



HAL
open science

Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt

J.L. Riffaud, D. Cornu

► **To cite this version:**

J.L. Riffaud, D. Cornu. Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt. *Agronomie*, 1981, 1 (8), pp.633-640. hal-02728059

HAL Id: hal-02728059

<https://hal.inrae.fr/hal-02728059v1>

Submitted on 2 Jun 2020

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

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

Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt (*)

Jean-Louis RIFFAUD & Daniel CORNU

avec la collaboration technique de Pierrette CAPELLI

I.N.R.A., Station d'Amélioration des Arbres forestiers, Centre de recherches d'Orléans Ardon, F 45160 Olivet

RÉSUMÉ

*Multiplication végétative,
Micropropagation in
vitro,
Variabilité clonale,
Culture de bourgeons,
Merisier.*

L'intérêt nouveau pour le merisier en reboisement et la difficulté d'application des procédés classiques de multiplication végétative ont conduit à envisager la multiplication par culture *in vitro* d'arbres adultes sélectionnés en forêt.

Les cultures sont établies à partir de bourgeons provenant soit de rameaux de l'année, prélevés dans la cime des arbres adultes, soit de jeunes drageons. L'expérimentation a porté sur le rôle de différents facteurs : solution de macroéléments, régulateurs de croissance, facteurs physiques (lumière, température).

L'obtention d'un plant se fait après une succession d'étapes nécessitant des passages sur différents milieux :

1. Initiation après une désinfection vigoureuse au chlorure mercurique à 2×10^{-2} M.
2. Multiplication en présence de l'équilibre BA 4×10^{-6} M, AIB 5×10^{-7} M, AG 3×10^{-7} M.
3. Elongation sur un milieu enrichi en acide gibbérellique à 3×10^{-5} M.
4. Enracinement sur un milieu minéral dilué au 1/5, après traitement par trempage rapide dans une solution auxinique (AIB à 2,5 ou 5×10^{-3} M).
5. Transfert et acclimatation en serre.

Cette suite, dont chaque étape peut être optimisée, a permis de multiplier 70 clones adultes de merisier dont 20 sont déjà repiqués en pépinière.

SUMMARY

*Vegetative propagation,
In vitro micropropagation,
Clonal variability,
Shoot culture,
Mazzard tree.*

Use of in vitro cultures to propagate mature mazzard trees selected in stands

Emphasis given in France to reforestation with mazzard (*Prunus avium* L.) and difficulties in applying classical means of vegetative propagation (cuttings or suckerings) have led to consider *in vitro* cultures to propagate mature trees selected in stands.

Cultures were established with buds collected either on crown shoots or on young root suckers. Different factors were studied : macroelement solutions, growth regulators, light and temperature.

The basic substrate is a slightly modified M.S. salt medium (half-concentration of NH_4NO_3) with 2 p. 100 sucrose and 7 p. 100 agar. Whole plants are obtained after a series of stages with a particular medium for each of them.

1. Initiation of the culture after a strong sterilization with mercuric chloride (2×10^{-2} M).
2. Multiple bud production with BA 4×10^{-6} M and IBA, 5×10^{-7} M and GA 3×10^{-7} M.
3. Shoot elongation with a high concentration of GA : 3×10^{-5} M.
4. Rooting on a low macroelements concentrated medium (dilution by 1/5 of basic medium) after short dipping in a IBA aqueous solution (2.5 to 5×10^{-3} M).
5. Transfert to soil with greenhouse acclimation.

70 trees are presently under culture. Two years after initiating this work, 20 clones are already transplanted in the nursery.

I. INTRODUCTION

Depuis quelques années, le merisier est l'objet d'un intérêt nouveau en reboisement et un programme d'amélioration génétique est engagé à la Station d'Amélioration des Arbres forestiers depuis la fin de l'année 1977. Ce pro-

gramme repose sur la sélection d'arbres remarquables en forêt (fig. 1) et débouchera dans un premier temps sur la fourniture de variétés multiclonales lorsque les génotypes auront été testés dans des plantations expérimentales. Des études sont donc engagées pour multiplier végétativement le merisier. Elles visent deux objectifs :

- la multiplication des arbres sélectionnés, toujours âgés (70 ans en moyenne), en vue de produire des pieds-mères et des plants destinés aux tests clonaux,
- la production en masse de plants pour le reboisement.

(*) Nous résumons ici une partie du travail présenté par J. L. RIFFAUD (1980) pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur des Techniques Forestières de l'École Nationale des Ingénieurs des Travaux des Eaux et des Forêts.



Figure 1
Merisier adulte sélectionné en forêt.
Mature mazzard tree selected in forest.

Actuellement, nous avons abordé essentiellement le premier aspect (RIFFAUD, 1980).

La nécessité de multiplier un nombre élevé de clones sauvages, très variables et souvent âgés, va conditionner le choix de la méthode de multiplication à adopter. Les techniques classiques de bouturage donnent des résultats très décevants (taux d'enracinement presque nuls). L'utilisation de jeunes drageons produits sur des racines superficielles peut-être intéressante pour certains clones, mais les résultats sont trop aléatoires. Ces raisons nous ont conduits à expérimenter la culture *in vitro*.

Dans le cadre de la production fruitière BOXUS (1971), BOXUS & QUOIRIN (1974, 1977) ont réussi, par cette technique, la régénération de différentes espèces et cultivars de *Prunus*, *Malus* et *Cydonia*, le but étant l'élimination de viroses par cultures de méristèmes.

La multiplication de plantes ligneuses fruitières à partir de nœuds, bourgeons ou méristèmes a été obtenue sur *Prunus* (POPOV *et al.*, 1976 ; SEIRLIS *et al.*, 1979) et *Malus* (JONES *et al.*, 1977, 1979).

Dans le domaine forestier, il faut citer les travaux de BOULAY (1979a et b) sur sequoia et douglas, CAMPBELL & DURZAN (1975, 1976) sur l'épicéa, DURAND & BOUDET (1979), de FOSSARD (1978) sur l'eucalyptus, DAVID *et al.* (1979), RANCILLAC (1979) sur le pin maritime.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quelle que soit la saison, pour installer un clone en culture *in vitro*, 2 types de matériel sont actuellement utilisés :

- des nœuds prélevés sur des rameaux de l'année ou d'un an récoltés dans la cime de l'arbre,
- de jeunes drageons prélevés sur des racines.

Dans toutes les opérations, nous utilisons exclusivement

des pousses issues de bourgeons préexistants. Nous prenons donc toutes les précautions pour obtenir une copie conforme, ce qui ne serait pas le cas si l'on passait par un stade de cal avec néoformation d'organes, comme le montrent les observations de LESTER & BERBEE (1977) sur *Populus*.

Après un passage rapide à l'alcool et un rinçage à l'eau distillée, les rameaux sont installés dans des sacs plastiques fermés hermétiquement et mis en chambre froide à + 4 °C jusqu'au moment de l'installation en tubes.

La désinfection du matériel reste un point délicat. Au début des essais, les fragments de rameaux étaient trempés 30 mn dans une solution d'hypochlorite de calcium à 100 g/l. Les résultats étaient très variables et souvent catastrophiques. Actuellement, le matériel végétal est agité durant 20 mn dans une solution de chlorure mercurique à 2×10^{-2} M. Il est ensuite rincé successivement avec une solution de chlorure de calcium et avec de l'eau distillée stérile. Les résultats sont plus homogènes et les taux de débourement avoisinent 90 p. 100.

Les explants mis en culture comprennent le bourgeon avec une portion de rameau (1 à 2 cm). Ils sont installés sur 20 ml de milieu de culture gélosé coulé dans des tubes de 25 × 150 mm munis de bouchon en plastique ou en polycarbonate.

La position du bourgeon, sur les rameaux prélevés dans la cime de l'arbre, ne semble pas jouer un rôle prépondérant sur la reprise d'activité.

Le milieu de culture de base comprend :

- les macroéléments de MURASHIGE & SKOOG (1962) :
 - NH_4NO_3 : 1,65 g/l ; KNO_3 : 1,9 g/l ; CaCl_2 , 2 H_2O : 0,44 g/l ; MgSO_4 , 7 H_2O : 0,37 g/l.
- la solution de microéléments de MURASHIGE & SKOOG (le dosage des éléments Fe, S, est multiplié par 2) :
 - H_3BO_3 : 6,2 mg/l ; MnSO_4 , 4 H_2O : 22,3 mg/l ; ZnSO_4 , 7 H_2O : 8,6 mg/l ; KI : 0,83 mg/l ; Na_2MoO_4 , 2 H_2O : 0,25 mg/l ; CuSO_4 , 5 H_2O : 0,025 mg/l ; CaCl_2 , 6 H_2O : 0,025 mg/l ; FeSO_4 , 7 H_2O : 27,85 mg/l ; Na_2EDTA , 2 H_2O : 37,25 mg/l.
- un mélange vitaminique :
 - biotine : 0,01 mg/l ; acide nicotinique : 1 mg/l ; pyridoxine hydrochloride : 1 mg/l ; thiamine hydrochloride : 1 mg/l ; pantothenate de calcium : 1 mg/l ; L. cystéine chlorhydrate : 1 mg/l.
- myoinositol 100 mg/l, L-glutamine 200 mg/l,
- saccharose 20 g/l,
- N_6 benzylaminopurine = BA 4×10^{-6} M,
- acide indolbutyrique = AIB 5×10^{-6} M,
- acide gibbérellique = AG 3×10^{-7} M,
- agar 7 g/l.

Avant autoclavage à 112 °C durant 30 mn, le pH est ajusté à 5,5.

Les cultures sont installées dans une salle de culture en jour long de 16 h. La température est de 25 °C le jour et de 19 °C la nuit.

Pour les essais, nous avons presque toujours utilisé 2 ou 3 clones avec 12 tubes par traitement. Les effectifs sont trop faibles pour permettre une interprétation statistique des résultats. Cette étude était une première approche et les tendances mises en évidence permettront une étude plus approfondie.

III. RÉSULTATS

Après une première phase de reprise d'activité des bourgeons installés en conditions stériles, l'obtention d'un

plant passe par la succession d'étapes nécessitant chacune un milieu approprié :

- A. Multiplication : développement des bourgeons axillaires préformés sur la pousse initiale.
- B. Elongation (les pousses formées ne s'allongent généralement pas sur le milieu de multiplication).
- C. Enracinement.
- D. Transfert du tube de culture en milieu naturel.

Nos études ont porté sur le rôle de différents facteurs :

- concentration en macroéléments,
- concentration et méthode d'utilisation des régulateurs de croissance,
- lumière, température.

Les essais ayant été parfois effectués de façon concomitante, les traitements adoptés ne sont pas toujours ceux qui seront ensuite définis comme optimaux.

A. Multiplication

Un mois à un mois et demi après son installation sur le milieu de base (phase d'initiation), le bourgeon prélevé sur l'arbre a repris son activité et se développe. Il peut alors être détaché de la portion de rameau et installé sur un milieu de multiplication.

1. Rôle de la solution de macroéléments

Nous avons testé différentes compositions et il est apparu que des concentrations élevées en ammonium pouvaient entraîner un déséquilibre des explants ; ceux-ci deviennent rapidement jaunâtres et très turgescents. Il est à noter que ce phénomène peut aussi s'observer lorsqu'on remplace l'AIB par le NOA (acide naphtoxyacétique) dans le milieu de base. Le milieu de MURASHIGE & SKOOG est donc trop concentré en ammonium et nous utilisons actuellement une solution contenant seulement 800 mg/l de NH_4NO_3 au lieu des 1 650 mg/l initiaux.

2. Rôle des régulateurs de croissance — Equilibre cytokinines/auxines

Nous avons cherché quel pouvait être l'équilibre optimal entre ces 2 régulateurs en faisant varier de manière factorielle leurs concentrations relatives et en admettant que chez la plupart des espèces la formation de bourgeons est stimulée par un rapport cytokinine/auxine supérieur ou égal à 1, comme le montrent GRINBLAT (1972) sur *Citrus* et CAMPBELL & DURZAN (1975) sur *Picea glauca*. Chez cette dernière espèce, l'induction maximale obtenue avec BA à 4×10^{-5} M est progressivement réduite avec des doses croissantes d'ANA.

A partir du milieu de base, 10 équilibres différents ont été testés sur 2 clones avec 6 explants par clone.

Les résultats (fig. 2) révèlent surtout l'importance de la BA, le nombre de bourgeons produits variant très brusquement quand la concentration change :

- il est maximal à 4×10^{-6} M,
- à 4×10^{-5} M, les explants sont jaunâtres, une grande proportion a un aspect turgescent, les pertes sont importantes.

Les traitements faibles en régulateurs, en particulier en auxine, donnent des explants très verts. On constate que de fortes concentrations en cytokinine inhibent le développement des feuilles et des pousses.

L'équilibre optimal pour ce stade de multiplication est : BA 4×10^{-6} M, AIB 5×10^{-7} M.

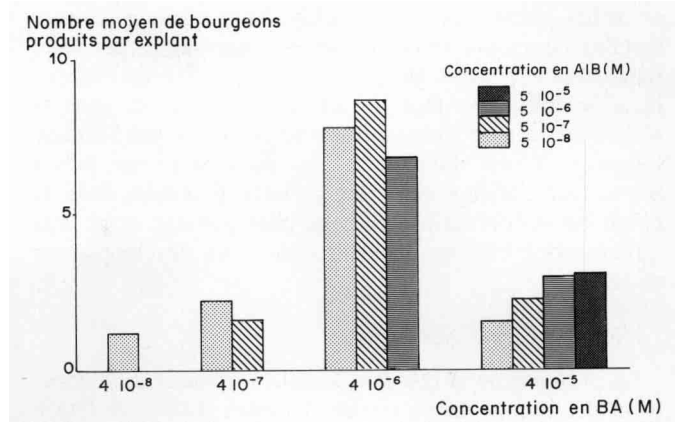


Figure 2

Influence de l'équilibre BA-AIB sur le nombre de bourgeons produits par explant. Résultats moyens sur 2 clones (6 explants par clone) après 1 mois de culture. L'AIB est toujours utilisé à une concentration égale ou inférieure à celle de la BA.

Effect of a BA-IBA balance on multiple bud explant production. Means after one month culture (2 clones, 6 explants by clone). IBA concentration always equal or smaller than BA concentration.

B. Phase d'élongation

Après la phase de multiplication, les petites pousses peuvent être directement installées sur un milieu d'enracinement, mais il est vite apparu que la réussite de celui-ci dépendait de la taille de l'explant mis en culture. En effet, des tiges très courtes (2 à 3 mm), mises sur un milieu d'enracinement contenant de l'AIB, se nécrosent très fréquemment. Celles qui s'enracinent voient la plupart du temps leur développement ultérieur bloqué. Les mêmes observations sont d'ailleurs faites par BOXUS & QUOIRIN (1974), l'AIB appliqué trop tôt à des bourgeons peut inhiber de façon irréversible leur allongement.

Or, après la phase de multiplication, la longueur des



Figure 3

Jeune pousse en cours d'élongation.

Elongation of a young shoot.

nouvelles pousses est très variable. Chez quelques clones, certains bourgeons finissent par s'allonger après plusieurs repiquages et peuvent alors être enracinés. Mais cet allongement semble apparaître de manière aléatoire et dans la plupart des cas les jeunes pousses ne dépassent pas 5 mm de longueur. Il est donc nécessaire de trouver un milieu permettant l'allongement des pousses obtenues dans la phase de multiplication, pour qu'elles puissent réagir aux traitements rhizogènes et avoir ensuite un développement normal.

1. Rôle de l'acide gibbérellique

La présence de la BA dans le milieu freine le développement des bourgeons en pousses feuillées (BOXUS & QUOIRIN, 1974), par contre un milieu enrichi en acide gibbérellique favorise les allongements (QUOIRIN *et al.*, 1977). Cette substance est d'ailleurs connue pour agir sur les mitoses et sur l'allongement tissulaire.

En utilisant le milieu de base, sans BA et sans AIB, nous avons testé sur 3 clones l'action de l'acide gibbérellique en faisant varier sa concentration de 0 à 3×10^{-5} M (avant autoclavage).

Au bout d'une semaine, les explants mis sur le milieu à 3×10^{-5} M manifestent un début d'allongement. Après 4 semaines aux concentrations 0 à 3×10^{-6} M, les pousses développent de nombreuses feuilles, sans allongement notable. C'est à 3×10^{-5} M, comme le montre le tableau 1, que le nombre de bourgeons allongés est le plus élevé et les allongements les plus importants : ils atteignent 1 à 3 cm pour des explants de quelques mm au départ.

TABLEAU 1

Influence de la concentration en AG sur l'élongation des pousses après 4 semaines de culture (3 clones, 4 explants par clone).
GA concentration effect on shoot elongation after 4 weeks (3 clones, 4 shoots by clone).

Concentration en AG	Nombre de bourgeons allongés	Nombre de bourgeons nécrosés	Elongation moyenne en mm
0	0	1	0
3×10^{-7} M	5	1	5
3×10^{-6} M	3	0	5
3×10^{-5} M	8	0	20

Cependant, même à la concentration optimale de 3×10^{-5} M, des différences importantes se manifestent entre les 3 clones :

- le clone 131 est le plus développé (1 à 3 cm) alors que, pour le clone 106, l'élongation n'est que de 5 mm,
- les 4 explants du clone 131 ont réagi, pour 1 seulement du clone 106.

Enfin, les explants à cette concentration ont un aspect étioilé, ce qui peut compromettre leur comportement ultérieur.

2. Equilibre entre différents régulateurs de croissance

Comme nous l'avons vu précédemment, certains équilibres BA/AIB ne provoquent pas de multiplication mais induisent un meilleur aspect des explants, avec un léger allongement. Nous avons donc étudié l'action de ces 2 régulateurs en liaison avec une forte concentration en AG.

L'incorporation de BA et d'AIB à une faible concentra-

tion (respectivement 4×10^{-7} M et 5×10^{-8} M) dans le milieu défini précédemment est très favorable à l'allongement des pousses. Sur 4 clones (12 tubes par clone), seulement 69 p. 100 des pousses s'allongent sur le milieu contenant uniquement de l'AG, contre 96 p. 100 sur le milieu contenant AG, BA et AIB. L'allongement est en moyenne de 15 mm et s'accompagne d'une lignification de la base des pousses qui sont ainsi beaucoup moins fragiles que celles provenant directement du milieu de multiplication.

C. Phase d'enracinement

La rhizogénèse (fig. 4) *in vitro* des ligneux est fréquemment une phase difficile à obtenir. Chez les *Prunus*, elle est restée longtemps le point le plus délicat de la technique (QUOIRIN *et al.*, 1977).

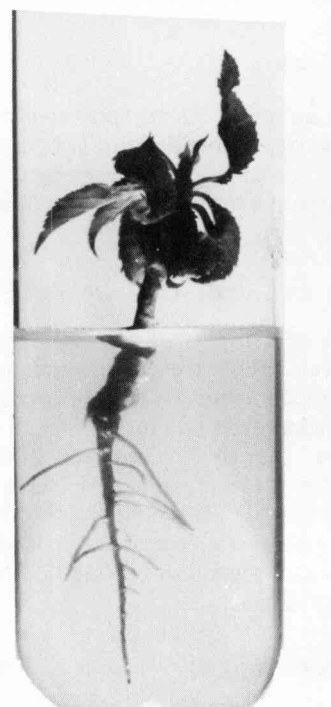


Figure 4
Enracinement après traitement par trempage rapide dans l'AIB.
Rooting after IBA quick dipping treatment.

Afin de provoquer l'enracinement des pousses obtenues en multiplication, nous avons testé l'influence de différents facteurs réputés plus ou moins actifs sur la rhizogénèse : auxine, concentration en macroéléments, lumière, température. Dans les premiers essais, les pousses provenaient directement du milieu de multiplication. Puis nous avons utilisé des pousses allongées.

1. Influence de la concentration en macroéléments

De meilleurs enracinements sont fréquemment obtenus chez de nombreuses espèces par l'utilisation de solutions de macroéléments de concentrations relativement faibles.

RANCILLAC (1979) sur *Pinus pinaster* utilise la solution mise au point par SOMMER *et al.* (1975) dont la force ionique totale est 3,5 fois moindre que celle de la solution de MURASHIGE & SKOOG. De même sur divers *Prunus*, QUOIRIN *et al.* (1977) augmentent de manière assez régulière et importante les taux d'enracinement en utilisant des solutions de macroéléments dilués.

Pour notre part, nous avons obtenu sur 2 clones (130 et 131) nos premiers enracinements spontanés par dilution au 1/5 de la solution de base et suppression des régulateurs de croissance. Tout en restant prudents sur la valeur absolue des résultats obtenus dans 2 autres essais (nombre de clones et de répétitions différents), nous pouvons constater, comme l'indique le tableau 2, l'action nettement positive de cette dilution sur le taux d'enracinement.

TABLEAU 2

Influence de la dilution des macroéléments sur l'enracinement. Traitement des explants par trempage instantané dans une solution d'AIB à 5×10^{-3} M.

Rooting effect of macroelements dilution. IBA (5×10^{-3} M) short dipping treatment.

Milieu	Nombre de clones	Nombre d'explants	Pourcentage d'enracinement
Normal	3	12	33
Dilué 1/5	5	57	91

En outre, la dilution des macroéléments favorise également l'allongement et la ramification des racines, ce qui n'apparaît pratiquement jamais sur milieu non dilué. Elle augmente ainsi la qualité de l'enracinement obtenu.

2. Influence d'un traitement auxinique

Pour la majorité des clones, l'utilisation d'une auxine est indispensable pour un bon enracinement. Différents essais ont montré que l'ANA ainsi que l'AIB avaient une action positive sur l'enracinement lorsqu'ils étaient incorporés dans le milieu à des concentrations de 5×10^{-5} M. Néanmoins, comme nous le verrons plus loin, la présence d'auxine dans le milieu d'enracinement peut avoir un effet négatif sur le développement futur du plant.

Nous avons donc exploré une autre voie de traitement similaire à celle pratiquée pour le bouturage. La base des pousses est trempée durant quelques secondes dans des solutions d'AIB de concentrations variables stérilisées par filtration sur millipore. Les explants sont placés sur milieu de base dilué au 1/5 en l'absence de régulateurs. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Enracinement des pousses par trempages instantanés dans des solutions d'AIB de concentration variable. Résultats après 5 semaines de culture.

Rooting with short dipping in different IBA solutions. Results after 5 weeks.

Clones	Concentrations en AIB			
	$2,5 \times 10^{-3}$ M	5×10^{-3} M	10^{-2} M	2×10^{-2} M
106	3/12 (a)	4/8	6/8	—
160	0/12	9/12	11/12	—
112	8/12	2/7	5/8	—
105	1/12	3/12	3/12	2/10
130	—	7/9	8/8	4/6
Total	12/48	25/48	33/48	6/16
Pourcentage	25	52	69	37

(a) Nombre d'explants enracinés/nombre d'explants installés.
Rooted/initial explants.

Il apparaît un optimum de concentration voisin de 10^{-2} M. Malheureusement la qualité des plants obtenus est insuffisante. Malgré un trempage rapide, nous avons probablement un « choc auxinique » et une trop forte teneur en auxine entraînant un jaunissement et parfois une chute des feuilles, surtout à partir de cette concentration optimale. Ceci rend nécessaire la recherche d'un compromis entre optimum d'enracinement et développement ultérieur.

3. Rôle de la lumière et de la température

Les conditions de lumière et de température régnant dans la salle de culture, qui semblent convenir pour les phases de multiplication et d'allongement, sont peut être moins favorables à l'enracinement.

Nous avons testé d'autres conditions d'environnement se caractérisant par une diminution de la température et/ou de la lumière. L'enracinement est préalablement induit par le trempage instantané de la base des boutures dans des solutions d'AIB ou d'ANA à 5×10^{-3} M. Les résultats apparaissent sur le tableau 4.

TABLEAU 4

Influence des conditions de culture (lumière et température) sur l'enracinement. Traitement par trempage rapide dans des solutions d'AIB ou d'ANA à 5×10^{-3} M.

Rooting effect of growth conditions (light and temperature). Short dipping treatment with IBA or NAA solutions (5×10^{-3} M).

Clones	25 °C/19 °C				19 °C	
	2 500 Lux		200 Lux		200 Lux	
	ANA	AIB	ANA	AIB	ANA	AIB
105	0/6 (a)	0/6	2/6	2/6	0/6	6/6
160	5/6	4/6	6/6	6/6	4/6	6/6
Pourcentage	42	33	67	67	33	100

(a) Nombre d'explants enracinés/nombre d'explants installés.
Rooted/initial explants.

Nous pouvons constater :

- l'influence positive d'une diminution de l'éclairement pour une même thermopériode,
- pour un éclairement équivalent, une température constante de 19 °C semble préférable à une thermopériode de 25 °C le jour et de 19 °C la nuit, lorsque l'on utilise de l'AIB. Par contre, l'ANA semble perdre son efficacité pour une température constante de 19 °C.

Les explants pour lesquels luminosité ou température sont réduites restent très verts, contrairement à ceux cultivés sous conditions classiques. Ceci est très favorable à la reprise ultérieure des plants.

Il faut noter particulièrement le très bon enracinement obtenu pour le clone 105 lorsque sont associés une température réduite et un traitement à l'AIB. Cette phase d'enracinement exige donc des conditions de lumière et de température différentes de celles des phases de multiplication et d'allongement. Un éclairement faible, une photopériode de jour long, une température ne dépassant pas 20 °C associés à un traitement à l'AIB donnent actuellement les meilleurs résultats.

TABLEAU 5

Variabilité clonale de l'enracinement en fonction du traitement rhizogène. Milieux d'enracinement (M.E.) : macroéléments dilués au 1/5 avec ou sans charbon actif 1 g/litre (C.A.).
Clonal variability for rooting with different root-induction treatments. Rooting-medium (M.E.) : diluted (1/5) macroelements with or without active charcoal (C.A.) 1 g/l.

Clones	Milieu d'enracinement et traitements					Total (pourcentage)
	M.E. + C.A.		M.E. Simple			
	Sans traitement	Trempe rapide ANA 5×10^{-4} M	Trempe rapide ANA 5×10^{-4} M	Trempe rapide ANA 10^{-3} M	ANA 5×10^{-6} M dans le milieu	
105	0/7 (a)	0/7	0/7	3/7	0/7	3/35 (8,6)
99	0/5	—	1/5	4/7*	1/6	6/23 (26)
130	1/8	3/8	1/8	7/8*	2/7	14/39 (36)
112	2/5	3/7	0/6	3/7	3/5	10/28 (35,7)
127	2/7	3/5*	0/5	4/6*	2/6	11/29 (38)
160	1/5	0/5	0/5	6/6*	3/5*	10/26 (38,5)
131	0/7	2/8	4/6*	5/6*	6/7*	17/34 (50)
106	2/8	6/9*	4/8*	6/8*	6/7*	24/40 (60)
114	3/5*	4/6*	2/5	5/5*	3/5*	17/26 (65,4)
Total	11/57	22/55	12/55	42/58	26/55	112/280
Pourcentage	19	38	22	72	47	40

(a) Nombre d'explants enracinés/nombre d'explants installés.
Rooted/Initial explants.
* Enracinement supérieur à 50 p. 100.
Rooted percentage higher than 50 p. 100.

4. Variabilité de l'enracinement en fonction du traitement rhizogène et du génotype

Les différences de réactivité entre clones peuvent limiter l'efficacité d'une multiplication végétative. Chez le merisier, ces différences apparaissent à toutes les étapes mais elles sont surtout marquées pour la phase d'enracinement : certains clones ne s'enracinent strictement pas avec certains types de traitements.

Sur un milieu d'enracinement comprenant une solution de macroéléments diluée au 1/5, nous avons installé 9 clones avec 5 traitements différents. Les résultats sont regroupés dans le tableau 5.

Il apparaît des différences très nettes entre traitements. Un trempage instantané dans une solution à 10^{-3} M d'ANA se révèle très supérieur à tous les autres.

Au niveau clonal, les différences sont toutes aussi marquées :

- le clone 105 ne s'enracine qu'à l'aide de doses élevées en ANA,
- sur les milieux contenant peu ou pas d'auxine, un certain nombre de clones ont des taux d'enracinement nuls ou très faibles (inférieurs à 30 p. 100) : 105, 99, 160, 127, 130,
- enfin, certains clones s'enracinent aisément sur tous les milieux testés (114 et 106).

La variabilité concerne également l'aspect général des explants et la tolérance aux auxines. Le clone 131, par exemple, a une bonne aptitude à l'enracinement (les pousses restent bien vertes et vigoureuses) et tolère des doses assez fortes d'auxine. Le clone 106 s'enracine également très bien (malgré un retard dû à des bactéries roses que nous n'avons pas pu éliminer), mais les explants peuvent se nécroser très vite avec de fortes concentrations d'AIB. Le clone 105 semble très sensible aux auxines et,

dans l'ambiance normale de la salle de culture, a presque toujours présenté un aspect jaunâtre et étioilé.

D. Transfert des plants en pots

Une fois enracinés, les jeunes plants sont sortis des tubes, lavés pour éliminer l'agar et repiqués sur un mélange de tourbe et perlite (1/1) non stérilisé. Ils sont installés dans une salle climatisée, en jours longs de 16 h avec une humidité relative maintenue à environ 70 p. 100. L'humidification du substrat est assurée par un film d'eau à la base des pots.

1. Influence de la température de la salle d'élevage

Elle joue un rôle important. Pour une température constante voisine de 20 °C, la survie est faible : 23 p. 100 en moyenne pour 7 clones transférés. Lorsque cette température est plus élevée (25 °C constants), les pourcentages de reprise sont nettement plus importants : 51 p. 100 tous clones et traitements confondus. Une température élevée assurant une croissance active est donc très favorable à la survie et au développement des plants repiqués.

2. Influence du traitement rhizogène sur la reprise

Nous avons rassemblé dans le tableau 6 les taux de reprise obtenus pour 9 clones dont l'enracinement a été acquis de 7 manières différentes.

Les résultats, bien qu'incomplets, révèlent de manière très nette les rôles importants joués par la concentration comme par le mode d'application des auxines rhizogènes.

Tous les traitements riches en auxine qui donnaient les meilleurs pourcentages d'enracinement conduisent à une reprise faible (inférieure à 50 p. 100). Les pourcentages

TABLEAU 6

Taux de reprise des plants transférés en pots selon le traitement rhizogène appliqué aux pousses *in vitro*.
Survival of plants transferred in containers according to rooting treatment applied to shoots during *in vitro* culture.

Clones	Traitement rhizogène <i>in vitro</i>							
	ANA 5×10^{-6} M incorporé dans le milieu d'enracinement	Milieu d'enracinement simple + trempage rapide dans			sans traitement	Milieu d'enracinement + charbon actif 1 g/l		Total (pourcentage)
		ANA 10^{-2} M	AIB 10^{-2} M	AIB 5×10^{-3} M		Trempage rapide ANA 5×10^{-4} M	AIB 10^{-3} M durant 1 semaine	
105	1/6 (a)	0/3	0/3	6/9	—	—	0/3	17/21 (33)
106	0/6	0/3	2/2	8/8	2/2	5/6	2/5	17/27 (63)
112	1/2	0/2	1/5	2/4	1/1	0/1	3/4	5/16 (31)
114	0/3	0/4	—	—	3/3	3/4	0/1	6/14 (43)
127	0/3	0/3	—	—	2/2	1/3	0/3	3/11 (27)
130	3/3	2/3	2/3	5/7	1/1	3/3	3/5	16/20 (80)
131	4/13	2/3	—	—	—	2/2	2/4	8/18 (44,5)
160	1/3	2/6	3/6	10/21	1/1	—	1/4	17/37 (46)
Total	10/39	6/27	8/19	31/49	10/10	14/20	11/29	79/164
Pourcentage	25,6	22,2	42,1	63,3	100	70	37,9	48

(a) Nombre de plants repris/nombre de plants repiqués.
Number of plants surviving/number of plants transplanted.

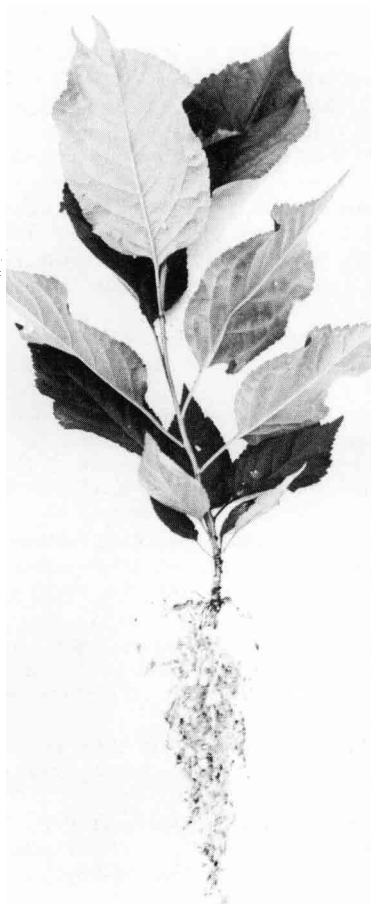


Figure 5
Jeune plant développée, 5 semaines après repiquage en serre.
Young plant 5 weeks after transplanting in greenhouse.

d'enracinement obtenus par trempage instantané (ANA 5×10^{-4} M ou AIB 5×10^{-3} M) ou par incorporation dans le milieu d'ANA (5×10^{-6} M) sont élevés et équivalents. La 2^e technique entraîne cependant une reprise beaucoup plus faible des jeunes plants formés. Comme le confirment d'autres essais, la présence d'auxine dans le milieu d'enracinement est préjudiciable pour le développement des jeunes plants formés. Ils ne reprennent pas leur croissance active et meurent à plus ou moins long terme.

L'interaction révélée va donc influencer sur le choix de la technique d'enracinement. On élimine en particulier les traitements où l'auxine révèle une action dépressive (concentration élevée, présence dans le milieu). Bien que donnant globalement des taux d'enracinement inférieurs, on s'oriente actuellement vers une utilisation brève, à dose moyenne, de l'auxine et son élimination du milieu d'enracinement. Ceci rejoint, en partie, la technique utilisée par QUOIRIN *et al.* (1977). Les plants sont transférés du milieu auxinique dans un milieu nutritif liquide sans auxine dès l'apparition des racines.

IV. CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de multiplier avec succès, par la culture *in vitro*, des merisiers forestiers âgés. C'est même, à l'heure actuelle, la seule technique qui ait permis de multiplier rapidement tous les arbres que nous avons sélectionnés.

Cette technique est perfectible mais on peut déjà faire les remarques suivantes :

- la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG est trop riche pour le développement des explants de merisier. Il est préférable de diminuer la concentration en ammonium pour

les phases de multiplication et d'élongation et de diluer l'ensemble de la solution au 1/5 pour la phase d'enracinement,

- les régulateurs de croissance jouent un rôle très important dans l'organogénèse :

- la BA est indispensable à la formation et à la multiplication des bourgeons, la présence d'AIB renforce son action,

- l'AG en forte concentration stimule l'allongement des pousses,

- une auxine est nécessaire pour favoriser l'enracinement de la plupart des clones,

- cependant les concentrations nécessaires à la formation des organes (bourgeons et racines) sont souvent inhibitrices de leur allongement. L'AIB peut même, et c'est là un point important, être inhibiteur du développement ultérieur des plants si sa dose d'emploi est trop forte ou son action trop prolongée.

Les clones ont révélé un comportement très variable. Certains réagissent très bien aux traitements optimaux, d'autres sont beaucoup plus longs à se multiplier comme à s'enraciner et souvent les rendements sont faibles. Nous serons donc nécessairement conduits à mettre au point, pour chaque phase de développement, différents milieux mieux adaptés à des groupes de clones plus homogènes dans leur réaction.

La culture *in vitro* répond donc aux besoins des améliorateurs. Les merisiers sélectionnés en forêt sont multipliés par

cette technique avec un taux de succès supérieur à 90 p. 100. Après un an et demi, plus de 70 clones différents sont ainsi en culture et certains sont déjà repiqués sur le terrain, après un peu plus de 6 mois de culture *in vitro*. Voici à titre d'exemple le déroulement des opérations concernant le clone 164 :

- origine : Haute-Saône.

- âge : 80 ans.

- diamètre à 1,30 m : 83 cm.

- bille de tranche : 15 m.

- 6/12/79 : installation des explants *in vitro*.

- 2/01/80 : 1^{er} repiquage — 4 tubes non infectés.

- 21/02/80 : 31 tubes.

- 13/03/80 : 84 tubes — multiplication et élongation.

- 8/05/80 : 52 pousses mises en enracinement.

- 6/06/80 : 38 pousses enracinées, soit 73 p. 100.

L'ensemble du matériel ainsi produit permettra de créer les parcs à pieds-mères et de mettre en place, dès 1982, les tests clonaux, objectif des améliorateurs.

La propagation en masse nécessite des études complémentaires. Celles-ci ne doivent pas se limiter seulement aux cultures *in vitro* mais aborder des voies plus classiques comme le bouturage de racine ou le bouturage herbacé. C'est le programme que nous poursuivons actuellement.

Reçu le 2 février 1981.

Accepté le 27 avril 1981.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boulay M.**, 1979a. Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par culture *in vitro*. *Micropropagation d'arbres forestiers*. AFOCEL Etudes et Recherches, **12**, 6/79, 49-55.
- Boulay M.**, 1979 b. Propagation *in vitro* du Douglas *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco par micropropagation de germination aseptique et culture de bourgeons dormants. *Micropropagation d'arbres forestiers*. AFOCEL Etudes et Recherches, **12**, 6/79, 67-75.
- Boxus P.**, 1971. La culture de méristèmes de *Prunus*. Note préliminaire relative à l'espèce *P. pandora*. *Bull. Rech. agron. Gembloux*, **6** (1-2), 3-5.
- Boxus P., Quoirin M.**, 1974. La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, **107** (1), 91-101.
- Boxus P., Quoirin M.**, 1977. Comportement en pépinière d'arbres fruitiers issus de culture *in vitro*. *Acta Hortic.*, **78**. *Tissue culture for horticultural purposes*, 373-379.
- Campbell R. A., Durzan D. J.**, 1975. Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. *Can. J. Bot.*, **53**, 1652-1657.
- Campbell R. A., Durzan D. J.**, 1976. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. *Can. J. For. Res.*, **6**, 240-243.
- David A., David H., Faye M., Isenukali K.**, 1979. Culture *in vitro* et micropropagation du pin maritime. *Micropropagation d'arbres forestiers*. AFOCEL Etudes et Recherches, **12**, 6/79, 33-40.
- Durand R., Boudet A. M.**, 1979. Le bouturage *in vitro* de l'Eucalyptus. *Micropropagation d'arbres forestiers*. AFOCEL Etudes et Recherches, **12**, 6/79, 57-66.
- Fossard R. A. (de)**, 1978. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.* Pékin, 425-438.
- Grinblat U.**, 1972. Differentiation of *Citrus* stem *in vitro*. *J. Am. Soc. hort. Sci.*, **97** (5), 599-603.
- Jones O. P., Hopgood M. E., O'Farrell D.**, 1977. Propagation *in vitro* of M. 26 apple rootstocks. *J. hort. Sci.*, **52**, 235-238.
- Jones O. P., Hopgood M. E.**, 1979. The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry F₁₂₁ (*P. avium*). *J. hort. Sci.*, **54** (1), 63-66.
- Lester U., Berbee J. G.**, 1977. Within-clone variation among black poplar trees derived from callus cultures. *For. Sci.*, **23** (1), 122-131.
- Murashige T., Skoog F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Popov Y. G., Vysotskii V. A., Trushechkin V. G.**, 1976. Cultivation of isolated stem apices of sour cherry. *Sov. Plant Physiol.*, **23** (3), 435-440.
- Quoirin M., Lepoivre Ph., Boxus Ph.**, 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *C. R. Rech. 1976-1977. Rapp. Synth. Sin. Cult. fruitières maraichères Gembloux* (Belgique).
- Rancillac M.**, 1979. Mise au point d'une méthode de multiplication végétative *in vitro* du pin maritime (*Pinus pinaster* Sol.). *Micropropagation d'arbres forestiers*. AFOCEL Etudes et Recherches, **12**, 6/79, 41-48.
- Riffaud J. L.**, 1980. *La multiplication végétative du merisier* (*Prunus avium* L.) par drageonnage et culture *in vitro*. Mémoire de 3^e année de l'E.N.I.T.E.F.-I.N.R.A. Stn. d'Amélior. Arbres forestiers. Doc. 80 (1), 81 p.
- Serlis G., Mouras A., Salesses G.**, 1979. Tentative de culture *in vitro* d'anthères et de fragments d'organes chez les *Prunus*. *Ann. Amélior. Plant.*, **29** (2), 145-161.
- Sommer H. E., Brown C. L., Kormanik P. P.**, 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.*, **136**, 196-200.