures de chêne.

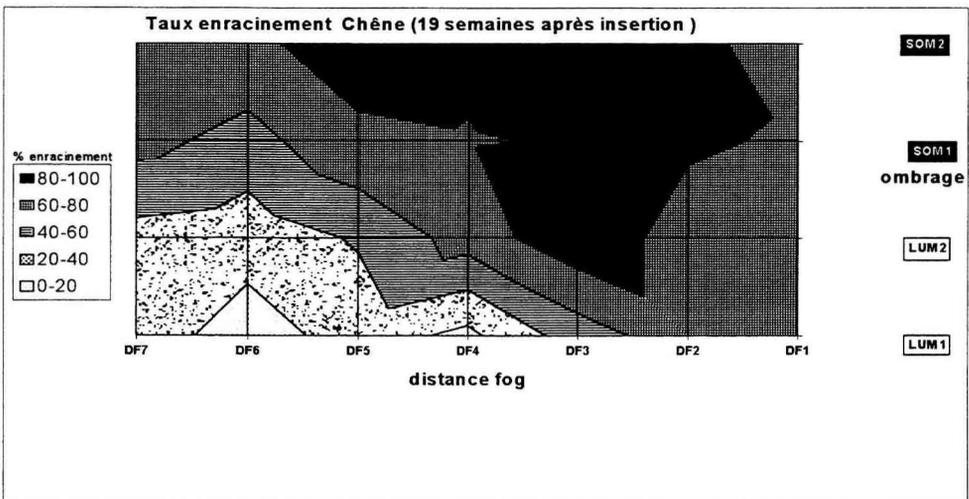


Figure 4 : Structuration géographique de l'enracinement du chêne 19 semaines après l'insertion.

² Le déficit de saturation en vapeur d'eau représente la différence entre la quantité de vapeur d'eau contenue dans un volume d'air et la quantité de vapeur d'eau que cet air pourrait contenir (situation de saturation) compte tenu de sa température et de sa pression.

2- Discussion

Nous avons donc observé et démontré des relations très fortes entre le comportement des boutures, leur position géographique dans la serre et le micro climat local par rapport à l'ombrage et à la distance au fog.

L'enracinement augmente lorsque l'ombrage croît et lorsque le déficit de saturation de l'air diminue. La diminution du déficit de saturation de l'air résulte de la combinaison du taux d'ombrage et de la distance à la rampe de fog.

Une approche thermodynamique du phénomène permet d'émettre des hypothèses sur le rôle relatif des deux facteurs contrôlés : ombrage et distance au fog ou pour être plus précis ombrage et déficit de saturation en vapeur d'eau.

Penman (1948) puis Monteih (1990) ont proposé une équation de calcul de la transpiration potentielle d'un couvert végétal, qui dépend des flux de rayonnement et du déficit de saturation en vapeur d'eau. Le modèle intègre également des constantes caractéristiques de l'environnement de la plante, en particulier des caractéristiques exprimant la résistance au transfert d'énergie et de matière (air et vapeur d'eau).

Boulard et Baille (1993) et Draoui (1994) ont proposé une formule simplifiée de l'équation de Penman-Monteih adaptée au climat des serres. La transpiration T_r s'exprime par :

$$T_r = A R_{gi} + B D_i$$

R_{gi} représentant le rayonnement global transmis et D_i le déficit en saturation en vapeur d'eau.

A et B sont des constantes caractéristiques de la serre.

Ce modèle montre de façon simple que le flux potentiel de transpiration baisse lorsque le rayonnement transmis diminue et que le déficit de saturation en vapeur d'eau diminue.

Par ailleurs Draoui (1994) a montré que dans une serre, toutes choses égales par ailleurs, le déficit en saturation en vapeur d'eau diminue lorsque le rayonnement baisse.

Grâce aux modèles évoqués ci dessus on peut donc expliquer la structuration observée du rayonnement et de l'hygrométrie relative de l'air dans la serre. Lorsque la distance au fog augmente, le flux d'eau liquide local fourni diminue. Or c'est l'évaporation de cette eau qui en consommant de la chaleur, abaisse localement la température et conduit à l'augmentation de l'hygrométrie relative de l'air. (Chraïbi et al, 1995 ; Boulard et Baille, 1993). Donc lorsque la distance à la rampe de fog augmente, l'effet d'augmentation de l'hygrométrie relative diminue. De même, lorsque l'ombrage augmente, le rayonnement transmis diminue.

La combinaison des facteurs ombrage et distance au fog permet d'expliquer la structuration géographique observée de l'hygrométrie dans la serre.

Au prix d'hypothèses simplificatrices sur les coefficients A et B, on est conduit à considérer que la transpiration potentielle est probablement structurée de la même façon et pour les mêmes raisons dans la serre. Elle diminue lorsque la distance au fog augmente et que l'ombrage augmente.

En ce qui concerne les taux d'enracinement observés, ils suivent une structuration géographique de même aspect.

Loach (1988) dans sa synthèse sur les relations entre le statut hydrique des boutures et leur enracinement a montré que de façon générale, le bilan de l'eau pour la bouture, déterminé par l'état initial des réserves et la dynamique de la perte en eau avant l'apparition des racines, conditionnait la réussite de la régénération racinaire.

On propose donc comme explication du comportement des boutures de chêne que leur enracinement et leur comportement ont été directement proportionnels au flux de transpiration induit par l'environnement climatique auquel elles ont été soumises. Cette proposition rejoint de multiples résultats de même type (Grange et Loach, 1984 ; Leakey et al, 1990, Loach, 1988 ; Newton et Jones, 1993 ; Rein et al 1991).

Il est notable que les meilleurs résultats ont été observés à des niveaux de transpiration très faibles correspondant à une hygrométrie saturée en permanence et à des niveaux d'énergie très faibles (20 % du rayonnement extérieur).

Ce résultat est à rapprocher des travaux de Pellicer (1997) qui, sur le mélèze hybride, a mis en évidence que, dans des conditions de transpiration très faible, semblables à celles conduisant au meilleur résultat pour le chêne, on avait une survie excellente et un développement aérien important de la bouture, lié à un bilan photosynthétique net positif, mais sans émission de racine adventive. La rhizogénèse adventive n'est donc pas pour toutes les espèces, systématiquement liée à la réduction absolue de la transpiration.

3- Synthèse et perspectives

3-1 Synthèse

La conclusion pratique simple est qu'il faut réduire la transpiration des boutures par un ombrage important et une hygrométrie de l'air élevée, les baisses d'enracinement se manifestant pour le chêne à des niveaux de transpiration très faibles au regard du climat naturel et des pratiques horticoles habituelles. (Morel et al, 1994 ; Newton et Jones, 1993)

Cependant, il faut craindre des difficultés de divers ordres à des taux d'ombrage extrême et des humidités saturées en permanence qui incitent à rester prudent quant à la généralisation de ce qui a été observé pour le chêne :

- Difficultés pathologiques : *Botrytis*, *Pythium* (Delsol dans cet ouvrage ; Nicot et al, 1996)
- Difficultés physiologiques : retard au développement aérien, sensibilité à des baisses accidentelles de l'hygrométrie, difficulté de sevrage, comportement particulier de certaines espèces telles que le mélèze hybride (Pellicer 1997).
- Difficultés technologiques : la mesure précise de l'hygrométrie de l'air et donc la possibilité d'un pilotage fin est particulièrement compliquée au-delà de 90% d'hygrométrie relative, ce qui semble pourtant constituer un optimum pour certaines essences forestières.

3-2 Perspectives

La variation géographique provoquée du climat à l'intérieur de la serre a eu des effets majeurs sur le comportement des boutures. Dans la pratique courante, il conviendrait sans doute d'être plus attentif aux variations non contrôlées, en particulier aux effets de bordure et à tous les facteurs qui peuvent conduire à rendre hétérogène le climat interne des serres de multiplication.

La possibilité d'un niveau très faible d'énergie transmise permet d'envisager des systèmes statiques de contrôle climatique à très forte hygrométrie s'appuyant sur des taux d'ombrage très élevés en confinement complet. Ces systèmes d'enracinement à l'étouffée peuvent être très économiques et faciles à mettre en œuvre ce qui les rend particulièrement intéressants en pépinière forestière (Leahey et al 1990).

En serre tunnel classique, il semblerait très intéressant d'appliquer à la multiplication végétative des ligneux le modèle de gestion couplée de l'aération et de la brumisation proposé par Boulard (1996). Une première approche appliquée à la serre ayant servi à l'expérience décrite a permis de montrer que l'on pouvait maintenir en serre des conditions réputées optimales pour l'enracinement du chêne par la simple variation de l'ouverture en pignon et de la durée de fonctionnement du fog calculée grâce à l'algorithme proposé par Boulard (1996). Celui-ci s'appuie sur la mesure instantanée de l'hygrométrie relative et de la température instantanée dans la serre (Boulard et Baille 1993, Boulard 1996, Morel et al 1994). Cependant l'obtention d'un capteur d'hygrométrie simple économique et fiable au-delà de 90 % d'hygrométrie reste un préalable non satisfait à ce jour.

Bibliographie

Boulard T., 1996 - Modèle de bilan Thermo-Hydrique de serre et gestion couplée de l'aération et de la brumisation. *Actes du séminaire de l'AIP Serres*, Alénia, 12-14 Mars, p. 293-295

Boulard T., Baille A., 1993 - A simple greenhouse climate control model incorporating effects of ventilation and evaporative cooling. *Agricultural and Forest Meteorology*, 65, p. 145-157

Chraïbi A., Makhlof S., Jaffrin A., Bentounes N., 1995 - Refroidissement évaporatif de l'air des serres : mesures et modélisation. *J. Phys. III, France* 5, p. 1039-1053

Draoui B., 1994 - Caractérisation et analyse du comportement thermo-hydrique d'une serre horticole. Identification *in-situ* d'une serre horticole. Thèse de Doctorat de l'Université de NICE-SOPHIA ANTIPOLIS, 118 p.

Frère G., 1994 - Multiplication végétative en vrac : Etude de l'influence de quelques facteurs environnementaux sur l'enracinement des boutures de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Mémoire de fin d'Etude pour l'Obtention de diplôme d'Ingénieur, ENITHP ANGERS, 38 p.

Grange R.I., Loach K., 1984 - Comparative rooting of eighty-one species of leafy cuttings in open and polyethylene-enclosed mist systems. *Journal of Horticultural Science*, 59 (1), p. 15-22

Leakey R.R.B., Mesen J.F., Tchoundjeu Z., Longman K.A., Dick J. McP., Newton A., Grace J., Munro R.C., Muthoka P.N., 1990 - Low technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Common. For. Rev.*, 69 (3), p.247-257

Lemerle S., 1996 - Croissance rythmique de jeunes plants de chêne sessile, *Quercus petraea*, en pépinière et aptitude à l'enracinement de boutures semi-ligneuses en fonction de leur stade de développement. Mémoire pour l'obtention de la M.S.T. BAPV Université ANGERS, 50 p.

Loach K., 1988 - Water relations and adventitious rooting. In : Adventitious root formation in cutting, Ch 8, p. 102-116

Monteih JL, 1990 - Principles of Environmental physics. *Second edition. Edward Arnold*. 291 p

Morel P., Laury J.C., Baille M., 1994 - Maîtrise des températures estivales sous serre : plaidoyer pour le brouillard. *PHM Revue Horticole*, 347, p. 27-33

Newton A.C., Jones A.C., 1993 - Characterization of microclimate in mist and non-mist propagation systems. *Journal of Horticultural Science*, 68 (3), p. 421-430

Nicot P., Decognet V., Bardin M., 1996 - Stratégie climatique et lutte intégrée contre les maladies cryptogamiques des cultures sous serre. *Actes du séminaire de l'AIP Serres*, Alénya, 12-14 Mars, p. 232-241

Pellicer V., 1997 - Déterminants environnementaux et physiologiques de l'aptitude à l'enracinement de boutures de mélèze hybride. Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers; 126 p.

Penman HL, 1948 - Natural évaporation from open water, bare soil and grass. *Proceedings of Royal Society of London. A*, 194 , p 120-145.

Rein W.H., Wright R.D., Seiler J.R., 1991 - Propagation Medium Moisture level Influences Adventitious Rooting of Woody Stem Cuttings, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116 (4), p. 632-636

L'horticulture et la culture *in vitro* font-elles bon ménage à l'aube du troisième millénaire ?

Do horticulture and in vitro culture get on well at the dawn of the third millennium ?

C. Jay-Allemand, P. Capelli

Station d'Amélioration des Arbres Forestiers,
INRA Orléans, F-45160 Ardon
E-mail : jay@orleans.inra.fr

Résumé : La culture *in vitro* regroupe des techniques utilisées dans des domaines très différents (recherche, médecine, pharmacie, agro-alimentaire, horticulture, foresterie). En horticulture, elles sont largement employées et répondent à des besoins bien spécifiques, à différents niveaux de la filière. La production de microboutures enracinées à partir de bourgeons ou d'embryons zygotiques permet de sauvegarder des génotypes et de constituer des collections qui alimenteront les programmes d'amélioration et de production. En parallèle, la culture de méristèmes et le microgreffage sont appliqués aux variétés sélectionnées afin de contrôler leur état sanitaire. Le développement de l'embryogenèse somatique s'est traduit en particulier par la mise au point d'une méthode de production bien adaptée aux gymnospermes et a permis de se doter d'un outil performant pour régénérer un matériel génétiquement transformé. Ce dernier point nous laisse déjà entrevoir de nombreuses possibilités, qui devraient se traduire par des sauts technologiques valorisés par les industriels au cours des prochaines années.

Mots-clés : Horticulture, collection, sauvegarde de génotype, rajeunissement, micropropagation, embryogenèse somatique, microgreffage, méristème, cryoconservation, transformation génétique.

Abstract: Various *in vitro* techniques are used in different fields such as research, medicine, pharmacology, food, horticulture, forestry. In horticulture, these techniques are widely used throughout the "plant production chain". Rooted microcuttings obtained from buds or zygotic embryos are produced for the rescue and collection of genotypes used for breeding programmes and plant production. Furthermore, meristem culture and micrografting are used as a first step to propagate healthy elite clones. Somatic embryogenesis enabled the development of appropriate *in vitro* methods both to propagate coniferous on a large scale and to regenerate transgenic plants from genetically modified cells by *Agrobacterium tumefaciens*. This last point opens new horizons in the field of plant biotechnology that will allow private nurseries to develop new "know-how" by using varieties with attractive characteristics.

Keywords: Horticulture, collection, genotype rescue, rejuvenation, micropropagation, somatic embryogenesis, micrografting, meristem, cryopreservation, genetic transformation.

Introduction

L'horticulture est née lorsque l'homme a voulu domestiquer la nature qui l'entourait non seulement pour assurer ses besoins vitaux mais aussi pour modeler son environnement selon ses goûts.

La culture *in vitro* est, par comparaison, une technique très récente puisqu'elle fut développée seulement au début de ce siècle par Gautheret (1934) qui fut parmi les premiers à cultiver des tissus provenant de cellules cambiales de différents arbres (peuplier, érable, saule) sur milieu gélosé en conditions aseptiques.

Aujourd'hui, sous l'expression "culture *in vitro*" se cachent des domaines et des techniques très diversifiées qui se sont fortement développés et spécialisés depuis une bonne trentaine d'années. Aujourd'hui, cette technique est très utilisée en recherche, médecine, pharmacie, agro-alimentaire, horticulture, foresterie, mettant en jeu des moyens matériels et financiers importants : enceintes stériles, conteneurs adaptés, ustensiles spécifiques, fermenteurs, chambres climatisées, ...

Dans le domaine végétal, les méthodes de culture *in vitro* s'appliquent à des matériels très diversifiés (protoplastes, cellules isolées, tissus, organes, plantes entières) pour atteindre des objectifs tournés soit vers la recherche soit vers la production industrielle.

L'empirisme comme toujours a pris le pas sur la connaissance des mécanismes physiologiques inhérents aux tissus végétaux cultivés *in vitro*, ce qui a conduit les utilisateurs d'une part à se heurter à des difficultés telles que la "vitrification", les variations somaclonales, le contrôle des processus d'organogenèse, l'acclimatation (passage de *in vitro* à la serre) et d'autre part à renforcer les recherches dans ces différents domaines.

Malgré ces limites, la culture *in vitro* tient une place prépondérante dans notre société et conditionne en particulier la qualité et la quantité des végétaux utilisés aujourd'hui en agriculture, arboriculture, foresterie et horticulture.

C'est uniquement sur ce dernier point, que nous tenterons de dresser un bilan didactique des bénéfiques pratiques que peut tirer l'horticulture de l'utilisation des techniques de culture *in vitro*, en faisant volontairement abstraction des problèmes physiologiques et/ou génétiques auxquels les plantes cultivées dans ces conditions sont confrontées.

1- Qu'est-ce que la culture *in vitro* ?

De très nombreux ouvrages ont traité de la culture *in vitro* au cours de la deuxième moitié de ce siècle décrivant toutes les méthodes déployées aussi bien dans le domaine animal que végétal (Augé et al., 1989; Margara, 1989). A notre niveau, nous pouvons retenir qu'il s'agit globalement d'une méthode de culture des plantes en conditions aseptiques, c'est à dire sans champignon et sans bactérie, utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés, sels minéraux) qui peuvent être liquides, gélosés, voire même solides avec l'emploi de la vermiculite (Jay-Allemand et al., 1992). On peut penser que la composition de ces milieux est maîtrisée, mais nous savons en particulier que leur autoclavage, nécessaire pour la stérilisation, entraîne de profondes modifications (Pedrotti et al., 1994) dont il est malgré tout possible de s'affranchir par ultrafiltration.

Malgré cette restriction, la culture *in vitro* permet de cultiver des tissus ou des fragments d'organes isolés d'une plante tels que des apex, des bourgeons, des nœuds pouvant régénérer des pousses, mais aussi des racines ayant une croissance de type infini, ou encore des feuilles maintenues en survie. Cette technique permet également de cultiver des cellules isolées voire même des protoplastes (cellules dépourvues de leur paroi) capables de se diviser, de former des cals, des tissus organisés et même de régénérer une plante entière. La culture *in vitro* permet donc d'utiliser toutes les potentialités régénératrices d'une plante, jusqu'à la totipotence cellulaire qui peut se traduire suivant cette formule simple :

1 cellule \Rightarrow 1 plante entière

2- Qu'entendons-nous par horticulture ?

La figure 1 présente très schématiquement les différents maillons de la filière horticole partant des variétés sélectionnées jusqu'à leur commercialisation et passant successivement par la mise en place de parcs à pieds-mères, le développement des méthodes de production de plants (semis, greffage et bouturage) et l'élevage de ces plants conduits par des pépiniéristes privés. La qualité des plants commercialisés dépend a) des performances des variétés forestières, fruitières et ornementales sélectionnées dans le cadre de programme d'amélioration génétique, b) des techniques mises en oeuvre pour obtenir des plants indemnes de maladies et les conserver dans un excellent état sanitaire, c) des techniques de production de plants répondant à des normes de qualité tant au niveau de la partie aérienne que du système racinaire.

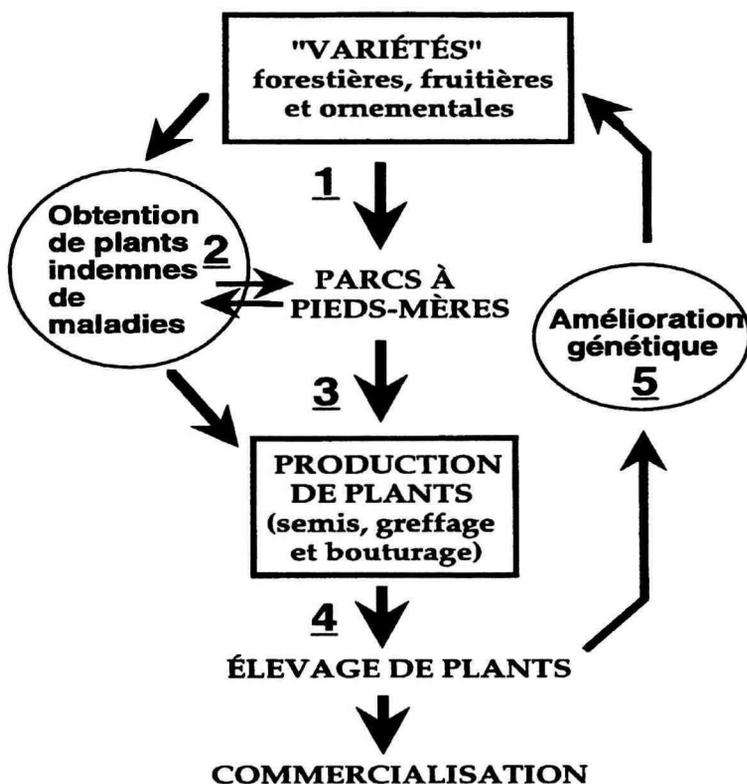


Figure 1 : Représentation schématique de la filière horticole incluant la recherche, la production et la commercialisation. Les numéros 1 à 5 indiquent les différents niveaux d'intervention possibles de la culture *in vitro*.

3- A quels niveaux peut intervenir la culture *in vitro* ? Quels sont les bénéfices attendus ?

Nous aborderons les rôles que peut jouer la culture *in vitro* à chacun des 5 niveaux correspondant aux principaux maillons de la filière présentés dans la figure 1.

3-1 Collection de génotypes et état physiologique du matériel conservé.

A partir d'un matériel sélectionné en forêt, en verger ou en pépinière, il est possible de produire par culture de nœuds et/ou micropropagation des copies végétatives qui serviront à l'installation de parcs à pieds-mères.

Le merisier en est un exemple puisque les arbres sélectionnés sur des critères phénotypiques en forêt ont été conservés grâce à la culture de nœuds prélevés sur des drageons, eux-mêmes développés sur des fragments de racines placés en chambre climatisée (figure 2). Par ailleurs, grâce à la culture d'embryons zygotiques, à la micropropagation et à l'embryogenèse somatique, des génotypes peuvent être conservés *in vitro* (tubes, bocaux ou boîtes de pétri) sur de longues périodes pouvant dépasser les 10 ans (cas de l'orme, du noyer, des porte-greffes fruitiers,...).

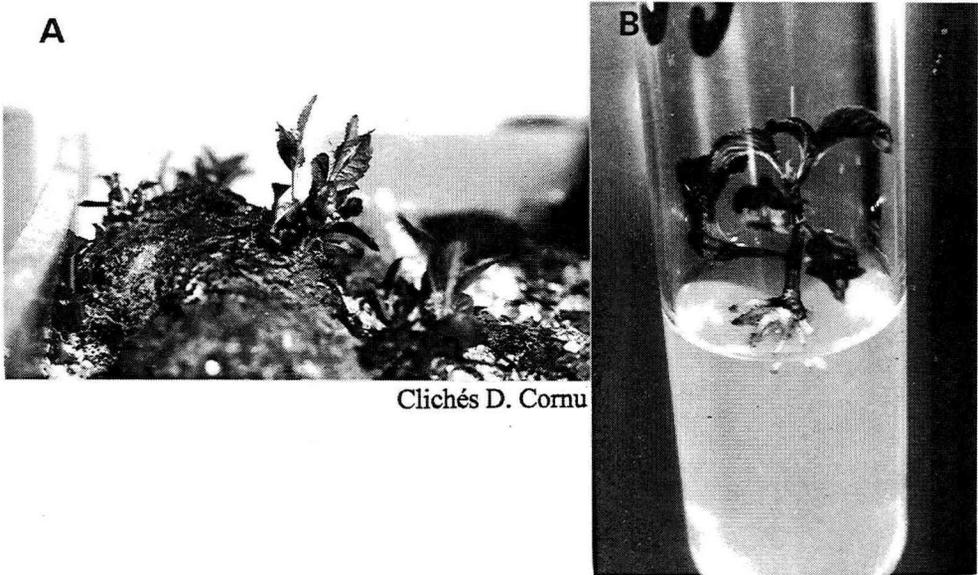


Figure 2 : (A) Drageons formés sur une portion de racine de merisier récoltée en forêt et placée en chambre climatisée. (B) Microbouture enracinée de merisier obtenue à partir d'une pousse feuillée produite par micropropagation d'un clone introduit *in vitro* sous forme de nœuds issus de drageons. Clichés D. Cornu

Cette technique demande d'importants moyens humains pour entretenir les souches *in vitro* tout au long de l'année sur la base de repiquages mensuels. Cependant, on peut envisager de conserver les génotypes clonés dans l'azote liquide par cryoconservation (Engelmann et Baubault, 1986) de méristèmes (cas du merisier et du noyer), d'embryons somatiques (cas du mélèze) et zygotiques (cas du palmier à huile). Enfin, l'application des techniques de culture *in vitro* (micropropagation et microgreffage) permet de maintenir le matériel sélectionné dans un état proche de la juvénilité favorable à la multiplication végétative, au bouturage en particulier (Franclét, 1980). Cette opération est généralement couplée à des techniques dites de rajeunissement (taille sévère, recépage) des pieds-mères ou des arbres âgés sélectionnés qu'il est nécessaire d'utiliser pour obtenir de bons résultats en culture *in vitro* (prolifération, croissance des pousses feuillées et formation des racines adventives).

3-2 Obtention de matériels indemnes de maladies.

Il est souvent indispensable de recourir à la culture de méristèmes ou à la technique de microgreffage pour produire des variétés indemnes de virus en particulier (cas du fraisier, de la pomme de terre, de la vigne et des porte-greffes fruitiers) et éviter ainsi des pertes de productivité voire même la dégénérescence des plants cultivés. Ces variétés peuvent être conservées soit en culture *in vitro* soit en pépinière. Un suivi de ces variétés peut être effectué grâce à des tests sérologiques attestant la qualité de l'état sanitaire des plants commercialisés.

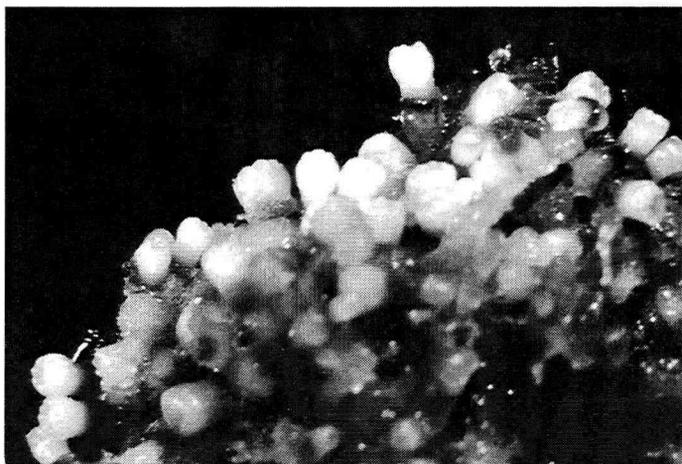
3-3 Développement de méthodes de production de plants.

La culture *in vitro* a depuis longtemps fait ses preuves comme outil de production de plants par sa rapidité à amplifier une variété donnée, par sa capacité à raccourcir les cycles de production et à stocker de grandes quantités de matériel dans un espace réduit, par sa puissance de production en masse sur des temps courts permettant une programmation précise de la sortie des plants commandés. Dans le domaine de l'horticulture, 2 principales méthodes sont aujourd'hui utilisées: la micropropagation (figure 3) et l'embryogenèse somatique (figure 4). La première est bien adaptée à la production de plantes herbacées, d'arbres fruitiers et de feuillus forestiers, alors que la seconde est performante pour les conifères et certaines monocotylédones telles que le palmier dattier par exemple. Dans le domaine des plantes ligneuses en particulier, d'importants progrès ont été réalisés afin d'améliorer les milieux de culture (Jay-Allemand et al., 1992) ou encore les conditions d'acclimatation des plants enracinés lors de leur transfert en serre ou en pépinière (Chenevard et al., 1995, 1997). Ces nouvelles techniques ont permis de faire de véritables sauts technologiques permettant de les appliquer au niveau industriel à des espèces dites récalcitrantes telles que le châtaignier, le chêne, l'hévéa, le noyer, le poirier, le pommier.



Cliché C. Jay-Allemand

Figure 3 : Micropropagation de noyers hybrides (*Juglans nigra* 23 x *Juglans regia*). Phase de multiplication réalisée en bocaux contenant chacun 10 micropousses cultivées sur milieu gélosé. Cliché C. Jay-Allemand



Cliché de M.A. Lelu

*Figure 4 : Embryons somatiques d'un clone de mélèze hybride (Larix kaempferi x Larix decidua) produit en boîte de pétri sur milieu gélosé (phase de maturation).
Cliché M.A. Lelu*

3-4 La culture *in vitro* comme un outil stratégique pour la production de plants.

De nombreuses entreprises ou pépinières privées ont intégré cette technique en tant qu'outil de production leur permettant de gérer la quantité de plants selon les commandes. Mais plus rares sont celles qui l'utilisent comme un outil central de gestion du matériel et de production, situé en permanence à l'interface pieds-mères et élevage en serre. C'est le cas de l'entreprise BIOFORESTA située à Oyarzun (Espagne) qui a construit son laboratoire au cœur de la pépinière constituée de plus de 250 variétés différentes, toutes élevées en pot (figure 5).

Selon les commandes, les pieds-mères en pot sont forcés (irrigation et température) pour produire des pousses qui sont ensuite introduites *in vitro* sous forme de nœuds, de bourgeons ou d'apex après désinfection. Les premiers explants rentrent alors dans un cycle de multiplication jusqu'à atteindre la quantité de plants voulus en tenant compte à la fois des taux d'enracinement et d'acclimatation, variables selon les espèces et l'état physiologique des pieds-mères. Les microboutures produites par culture *in vitro* sont ensuite directement transférées en serre pour obtenir des plants commercialisables dans un laps de temps le plus court possible (3 à 8 mois selon l'espèce et la quantité de plant à fournir).

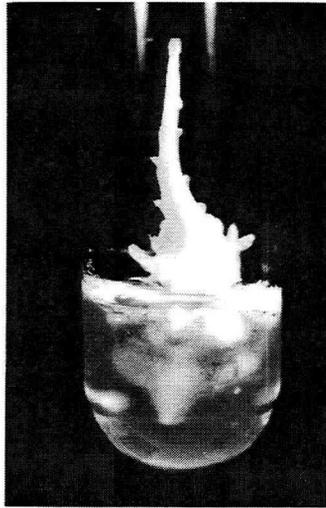


Cliché C. Jay-Allemand

Figure 5 : Laboratoire de culture in vitro BIOFORESTA (Oyarzun, Espagne) entouré d'une collection de très nombreuses variétés ligneuses élevées en pots servant de pieds-mères. Cliché C. Jay-Allemand

3-5 La culture in vitro au service de l'amélioration variétale, comprise au sens large.

L'amélioration génétique traditionnelle tient et tiendra encore toute sa place pour les années à venir afin de sélectionner des variétés bien adaptées à l'environnement dans lequel elles seront cultivées, tolérantes aux maladies et possédant des caractéristiques agronomiques intéressantes. Cependant, là encore la culture *in vitro* joue et jouera un rôle déterminant à 3 principaux niveaux : a) la sauvegarde de génotypes produits par fécondation contrôlée grâce à la culture d'embryons zygotiques ou d'axes embryonnaires (figure 6). b) La production d'haploïdes par androgenèse (culture d'anthers) ou gynogenèse (sacs embryonnaires, oosphères non fécondés) permettant d'obtenir des lignées homozygotes après diploïdisation, recherchées par les améliorateurs. c) La production de plants génétiquement modifiés via *Agrobacterium tumefaciens* par l'utilisation de techniques de régénération faisant appel à l'embryogenèse somatique, au bourgeonnement adventif et à la micropropagation. Les stratégies sens et antisens sont déjà opérationnelles sur plusieurs plantes ligneuses et dépendent des gènes d'intérêts permettant de : a) conférer des capacités de résistance aux variétés utilisées, b) modifier des caractéristiques intrinsèques des plantes pour améliorer la qualité des produits (couleur et lignines), c) augmenter les capacités d'enracinement des (micro)boutures et amplifier le système racinaire en intervenant sur l'expression de gènes impliqués dans la formation des racines adventives et secondaires. L'ensemble de ces travaux devraient déboucher sur la création de génotypes élites possédant de plus grandes capacités de régénération profitables tant à leur commercialisation qu'à leur utilisation.



Cliché C. Jay-Allemand

Figure 6 : Culture in vitro d'un axe embryonnaire issu d'une noix hybride (Juglans nigra 23 x Juglans regia) après 3 semaines à l'obscurité sur milieu gélosé. Noter le fort développement de l'épicotyle. Cliché C. Jay-Allemand

Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus sur les plantes ligneuses (El Euch et al., 1996, 1998), mais le développement de ces travaux et leur valorisation dépendront de la réglementation en vigueur concernant la diffusion du matériel génétiquement transformé.

Un récapitulatif des différentes techniques *in vitro* mises en oeuvre dans le domaine de l'horticulture est présenté dans le tableau n° 1. Il résume ainsi les principales utilisations ou applications qui en découlent.

TECHNIQUES	→ APPLICATIONS
<ul style="list-style-type: none"> - Culture d'embryons zygotiques - Embrogenèse somatique 	<ul style="list-style-type: none"> - Sauvegarde de génotypes - Production & transformation génétique
<ul style="list-style-type: none"> - Culture de noeuds et de bourgeons - Culture d'apex - Microgreffage - Micropropagation 	<ul style="list-style-type: none"> - Rajeunissement & microboutures - État sanitaire & Rajeunissement - État sanitaire & Rajeunissement - Rajeunissement & production
<ul style="list-style-type: none"> - Androgenèse et gynogenèse - Culture de cellules isolées - Culture de tissus, de cals 	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration (haploïdes) - Modèles d'études & recherche - Substances pharmacologiques

Tableau n° 1 : Les techniques de culture in vitro et leurs principales applications en horticulture

Conclusion et perspectives

Malgré le développement important de ces méthodes *in vitro* tant au niveau de la recherche qu'au niveau industriel, les connaissances physiologiques du matériel cultivé *in vitro* restent encore très limitées. Néanmoins, les applications sont aujourd'hui multiples dans de nombreux domaines, notamment en horticulture tels que la sauvegarde d'embryons, l'élimination des virus, le rajeunissement des souches, la production, l'amélioration variétale et la transformation génétique. Ce dernier point nous laisse désormais un champ d'investigations immense, permettant dès aujourd'hui d'envisager de faire de véritables sauts technologiques qui seront valorisés au niveau industriel. On peut espérer ainsi au cours des 10 prochaines années mieux maîtriser encore l'ensemble de ces techniques au profit de a) la sauvegarde de nombreuses espèces et variétés, b) la production de nouveaux produits horticoles, alimentaires et pharmaceutiques, c) la création de nouvelles variétés améliorées, d) l'extension de leur culture grâce à des méthodes de production plus performantes, notamment dans le domaine de l'horticulture.

Bibliographie

Augé R., Beauchesne G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.C., Reynoird J.P., Strullu G. et Vidalie H. , 1989- La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Lavoisier TEC & DOC, Paris 8ème, ISBN : 2-85206-504-5. 225p.

Chenevard D., Jay-Allemand C., Frossard J.S. and Gendraud M., 1995- Morphological and biochemical factors affecting the survival rate of microcuttings of two hybrid walnut (*Juglans nigra* x *Juglans regia*) clones during their acclimatization. *Ann. Sci. For.*, 52, p. 147-156.2.

Chenevard D., Frossard J.S., Jay-Allemand C., 1997- Carbohydrates reserves and CO₂ balance of hybrid walnut plantlets during acclimatisation. *Scientia Horticulturae*. 68, p. 207-217.

El Euch C., Jay-Allemand C., Pastuglia M., Dumas P., Charpentier J.P, Capelli P., Jouanin L., 1996- Modification de l'expression du métabolisme phénolique chez le noyer et réactivité *in vitro*. Réunion de la Société Botanique de France, Montpellier (France), 22 sept. 1995. *Acta Botanica Gallica*, 143, 6, p. 547-553.

El Euch C., Jay-Allemand C., Pastuglia M., Dumas P., Charpentier J.P, Capelli P., Jouanin L., 1998- Expression of Antisens Gene Chalcone Synthase in Transformed Hybrid Walnut Microcuttings: Effect on Flavonoid Content and Rooting Percentage. *Plant Mol. Biol.* (in press)

Engelmann F. et Baubault C., 1986- La cryoconservation des embryons somatiques, polliniques et zygotiques. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 133, *Actualités bot.*, 3, p. 89-103.

Francllet A., 1980- Rajeunissement, culture *in vitro* et pratique sylvicole. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 130, p. 87-101.

Gautheret R.J., 1934- La culture de tissus cambial. *C.R.Acad.Sci. Paris*, série III.198, p. 2195-2196.

Jay-Allemand C., Capelli P. and Cornu D., 1992- Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*, 51, p. 335-342.

Margara J., 1989- Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogenèse. *Ed. INRA*, Paris 7ème, ISBN : 2-85340.379.3, 262p.

Pedrotti E. L., Jay-Allemand C., Doumas P. and Cornu D., 1994- Effect of autoclaving amino acids on *in vitro* rooting response of wild cherry shoot. *Scientia Horticulturae*, 57, p. 89-98.

Influence de la position *in situ* de la bouture sur son enracinement et son développement ultérieur : synthèse de travaux publiés

Influence of the in situ location of the cutting on its rooting capacity and further development : synthesis of published results

O. Monteuis

Cirad-Forêt, Campus de Baillarguet, BP 5035
34032 Montpellier Cedex 1.
Tel: 04 67 59 37 87
Fax: 04 67 59 37 33/55
E-mail: monteuis@cirad.fr

Résumé : L'origine topographique *in situ* de la bouture à l'échelle i) de l'individu, ii) du rameau, et iii) du niveau de branchaison et de la position intra-raméale, influe sur son aptitude à la rhizogenèse adventive, et sur son développement ultérieur éventuel. Ces résultats, obtenus respectivement sur i) *Sequoiadendron giganteum* et *Sequoia sempervirens*, ii) *Acacia mangium* et iii) *Metasequoia glyptostroboides*, sont discutés dans le contexte plus général de la reproduction végétative par bouturage des espèces arborescentes.

Mots-clés : *Acacia mangium*, arbre, bouturage, *Metasequoia glyptostroboides*, origine *in situ*, rhizogenèse, adventive, *Sequoiadendron giganteum*, *Sequoia sempervirens*.

Abstract: The *in situ* origin of the cutting considered successively by its location i) within the donor plant, ii) within the shoot, and iii) according to the lateral axis level and within this latter, had a significant influence on its rooting ability and its possible further development. Results obtained on i) *Sequoiadendron giganteum* and *Sequoia sempervirens*, ii) *Acacia mangium* and iii) *Metasequoia glyptostroboides* respectively are discussed in relation to vegetative propagation of arborescent species by rooted cuttings.

Keywords: *Acacia mangium*, adventitious rooting, arborescent species, cutting, *in situ* location, *Metasequoia glyptostroboides*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sequoia sempervirens*.

Introduction

Les espèces arborescentes sont des structures végétales complexes. Cette complexité, d'autant plus importante que les sujets sont développés, a été mise en évidence au niveau architectural, morphologique, et est de mieux en mieux perçue au niveau physiologique et génétique. Elle pourrait influencer sur les capacités rhizogènes des boutures en fonction de leur position "topographique" au sein de l'individu sur lequel elles sont récoltées (Borchert, 1976; Bonga, 1982; Hackett, 1983; 1988).

Au-delà de sa signification sur un plan purement physiologique, cette influence de la position *in situ* de la bouture sur son aptitude à l'enracinement adventif peut avoir une incidence réelle, en fonction des espèces, sur les possibilités de clonage conforme par bouturage.

Nous avons analysé cette problématique concrètement sur plusieurs espèces arborescentes forestières de zones tempérées et tropicales. Le présent article se propose de faire une synthèse des résultats les plus intéressants obtenus en la matière, à partir d'études publiées que le lecteur pourra consulter pour de plus amples renseignements.

1- Influence du niveau de prélèvement intra-individu

Plusieurs travaux font état de l'influence du niveau de prélèvement de la bouture *in situ*, au sein de l'individu d'origine - ortet pour les forestiers -, sur ses capacités à la rhizogenèse adventive (Francllet, 1981; Bonga, 1982; Monteuis et Pagès, 1987). Cet aspect a été plus particulièrement analysé sur *Sequoiadendron giganteum*, conifère à grand développement.

Globalement, un gradient croissant basipète d'aptitude à l'enracinement a pu être établi au sein des individus étudiés, âgés d'une trentaine et d'une centaine d'années (Monteuis, 1985).

Plus précisément, les boutures prélevées dans les zones les plus proches de l'appareil racinaire: base des individus, rejets de branches basses ou pousses épicomiques, s'enracinent en plus grandes proportions que celles récoltées plus haut dans le houppier, et ce de façon significative (Figure 1).

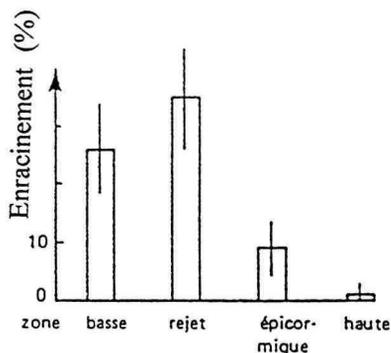
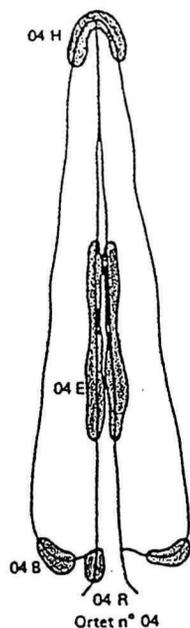


Figure 1 : Influence de l'origine topographique des boutures de *Sequoiadendron giganteum* (indiquée sur l'ortet centenaire d'origine à gauche: B: zone basse; R: rejet; E: pousses épico-romiques; H: zone haute) sur leur pourcentage d'enracinement (histogramme à droite; les barres verticales représentent les intervalles de confiance au seuil $P_0=5\%$). Pour plus de renseignements, voir Monteuis, 1985.

Cette influence du niveau de prélèvement *in situ* des pousses sur leurs aptitudes rhizogènes a pu être approfondie sur *Sequoia sempervirens* dans des conditions de culture *in vitro* (Bon et al, 1994). Outre le fait que la morphologie des pousses prélevées à la base de l'arbre s'apparente plus au type juvénile - feuilles sensiblement plus longues - que celle des pousses du houppier, celles-là présentent une aptitude à la rhizogenèse adventive *in vitro* bien supérieure à celles-ci. Ceci a été clairement mis en évidence au niveau des proportions de tigelles enracinées, du nombre de racines néoformées, de la répartition spatiale de ces racines et de leur longueur, toujours à l'avantage des pousses provenant de la base de l'arbre (Figure 2). Après acclimatation en conditions *ex vitro*, ces dernières poussent plus vigoureusement et de façon orthotrope, alors que les tigelles enracinées provenant du houppier se développent plus laborieusement en manifestant des degrés variables de plagiotropie, vraisemblablement induits par le phénomène de topophysie (Robbins, 1957; Borchert, 1976).

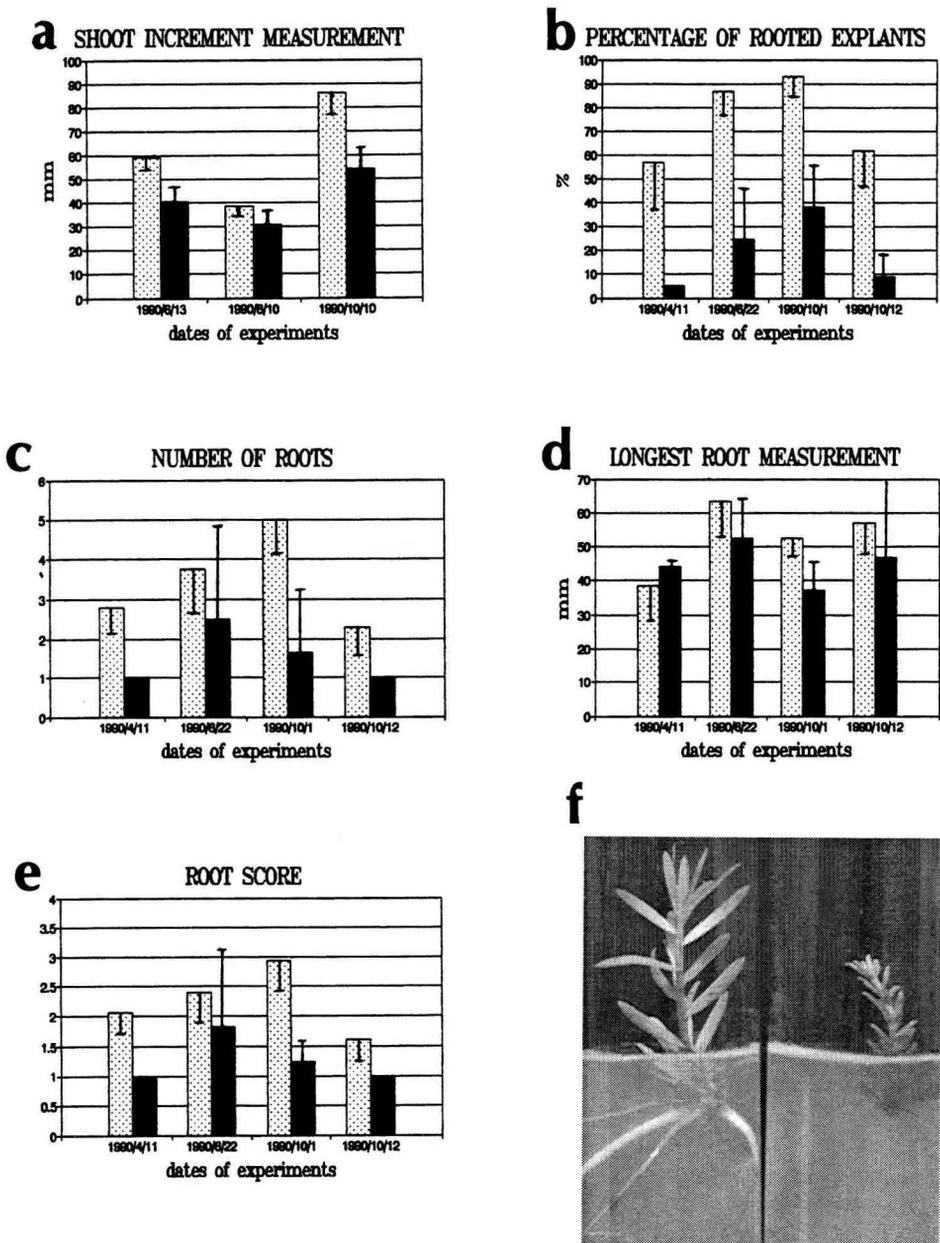


Figure 2 : Capacités organogéniques comparées, à l'issue de sub-cultures *in vitro* de 2 mois, de microboutures provenant de rejets de base et du houpier d'un *Sequoia sempervirens* de 90 ans environ. a: accroissement en hauteur; b: pourcentages d'enracinement; c: nombre moyen de racines néoformées par microbouture enracinée; d: mesure moyenne de la plus longue racine, e: indice de répartition spatiale des racines; f: différences de morphologie entre une pousse de rejet (à gauche) et de houpier (à droite). Pour plus de renseignements, voir Bon et al, 1994.

2- Influence de la position intra-raméale

L'influence sur la rhizogenèse adventive de la position de la bouture au sein de rameau à partir duquel elle est prélevée a été plus spécialement étudiée sur *Acacia mangium* (Poupard et al, 1994). Les observations effectuées à partir de matériel récolté sur des sujets jeunes - 6 mois - et plus âgés - 6 ans - mettent en évidence une aptitude à la formation de racines adventives croissante acropète, les boutures de tête s'enracinant dans de plus grandes proportions et produisant plus de racines néoformées que les boutures de nœuds sous-jacentes (Figure 3).

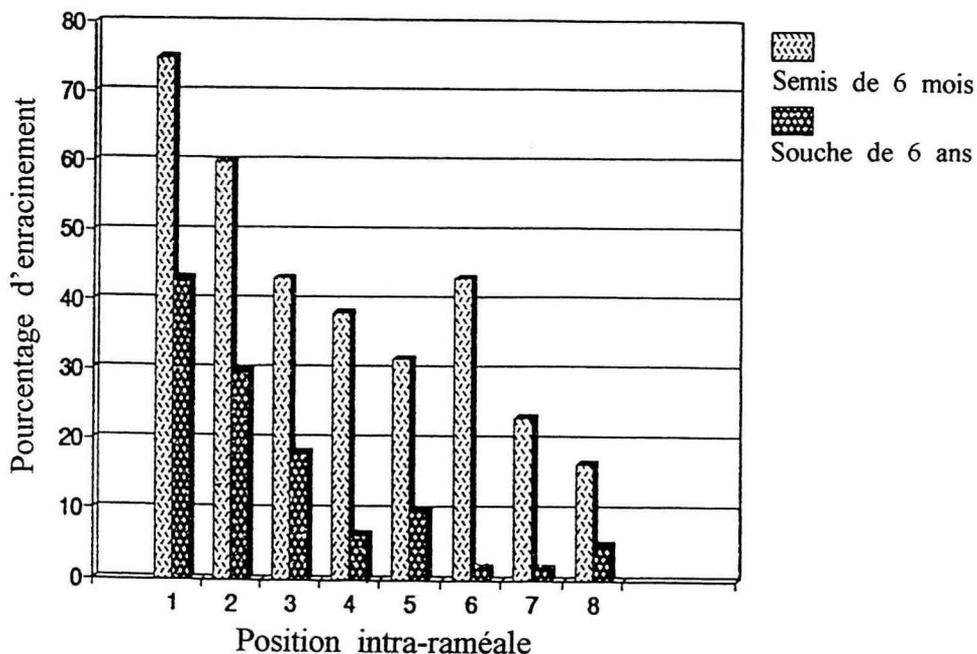


Figure 3 : Pourcentages d'enracinement comparés de boutures d'*Acacia mangium* prélevées sur des semis de 6 mois et des rejets de souches d'individus de 6 ans, en fonction de leur position intra-raméale indiquée par des numéros (en abscisse) croissant de l'extrémité du rameau (1) à sa base (8). Pour plus de renseignements, voir Poupard et al, 1994.

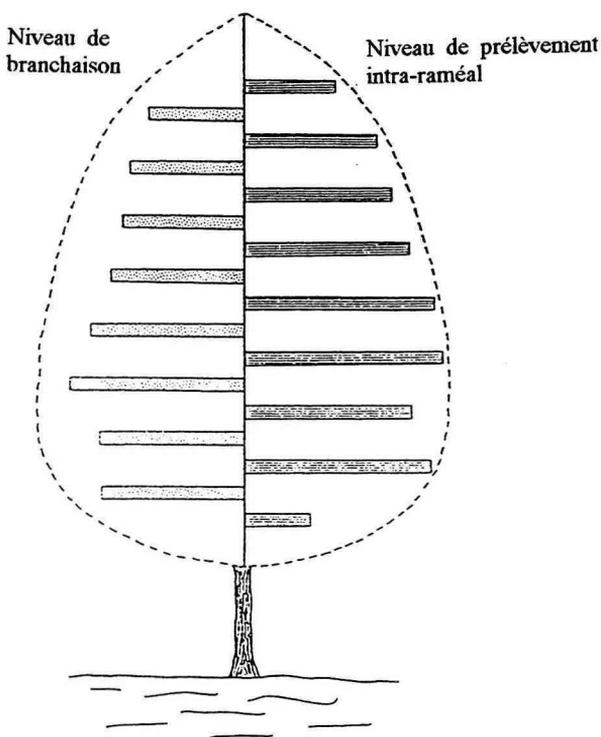
3- Influence du niveau de branchaison et de la position intra-raméale

L'architecture bien définie de jeunes plants - 16 mois - de *Metasequoia glyptostroboides* en période de repos végétatif hivernal nous a permis d'analyser l'influence du niveau de branchaison et de la position intra-raméale sur les capacités à la rhizogenèse adventive de boutures de "bois sec" (Monteuuis et al, 1988).

Sur ce type de matériel expérimental, le taux d'enracinement augmente des ramifications les plus hautes aux plus basses, plus proches du système racinaire. Les boutures provenant de l'axe central s'enracinent également dans de plus fortes proportions que celles issues des ramifications latérales de la partie supérieure des plants.

Nous avons pu observer aussi que les taux d'enracinement augmentaient de façon croissante basipète le long des axes primaires et secondaires (ramifications); les boutures "de tête" s'enracinant dans de plus faibles proportions que les "boutures de nœuds" sous-jacentes.

L'ensemble est schématisé de façon imagée sous forme d'histogrammes dans la figure 4.



*Figure 4 : Représentation schématique et imagée des gradients d'enracinement de boutures de "bois sec" de *Metasequoia glyptostroboides* en fonction de leur position sur le rameau (à droite) et du niveau de branchaison de ce rameau par rapport à l'axe central (à gauche). Pour plus de renseignements, voir Monteuiis et al, 1988.*

La même tendance s'observe sur l'accroissement en hauteur 2,5 mois après repiquage, au détriment des boutures enracinées provenant de la partie distale des rameaux.

4- Discussion

L'existence de zones physiologiquement différentes au sein de végétaux à grand développement architectural a été évoquée à de nombreuses reprises dans la littérature, à partir initialement d'observations morphologiques : persistance des feuilles en période hivernale, différence de morphologie foliaire, parties florifères, etc...(Robbins, 1957; Leopold et Kriedemann, 1975, Hackett 1983). Cette "parcellisation de l'individu" (Nozeran, 1978) influe également sur ses potentialités à la reproduction végétative, notamment à travers l'aptitude à la rhizogenèse adventive (Bonga, 1982; Hackett, 1983). Les observations réalisées sur *Sequoiadendron giganteum* et de *Sequoia sempervirens* sont de ce point de vue éloquentes, avec pour cette dernière espèce, en sus des morphologies distinctes selon le niveau de prélèvement des pousses, des différences sensibles de profils protéiques (Bon et al, 1994).

L'influence de la distance entre l'appareil racinaire et la pousse prélevée pour être bouturée paraît objectivement devoir être prise en considération (Robbins, 1957). Les racines interviendraient en tant que source de substances trophiques et de cytokinines naturelles synthétisées au niveau des pointes racinaires (Leopold et Kriedemann, 1975). Au cours du développement ontogénétique de l'individu, l'accroissement du nombre d'organes, "puits" virtuels, et des corrélations résultantes au sein d'un système architectural de plus en plus complexe seraient autant d'entraves à l'afflux des ressources provenant du système racinaire. Cet aspect a été particulièrement développé par Borchert (1976).

Les techniques de taille des pieds-mères, bien connues des praticiens, reviennent à limiter de façon plus ou moins drastique le développement de l'appareil caulinaire en le simplifiant. Les effets positifs de ces pratiques sur les capacités au bouturage des pousses sont unanimement reconnus (Francllet, 1977; 1981; Hackett 1988). Les "puits" (méristèmes) deviennent plus près de la "source" (racines), ce que certains systèmes de culture tendent aussi à privilégier en favorisant, par le choix de substrat adaptés, le développement d'un appareil racinaire bien ramifié et fourni, avec de nombreuses pointes racinaires.

Le succès du bouturage de nombre d'espèces arborescentes consiste à gérer les pieds-mères de façon intensive (Francllet, 1977; Monteuis, 1993; Monteuis et al, 1995), la fréquence des tailles et autres pincements "en vert" limitant le développement spatial des pousses et les différences inter-axes - phénomènes de hiérarchisation entre pousses dominantes et pousses dominées - et intra-axes susceptibles d'induire des variations intra-clonales (Hackett 1983). L'exemple de *Metasequoia glyptostroboides* est à cet égard éloquent, mettant bien en évidence l'hétérogénéité des réponses rhizogènes en fonction de la localisation *in situ* de la bouture par rapport au niveau de branchaison - inter-axe - et au niveau du rameau - intra-axe.

Le gradient décroissant acropète d'aptitude à la néoformation de racines observé chez *Metasequoia glyptostroboides*, contrairement à *Acacia mangium*, peut s'expliquer par l'activité physiologique du matériel végétal au moment du prélèvement, en repos végétatif pour la première espèce, en croissance active pour la seconde espèce.

Il est en effet établi que l'activité de croissance des pousses est associée à d'importantes variations métaboliques, tant au niveau trophique que des régulateurs de croissance endogènes, auxine notamment, dont on ne saurait contester l'influence sur la rhizogenèse adventive (Leopold et Kriedemann, 1975; Gaspar et Hofinger, 1988; Hackett, 1988).

Bibliographie

Bon M.-C., Riccardi F., Monteuis O., 1994- Influence of phase change within a 90-year-old *Sequoia sempervirens* on its in vitro organogenic capacity and protein patterns. *Trees*, 8, p. 283-287.

Bonga J.M., 1982- Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: *Tissue Culture in Forestry* (Bonga J.M., Durzan D.J., ed), Martinus Nijhoff, Dr Junk Publishers, The Hague, p. 387-412

Borchert R., 1976- The concept of juvenility in woody plants. *Acta Hort.*, 56, p.21-36

Francllet A., 1977- Manipulation des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures. AFOCEL, *Etudes et Recherches*, 12. Nangis, 20 p.

Francllet A., 1981- Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. *Annales AFOCEL* 1980, p. 11-40

Gaspar T., Hofinger M., 1988- Auxin metabolism during adventitious rooting. In: *Adventitious Root Formation In Cuttings* (Davis T.D., Haissig B.E., Sankhla N., ed), Dioscorides Press, Portland, p. 117-131

Hackett W.P., 1983- Phase change and intra-clonal variability. *Hort. Science*, 18 (6), p. 12-16

Hackett W.P., 1988- Donor plant maturation and adventitious root formation. In: *Adventitious Root Formation In Cuttings* (Davis T.D., Haissig B.E., Sankhla N., ed), Dioscorides Press, Portland, p. 11-28

Leopold A.C., Kriedemann, P.E., 1975- Juvenility, maturity and senescence. In: *Plant Growth and Development*, Mc Graw-Hill Book Company, 2nd ed., p.249-269

Monteuuis O., 1985- La multiplication végétative du séquoia géant en vue du clonage. *Annales AFOCEL 1984*, p. 139-171

Monteuuis O., 1993- Current advances in clonal propagation methods of some indigenous timber species. In Sabah (Malaysia). In: *Proceedings of the Regional Symposium on Recent Advances in Mass Clonal Multiplication of Forest Trees for Plantation Programmes* (Davidson J., ed) UNDP/FAO, Los Banos, p. 168-193

Monteuuis O., Pagès C., 1987- Données sur le bouturage du pin sylvestre. *AFOCEL-ARMEF Informations Forêt*, 321, p. 143-153

Monteuuis O., Goubier P., Pagès C., Pezet C., Sarran P., 1988- *Metasequoia glyptostroboïdes* : renseignements spécifiques et bouturage. *Annales AFOCEL 1987*, p. 211-253

Monteuuis O., Vallauri D., Poupard C., Hazard L., Yusof Y., Wahap Latip A., Garcia C., Chauvière M., 1995- Propagation clonale de tecks (*Tectona grandis*) matures par bouturage horticole. *Bois et Forêts des Tropiques*, 243, p.25-39

Nozeran R., 1978- Polymorphisme des individus issus de la multiplication végétative des végétaux supérieurs, avec conservation du potentiel génétique. *Physiol. Vég.*, 16, p. 177-194.

Poupard C., Chauvière M., Monteuuis O., 1994- Rooting *Acacia mangium* cuttings: effects of age, within-shoot position and auxin treatment. *Silv. Genet.*, 43 (4), p.226-231

Robbins W.J., 1957- Physiological aspects of aging in plants. *Amer. J. Bot.*, 44, p. 289-294



Souvent clone interagit avec les paramètres contrôlant la réussite de la multiplication végétative

Interaction between clones and factors controlling success of vegetative propagation by cutting

M.Verger

INRA, Station d'amélioration des arbres forestiers
45160 Ardon France
Tél. 02 38 41 78 00
Fax 02 38 41 78 79
E-mail : michel.verger@orleans.inra.fr

Résumé : Le but de cet article est de montrer le comportement souvent interactif des clones vis à vis des paramètres techniques contrôlant la réussite de la multiplication végétative : traitement des pieds-mères (bouturage en cascade, taille) et des boutures (date d'insertion, type de boutures, hormone et substrat de bouturage). Les conséquences de ce comportement interactif sont discutées.

Mots-clés : multiplication végétative / ligneux forestiers / interaction /

Abstract: *In this article, we investigate the interaction between clones and factors controlling success of vegetative propagation such as stock plant management (serial propagation, hedging) and cutting management (time of cutting collection, type of cutting, rooting hormone and substrate). The consequences of this interaction are discussed.*

Keywords: *vegetative propagation / forest trees / interaction /*

Introduction

La multiplication végétative est, avec la reproduction sexuée, un outil qui permet de diffuser auprès des sylviculteurs, le gain génétique procuré par les programmes d'amélioration génétique d'essences forestières (Verger, 1997).

Les avantages de la multiplication végétative sont multiples : gain génétique optimal, homogénéité de la production et raccourcissement des rotations, affranchissement des contraintes liées à la reproduction sexuée (Libby, 1983).

Afin de mettre au point une méthode de multiplication végétative pour un ligneux, deux types d'expérimentations sont généralement menés. Les premières et les plus fréquentes visent à tester les facteurs techniques qui semblent *a priori* les plus importants (taille des pieds-mères, hormone, substrat, ambiance de bouturage etc.).

Ces facteurs techniques sont expérimentés indépendamment, en ne prenant pas en compte de niveau génétique ou une base génétique très large. Les deuxièmes visent à déterminer, dans un environnement technique *a priori* satisfaisant, quelle prise peut avoir la sélection sur des critères d'aptitude à l'enracinement. Elle aboutit à la sélection de combinaisons génétiques (clones ou familles) sur ces critères (Haissig et Riemenschneider, 1988 ; Radosta et al, 1994 ; Schermann et al, 1996).

Le but de cet article est de montrer, à l'aide de quelques expérimentations menées à l'INRA d'Orléans sur le bouturage horticole de différentes essences forestières, que facteurs génétiques et facteurs techniques interagissent souvent ensemble. Pour cette illustration, c'est le niveau génétique le plus fin (le clone) qui est pris en compte.

	espèce	âge des PM (année)	nombre de clones	élevage des PM	ambiance de bouturage	substrat	hormone	date de bouturage
Conduite des pieds-mères								
- bouturage en cascade	mélèze hybride	<i>facteur testé</i>	10	pépinière	fog	4/3/3 tourbe/ écorce/ sable	AIB= 0.1% en poudre	17/04/89 et 4/04/90
- taille	mélèze hybride	9	4 et 4	pépinière	fog	4/3/3 tourbe/ écorce/ sable	AIB= 0.1% en poudre	8/04/91
Enracinement des boutures								
- date de prélèvement	cryptomeria	9 et 6	8	pépinière	mist	7/3 tourbe/ perlite	AIB= 0.5% en poudre	<i>facteur testé</i>
- type de boutures	douglas	1	30 et 26	serre	fog	1/1 tourbe/ perlite	trempage rapide 1000 ppm d'AIB	13/02/92
- hormone	cryptomeria	9 et 6	6	pépinière	mist	7/3 tourbe/ perlite	<i>facteur testé</i>	27/06/89
- substrat	épicéa	13	4	pépinière	mist	<i>facteur testé</i>	AIB= 0.1% en poudre	17/04/90

Tableau n° 1 : principales caractéristiques techniques des expériences sur la gestion des pieds-mères et l'enracinement des boutures

Deux types d'expériences ont été menés : a) sur la conduite des pieds-mères et b) sur l'enracinement des boutures. Dans le premier type d'essai, nous avons retenu des expériences portant sur a1) l'efficacité d'un bouturage en cascade et sur a2) l'effet de la taille. Le bouturage en cascade consiste à récolter des boutures sur des plants issus de bouture. Il est reconnu comme pouvant ralentir (Kleinshmit et Schmidt, 1977 ; Saint Clair et al, 1985), tout au moins un certain nombre d'années (Dekker-Robertson et Kleinschmit, 1991), les effets du vieillissement des pieds-mères (baisse de l'aptitude à l'enracinement et croissance plagiotrope des plants issus de multiplication végétative). La taille, en rapprochant les axes bouturables du pôle racinaire, considéré comme un pôle de juvénilité, permet également d'annuler ou de ralentir des effets du vieillissement (Libby et al, 1972 ; Franclet, 1977).

Pour le deuxième type d'essai, les expériences ont porté sur b1) la date de prélèvement des boutures, b2) le type de boutures, b3) la concentration en hormone de bouturage et b4) le substrat de bouturage. Tous ces facteurs sont connus pour influencer l'enracinement des boutures d'essences ligneuses (Hartmann et Kester, 1990).

1- Matériels et méthodes

1.1 Matériel végétal et conditions agronomiques

Les principales caractéristiques techniques des essais sont résumées dans le Tableau 1.

1.2 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont consisté en analyses de la variance multifacteurs avec contrôle de l'hétérogénéité par des blocs de bouturage.

Le modèle d'analyse de la variance était le suivant : moyenne + effet des clones (C) + effet du facteur technique testé (T) + effet bloc de bouturage (B) + interaction 2 à 2 (CT + CB + BT) + résiduelle (en modèle fixe).

Cette analyse permet de répondre à la question : existe-t-il un effet significatif de C, T et B et des interactions (CT, CB et BT) ?

Ensuite la part de chaque facteur dans la variabilité totale a été estimée en modèle aléatoire.

Pour cela on sait que la variation due au facteur d'interaction facteur C * facteur T (σ_{CT}) est :

$\sigma_{CT} = (\text{carré moyen interaction CT} - \text{carré moyen résiduel}) / \text{nombre de couples CT}$
et que la variation due au facteur C (σ_C) est :

$\sigma_C = (\text{carré moyen facteur C} - \text{carré moyen CT} - \text{carré moyen CB} + \text{carré moyen résiduel}) / n_C$

avec n_C = nombre de parcelles unitaires/nombre de niveau de facteur de C

La variation totale est $\sigma_{\text{Totale}} = \sigma_C + \sigma_T + \sigma_B + \sigma_{CT} + \sigma_{CB} + \sigma_{BT}$

La part du facteur C dans la variation totale est $\sigma_C * 100 / \sigma_{\text{Totale}}$

La part du facteur CT dans la variation totale est $\sigma_{CT} * 100 / \sigma_{\text{Totale}}$

La part des facteurs T, B et CB et BT se calcule de la même façon (en réalisant des permutations circulaires).

Cette analyse permet de déterminer quelle est la part de chaque facteur dans la variation totale observée.

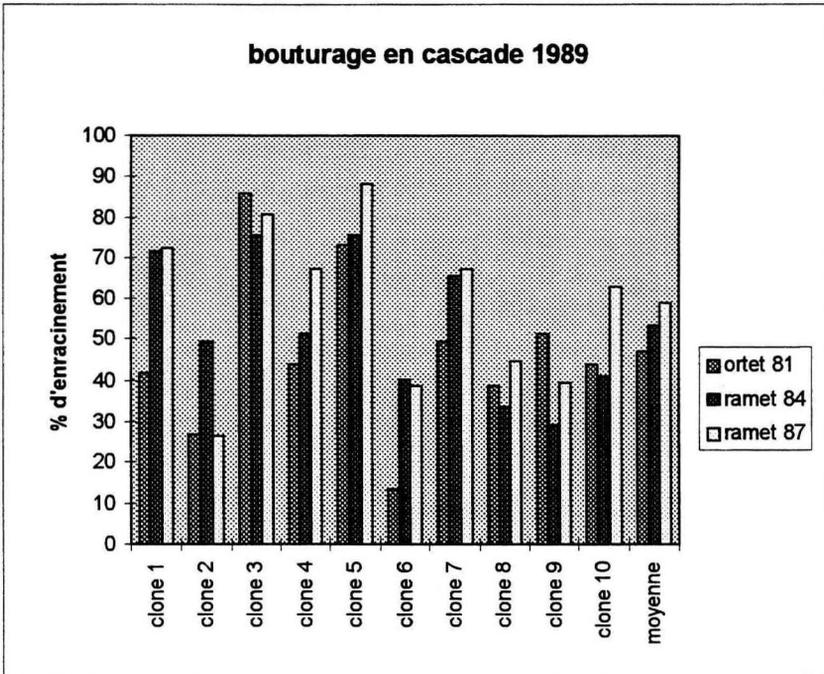


Figure 1 : Réponse de 10 clones de mélèze hybride au bouturage en cascade (essai 1989)

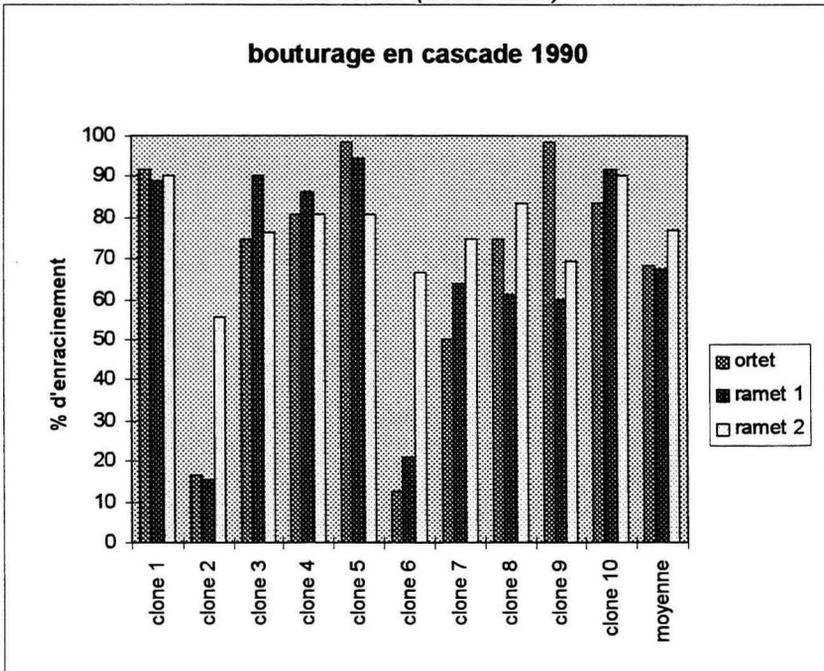


Figure 2 : Réponse de 10 clones de mélèze hybride au bouturage en cascade (essai 1990)

2- Résultats

2.1 Conduite des pieds-mères

2.1.1 bouturage en cascade

On désigne par le terme d'«ortet» le plant initial (il s'agit donc d'un semis) et par le terme de «ramet», les plants issus de multiplication végétative à partir de cet ortet ou à partir d'autres ramets. Pour cet essai, répété en 1989 et 1990, nous avons comparé l'aptitude à l'enracinement de boutures récoltées sur l'ortet (semé en 1981), sur le ramet 1 (obtenu par bouturage de l'ortet en 1984) et le ramet 2 (obtenu par bouturage du ramet 1 en 1987 pour l'essai de 1989 et en 1988 pour l'essai de 1990).

	signification test F %		% dans la variation totale	
	1989	1990	1989	1990
A clone	***	***	63.1	73.0
B niveau de cascade	**	*	6.1	1.0
C bloc de bouturage	NS	NS		
Interaction				
AB	*	**	17.8	26.0
AC	*	NS	13.1	
BC	NS	NS		

Tableau n° 2 : Effets des différents traitements testés et part dans la variation totale (bouturage en cascade).

*** (**) [*] significatif au seuil de 0.1% (1%) (5%) d'erreur

La part due aux clones dans la variation total est systématiquement prépondérante (Tableau 2). La part du facteur technique expérimenté (le niveau de cascade) est très faible et toujours moins importante que la part due au facteur d'interaction clone * niveau de cascade.

La figure 1 montre bien ce phénomène : si au niveau moyenne de clone, on observe que les niveaux de cascade se «rangent» bien dans un ordre qui traduirait l'effet bénéfique sur l'enracinement d'un bouturage en cascade (ce qui n'est plus vrai pour l'essai de 1990! cf. figure 2), au niveau clonal on constate que cette situation ne se retrouve pas systématiquement et que tous les cas de figures sont possibles.

De même, un même clone peut «réagir» deux années de suite différemment aux facteurs techniques expérimentés : par exemple le clone 5 se comporte de façons tout à fait opposées en 1989 et 1990 (classement ortet < ramet 1 < ramet 2 en 1989 et ortet > ramet 1 > ramet 2 en 1990).

2.1.2 Taille des pieds-mères

On a comparé deux types de taille effectuée en 1990 sur des pieds-mères de mélèze hybride bouturés en 1982 à partir d'un ortet semé en 1980

- une taille dite courte (TC) consistant à tailler toutes les ramifications à 1 cm du tronc.

- une taille dite longue (TL) consistant à tailler toutes les ramifications à 30 cm du tronc.

Les pieds-mères taillés ont également été étêtés à 1.30 m. Pour chaque clone, on disposait de deux ramets : l'un subissant une taille (TL ou TC) l'autre restant ni taillé ni étêté et considéré comme témoin (TE). Les boutures ont été récoltées et insérées 1 an après la taille.

comparaison taille courte / témoin

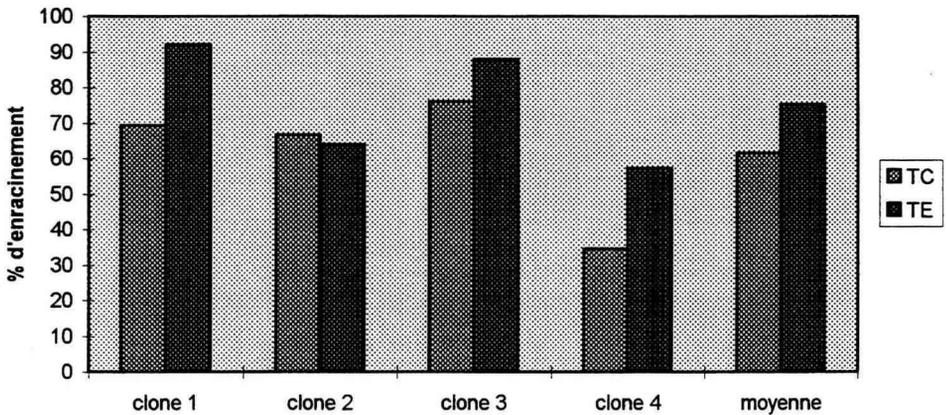


Figure 3 : Réponse de 4 clones de mélèze hybride selon la taille des pieds-mères (taille courte/ témoin)

comparaison taille longue / témoin

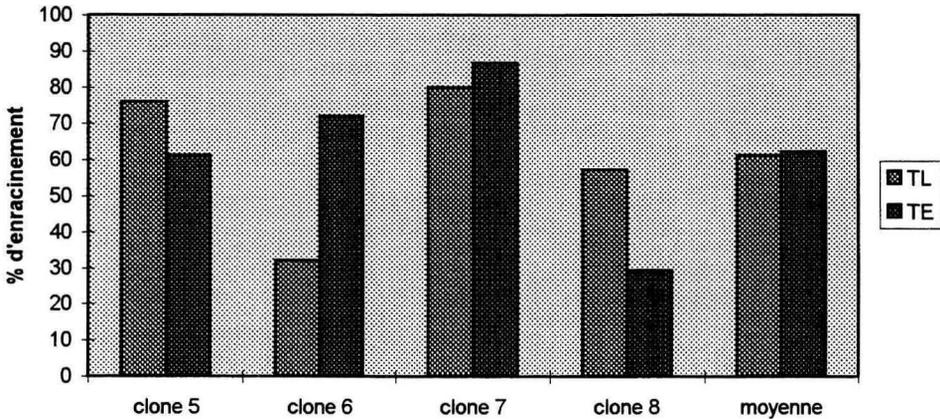


Figure 4 : Réponse de 4 clones de mélèze hybride selon la taille des pieds-mères (taille longue / témoin)

	Signification test F %		% dans la variation totale	
	TC/TE	TL/TE	TC/TE	TL/TE
A clone	*	**	100	20.2
B taille	NS	NS		
C bloc de bouturage	NS	NS		
Interaction				
AB	NS	**		78.8
AC	NS	NS		
BC	NS	NS		

Tableau n° 3 : Effets des différents traitements testés et part dans la variation totale (taille des pieds-mères).

*** (**) [*] significatif au seuil de 0.1% (1%) [5%]d'erreur

Deux comportements différents ont pu être observés (Tableau 3) : interaction clone * modalités de taille (comparaison TL/TE) ou aucune interaction (TC/TE). Dans le premier cas, la part de l'interaction clone * modalité de taille est prépondérante par rapport à l'effet clonal. Dans les deux cas, il n'y a pas d'effet du facteur technique expérimenté.

La figure 3 montre effectivement que le comportement moyen des clones reflète le comportement individuel. A l'inverse, dans le cas d'une interaction clone * modalité de taille significative, deux clones ont leur optimum avec la taille longue et les deux autres avec la taille courte (figure 4).

2.2 Enracinement des boutures

2.2.1 Date d'insertion

Des boutures de cryptomeria ont été récoltées tous les 15 jours environ à partir du 16/05/1989 jusqu'au 08/08/89 (ce qui correspond à 7 dates différentes d'insertion).

	Signification test F %	% dans la variation totale
A clone	**	3.2
B date	***	61.2
C bloc de bouturage	***	13.4
interaction		
AB	**	22.3
AC	NS	
BC	NS	

Tableau n° 4 : Effets des différents traitements testés et part dans la variation totale (date d'insertion). *** (**) [*] significatif au seuil de 0.1% (1%) [5%]d'erreur

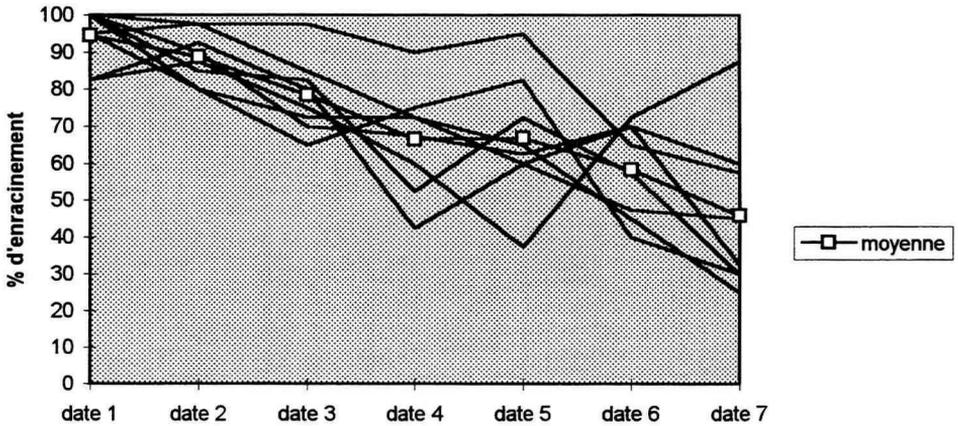


Figure 5 : Réponse de 8 clones de cryptomeria à différentes dates d'insertion

clones de la série 1

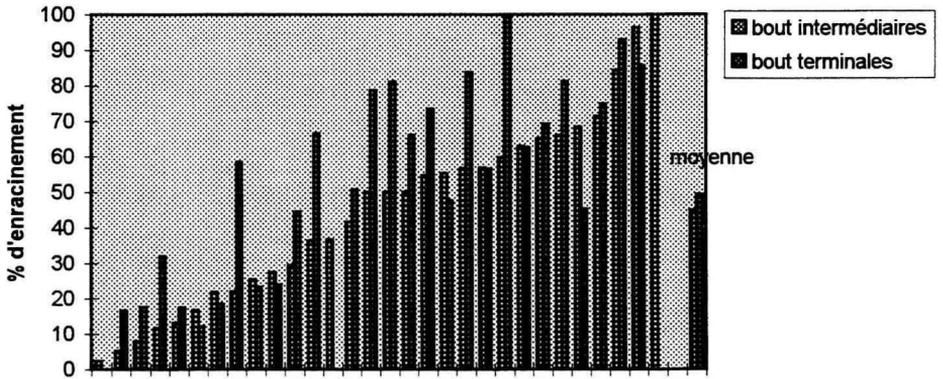


Figure 6 : Réponse à l'enracinement de boutures terminales et intermédiaires de 30 clones de sapin de Douglas (série 1)

clones de la série 2

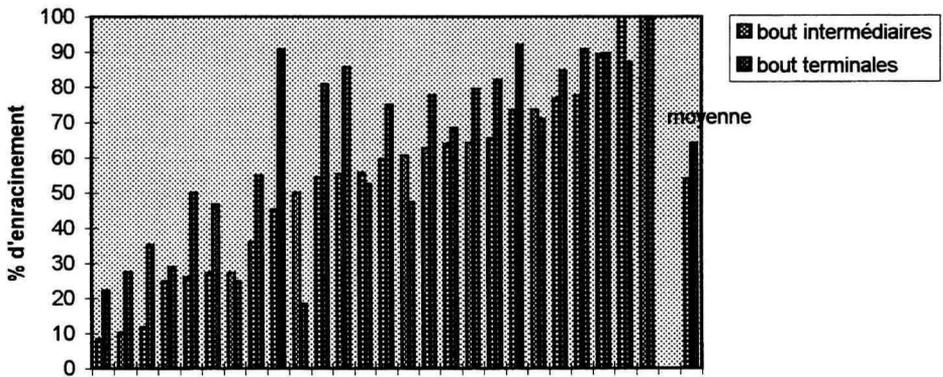


Figure 7 : Réponse à l'enracinement de boutures terminales et intermédiaires de 26 clones de sapin de Douglas (série 2)

On constate une part prépondérante dans la variation totale du facteur technique expérimenté (la date d'insertion) alors que la part due à l'effet clonal est négligeable (Tableau n° 4). Il existe un effet important de l'interaction clone * date d'insertion.

La figure 5 montre qu'après les deux premières insertions qui conviennent à l'ensemble des clones, les clones présentent des variations d'enracinement non synchrones.

2.2.2 Type de boutures

Deux types de boutures ont été récoltées sur des pieds-mères de sapin de Douglas âgés d'un an : des boutures terminales (possèdent un bourgeon terminal) et des boutures intermédiaires (tronçon de tige n'ayant pas de bourgeon terminal). Deux séries de pieds-mères, qui appartenaient à deux combinaisons génétiques différentes, ont été considérées.

	Signification test F %		% dans la variation totale	
	Série 1	série 2	série 1	série 2
A clone	***	***	61.2	86.9
B type de bouture	NS	**		7.5
C bloc de bouturage	**	**	2.9	5.7
interaction				
AB	**	NS	31.4	
AC	NS	NS		
BC	*	NS	4.5	

*Tableau 5 : Effets des différents traitements testés et part dans la variation totale (type de boutures).
*** (***) [*] significatif au seuil de 0.1% (1%) [5%]d'erreur*

On observe entre les deux séries des profils de comportement différents (Tableau n° 5). S'il y a toujours un effet clonal important, il peut ou non y avoir un effet du type de boutures et l'on peut ou non observer une interaction significative entre les clones et le type de boutures. Dans ce dernier cas, la part de l'interaction clone * type de bouture dans la variation totale représente la moitié de la variation due aux clones. Les figures 6 et 7 illustrent bien l'ampleur des variations observées entre clones (de 0 à 100%). Pour la série 1, en fonction du type de boutures insérées un clone peut être ou non multiplié.

2.2.3 Concentration en hormone de bouturage

Trois concentrations d'hormone de bouturage (Acide Indol Butyrique) mélangée à du talc ont été expérimentées pour promouvoir l'enracinement de boutures de cryptomeria

- témoin (talc pur)
- AIB= 0.1%
- AIB = 0.5%
- AIB = 1%

	signification test F %	% dans la variation totale
A clone	***	56.9
B concentration en hormone	**	8.3
C bloc de bouturage	**	14.4
interaction		
AB	*	20.4
AC	NS	
BC	NS	

Tableau n° 6 : Effets des différents traitements testés et part dans la variation totale (hormone de bouturage).
 *** (**) [*] significatif au seuil de 0.1% (1%) [5%] d'erreur

La part de l'effet clonal est prépondérant dans la variation totale suivie par la part due à l'interaction clone * concentration en hormone (Tableau n° 6).

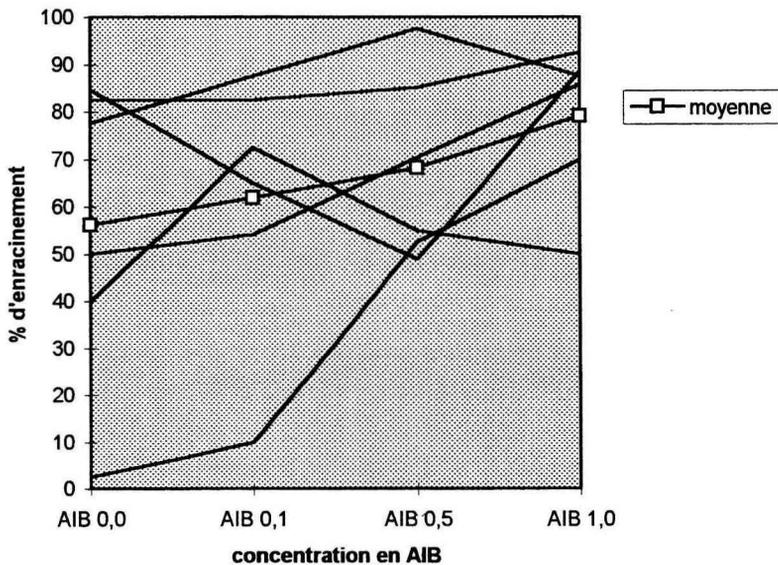


Figure 8 : Réponse de 6 clones de cryptomeria à différentes concentrations en hormone de bouturage (AIB)

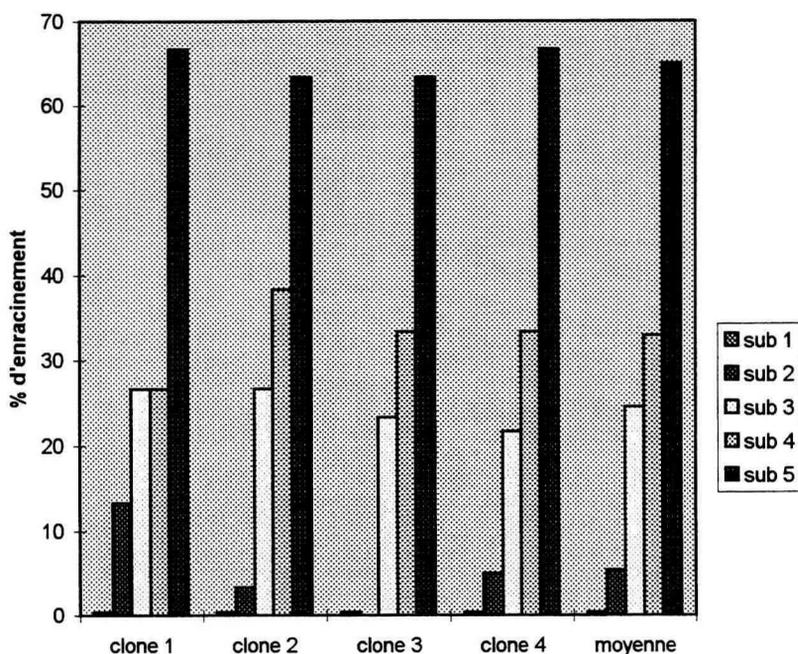


Figure 9: Réponse de 4 clones d'épicéa commun à 5 substrats de bouturage

La figure 8 montre que si la moyenne augmente régulièrement avec la concentration en hormone, tous les clones ne réagissent pas selon ce modèle : en l'occurrence, deux clones ne présentent pas leur optimum pour la plus forte concentration en hormone.

2.2.4 Le substrat de bouturage

Cinq substrats d'enracinement ont été expérimentés sur des boutures d'épicéa commun.

- gravier pur (sub 1)
- 100% tourbe blonde (sub 2)
- 100% écorce de pin (sub 3)
- pouzzolane, tourbe blonde et terreau horticole (60/30/10) (sub 4)
- mélange terreau horticole et perlite (70/30) (sub 5)

	signification test F %	% dans la variation totale
A clone	NS	
B substrat	***	90.4
C bloc de bouturage	*	2.5
interaction		
AB	NS	
AC	NS	
BC	*	7.1

*Tableau 7 : Effets des différents traitements testés et part dans la variation totale (substrat de bouturage).
*** (**) [*] significatif au seuil de 0.1% (1%) [5%]d'erreur*

Le tableau n° 6 montre qu'il y a essentiellement un effet du type du substrat. Aucune interaction clone * substrat de bouturage n'apparaît. La figure 9 montre que quel que soit le clone les substrats donnent des profils de résultats semblables.

Synthèse et conclusion

Lors des différentes expériences décrites, le comportement interactif des clones par rapport aux facteurs contrôlant la réussite de la multiplication végétative a souvent été mis en évidence. Ce comportement n'est pas systématique mais il peut représenter une part importante de la variation totale. Il montre qu'à chaque clone correspondent des modalités particulières pour obtenir un enracinement optimal. L'expérience sur le bouturage en cascade montrerait même que cet optimum pourrait changer d'année de bouturage en année de bouturage!

De même, ces expériences ont confirmé la part importante de la variation due aux clones dans la variation totale (effet clonal). Sauf pour les expériences date d'insertion et substrat de bouturage, les facteurs techniques expérimentés, ne représentent qu'une part minime de la variation totale observée, même s'ils ont une action significative sur la réussite du bouturage.

Cette relative instabilité du comportement des clones peut expliquer les nombreuses contradictions que l'on trouve dans la littérature sur le bouturage des ligneux, les différents auteurs ne travaillant pas avec le même matériel végétal. Elle limite les possibilités de généralisation à l'espèce entière d'un parcours technique mis au point sur un ou quelques clones. Nous l'avons illustré avec l'expérience type de boutures où les profils de réponses différent entre deux groupes de clones d'une même espèce.

Elle implique également que, pour toutes les expérimentations sur le bouturage de ligneux, le facteur clone doit être un facteur contrôle ou que la base génétique utilisée dans l'expérience doit être représentative de la base génétique qui sera ensuite multipliée.

Ce phénomène, conjugué avec un effet clonal important, est particulièrement important à prendre en compte pour les variétés multiclonales multipliées sans conservation de l'identité clonale durant la phase d'enracinement (parce que pour des raisons techniques pratiques ou génétiques, il n'est pas possible ou il n'est pas intéressant de maintenir cette identification ce qui est le cas pour les variétés clonales d'épicéa, de mélèze hybride et de sapin de Douglas).

Effectivement en partant du même nombre de boutures par clones et en appliquant différentes modalités, on n'obtient pas *in fine* la même composition clonale.

Ainsi l'expérience sur les dates d'insertion montre que, multipliée dans ces conditions, la composition clonale d'une variété de cryptomeria dépendrait de la date d'insertion des boutures. De même, ces variétés, multipliées en aveugle plusieurs années consécutives, si les conditions optimales changent ou si les modalités d'enracinement sont modifiées, auront des compositions clonales différentes d'une année à l'autre ce qui peut se traduire par des phénomènes de millésimes.

Il convient donc non pas de retenir la meilleure modalité mais, dans une gamme de résultats acceptables, la modalité qui présente la plus faible variation possible des moyennes de clones. Ainsi il y aura peu de dérive entre la population initiale (les boutures récoltées) et la population finale (les boutures enracinées).

Dans de prochaines expériences, nous allons tester l'hypothèse que le vieillissement des pieds-mères amplifie ce phénomène d'interaction. Des clones «jeunes» auraient peu d'exigences et une technique "passe partout" donnerait satisfaction.

Avec le vieillissement, chaque clone demanderait des conditions particulières qui s'écarteraient de celles des autres clones. La technique "passe partout" conviendrait à un nombre de clones de plus en plus faible.

La baisse de l'aptitude à l'enracinement qui accompagne le vieillissement des pieds-mères s'expliquerait par un rétrécissement et une divergence des fenêtres d'enracinement et non par une inaptitude réhibitoire à la multiplication végétative.

Bibliographie

Dekker-Robertson DL, Kleinschmit J ,1991 - Serial propagation in norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.): results from later propagation cycles, *Silvae Genet* 40, p. 202-214.

Francllet A ,1977 - Manipulation des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures. AFOCEL, *Etudes et Recherches* 8, 20 p

Haissig BE, Riemenschneider DE ,1988 - Genetic effects on adventitious rooting. in: *Adventitious Root Formation In Cuttings* (Davis TD, Haissig BE, Sankhla N eds), Discorides press Portland, Oregon, p. 47-60

Hartmann HT, Kester DE 1990 - Plant propagation. Principles and practices, Prentice/Hall international, New Jersey, 727 p

Kleinschmit J, Schmidt J ,1977 - Experiences with *Picea abies* cuttings propagation in germany and problems connected with large-scale application, *Silvae Genet* 26, p. 197-203

Libby WJ ,1983 - The clonal option. Norsk Institutt for Skogforskning, Norw For Res Inst, 32 p

Libby WJ, Brown AG, Fielding JM ,1972 - Effects of hedging Radiata pine on production, rooting, and early growth of cuttings. *N Z J For Sci* 2, p. 263-283

Radosta P, Pâques LE, Verger M ,1994 - Estimation of genetic and non-genetic parameters for rooting traits in hybrid larch, *Silvae Genet* 43, p. 108-114

Saint-Clair JB, Kleinschmit J, Svolba J ,1985 - Juvenility and serial vegetative propagation of norway spruce clones (*Picea abies*), *Silvae Genet* 34, p. 42-48

Schermann N, Verger M, Bastien JC ,1996 - Sélection de familles de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) pour leur aptitude au bouturage : conséquences pour la diffusion de variétés améliorées. *Ann Sci For*, 53, p. 1113-1126

Verger M.,1997 - Plants forestiers génétiquement améliorés : production par multiplication végétative. *Forêt Entreprise* 114, p. 55-60

HORTIS :

Un outil pédagogique pour l'enseignement des techniques de multiplication des plantes horticoles

HORTIS :

A pedagogical tool for the teaching of horticultural plant propagation techniques

A. Lafay

Professeur d'Horticulture
Lycée d'Enseignement Général et Technologique Agricole
26. chemin de la Bruyère
69570 Dardilly
E-mail : alain.lafay@educagri.fr

Résumé : Hortis, outil de formation apportant une nouvelle dimension pédagogique pour l'apprentissage des gestes relatifs à la multiplication des plantes horticoles, se présente sous la forme d'une collection de films vidéo associée à un CD-ROM sur le greffage. Chaque film vidéo traite d'une technique de multiplication spécifique, en montrant le geste professionnel intégré à un processus de production destiné à produire des plantes adultes. Le CD Rom, conçu comme une encyclopédie du greffage, propose un chapitre didactique où les buts, l'outillage et la physiologie de la greffe sont abordés. L'aspect démonstration du geste est ensuite exposé, en explicitant les détails nécessaires à une bonne compréhension des techniques employées, et en proposant des exercices de simulation. Une base de données fournit enfin les renseignements relatifs à la multiplication des principales plantes horticoles.

Mots-clés : horticulture, multiplication des plantes, film vidéo, CD ROM.

Abstract: *Hortis is a collection of videos with an accompanying CD ROM about grafting. This training kit brings a new pedagogical dimension to the teaching of the gestures connected with the propagation of horticultural plants.*

Each video deals with a specific technique of propagation, and shows the professional gesture as part of the process to produce adult plants.

The CD ROM, conceived as an encyclopedia of grafting, contains an introductory chapter exposing the aims, the equipment and physiology of grafting. Next it demonstrates the gestures, making clear the details necessary for a complete understanding of the techniques involved, and suggesting simulation exercises. Finally a data bank provides information about the propagation of the main horticultural plants.

Keywords: horticulture, propagation of plants, videos, CD ROM

Introduction

L'enseignement des techniques relatives à la pépinière d'ornement, fruitière et forestière, dans l'une des filières de l'horticulture où les gestes professionnels revêtent une importance capitale en vue de la préparation au métier, se heurte aux limites propres à l'apprentissage du geste *in situ*.

Ces limites se situent à plusieurs niveaux : impact de la saisonnalité des travaux, appréhension du geste difficile pour des élèves en groupe, difficultés d'intégration du devenir d'une plante dans le temps, exemples variétaux parfois limités, autoformation des élèves inexistante.

1. Intérêt pédagogique

Des outils pédagogiques innovants, basés sur des moyens audiovisuels de modélisation du vivant, peuvent apparaître comme des instruments adaptés et complémentaires à l'apprentissage des pratiques professionnelles.

L'utilisation des films vidéo et du CD Rom par l'élève permettra d'éviter les écueils relatifs aux approches pédagogiques traditionnelles, en mettant en évidence :

- les gestes de base propres à une technique, avec possibilité de décomposition des gestes, de l'arrêt sur image.
- la morphologie et l'anatomie des plantes en trois dimensions, en permettant de mieux appréhender les phénomènes physiologiques inhérents à la croissance des végétaux.
- des exemples nombreux, et en particulier ceux propres à d'autres régions ou pays.
- le devenir de la plante cultivée : l'élève ayant des difficultés à imaginer le végétal en fin de cycle de production, l'outil graphique facilitera cette vue prospective, en "raccourcissant" le temps.
- le produit fini, de manière à intégrer le geste dans un itinéraire cultural global.
- des exercices de simulation, de manière à mieux maîtriser, voire peaufiner le geste professionnel.
- l'éventualité du travail en groupes restreints, dans le cadre d'activités pédagogiques diversifiées.
- la possibilité de l'auto-formation individuelle par les élèves en Centre de Documentation.

Ces outils interactifs constituent donc un support de formation complémentaire à celui de l'apprentissage pratique : si le film vidéo trouve son intérêt pour montrer le détail gestuel, le disque compact apporte la dimension du temps, avec la destinée d'un geste, ses causes et ses conséquences.

2. Les objectifs de conception

La réalisation de ces outils de formation se décline à la lumière de plusieurs principes :

Réalisation d'une collection intégrant différents thèmes ayant trait à la filière horticole, avec comme point de départ la multiplication des végétaux, puis à moyen terme l'élevage et la croissance des plantes, la taille de formation et de fructification, la récolte et la mise à disposition du produit, les jardins paysagers, les métiers de l'horticulture.

Caractère de ces outils résolument novateur par la forme, et produit de référence par un contenu prenant en compte les techniques horticoles modernes.

Adaptation des ces outils aux différents publics potentiels, par leur transversalité :

- * élèves et étudiants de l'enseignement agricole.
- * public des enseignants de l'horticulture.
- * amateurs avertis, etc.

Rapprochement entre équipes pédagogiques d'établissements d'enseignement agricole.

Rapprochement de l'axe recherche-formation, par le biais du processus d'élaboration de cet outil, qui prend en compte les dernières avancées scientifiques concernant le greffage.

3. Les acteurs d'Hortis

Deux types d'acteurs sont impliqués dans la réalisation de ces outils pédagogiques: les acteurs directs, qui ont mis en place le projet initial et œuvrent à sa réalisation, les acteurs indirects qui ont permis d'asseoir les contenus.

Les acteurs directs :

- Alain Lafay, Professeur d'horticulture au Lycée d'Enseignement Général et Technologique Agricole de Dardilly, Rhône. Initiateur du projet, il conçoit et scénarise les films vidéo, et a participé à la réalisation de la trame du CD Rom, dont il a écrit les textes relatifs au chapitre didactique.

- l'ENESAD - Etablissement National d'Enseignement Supérieur Agronomique de Dijon - Côte d'Or, par son département "Espace médias et formations", assure la réalisation des films vidéo et du CD ROM.

- le Lycée d'Enseignement Général et Technologique Agricole de Romans, Drôme, (France) participe à la structuration des contenus du CD Rom et à la mise en place de la base de données.

Les acteurs indirects :

A l'heure actuelle, ont apporté leur contribution à la réalisation de ces documents pédagogiques :

- l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) : station fruitière méditerranéenne d'Avignon, Vaucluse .
- le CEPEM (Centre d'Expérimentation de la Pépinière Méridionale) à Montfavet, Vaucluse .
- le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), à Saint - Pierre (Ile de la Réunion).
- le Lycée agricole Olivier de Serres à Aubenas (Ardèche).
- Le Lycée d'Enseignement Professionnel Agricole de Saint-Joseph à La Réunion.
- L'ONF (Office National des Forêts) : station de la Joux (Jura), forêts domaniales de Seillon (Ain), de Jabron (Alpes de Haute-Provence), de Mouchard (Jura), de Chaumont (Haute-Marne).
- l'Arboretum National des Barres, à Nogent sur Venisson (Loiret).
- la Ville de Lyon (Services des Espaces Verts), Rhône.
- des entreprises de production des différentes filières horticoles.
- l'exploitation horticole et l'arboretum du LEGTA de Dardilly et du Centre de Formation Professionnelle d' Ecully, Rhône.
- le laboratoire de culture In vitro d'Ecully, Rhône.

4. Les Films Vidéo

Les films vidéo axés sur le thème de la multiplication des plantes horticoles possèdent une structure propre et constituent une collection.

4.1 La structure et le contenu des films vidéo.

4.1.1 Fonction

La fonction essentielle des films est de montrer les gestes propres aux différents procédés de multiplication, en libérant, en particulier, le public des contraintes saisonnières. Autour du thème central, les films abordent des sujets annexes indispensables à la bonne compréhension des gestes : végétaux concernés, dates d'exécution, outils utilisés, principes biologiques, etc..., mais sans insister, puisque ces points sont développés par ailleurs dans le CD ROM.

4.1.2 Contenu

Le contenu est élaboré à partir de textes rédigés par Alain Lafay, en fonction de ses cours et de son expérience d'enseignant. Il ne prétend pas être exhaustif, ni défier toute critique, le gestuel pouvant légèrement varier d'une région ou d'un pays à l'autre, en fonction des pratiques culturelles.

4.1.3 Structure d'ensemble

Chaque film débute par un logo animé de la série et son jingle. Les premières images présentent des plantes adultes obtenues par le procédé de multiplication en question. Le titre du film apparaît sur ces images, accompagné par le thème musical de la série. La forme des films fait appel aux différentes techniques multimédia : images + graphismes + animations + effets visuels + incrustations de texte. Chaque film, dont la durée n'excède jamais 11 minutes, se termine par quelques images de plantes obtenues à partir de la méthode décrite.

4.2 Forme

Le contenu du film lui vaut son appellation de pédagogique, sa forme devant guider le spectateur, élève, jardinier ou curieux, et l'aider à comprendre, à maintenir son attention et à mémoriser le maximum du contenu. La caractéristique principale de la vidéo est de pouvoir jouer sur les émotions. C'est l'esthétique qui doit générer chez le spectateur cette émotion, pour lui faire sentir l'objectif final propre à tout acte de multiplication : concevoir un produit végétal abouti, significatif d'une pratique professionnelle adaptée, mais aussi marqué par l'élégance, la beauté, l'harmonie, à partir des êtres (végétaux) vivants.

Lorsqu'elle sera menée à son terme, la collection comprendra vingt et un films dont les thèmes seront les suivants :

Le greffage

- Ecussonnage type (fruitier, rosier).
- Variantes de l'écussonnage (chip-budding, flûte, écusson par placage).
- Par approche (par placage et en arc-boutant).
- En fente (simple, double, en gueule de brochet, demi-fente).
- A l'anglaise (simple, compliquée, épaulée).
- Oméga (sur vigne)
- En incrustation (sur tige et sur arbuste).
- En couronne et en coulée.
- En placage (conifères).
- En cultures maraîchères (perforation latérale, japonaise, etc).
- Par application (cactées).

Le bouturage

- rameau défeuillé et autres organes (racine, oeil).
- rameau feuillé.

Le marcottage

- par couchage, par buttage et aérien.

La division de touffes et l'éclatage.

Le drageonnage et les proliférations naturelles.

Le stolonnage.

Les vitrocultures.

Le semis

- récolte et conservation des semences.
- la préparation des semences.
- les semis sous abris et en plein-air

5. Le CD ROM

Le CD Rom présente une structure où les contenus mettent en évidence les questions auxquelles doivent répondre chacun des chapitres. Le découpage des contenus est présenté dans le tableau suivant :

Le greffage

- Présentation rapide du greffage.

Définition

- Intérêt du greffage, avantages, inconvénients

- Physiologie du greffage

- Classification des greffes

Les techniques de greffage

- Présentation, spécificités

- Conditions de réalisation (période, température, etc...)

- Types de plantes concernées.

Exemples.

- Avantages et inconvénients

- Techniques voisines, variantes

- Réalisation de la greffe. Gestes

- Outils et matériels utilisés

- Conditions et durée de reprise

- Soins post-greffage

- Exercices de simulation

Les outils et matériels

Utilisation

Les plantes

- Techniques de multiplication adaptées

- Conditions spécifiques de multiplication

- Porte-greffes

Calendrier

- Planning des opérations

- Schéma cultural

Index général

Lexique

. Qu'est ce que le greffage ?

. Pourquoi greffe-t-on ?

. Pourquoi ne greffe-t-on pas ?

. Comment fonctionne la greffe ?

. Quelles sont les conditions de reprise ?

. Quelles sont les différents types de greffes ?

. Quelles sont les différentes techniques ?

. Qu'est ce que ce type de greffe ?

. Quelles sont les conditions de reprise ?

. A quelles plantes s'applique ce type de greffe ?

. Pourquoi ce type de greffe plutôt qu'un autre ?

. Quelles sont les autres techniques

envisageables ?

. Comment réalise-t-on cette greffe ?

. Avec quels outils et matériels réalise-t-on cette greffe ?

. Comment sait-on si la greffe est reprise ?

. Quels sont les soins à apporter à la greffe ?

. Ai - je bien compris comment faire ?

. Quels sont les outils et matériels à ma disposition ?

. A quoi servent - ils ?

. Comment les utilise - t - on ?

. Comment multiplier cette plante ?

. Quelles sont les conditions spéciales (dates, T', site, etc...) ?

. Sur quelle plante va-t-on greffer ?

. Que faire à cette époque ?

. Quel va être l'itinéraire de la plante après multiplication ?

. Quelles informations disponibles pour ce mot ?

. Que veut dire ce mot ?

Conclusion

L'idée force qui préside à la mise en place de ces outils de formation gravite autour de l'utilisateur : il s'agit d'instruments de savoir pouvant être employés par différents publics, et en particulier celui des apprenants, quels qu'ils soient, mais surtout l'élève, avec son projet de formation, et ses apprentissages.

La diffusion d'Hortis sera assurée par :

Educagri Editions
BP 1607. 21036 Dijon Cédex.
Téléphone : 03 80 77 25 98
Télécopie : 03 80 77 26 53

Bibliographie

Lafay A., 1997 - Hortis : un outil pédagogique pour l'enseignement horticole.
Bulletin horticole n° 7, p. 18-19.





Le groupe de la Sainte Catherine a pour but de favoriser les échanges et les collaborations entre chercheurs, enseignants et praticiens de la multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux.

Au cours de cette première rencontre, des thèmes très variés ont été abordés : utilisation des réserves glucidiques par les boutures, problèmes pathologiques et climatiques durant l'enracinement, greffe-bouture, micro pied-mère, utilisation de la mycorhization et de la culture in vitro.

Ce document intéresse toute personne utilisant ou désirant utiliser la multiplication végétative dans le cadre de son activité professionnelle ainsi que les enseignants et les étudiants.



INH

*De la science du végétal
à la culture du paysage*

ISBN 2-85362-505-2

Prix : 195 F TTC



9 782853 625029