

LA MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE

TECHNIQUES HORTICOLES ET CULTURE *IN VITRO*

La multiplication végétative repose sur l'aptitude d'un végétal à pouvoir reconstituer un individu, identique à lui-même, à partir d'un organe (tige, racine, feuille...), d'un tissu ou d'une cellule. Elle est, depuis des siècles, largement utilisée pour reproduire de nombreuses espèces en horticulture, arboriculture... Pour la forêt, seules quelques espèces sont multipliées de façon routinière depuis des décennies (Saules, Peupliers, *Cryptomeria japonica*). Les progrès réalisés dans les équipements de multiplication et dans les connaissances en physiologie des végétaux ligneux ont fait progresser les techniques à pas de géants. A l'heure actuelle, de nombreux programmes d'amélioration et de production intègrent ou reposent sur la multiplication végétative.

TECHNIQUES HORTICOLES DE MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE

En dehors du bouturage et des techniques de culture *in vitro* développés plus loin, différentes méthodes de multiplication sont applicables aux arbres forestiers. Néanmoins, en raison de leur coût et de la difficulté de leur mise en œuvre, elles sont restreintes aux programmes d'amélioration ou à certaines espèces.

Greffage, marcottage, drageonnage

Le greffage est une des plus anciennes techniques horticoles, restreinte cependant à l'établissement de collections de clones et de vergers à graines chez les espèces forestières. Le succès varie suivant les espèces, selon le type de greffe effectuée et l'époque de greffage. Le greffage en tête est recommandé pour l'établissement des vergers à graines, afin d'obtenir une croissance rapide et harmonieuse des plants et de raccourcir les délais nécessaires à la production de graines (*Pinus*, *Picea*...).

Certaines espèces (Douglas...) présentent des phénomènes d'incompatibilité à plus ou moins long terme. Dans ce cas, on sélectionne des porte-greffes compatibles qui seront produits par semis ou boutures.

Le marcottage consiste à provoquer la formation de racines sur un rameau non détaché de l'arbre-mère. Après annélation de l'écorce et traitement à l'aide de substances rhizogènes, le milieu nécessaire au développement des racines est installé sous forme de buttes (marcottage en cépée) ou de manchons (marcottage aérien) autour des rameaux. Le plant sera séparé du pied-mère une fois enraciné. C'est une technique complexe et coûteuse qui ne peut être envisagée que dans le cas d'échec des autres méthodes (Noyer, par exemple).

Naturellement, certaines espèces comme le Merisier, les Peupliers de la section *Leuce*,... produisent de jeunes pousses sur leurs racines, conduisant à la formation de bouquets constitués par un seul clone. C'est le drageonnage.

Les Peupliers *Leuce* (en particulier les hybrides interspécifiques *Populus tremula* × *Populus alba* ou *Populus tremuloïdes*) font l'objet d'une telle production. Sur de jeunes plants (2 ans), 50 à 100 racines courtes de 8 cm (installées en serre) ou 2 à 3 racines longues de 20 cm (installées en pépinière) peuvent être prélevées pour reconstituer un plant.

Le bouturage

Technique traditionnelle en horticulture, ce n'est que récemment qu'elle est utilisée dans les programmes d'amélioration et de multiplication de nombreuses espèces forestières dans le monde (Épicéa, Eucalyptus, divers Pins, Merisier...).

• Facteurs conditionnant la réussite au bouturage

Ceux-ci peuvent être endogènes (liés à l'état de développement du matériel végétal), ou exogènes (en particulier conditions de bouturage et traitements).

— Facteurs endogènes

L'enracinement des boutures décroît avec l'augmentation de l'âge des pieds-mères. Excellent pour de jeunes semis, le taux d'enracinement peut chuter très rapidement (cas du Noyer) ou plus graduellement (Épicéa, Mélèze...) et il est pratiquement nul pour des arbres adultes. Cette décroissance s'accompagne toujours d'une diminution importante de la qualité (racines faibles et peu nombreuses...) et du développement des boutures (croissance médiocre, plagiotropie⁽¹⁾...).

Ce phénomène de maturation sous contrôle génétique et physiologique constitue le problème le plus délicat à résoudre pour les arbres forestiers. Nous développerons plus loin différentes stratégies de multiplication qui en ont découlé.

Toutes les pousses d'un plant ne sont pas susceptibles de fournir de bonnes boutures. Les gros rameaux mal aoûtés comme ceux très petits conduisent à des résultats faibles. Chez les conifères, les pousses des dernières ramifications comportant 3 à 5 bourgeons donnent les meilleurs pourcentages d'enracinement. Il en est de même pour les boutures prélevées dans la portion basse de la couronne. Elles sont considérées comme plus juvéniles.

L'état physiologique des boutures conduisant à un bon enracinement varie selon la saison de prélèvement. En général, les meilleurs résultats sont enregistrés pour les conifères (Épicéas, Douglas...) juste avant le débourrement au printemps et, pour les feuillus (Chênes, Merisiers...) et les Mélèzes, en phase active de croissance en été. Une deuxième vague d'enracinement est fréquemment obtenue en fin d'été quand l'élongation a cessé et que la lignification commence. On peut parfois étendre la période favorable au bouturage en jouant sur les conditions d'environnement (confinement...) lors de sa réalisation (exemple : bouturage herbacé de l'Épicéa).

— Facteurs exogènes

De très nombreux milieux de bouturage sont utilisés, soit inertes et simples (sable, gravier, perlite...), soit composites à base de tourbe, de terreau ou d'écorces. Le choix est conditionné par de nombreux critères dont :

— La capacité de rétention en eau et la disponibilité en air en fonction du système d'irrigation utilisé. Dans le cas de pulvérisations grossières, l'utilisation de milieux filtrants (graviers...) est à préconiser. Un milieu trop riche en eau conduit toujours à des pertes par pourritures et attaques de pathogènes.

— La méthode de production adoptée. L'utilisation de conteneurs par exemple nécessite l'emploi de milieux fibreux ayant plus de tenue pour le repiquage.

(1) Conserve un port de branche par opposition à l'orthotropie pour laquelle le port est redressé.

Tout en conduisant à un même taux d'enracinement, les milieux peuvent influencer différemment sur la qualité des racines produites. Pour le Douglas, le gravier conduit à des racines blanches épaisses et peu ramifiées, fragiles au repiquage, et des milieux composites à base de tourbe favorisent la formation de racines fines, lignifiées et ramifiées très favorables à la reprise.

L'environnement dans lequel sont placées les boutures joue un rôle important. Deux facteurs sont prépondérants : l'humidité et la température.

L'absence de racine ne permet pas à la bouture de pouvoir maintenir son taux de turgescence. L'entretien d'un taux hygrométrique élevé (couverture plastique, systèmes de brumisation ou de « fog »...), tout en veillant à ne pas saturer le milieu en eau, permet de réduire le stress hydrique et de favoriser l'enracinement.

En horticulture, de nombreuses études ont été conduites sur l'effet d'une chaleur de fond. L'idéal est souvent compris entre 20 et 25°C. Néanmoins, elle agit plus sur la vitesse que sur le taux d'enracinement. La température ambiante est plus difficile à contrôler. Les boutures peuvent tolérer de larges fluctuations à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité. Cependant, une température uniforme, même relativement peu élevée (20°C) est nettement plus favorable pour l'enracinement.

La majorité des espèces nécessite l'emploi de substances rhizogènes. Différents composés — acides : indol-butyrique (A.I.B.), naphthyl-acétique (A.N.A.), ou indol-acétique (A.I.A.) —, simples ou en mélanges et différentes méthodes d'applications (poudre, solutions concentrées et trempage rapide ou diluées et trempage long) sont utilisables. Dans tous les cas, le traitement doit être expérimenté et adapté à l'espèce, au clone et modulé selon l'âge ou l'état physiologique de la bouture. Par exemple, les Épicéas ainsi que le Mélèze jeunes ne nécessitent pas de traitement, mais 0,1 % d'A.I.B. (en poudre) est nécessaire dès l'âge de 5 ans environ. Le Douglas ainsi que de nombreux feuillus difficiles à bouturer (Frêne, Chêne...) demandent des doses plus élevées (0,5 à 1 % d'A.I.B. en poudre).

Les principaux facteurs présentés ci-dessus sont étroitement corrélés et le changement d'une condition nécessite l'ajustement des autres pour maintenir un succès élevé. Néanmoins, les progrès réalisés ces vingt dernières années ont permis la mise en place de standards de multiplication pour de nombreuses espèces (Épicéa, Merisier, Séquoia, Eucalyptus...).

- *Différentes stratégies de bouturage*

- Multiplication clonale d'arbres âgés

S'ils ont alors exprimés toutes leurs potentialités permettant une bonne sélection, les boutures prélevées directement sur de tels sujets s'enracinent difficilement et conduisent à des plants de qualité médiocre.

Différentes méthodes sont développées pour libérer le développement de bourgeons initiés depuis de nombreuses années mais maintenus réprimés, ou pour briser les corrélations au niveau de l'architecture de l'arbre. Elles permettent un retour du clone à un certain état de jeunesse, partiel ou total, compatible avec un bon enracinement. Ainsi les tailles sévères, le recépage permettent la multiplication d'espèces résineuses (Séquoia, Pins...) et feuillues (Chêne, Frêne, Tulipier, Noyer...). Une certaine réjuvenilisation peut être aussi obtenue par des greffages répétés sur de jeunes semis (Douglas, Eucalyptus, Pin...).

Néanmoins, ces techniques sont lourdes à mettre en œuvre et coûteuses. Elles sont en général limitées à la confection de parcs à pieds-mères de boutures ou à la réalisation de programme d'amélioration.

— Multiplication de matériel juvénile

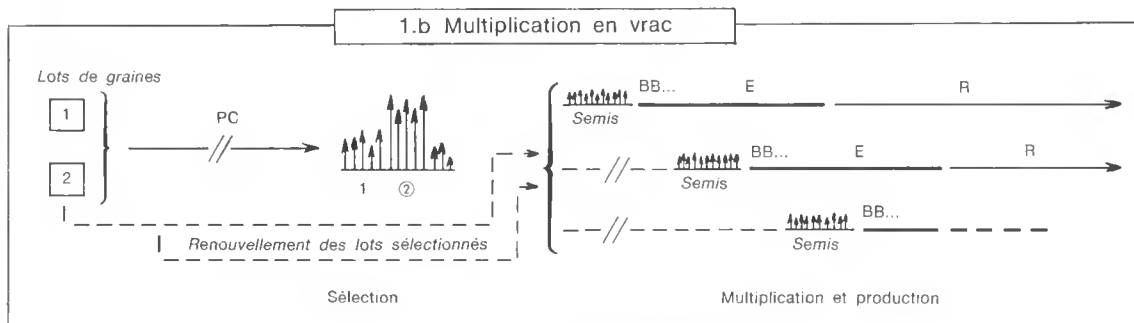
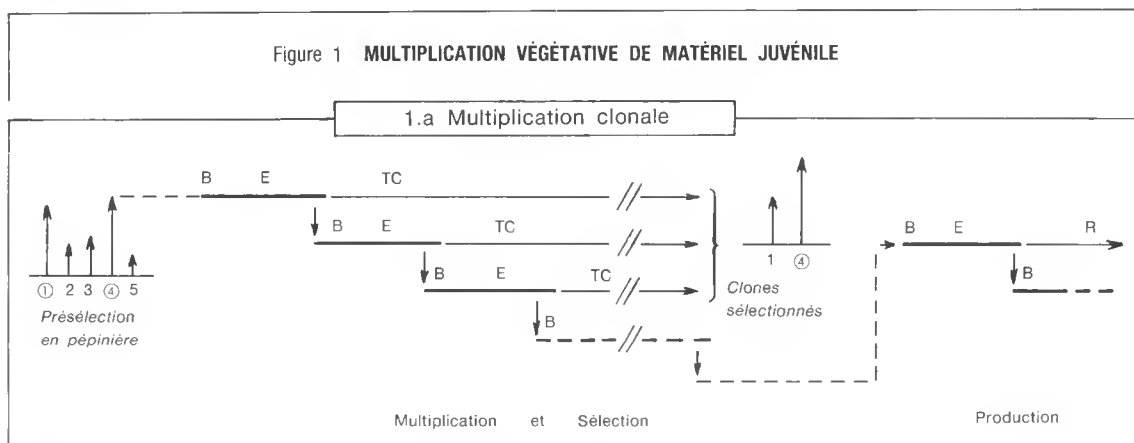
Les deux principales stratégies développées sont schématisées dans la figure 1. Elles permettent de bénéficier de taux d'enracinement élevés et d'une bonne restitution de l'orthotropie.

La multiplication avec sélection clonale en pépinière (figure 1a) a été la première mise en place pour l'Épicéa commun en Allemagne. La difficulté de sélectionner valablement à un stade très jeune entraîne la nécessité de prélever un nombre élevé de clones (plusieurs milliers) dont la sélection définitive sera différée au stade des tests clonaux. La constitution de variétés polyclonales de production ne peut ainsi intervenir que de nombreuses années plus tard.

Les clones doivent, de plus, jusqu'à leur utilisation être maintenus juvéniles. Deux techniques principales sont utilisées : le bouturage cyclique (figure 1a) ou le maintien des clones sous forme de haies. Il semble cependant que ces techniques ne peuvent empêcher (au plus retarder) une certaine maturation des clones.

La multiplication en vrac (Bulk propagation) (figure 1b) de provenances ou de descendance sans sélection clonale découle directement de l'état d'avancement des programmes d'amélioration. L'amplification par bouturage des meilleures sources de graines peut permettre de produire rapidement des plants de qualité et performants.

Figure 1 MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE DE MATÉRIEL JUVÉNILÉ



B : Bouturage BB... : Bouturage successif sur 1 à 3 ans à partir des mêmes pieds-mères.
 E : Elevage des boutures en pépinière TC : Test clonal PC : Plantation comparative R : Reboisement.



Bouturage d'Épicéas communs âgés de 3 ans, en serre plastique, sur gravier et sous brumisation. Photo : O. CORNU - I.N.R.A. - ORLÉANS

Cette méthode a été mise au point au Canada sur *Picea mariana* et en Angleterre sur *Picea sitchensis*. De jeunes semis forcés en serre peuvent fournir 2 à 3 générations de boutures par an. Le facteur d'amplification est très élevé et peut atteindre l'ordre de 50 à 100 fois sur une année en 3 cycles de bouturage chez *Picea mariana*, et 250 à 1 000 fois sur 4 à 6 ans en 2 cycles de bouturage chez *Picea sitchensis*. Elle permet, de plus, de s'affranchir de la gestion de parcs à pieds-mères à maintenir juvéniles. Dès l'apparition de symptômes de maturation au niveau du bouturage, les plants peuvent être remplacés par de nouveaux semis issus du même lot de graines. De même, toute nouvelle source de matériel plus performant peut être immédiatement exploitée en la substituant à la précédente. Néanmoins, cette technique nécessite (surtout dans le modèle *Picea mariana*) des équipements lourds, tant pour l'élevage et le forçage des plants que pour la réalisation du bouturage (boutures herbacées plus fragiles).

Différentes stratégies de multiplication viennent d'être présentées. Le choix de l'une ou l'autre dépend, comme nous l'avons vu, de nombreux facteurs mais aussi du prix de revient des plants bouturés. En dehors du coût réel de production (largement conditionné par le volume de la production), le coût supportable dépend de l'espèce, de sa rareté et des gains que l'on peut attendre d'une production par multiplication végétative. A de rares exceptions, ce sont les deux dernières stratégies qui conduisent à des coûts de production rivalisant avec ceux de semis. En Allemagne, le prix d'une bouture d'Épicéa commun est estimé à une fois et demie celui d'un semis équivalent et, au Canada, les essais de multiplication en vrac de *Picea mariana* ont permis de produire des plants au même prix que celui de semis en conteneurs.

LA CULTURE *IN VITRO*

Cette technique englobe deux modes de multiplication (conforme et non conforme), présentés sur la figure 2. Seuls sont développés actuellement pour les essences forestières le bourgeonnement axillaire (départ des méristèmes situés à l'aisselle des feuilles) et le bourgeonnement

adventif (induction de méristèmes de tiges sur des organes n'en possédant pas) chez *Pinus radiata* en particulier, l'expérimentation n'en étant qu'à ses débuts pour les autres méthodes.

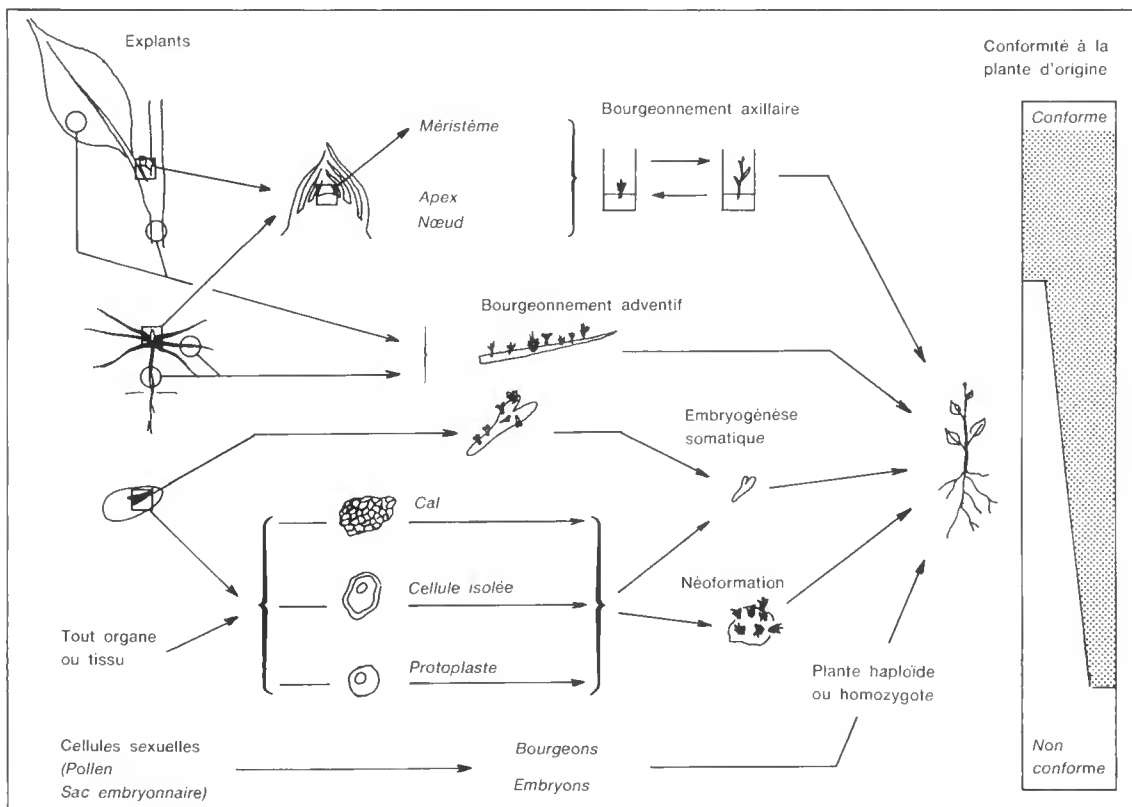
Plusieurs étapes sont incluses dans la micropropagation *in vitro*. Certaines s'apparentent à la multiplication classique (prétraitement du pied-mère, rhizogénèse, acclimatation), d'autres sont propres à la culture *in vitro* (choix de l'explant le plus réactif, stérilisation de l'organe végétal, choix de la technique de propagation).

Prétraitement du pied-mère et choix des explants

Selon la littérature, la multiplication *in vitro* de la plupart des essences forestières se fait à partir de géotypes jeunes ou très jeunes (semis, graines). Comme en propagation classique, le phénomène de maturation des pieds-mères et les problèmes associés (manque de réactivité des explants, fortes contaminations, etc...) sont souvent surmontés par l'application de techniques de rajeunissement ou de réactivation des pieds-mères (taille, recépage, greffages réitérés ou non...). La sélection de tissus ou organes jeunes et vigoureux facilite l'introduction *in vitro* du matériel végétal et sa multiplication ultérieure. Des succès ont été ainsi obtenus en utilisant des rejets de souches (*Sequoia sempervirens*, Noyer), des drageons (Merisier), des pousses obtenues après taille (Pin maritime), etc...

Le choix des explants dépend de la méthode de multiplication utilisée. Ceux-ci peuvent être, pour le bourgeonnement axillaire, des nœuds (2 à 5 cm de long), jusqu'à des méristèmes (0,1 à

Figure 2 DIFFÉRENTES MÉTHODES DE CULTURE *IN VITRO*



0,2 mm). Tous possèdent un méristème caulinaire préexistant, mais il est possible, dans le cas du bourgeonnement adventif, d'induire la formation de méristèmes sur d'autres organes tels que feuilles, cotylédons, hypocotyles...

Stérilisation

Le milieu de culture contenant une source de carbone (saccharose en général), il est nécessaire de débarrasser l'organe mis en culture de la flore bactérienne et fongique qui lui est associée. Ceci est réalisé par bains, de durée variable, dans une solution de désinfectant. Cette opération délicate, dont dépend en majeure partie la réussite de la multiplication, doit prendre en compte l'état du matériel végétal (ligneux ou herbacé) et la nature de l'explant. Des contaminations survenant après plusieurs transferts ont amené certains auteurs à choisir un explant aussi petit que possible et protégé de l'extérieur : le méristème.

Multiplication

Peu d'essences forestières ont été régénérées par néoformation de bourgeons sur cal. Ce sont presque toutes des Angiospermes (*Populus* en particulier) et le matériel est généralement prélevé sur un semis. L'embryogénèse somatique (obtention de « pseudo-graines ») a été obtenue sur différentes espèces (*Ulmus americana*, Liquidambar, Santal, Noisetier, Marronnier). Dans ce cas aussi, le matériel est souvent issu de sujets très jeunes (embryons matures et immatures, hypocotyles, ovaires immatures, etc...). Au niveau des conifères, des résultats récents ont montré la possibilité d'obtenir des structures embryonnaires en utilisant comme source d'explant l'embryon immature (*Picea abies*, Douglas et Méléze).

Le bourgeonnement adventif a été obtenu sur de nombreux conifères en utilisant comme matériel de départ : cotylédons, hypocotyles, embryons, etc... L'application la plus importante est actuellement faite en Nouvelle Zélande pour multiplier des descendants de croisements contrôlés de *Pinus radiata*. D'autres productions pilotes ont été faites sur Douglas et sur *Pinus taeda*. Cette méthode a été peu utilisée chez les feuillus qui répondent mieux au bourgeonnement axillaire. Celui-ci a été appliqué avec succès jusqu'au niveau commercial, au Merisier, au Tremble, à l'Eucalyptus... Chez les conifères, seul le *Sequoia sempervirens* répond bien à ce type de production. Toutes ces méthodes ont pour but d'obtenir à partir d'un explant des pousses feuillées, qui sont remultipliées périodiquement par transfert sur des milieux nutritifs complexes (sels minéraux, vitamines, sucre, hormones...) liquides ou gélés.

Élongation, rhizogénèse et transfert

Pour quelques espèces, élévation et enracinement prennent place sur le même milieu (Peuplier, Saule, Tremble). Il est cependant souvent nécessaire de définir un milieu permettant une élévation de la pousse feuillée avant d'entamer le processus d'enracinement. Celui-ci peut se dérouler en conditions stériles et un repiquage sur milieu gélosé riche en auxine est alors nécessaire, ou en conditions horticoles (substrat classique de bouturage en serre à l'étouffée ou sous brouillard). Le choix de la technique est fonction de la réactivité de l'espèce. Ainsi, pour le Merisier, l'enracinement se fait *in vitro* et les plantes enracinées sont acclimatées, alors que pour le *Sequoia sempervirens*, l'enracinement se fait en serre après prétraitement préalable à 10-15°C des pousses feuillées sur milieu d'élévation.

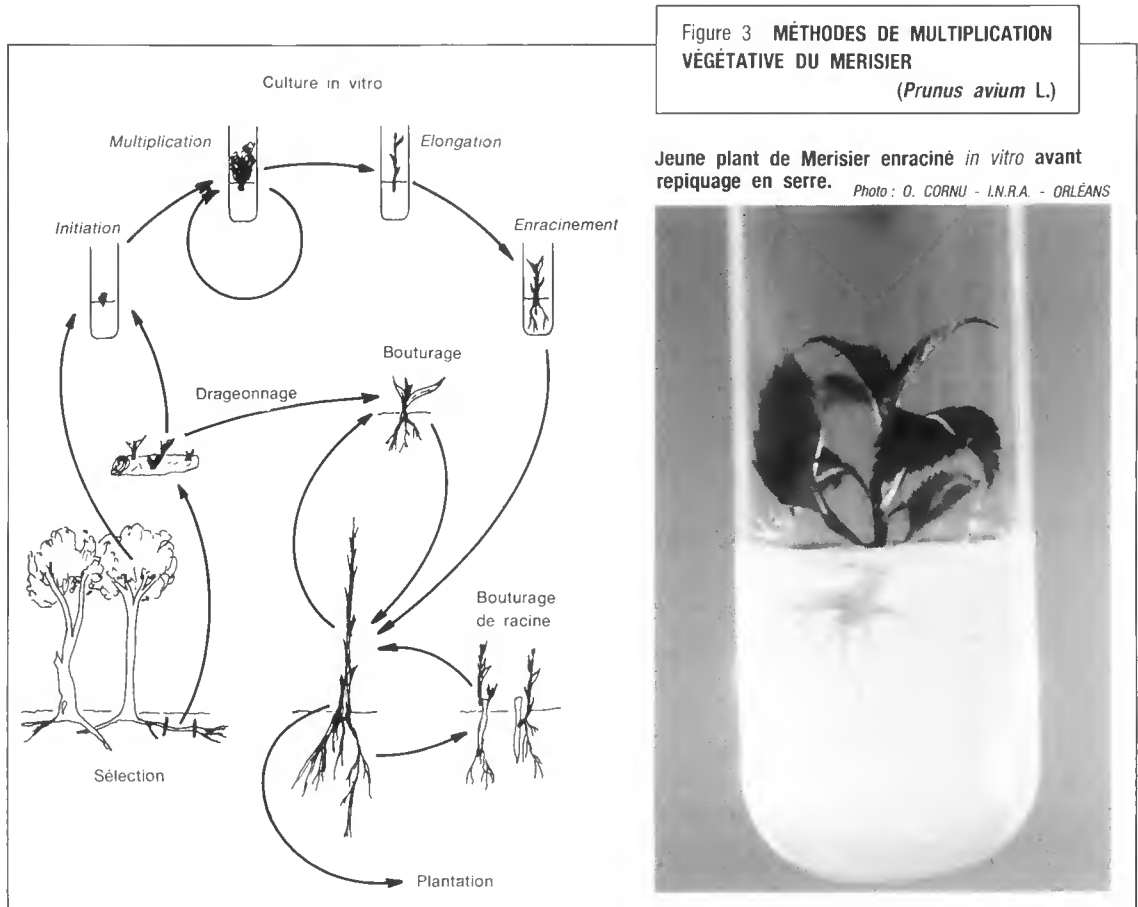
Quelle que soit la méthode d'enracinement choisie, les plants obtenus doivent être acclimatés aux conditions extérieures. Cette étape est souvent délicate, car il s'agit pour la plante de passer des conditions d'humidité saturante du tube de culture à celles de l'extérieur. Un séjour de 15 jours à 1 mois en atmosphère confinée ou sous brouillard en serre, suivi d'un sevrage progressif permettent le transfert de nombreuses espèces.

Conclusions

L'application des techniques *in vitro* aux essences forestières est relativement récente. Elle est souvent limitée à la multiplication de sujets juvéniles (cas des conifères par exemple). Cependant des applications commerciales importantes ont été faites sur les essences répondant bien à ces techniques (Merisier et *Sequoia sempervirens* en France et Tremble en Allemagne) et, dans ce cas, la propagation de matériel sélectionné à l'état adulte est possible.

Une des limitations de l'application de ces méthodes, hormis les problèmes techniques, est sans doute le coût de la plante produite, qui est souvent nettement supérieur à celui obtenu par les techniques classiques de multiplication. Ainsi à l'heure actuelle, l'application commerciale est limitée à la propagation d'essences précieuses (Merisier par exemple) ou à celles pour lesquelles les techniques de multiplication et la constitution de parcs à pieds-mères de boutures sont difficiles (*Sequoia sempervirens*).

Néanmoins le développement de certaines techniques (embryogénèse somatique par exemple) ou la mécanisation de la micropropagation devrait permettre de diminuer les prix des plants produits. Enfin, dans un autre domaine, la possibilité de sélection *in vitro*, d'hybridation somatique, etc... peut ouvrir d'autres voies aux généticiens et permettre à ces biotechniques d'avoir une utilisation très large en matière forestière.



Les différentes méthodes de multiplication végétative développées ci-avant, loin d'être concurrentes, sont fréquemment utilisées de manière complémentaire au sein des programmes d'amélioration et de production des espèces forestières. Le Merisier étudié à l'I.N.R.A. en est une très bonne illustration (figure 3). Si le drageonnage et la culture *in vitro* sont essentiellement utilisés pour la récolte des clones adultes sélectionnés en forêt, le bouturage de racines, le bouturage herbacé et la culture *in vitro* peuvent assurer la production de plants pour le reboisement. À l'heure actuelle, la majorité de ceux-ci provient de culture *in vitro*.

D. CORNU

Station d'Amélioration des Arbres forestiers
CENTRE DE RECHERCHES FORESTIÈRES (I.N.R.A.)
ARDON
45160 OLIVET

M. BOULAY

ASSOCIATION FORÊT-CELLULOSE
Domaine de l'Étançon
77370 NANGIS

BIBLIOGRAPHIE

- AUGE (R.), BEAUCHESENE (G.), BOCCON-GIBOD (J.), DECOURTYE (L.), DIGAT (B.), GALANDRIN (J.CI.), MINIER (R.), MORAND (J.CI.), VIDALIE (H.). — La culture *in vitro* et ses applications horticoles. — Paris : J.B. Baillière, 1984. — 152 p.
- BONGA (J.M.), DURZAN (D.J.). — Tissue culture in forestry. — The Hague : Martinus Nijhoff, 1982. — 420 p.
- CHAUSSAT (R.), BIGOT (C.). — La multiplication végétative des plantes supérieures. — Paris : Gauthier-Villars Ed., 1980. — 277 p.
- HARTMAN (H.T.), KESTER (D.E.). — Plant propagation. Principles and practices. 4^e édition. — Prentice-Hall, 1983. — 727 p.
- HUHTINEN (O.). — Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières. I.U.F.R.O., Fontainebleau, 1982. — Nangis : AFOCEL, 1982. - 363 p.
- KLEINSCHMIT (J.). — Proceedings of the IUFRO joint meeting of working parties on « Genetics about breeding strategies including multiclonal varieties ». — Staufenberg-Echerode (R.F.A.) : Lower Saxony Forest Research Institute, 1982. — 238 p.
- KRUGMAN (S.L.). — Special issue on vegetative propagation. Proceeding of the IUFRO meeting in Rotorua in 1973 on reproductive processes. — *New Zealand Journal of Forest Science*, vol. 4, n° 2, 1974, pp. 120-458.
- MARGARA (J.). — Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. — Paris : Institut national de la Recherche agronomique, 1981. — 262 p.