Application de la Technique de Culture des Tissus Végétaux à l'étude de quelques problèmes de la physiologie de l'arbre

PAR

C. JACQUIOT

Ingénieur en Chef des Eaux et Forêts
Directeur de Recherches
au Centre Technique du Bois
Professeur à l'Ecole Supérieure du Bois

TABLE DES MATIÈRES

Application de la technique de culture des tissus végétaux à l'étude de quelques problèmes de la physiologie de l'arbre, par C. JACQUIOT, Ingénieur en Chef des Eaux et Forêts, Directeur de Recherches au Centre Technique du Bois, Professeur à l'Ecole Supérieure du Bois.

	PAGES
INTRODUCTION	317
PREMIÈRE PARTIE. — HISTORIQUE	319
I Rythme d'activité du cambium	321
II Organisation des tissus néoformés	331
III Organogenèse	336
DEUXIÈME PARTIE. — Matériel et méthodes	345
TROISIÈME PARTIE. — Résultats expérimentaux	355
<i>Chapitre I.</i> — Observations générales sur les conditions de culture du tissu cambial de diverses essences	357
A) <i>Premiers isoléments</i>	357
1° Les cas d'échecs des cultures	358
a) inertie et nécrose	359
b) contaminations	362
2° Action de diverses substances sur la prolifération des tissus	363
Saccharides	363
Auxines	363
Vitamines	364
Substances diverses	365
Extraits naturels	365
B) <i>Tissus repiqués</i>	366
Vitesse de prolifération	366
Action des auxines	366

Action des vitamines	369
Action des acides aminés	371
Glutathion	371
Bases puriques et pyrimidiques	371
Action de la gibberelline	371
Action de l'acide traumatique	372
Action des cancérogènes	372
Action du diéthylthiocarbamate de sodium	372
Action de la 1-3, diphénylurée	372
Action des produits et extraits naturels	372
Cultures associées de tissus d'essences différentes	373
<i>Chapitre II. — Reprise d'activité du tissu cambial en hiver</i>	375
Tableaux des essais de culture de cambium prélevé en hiver.	375
Tableau II Genre <i>Populus</i>	376
III <i>Juglans regia</i> L.	377
IV <i>Castanea vesca</i>	377
V Genre <i>Quercus</i>	378
VI <i>Fagus sylvatica</i> L.	378
VII <i>Carpinus betulus</i> L.	378
VIII <i>Betula verrucosa</i> Ehr.	379
IX <i>Ulmus campestris</i> L.	379
X <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	380
XI <i>Tilia parvifolia</i> Ehr.	380
XII Genre <i>Eucalyptus</i>	380
XIII <i>Fraxinus excelsior</i> L.	381
XIV <i>Sambucus nigra</i> L.	381
XV Conifères <i>Abies pectinata</i> D.L.	381
<i>Picea excelsa</i> Link.	381
Cultures dans l'eau	382
Comportement du cambium dans des conditions climatiques exceptionnelles	383
Reprise d'activité du cambium dans des souches d'arbres abattus en hiver	384

TABLE DES MATIÈRES

313

PAGES

Persistance de l'état de repos pendant la saison de végétation	384
Examen critique des résultats	384
Discussion	386
<i>Chapitre III. — Morphologie et anatomie des tissus en culture. ..</i>	391
I Premiers isolements A) Morphologie externe	391
B) Anatomie	393
II Tissus repiqués A) Morphologie externe	396
B) Anatomie	399
1° Tissus cohérents	399
2° Tissus sans cohésion	400
3° Evolution de la structure	401
4° Tubes criblés	401
C) Réserves	401
D) Lignification	402
<i>Interprétation des résultats</i>	403
<i>Analyse des facteurs agissant sur la différenciation ..</i>	403
1 — Annulation de la pression radiale	404
2 — Maintien de la pression radiale, le cambium étant séparé de la cime	405
3 — Maintien de la pression radiale, le cambium étant séparé à la fois de la cime et des racines.	405
4 — Action de perturbations chimiques sur le cam- bium <i>in situ</i> dans l'arbre intact	406
<i>Comparaison des résultats</i>	410
Action du greffon sur le sujet	412
Action des bourgeons	412
Action des auxines	414
Action des vitamines	416
Action des bases puriques et pyrimidiques	416
Action de substances diverses (gibberelline, cancéro- gènes, vanilline, eugénol, isoéugénol, pyrrol, phy- tol, substances naturelles complexes)	416

	PAGES
<i>Chapitre IV. — Formation d'organes par les tissus cultivés in vitro.</i>	419
A) Premiers isoléments	419
1° Formation de racines	419
2° Formation de bourgeons	419
Variations individuelles	420
Variations saisonnières	422
Potentiel caulogène des racines	424
Polarité	425
Action de facteurs chimiques	425
Action d'extraits de tissus	429
Expériences complémentaires sur des segments de tiges ou de racines cultivés dans l'eau	430
Comportement du tissu cambial sur le périmètre des blessures	431
Conclusion	432
B) Tissus repiqués	432
1° <i>Populus tremula</i> L.	432
Souche de Villefermoy	433
Formation de racines	433
Formation de pousses	434
Souche de Maurienne	435
Souche de Ristolas	435
Cultures associées de souches différentes	435
2° <i>Betula verrucosa</i> Ehr.	437
3° <i>Ulmus campestris</i> L.	440
4° <i>Tilia parviflora</i> Ehr.	441
5° Autres essences	441
EXPOSÉ D'ENSEMBLE DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	442
I — Conditions de culture du tissu cambial d'arbres	442
A) Premiers isoléments opérés pendant la saison de végétation	442

TABLE DES MATIÈRES

315

	PAGES
B) Tissus repiqués	443
II — <i>Reprise d'activité du cambium</i>	444
Incidences technologiques	445
III — <i>Anatomie</i>	447
IV — <i>Organogenèse</i>	449
BIBLIOGRAPHIE	454

100

100 100 100 100

100

100 100 100

100

100 100 100

100 100 100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100 100 100

100

100

100

100

100

100

100

100

100 100 100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

INTRODUCTION

Les études sur la physiologie de l'arbre présentent des difficultés techniques considérables qui résultent, d'une part, des grandes dimensions du végétal et, d'autre part, de sa très longue durée de vie.

Si les études sur le développement global de l'arbre et, en particulier, sur celui de la tige qui en constitue, pour la plupart des essences, le produit économiquement important, ont permis, grâce aux données obtenues par les techniques de la dendrométrie et interprétées à l'aide de calculs statistiques, de mesurer la production ligneuse d'un peuplement, d'établir des corrélations entre cette production, les caractéristiques climatiques et édaphiques de la station, et les particularités génétiques de la population d'arbres étudiée, le détail des processus physiologiques qui interviennent dans le développement du végétal n'est encore connu que de manière fragmentaire. Ces lacunes dans nos connaissances restreignent les possibilités d'action sur les phénomènes vitaux qui, en dernière analyse, déterminent qualitativement et quantitativement la production ligneuse. L'étude du végétal entier dans des conditions de milieu déterminées par l'expérimentateur ne pourrait se concevoir qu'en faisant appel à des phytotrons géants où des générations successives de chercheurs devraient, pour certaines questions, poursuivre une même expérience pendant des dizaines d'années.

Cette difficulté peut être tournée pour l'étude de certains problèmes, tels que ceux relatifs à la physiologie du cambium, en faisant appel à la technique des cultures de tissus qui, en permettant d'étudier ces tissus dans des conditions physiques et sur des milieux que l'expérimentateur peut librement choisir, offre des perspectives nouvelles pour le progrès de nos connaissances sur la physiologie de l'arbre.

C'est dans cet esprit que j'ai entrepris, au lendemain de la guerre, des recherches faisant appel à la culture du tissu cambial sur certains problèmes de la biologie de l'arbre: déterminisme de l'activité du cambium, de l'organisation des tissus secondaires, de la néoformation d'organes, problèmes d'importance primordiale pour des progrès des techniques forestières.

Dans la poursuite de mon travail, j'ai bénéficié d'aide, d'encouragements, de conseils qui m'ont été particulièrement précieux. A ceux

qui m'ont apporté ainsi leur appui, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance. C'est avec beaucoup d'émotion que j'évoque d'abord ici la mémoire des disparus: de mon maître Philibert GUINIER, Membre de l'Institut, Directeur honoraire de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts, qui suivit constamment mes travaux avec le plus bienveillant intérêt, de Raoul COMBES, Membre de l'Institut, qui m'accueillit, dès avant la guerre, au Laboratoire de Biologie Végétale de Fontainebleau où je pus acquérir la pratique approfondie des techniques de la Physiologie végétale.

En M. le Professeur GAUTHERET, Membre de l'Institut, pionnier des cultures de tissus végétaux, j'ai trouvé le guide le plus compétent et le plus amical, dont les conseils ont eu pour moi une valeur inestimable.

M. le Professeur EICHHORN a également manifesté à mon égard la plus grande bienveillance en me donnant la possibilité de poursuivre mes travaux dans son laboratoire de Fontainebleau, et en mettant à ma disposition tout le matériel qui m'était nécessaire.

Mlle PAUPARDIN, collaboratrice de M. GAUTHERET, a bien voulu procéder aux essais biologiques sur des extraits de tissus. Je lui exprime tous mes remerciements. Je remercie mes collaboratrices dont l'aide m'a été précieuse dans l'exécution de mon travail: Mme GUILLEMAIN, ingénieur-chimiste et Mlle LAMOUR, chimiste, qui procédèrent au fractionnement chromatographique des extraits de tissus, Mines HURON, VENUAT, MEREAU, TRENARD, Mlles GENEAU et DESPOUY qui ont apporté tous leurs soins et leur habileté à l'exécution des microphotos.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à mes camarades forestiers qui m'ont procuré, avec le plus cordial empressement, mon matériel d'étude: MM. les Conservateurs et Ingénieurs en Chef METRO, CLAUDOT, directeurs de la Station de Recherches Forestières de Rabat, GUINAUDEAU, directeur de la Station de Recherches Forestières de Bordeaux, MOREL, Chef du Service Forestier de Melun, MM. les Ingénieurs Principaux BOUVAREL et MOUTON, M. l'Ingénieur de SÈSMAISONS, Chef de Service à Fontainebleau, ainsi que leurs collaborateurs les Ingénieurs des Travaux DURAND et GAGNON.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

Le puissant moyen d'investigation qu'offre la technique de culture des tissus végétaux a permis d'aborder par une voie nouvelle bien des problèmes particulièrement importants de la biologie des végétaux supérieurs.

C'est en s'adressant au cambium de différents végétaux que, dès 1934, R.J. GAUTHERET (54, 55, 56) avait ouvert la voie à la solution du problème de la culture des tissus végétaux. En effet, les échecs de ses prédécesseurs tenaient à ce qu'ils avaient tenté de cultiver soit des tissus différenciés, ayant perdu la faculté de proliférer, soit des méristèmes primaires qui proliféraient en reconstituant un organe dans sa totalité. Les méristèmes secondaires, au contraire, placés dans des conditions convenables, prolifèrent en donnant des masses inorganisées de tissu.

Dans le cas particulier des arbres, la possibilité de cultiver le cambium permet de se placer au centre même de tous les problèmes concernant l'édification et la structure du corps ligneux et la reproduction végétative.

Depuis plusieurs années nous avons consacré des recherches, poursuivies en partie au Laboratoire de Biologie Végétale de Fontainebleau où sont entretenues nos cultures de tissus, en partie au Laboratoire du Centre Technique du Bois, à l'étude de certains de ces problèmes: rythme d'activité du cambium, organisation et lignification des tissus néoformés, organogenèse.

I. — Rythme d'activité du cambium

L'un des problèmes fondamentaux de la physiologie végétale est l'analyse des facteurs qui déterminent, à chaque instant, l'activité des différents organes et des différents tissus d'une même plante. Même l'observation superficielle permet de constater chez les êtres vivants la succession de certains phénomènes dans un ordre déterminé. Chez les végétaux à longue durée de vie comme les arbres, beaucoup de phénomènes se répètent périodiquement d'année en année, l'activité de chaque organe ou chaque tissu étant alors un phénomène cyclique comportant une alternance de phases actives et de phases de repos.

Comme les périodes de chaque cycle coïncident avec les variations annuelles des conditions physiques du milieu : température, photopériode, hygrométrie, on peut être tenté d'attribuer à ces facteurs physiques une action directe sur chacun des phénomènes constatés. L'observation courante de beaucoup de phénomènes vitaux semble, au premier abord, justifier cette attitude d'esprit : même en présence d'eau la germination des graines d'une espèce donnée, par exemple, se produit au-dessus d'une certaine température minima. A première vue, le facteur température apparaît donc comme le facteur déterminant de la germination. Mais une analyse approfondie des faits montre que la germination est la résultante d'un enchaînement complexe de phénomènes de nature très différente : hydratation des tissus, transformation de substances de réserve sous l'action des enzymes, déclenchement de la prolifération des méristèmes, élongation cellulaire, etc... Chacun de ces phénomènes constitue l'un des stades indispensables de tout l'ensemble et l'idée s'impose alors qu'il doit exister entre eux des corrélations, indépendantes des facteurs de milieu.

Le fait que certaines graines ne sont capables de germer qu'après une période de maturation plus ou moins longue, postérieure à leur dispersion, met d'ailleurs bien en évidence l'intervention de facteurs intrinsèques, ne dépendant pas du milieu.

Il est tout naturel de penser que cette influence déterminante, que certains tissus de la plante exercent sur d'autres tissus, est due à des substances spécifiques élaborées par les premiers et qui, transportées à travers les organes, viennent agir sur les seconds. Dès 1880, et en l'absence de toute base expérimentale, SACHS (171) avait édifié une théorie fondée sur cette idée, mais ce n'est qu'en 1928, lorsque WENT (207) découvrit l'auxine, que des faits précis vinrent pour la première fois corroborer ses conceptions. Depuis cette époque, beaucoup d'autres substances élaborées par certains tissus d'une plante et exerçant une action sur d'autres tissus, ont été découvertes et les progrès des moyens d'investigation de la biochimie (chromatographie, spectrophotométrie en lumière ultraviolette et infrarouge, etc...) ont permis, dans l'étude du mécanisme d'un phénomène biologique complexe, d'isoler et d'identifier les facteurs chimiques qui interviennent, de délimiter leur rôle en même temps que celui des facteurs physiques.

La reprise d'activité du méristème cambial des arbres a fait l'objet de nombreuses recherches, mais il est peu de questions pour lesquelles l'ensemble des résultats soit aussi contradictoire.

La première étude sur la question a été publiée en 1844 par H. von MOHL (144) qui conclut à une relation entre l'accroissement et l'activité assimilatrice des feuilles.

Les très nombreuses recherches qui se sont succédé depuis celles de H. von MOHL jusqu'à l'époque contemporaine peuvent se diviser en deux grands groupes suivant qu'elles consistent seule-

ment en observations plus ou moins précises du déroulement des phénomènes chez des arbres placés dans des conditions naturelles ou que, visant à mettre en évidence des corrélations possibles entre l'activité des méristèmes secondaires et celle des méristèmes primaires, elles ont fait appel à des techniques expérimentales telles que l'ébourgeonnement, l'élagage ou l'annelation circulaire.

Dans le premier cas, les auteurs ont porté leur attention sur la date, le point de départ et le sens de propagation de la reprise d'activité du cambium. En général, pour situer ce phénomène dans le temps, ils ont pris comme origine des temps l'époque d'éclatement des bourgeons chez les arbres observés. Les résultats obtenus présentent les plus grandes divergences. Certains auteurs ont observé que la reprise d'activité du cambium commence à l'extrémité des rameaux après l'éclatement des bourgeons et progresse dans le sens basipète. Telles sont les conclusions auxquelles sont parvenus GULBE (89), WIELER (211), J.A. AMILON (2), Th. SWARBRICK (190), FRASER (49). D'autres observateurs ont constaté que le cambium reprend son activité dans les rameaux avant l'éclatement des bourgeons, ce réveil gagnant progressivement la base de l'arbre, dont le cambium peut alors être déjà en pleine activité avant que les bourgeons ne soient ouverts. Ces faits ont été notamment observés par REES (167) chez *Picea rubra*. D'autres chercheurs, tels N.J. MULLER (149), KNUDSON (124), etc... ont, au contraire, constaté que la formation du bois commence dans le tronc et gagne ensuite la cime de l'arbre. Mais beaucoup d'auteurs ont abouti à des conclusions beaucoup plus nuancées. Dès 1889, CHRISTISON (26) a signalé que chez *Quercus robur* L. la croissance en diamètre précède l'éclatement des bourgeons, alors que chez les essences à bois homogène elle lui succède. On trouve là, pour la première fois, l'indication d'une différence entre le comportement des essences feuillues à zone poreuse et les essences à structure homogène.

Une mention toute spéciale doit être réservée aux travaux de E. MER (138) qui a étudié un grand nombre d'arbres appartenant à six genres : chêne, hêtre, charme, tilleul, peuplier, sapin. Il a constaté que, chez les jeunes arbres de moins de 25 ans croissant en massif, la reprise de l'activité cambiale commence dans les pousses puis s'étend progressivement ou presque instantanément au tronc, pour gagner enfin les racines 10 ou 15 jours après, en commençant par les racines principales. Chez les jeunes arbres isolés tels que des réserves de taillis-sous-futaie, le développement commence à peu près simultanément dans les rameaux et les renflements de la tige situés à l'insertion des grosses branches. Chez les arbres âgés, normalement dégagés, il a observé un début d'activité simultané dans la région basilaire, les branches supérieures et les renflements du tronc au niveau d'insertion des grosses branches. Il existe ainsi de multiples foyers de développement à partir desquels le réveil de l'activité cambiale progresse à la fois dans le sens basipète et dans

le sens basifuge. Chez les arbres dominés à végétation languissante, notamment chez le Sapin, au contraire, la reprise de l'activité cambiale commence à la cime et progresse vers la base. WIELER, dans un second Mémoire (212), a exposé les résultats d'observations portant sur *Pinus sylvestris* L., *Picea excelsa* Link., *Abies alba* Mill., *Quercus robur* L., *Fagus sylvatica* L. et conclu à la grande amplitude des variations entre espèces et entre individus d'une même espèce. H.P. BROWN (16) a observé que chez *Pinus rigida* et *Pinus strobus* L. l'activité cambiale commence à une certaine distance de la cime, puis gagne celle-ci au bout de 19 jours. Le même fait a été constaté par KNUDSON (124) chez *Larix laricina* Kah. CHALK (20, 21) a observé que chez *Fraxinus excelsior* L. la formation du bois commence dans le tronc 2 à 3 semaines avant la foliation et que, au 26 mai, un tiers de l'accroissement annuel est déjà formé. Chez *Pseudotsuga taxifolia* la croissance en diamètre commence 12 jours avant l'éclatement des bourgeons. LODEWICK (137) a étudié *Fraxinus americana* L., *Quercus borealis* Michx., *Betula lutea* Michx., *Acer saccharum* March., *Liriodendron tulipifera* L., *Thuja occidentalis* L. Chez les feuillus à zone poreuse il a constaté, en accord avec CHRISTISON, que l'accroissement en diamètre commence avant l'éclatement des bourgeons ou en même temps, mais seulement deux à trois semaines après chez les autres essences.

J.H. PRIESTLEY, Lorna SCOTT et E. MALINS (166), après une série d'observations portant sur 36 essences, ont constaté que l'activité cambiale commence à la base des bourgeons et progresse dans le sens basipète. En ce qui concerne les conifères, ils ont observé de jeunes sujets vigoureux dans des plantations. Chez les genres *Pinus*, *Picea* et *Abies* l'activité cambiale précède l'éclatement des bourgeons. Chez *Larix*, au contraire, elle lui succède. En ce qui concerne les essences feuillues, chez *Fraxinus excelsior* L., *Quercus robur* L., *Ulmus glabra* et *Aesculus hippocastanum* L., la formation du bois commence dans les jeunes rameaux et progresse très rapidement vers la base du tronc, de sorte que le cambium est déjà actif dans cette région avant l'éclatement des bourgeons. Chez *Alnus glutinosa* et *Fagus sylvatica* la formation du bois commence dans les rameaux d'un an et progresse rapidement vers la base de l'arbre. Chez les *Rosaceae* et chez les genres *Acer*, *Salix*, *Populus*, la succession est la même mais beaucoup plus lente.

K. LADEFOGED (130) a étudié pendant deux années consécutives, 1944 et 1945, le comportement d'une vingtaine d'essences feuillues et résineuses. Il a constaté, dans l'ensemble, une progression basipète du réveil de l'activité cambiale. Chez les feuillus à zone poreuse (*Quercus*, *Fraxinus*, *Ulmus*), cette reprise d'activité est presque simultanée dans toutes les parties de la tige. Les mitoses du cambium commencent 3 à 9 jours avant l'éclatement des bourgeons. Chez les feuillus à structure homogène elles débütent à la base des bourgeons, sensiblement au moment de leur éclatement, et gagnent

la base de l'arbre en un temps qui varie de 1 à 39 jours suivant les essences, les individus et suivant l'année chez les mêmes individus. Les Conifères des genres *Picea*, *Pseudotsuga*, se sont comportés comme les feuillus à zone poreuse; *Pinus sylvestris* L. et *Larix decidua*, au contraire, comme les feuillus à bois homogène.

K.A. CHOWDURY et K.N. TANDAN (25) ont constaté que chez *Michelia Champaca* L. et *Melia azeradach* L. il s'écoule des intervalles de l'ordre de 2 à 3 mois, beaucoup plus considérables que chez les essences de la zone tempérée froide qui viennent d'être citées, entre le gonflement des bourgeons et le début de l'élongation des pousses, d'une part, et entre ce dernier phénomène et la reprise d'activité de l'assise cambiale, d'autre part.

Les recherches de MESSERI (141) à Bari et de GINDEL (76) en Israël sur *Pinus halepensis* ont montré que sous climat méditerranéen, l'activité du cambium commence très tôt (fin février-mars) et ne cesse qu'à la fin de janvier. La période de repos, dont le début succède à la formation de trachéides du bois final à section tangentiellement aplatie, est donc très brève, mais des suspensions d'activité peuvent se produire par période de grande sécheresse. Les facteurs déterminants du rythme de l'activité cambiale sont donc essentiellement ici la température et l'alimentation en eau.

Plusieurs auteurs ont, en outre, étudié ces phénomènes au point de vue anatomique. En 1912, H.P. BROWN (16) a observé chez *Pinus strobus* L. que dans le courant de mars les cellules cambiales se modifient: leur parois radiales subissent une extension qui provoque un accroissement en diamètre de l'arbre, mais que c'est seulement quelques jours avant l'éclatement des bourgeons qu'elles commencent à se diviser. Le même fait a été constaté par SWARBRICK (190) chez les arbres fruitiers dont les cellules cambiales s'accroissent dans le sens radial avant de commencer à se diviser, par KNUDSON (124) et par K. LADEFOGED chez de nombreuses essences feuillues et résineuses. COCKERMAN (27) a observé en outre chez *Acer pseudo-platanus* que, au printemps, la différenciation des tubes criblés précède de beaucoup l'éclatement des bourgeons et la formation du bois. L'influence des conditions physiques extérieures, et notamment de la température, a été prise en considération par R. HARTIG qui a constaté que la reprise d'activité est plus précoce dans les troncs d'arbres ensoleillés que dans ceux qui sont à l'ombre et qui estime que le réchauffement plus rapide de la cime de l'arbre explique que l'activité cambiale commence plus tôt dans cette partie du végétal. Cette opinion est partagée par AMILON (2). ROMELL (170) a constaté que la progression de la reprise d'activité est plus rapide chez les arbres de peuplements éclaircis. REES (167) a observé que chez *Picea rubra* la formation du bois commence en sol bien drainé environ 15 jours plus tôt qu'en sol froid et humide. IWANOFF (99), étudiant *Picea excelsa* et *Pinus sylvestris*, a constaté que la formation du bois est activée

par l'éclairement du fût. ANTEVS (3) a également souligné l'importance des conditions extérieures. LADEFOGED considère que le changement d'état du cambium se produit lorsque la température maxima diurne atteint 12-13°. MAC DOUGAL (37) a observé que chez *Pinus radiata* l'activité cambiale ne commence que si la température minimale nocturne est au moins 8°C. FOWELLS (47) a étudié le comportement de plusieurs espèces de conifères à des altitudes différentes dans la même région et a constaté un retard significatif de reprise d'activité pour chaque accroissement d'altitude de 650 m environ. Toutefois entre 1 650 et 2 000 m la différence d'altitude de 350 m suffit à entraîner un retard significatif. FRIESNER et WALDEN (53) ont observé pendant 5 années consécutives deux individus de *Pinus strobus*. Les dates extrêmes de reprise de l'activité cambiale ont été le 15 avril et le 26 mai pour l'un des arbres, le 29 avril et le 15 mai pour l'autre.

La plupart de ces constatations, et en particulier celles de FOWELLS, conduisent à la conclusion que le principal facteur externe agissant sur la reprise de l'activité du cambium est la température de l'air et du sol.

Par contre, DAUBENMIRE (30) a abouti à des résultats opposés : ayant mesuré au printemps l'augmentation de diamètre du tronc chez plusieurs essences dans des stations voisines d'altitude différente, il a constaté que la date de reprise d'activité du cambium était indépendante de l'altitude. Il en a conclu que la photopériode est le facteur essentiel du déclenchement de l'activité du cambium, mais tenant compte de la discordance entre ses observations et celles de ses prédécesseurs, il a finalement admis que la photopériode et la température ne sont pas les seuls facteurs déterminants et que d'autres causes, notamment génétiques, peuvent intervenir. Il pense, en outre, qu'il existe une interaction entre photopériode et température, l'un des facteurs ne pouvant agir que dans un certain intervalle de valeurs de l'autre.

L'ensemble des résultats de ces recherches peut soulever quelques objections. D'une part, une partie des observations est basée sur la simple mesure de l'accroissement en diamètre du tronc avec des appareils parfois très précis tels que le « Fühlhebel » de JOST. Mais on sait que les variations de la teneur en eau des tissus du cambium et du liber peuvent entraîner, en modifiant la turgescence des cellules non lignifiées, des variations sensibles du diamètre de la tige, indépendamment de toute division cellulaire. Il est donc nécessaire de suivre les modifications anatomiques des tissus étudiés en pratiquant des coupes à intervalles réguliers dans ces tissus, méthode qui n'a pas été appliquée par tous les auteurs.

D'autre part, en prenant comme origine des temps l'époque d'éclatement des bourgeons, on se réfère à un phénomène qui, chez un arbre adulte, s'étale sur plusieurs jours et on ne tient pas compte des phénomènes dont les différents tissus d'un arbre peuvent être

le siège bien avant l'ouverture des bourgeons, parfois même en plein hiver. On sait, par exemple, que chez l'érable à sucre, il se produit une transformation et une migration intense des glucides au début du mois de mars, époque à laquelle on récolte le sirop d'érable, que chez certaines essences, en particulier les chênes, la méiose a lieu dès les premiers jours de mars, etc... Les bourgeons, eux-mêmes, présentent un gonflement très sensible vers la fin de l'hiver, plusieurs semaines avant leur éclatement. Enfin, parmi les facteurs physiques, la température du sol, qui peut influer sur l'absorption de l'eau par les racelles et, par suite, sur la réhydratation du tissu cambial n'a pas, en général, été prise en considération.

En ce qui concerne le photopériodisme, WAREING, à la suite de ses expériences sur de jeunes sujets de *Pinus sylvestris* (199, 200, 201, 202, 203) et sur *Robinia pseudoacacia* en collaboration avec ROBERTS (205), a émis l'opinion (204, 206) que le photopériodisme joue un rôle déterminant dans la cessation d'activité du cambium à la fin de l'été mais non dans sa reprise d'activité au printemps.

Une autre série de recherches comporte des expériences qui ont pour but de rechercher si la reprise de l'activité cambiale dépend ou non de facteurs provenant des bourgeons ou des pousses et, en ce qui concerne les plus récentes, à déterminer la nature chimique de ces facteurs.

C'est Th. HARTIG (92) qui, le premier, a fait appel à l'expérience dans l'étude de ce problème. En pratiquant des ébranchages et des effeuillages, il est parvenu à la conclusion que l'activité cambiale est liée à l'activité assimilatrice des feuilles et a donné de ce résultat une interprétation purement trophique.

R. HARTIG (91), ayant ébranché en hiver des arbres âgés, notamment des hêtres âgés de 100 à 120 ans, a constaté que ces arbres formaient néanmoins la saison suivante un anneau de bois normal. L. JOST (121), après les avoir âprement critiquées, a répété ces expériences sur des arbres jeunes appartenant à différentes essences et trouvé que l'ébourgeonnement inhibe la formation du bois. Il a alors expliqué les résultats de HARTIG par l'action de pousses preventives ou adventives dont le développement était difficile à contrôler chez de grands arbres. Mais, plus récemment (122), il a été conduit à donner une toute autre interprétation aux faits observés par R. HARTIG et à admettre que non seulement les bourgeons mais les cellules cambiales seraient capables de faire la synthèse de l'auxine.

Jusqu'aux travaux de WENT (207), si les expériences ont pu mettre en évidence l'action de substances provenant des bourgeons ou des pousses, aucune précision sur la nature de ces substances n'avait été fournie et leur existence, déjà postulée par SACHS en 1884, restait hypothétique. En 1930, les expériences de greffe de S. SIMON (174), puis les années suivantes celles de R. SNOW (177,

178, 179) et de SNOW et B. LE FANU (180) ont fait entrer les recherches dans une nouvelle voie. L'action de l'auxine et de l'hétéroauxine a été mise en évidence chez des plantes herbacées et chez des végétaux ligneux par les auteurs précités puis par H. SÖDING (183, 184), par C. GOUWENTAK (78) et par FRASER (48) qui ont démontré l'action de l'acide β -indolyl-acétique sur la formation du bois. AVERY, BURKHOLDER et CREIGHTON (4), étudiant la distribution de l'auxine dans les branches, ont trouvé un rapport direct entre cette distribution et l'activité cambiale. GOUWENTAK a observé, en outre, en opérant sur des rameaux de *Fraxinus ornus*, qu'il est nécessaire d'activer les rameaux à l'état de repos en les exposant à des vapeurs de chlorhydrine du glycol avant de faire agir l'auxine. Il convient de rapprocher ces expériences de celles ayant permis de mettre en évidence l'action de substances naturelles, non identifiées, émanant des bourgeons.

En 1908-1909 MOLISCH (145) avait provoqué la reprise de la croissance de pousses en les baignant dans l'eau tiède. Des essais analogues ont été repris en 1945 sur le tilleul et le frêne par RICHTER et KRANOSSELSKAYA (169) et en 1946 sur le frêne par DANILOV (29). Les bourgeons dont la dormance a été levée par le bain chaud sont broyés au mortier et la pulpe obtenue est insérée sous l'écorce incisée de pousses dormantes. Après une période de 5 à 7 jours (RICHTER et KRANOSSELSKAYA) les bourgeons des pousses traitées avec le broyat de bourgeons de la même espèce commencent leur développement. DANILOV a traité des pousses dormantes de frêne avec des broyats de coléoptiles d'avoine, de bourgeons de chêne, de bourgeons de houleau. Dans tous les cas l'éclatement des bourgeons est survenu 17 à 22 jours après le traitement. Le bain chaud suivant la méthode de MOLISCH a donné les mêmes résultats. L'incision seule des pousses dormantes n'a provoqué qu'un très lent gonflement des bourgeons, l'incision suivie d'injection d'eau pure a provoqué en 25 jours le gonflement des bourgeons, mais non leur éclatement.

KÜNNING et SÖDING (128) et KÜNNING (129) ont montré que des broyats et des extraits de cambium, aussi bien dormant qu'actif, de *Tilia ulmifolia*, sont actifs sur le cambium de plants décapités de *Phaseolus multiflorus*.

Tout récemment FALLOT (43, 44) dans des essais de culture de tissu de rameaux de deux espèces de *Vitis* a montré que le cambium de segments d'entre nœuds de trois variétés de *Vitis vinifera* prélevés en hiver proliférèrent en l'absence d'auxine alors que le cambium de segments de rameaux de *Vitis rupestris* du Lot ne peut proliférer que si les explantats sont munis de bourgeons. L'action des bourgeons ne peut être remplacée par l'addition d'hétéroauxine. L'acide α -naphthylacétique n'agit qu'à des doses très élevées (10^{-4}) en provoquant des formations aberrantes.

Toutes ces expériences portaient sur des rameaux jeunes, et leurs résultats apparaissent comme notablement différents de ceux obtenus sur le tronc, en premier lieu de ceux déjà cités de R. HARTIG et plus récemment ceux de P.F. WAREING. En 1951, ce dernier a procédé à des expériences d'ébourgeonnement sur de jeunes plants d'arbres à zone poreuse: *Fraxinus excelsior* L. de 10 à 12 ans, *Quercus pedunculata* Sm. de 7 ans, semis de *Fraxinus excelsior* L., *Castanea sativa* et *Robinia pseudoacacia* L. Les bourgeons proventifs qui commençaient à se développer étaient supprimés au fur et à mesure de leur apparition. Il a observé que sur ces sujets décapités ou ébourgeonnés le cambium reprend son activité et commence à former un anneau de bois normal. Toutefois au bout de quelque temps, bien que la prolifération se poursuive, la lignification des tissus s'arrête. D'autre part, dans les branches et les rameaux la croissance cambiale est faible ou nulle chez les arbres ébourgeonnés.

La même expérience effectuée sur *Acer pseudoplatanus* L. a montré, au contraire, que l'ébourgeonnement inhibe totalement l'activité cambiale.

Ces expériences mettent en évidence une différence de comportement entre les essences à zone poreuse et une essence à pores diffus ainsi qu'une différence de comportement entre le tronc et les ramifications d'un même sujet.

WAREING (204, 206) explique ces résultats en supposant que, chez les feuillus à zone poreuse, il existerait dans le cambium des réserves d'un précurseur de l'auxine qui permettraient une reprise rapide de l'activité cambiale, se traduisant par la formation de vaisseaux de gros diamètre dans l'ensemble de l'arbre.

De son côté, JOST (122), dans sa seconde interprétation des phénomènes observés par R. HARTIG, a émis l'hypothèse que les cellules cambiales auraient la faculté de faire la synthèse de l'auxine.

Il convient, d'autre part, de citer ici les expériences inspirées par des préoccupations toutes différentes, et qui ont établi la possibilité pour un élément séparé de la tige d'un arbre (un tronc par exemple) d'épuiser complètement ses réserves d'amidon. Ces recherches avaient pour but de trouver une méthode permettant d'éliminer les réserves d'amidon des bois abattus afin de les immuniser contre les attaques des *Lyctidae*, Coléoptères dont les larves se nourrissent aux dépens de l'amidon accumulé dans les parenchymes de l'aubier. Dès 1893, MER (139, 140) avait montré que l'élimination de l'amidon du bois le met à l'abri de ces attaques, et en 1903 il avait noté que l'annélation circulaire de l'écorce immédiatement sous le houppier diminue les réserves d'amidon du tronc. S.E. WILSON (213) utilisant des disques de 1 cm d'épaisseur, découpés dans une tige de frêne et placés à 33°C en atmosphère saturée, a montré que l'aubier de ces fragments de tige avait entièrement consommé

son amidon en 5 jours. HENDERSON (96, 97) a renouvelé l'expérience sous une autre forme, en soumettant des débits industriels à des températures variables. L'optimum de température trouvé avait été 41°C. A cette température l'amidon était entièrement consommé en 16 jours, alors que vers 37°C il n'avait que partiellement disparu pendant cette même période. A 45°C les cellules sont tuées et l'amidon subsiste intégralement.

Ces auteurs n'avaient pas cherché à préciser le devenir de l'amidon consommé, problème étranger au but de leurs recherches.

L'ensemble de ces recherches, malgré l'importance des résultats obtenus, présente beaucoup de discordances et laisse subsister certains points obscurs. Il semble bien établi qu'il n'existe pas de loi générale en ce qui concerne le point de départ et le sens de propagation de la reprise de l'activité du cambium. Tantôt elle commence vers l'extrémité des rameaux et se propage dans le sens basipète, tantôt au contraire elle commence dans le tronc pour gagner ensuite la cime de l'arbre. Le premier cas semble le plus fréquent chez les essences à pores diffus, le second chez les essences à zone poreuse mais ce fait n'est pas général, le second type de processus ayant été observé chez PRIESTLEY, SCOTT et MALINS chez *Aesculus hippocastanum*, par R. HARTIG chez des individus âgés de *Fagus sylvatica*. De plus, on constate des variations entre individus d'une même essence (WIELER, KNUDSON) et chez un même individu d'une année à l'autre (LADEFOGED, FRIESNER et WALDEN, etc...). MER a mis en évidence la corrélation entre l'âge et la vigueur des arbres et le type du processus de reprise d'activité du cambium. Les expériences de décapitation ou d'ébourgeonnement faites par R. HARTIG et par WAREING ont montré que dans beaucoup de cas la reprise d'activité du cambium n'était pas tributaire de l'activité des bourgeons, ce qui a conduit WAREING à émettre l'hypothèse que le cambium disposerait de réserves d'un précurseur de l'auxine et JOST celle que le cambium posséderait la propriété de faire la synthèse de l'auxine. Les observations de WAREING sur la différence de comportement entre les rameaux et les branches d'un arbre, d'une part, et son tronc, d'autre part, montrent qu'il serait aventureux de généraliser à tout l'arbre les résultats des expériences de GOUWENTAK, de RICHTER et KRASNOSELSKAYA et de DANILOV, expériences qui portaient sur des rameaux ou des branches.

Il nous a paru que la technique des cultures de tissu, en permettant d'étudier le cambium dans des conditions rigoureusement définies, pourrait permettre de compléter les résultats déjà acquis en précisant les points suivants en ce qui concerne le cambium du tronc :

- 1° le tissu cambial se trouve-t-il, au moins pendant une partie de l'hiver, dans un état de repos exclusif de toute reprise d'acti-

tivité lorsqu'il est privé de ses liaisons normales avec la cime de l'arbre, bien que se trouvant placé dans des conditions physiques favorables et pourvu des aliments minéraux et glucidiques nécessaires?

- 2° Dans l'affirmative, cet état de repos résulte-t-il simplement d'une carence en substances de croissance du cambium et des tissus adjacents ou s'agit-il d'une véritable dormance liée à la présence d'inhibiteurs et ne pouvant être levée que par l'action de substances émises par les bourgeons?
- 3° Dans la négative, la possibilité de reprendre immédiatement son activité dès que les conditions de milieu deviennent favorables résulte-t-elle de la présence de réserves de substances de croissance dans le cambium et les tissus adjacents (hypothèse de WAREING et LADEFOGED) ou de la faculté pour ces tissus de faire la synthèse de toutes les substances et facteurs de croissance nécessaires et suffisants (hypothèse de JOST)?

II. — Organisation des tissus néoformés

Dans les conditions normales le cambium édifie un ensemble de tissus, bois et liber, caractérisés par un arrangement spécifique rigoureux (plan ligneux et plan libérien) des cellules différenciées: fibres, trachéides, vaisseaux, tubes criblés, parenchymes, cellules sécrétrices qui les constituent. Les cellules elles-mêmes présentent pour chaque essence des caractères constants: forme, dimensions, type, dimensions et disposition des ponctuations, sculpture en relief des membranes, etc...

Toutes les recherches sur les cultures de tissus, qu'elles aient porté sur des plantes herbacées ou ligneuses, montrent que les tissus néoformés *in vitro* ont, en général, une structure différente de celle des tissus normaux de l'espèce dont ils dérivent. Le plus souvent ils se présentent comme des cals formés d'un parenchyme à structure plus ou moins régulière, pouvant contenir soit des éléments disjoints d'assises génératrices qui donnent naissance à des îlots de cellules lignifiées et à des tubes criblés, soit des éléments lignifiés, isolés ou groupés en îlots, épars dans le parenchyme. Les cellules lignifiées sont généralement très différentes des cellules lignifiées normalement présentes dans les organes où les tissus ont été prélevés et appartiennent à un type très uniforme, caractéristique des tissus de transfusion, de trachéides réticulées ou simpliciponctuées.

En ce qui concerne les plantes ligneuses, les structures décrites par les auteurs se classent en deux types fondamentaux:

- 1° Dans la région immergée des explantats de *Salix caprea* L., GAUTHERET (65, 66) a observé la formation d'une couche de tissu

d'épaisseur faible et régulière, comprenant des faisceaux libéro-ligneux contigus formant une couche uniforme. Les vaisseaux sont presque normaux et, dans l'ensemble, la structure des tissus néoformés est assez proche de la structure normale.

2° Chez certaines essences, les tissus néoformés en culture, qu'il s'agisse des premiers isoléments ou des tissus repiqués, apparaissent comme des cals, constitués par un parenchyme cohérent, inorganisé, dans lequel sont répartis des éléments disjoints d'assises génératrices, souvent cyclisées, donnant naissance à des îlots de cellules lignifiées munies d'épaississements réticulés.

Souvent il se développe à la surface du cal des cellules disposées en files disjointes (pseudothalles) formant un duvet plus ou moins épais.

Des structures de ce type ont été décrites :

- par GAUTHERET (65, 66) sur la partie émergée des explantats de *Salix caprea*;
- par MOREL (147, 148) chez *Crataegus monogyna* Jacq., *Pirus communis* L. var. « Conférence », *Syringa vulgaris* L.
- par BALL (5) chez *Sequoia sempervirens* Endl.;
- par KARSTENS (123) chez *Sambucus nigra* L.;
- par BARNOUD (7) chez *Syringa vulgaris*;
- par CHARDENON et TARIS (23) chez 4 cultivars de *Populus* et chez *Salix alba*.

Sauf les tissus de la partie immergée des explantats de *Salix caprea*, tous les tissus cultivés présentent donc des structures très éloignées de la structure normale des tissus secondaires édifiés *in situ* par le cambium. Ils sont dépourvus d'organisation, sont surtout formés de cellules non lignifiées et les cellules lignifiées, peu nombreuses, qu'ils renferment, sont d'un type uniforme, très éloigné des types cellulaires spécifiques de chaque essence, et plutôt comparables aux cellules des tissus de transfusion.

Ces observations soulèvent donc la question du déterminisme de la différenciation et de l'organisation des tissus secondaires.

Dans les conditions normales le tissu cambial est soumis à des conditions mécaniques, physiques et chimiques très différentes de celles auxquelles il est soumis en culture.

Conditions mécaniques. — Sauf chez les *Tilia* le processus d'accroissement tangentiel des tissus extérieurs au cambium (liber et parenchyme cortical) comporte, sous l'effet de la tension due à l'accroissement en diamètre du corps ligneux, l'apparition de déchirures comblées ensuite par des thylls évoluant en sclérites. La tension subie par l'ensemble de ces tissus externes est donc égale à sa ten-

sion de rupture tangentielle. Soit T cette tension le long d'un segment, égal à l'unité de longueur, d'une génératrice de la surface du tronc. La pression, dirigée vers le centre de la section correspon-

dante, s'exerçant sur un élément de cambium est donc $p = \frac{T}{R}$,

R étant le rayon de la section du tronc. H. de VRIES (194) puis KRABBE (127) avaient supposé que l'augmentation de cette tension tangentielle au cours de la saison de végétation pourrait expliquer la formation successive de bois initial et de bois final dans chaque accroissement annuel, mais les recherches de ce dernier ont démontré que les pressions pouvant agir sur la forme des cellules étaient de beaucoup supérieures aux pressions résultant de la tension de l'écorce dans les conditions naturelles.

Chez les *Tilia*, l'accroissement des tissus extérieurs au cambium est assuré par la prolifération dans le sens tangentiel des cellules des rayons ligneux. Il est impossible dans ce cas d'évaluer la pression exercée, qui est probablement encore plus faible que dans le cas précédent.

Conditions physiques. — Toutes les cellules du cambium sont incluses dans des tissus riches en eau et protégées de la dessiccation par la couche de liège formant le revêtement externe de la tige.

Conditions chimiques. — Le cambium *in situ* reçoit des autres parties du végétal des substances très variées dont les unes sont les éléments de base nécessaires à sa nutrition : glucides, protides, sels minéraux, d'autres étant des substances de croissance ou d'autres facteurs connus et inconnus pouvant jouer un rôle dans la différenciation des cellules néoformées.

Un certain nombre de résultats expérimentaux ont apporté des indications importantes sur le rôle de certains facteurs chimiques ou physiques dans les processus d'organisation.

Il convient tout d'abord de rappeler les résultats fournis à cet égard par certaines des expériences d'écimage ou d'ébourgeonnement d'arbres, entreprises pour l'étude du déterminisme du rythme d'activité du cambium et déjà précédemment citées. Si R. HARTIG (91) a trouvé que les hêtres ébranchés en hiver formaient à la saison suivante une zone d'accroissement normale, JOST (121) a constaté chez *Pinus laricio* que des arbres ébourgeonnés en mars ne forment qu'un accroissement de structure anormale, constitué de parenchyme sporadiquement parsemé de trachéides aberrantes.

Plus récemment MÜNCH (150) avait obtenu des résultats analogues sur pin sylvestre et WAREING (204, 206) avait constaté, chez des arbres appartenant à diverses essences feuillues, qu'après décapitation et ébourgeonnement, le cambium commence à former une zone d'accroissement normal mais qu'ensuite, et bien que la prolifé-

ration du tissu se poursuive, il ne se forme plus de tissu lignifié. Ces derniers travaux conduisent donc à la conclusion que, contrairement aux affirmations de HARTIG, la présence des bourgeons, même si elle n'est pas nécessaire à la prolifération du cambium, est nécessaire à l'organisation des tissus.

D'autres expériences ont porté sur des tissus en culture :

Le contraste observé par GAUTHERET (66) entre la structure des tissus formés par la partie immergée et la partie émergée d'un même explantat de *Salix caprea* pouvait être interprété soit comme une action de contact du milieu aqueux, soit comme la conséquence d'une asphyxie partielle. Une nouvelle expérience où des explantats étaient placés dans des milieux liquides de telle sorte que leur partie émergée était humectée par capillarité, a montré que sur toute la surface de ces explantats, les tissus néoformés offraient les mêmes caractères que pour la partie immergée dans les premières expériences et que, par suite, c'était le contact même du milieu aqueux qui agissait sur la différenciation.

Au point de vue chimique l'action de substances définies a été démontrée :

- par GAUTHERET sur le même matériel : dans un milieu contenant de l'acide β -indolyl-acétique à 10^{-6} , non seulement la prolifération du tissu est considérablement stimulée, mais la structure des assises lignifiées néoformées devient presque identique à la structure normale du bois.

L'action de substances non identifiées élaborées par les feuilles ou les bourgeons a été démontrée :

- par CAMUS (18) sur le tissu cambial d'*Ulmus campestris* L. Des bourgeons greffés sur ce tissu induisent la formation de vaisseaux.
- chez *Syringa vulgaris* L. par WETMORE (209, 210) qui a également obtenu la formation d'un système vasculaire dans des colonies de tissu sur lesquelles étaient greffés des bourgeons de la même essence.

Nous avons cherché à comparer non seulement le comportement du cambium en situation normale dans l'arbre sain et du cambium excisé cultivé *in vitro*, qui représentent les conditions extrêmes, mais encore celui du cambium placé dans des conditions intermédiaires :

cambium situé au bord d'une blessure d'un arbre restant, par ailleurs, dans un état physiologique normal ;

cambium *in situ* soumis à l'action de substances chimiques émises par un parasite ou apparaissant à la suite de traumatismes n'entraînant pas de lésions des tissus ;

cambium de la base d'un tronc d'arbre abattu ou d'un segment de tige dont la base est immergée dans l'eau;

cambium du sujet d'un arbre greffé.

Lignification. — La lignification des membranes étant l'un des processus fondamentaux de différenciation qui aboutissent à la formation des cellules du bois, on pouvait se demander s'il s'agissait d'un phénomène purement biochimique ou s'il était intimement lié à d'autres phénomènes intervenant dans la différenciation: élongation des cellules suivant des directions privilégiées, édification d'une membrane présentant une microstructure bien définie (membrane primaire et membrane secondaire), des ponctuations et éventuellement des épaississements spirales conformes à des types spécifiques également bien définis.

Parmi la somme considérable de travaux consacrés à la lignine, la plus grande partie porte sur sa constitution chimique mais, surtout au cours des 15 dernières années, beaucoup de chimistes ont pensé que l'étude de la biosynthèse de la lignine pourrait fournir des éléments précieux pour la connaissance de cette substance. FREUDENBERG et ses collaborateurs en particulier (50, 51, 52), développant les résultats déjà obtenus en 1908 par COUSIN et HERISSEY (28), avaient montré le rôle des réactions enzymatiques dans la formation de la lignine à partir de la coniférine (50). En 1953 (110), nous avons soumis aux réactions histochimiques de la lignine des colonies de tissu cambial de *Populus tremula*, *Betula verrucosa*, *Quercus* sp. et *Castanea vesca* et constaté que les propriétés des membranes apparemment lignifiées de ces tissus différaient de celles des cellules du bois normal. Plus récemment, A. von WACEK et ses collaborateurs ont, sur notre suggestion, étudié l'action de la coniférine introduite dans le milieu de culture de tissus végétaux, d'abord sur tissu de carotte (197) puis sur tissu d'épicéa (*Picea excelsa* LK) (198). Sur les deux tissus la coniférine provoque une extension considérable de la lignification mais on doit remarquer que, dans le cas du tissu d'épicéa, cette extension de la lignification intéresse les cellules des rayons libériens qui, normalement, ne sont jamais lignifiées. Il semble donc, d'après ces expériences, que le processus de lignification serait un phénomène purement biochimique, venant compléter les phénomènes d'organisation mais indépendant d'eux. Ces recherches ont depuis lors été développées par TRAVNARD et BARNOUD (193) et BARNOUD (9). Dans le second travail cité, l'auteur, ayant cultivé des tissus de lilas et de rosier sur des milieux contenant des concentrations de coniférine ou de syringine variant de $2,5 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-3} , a observé une extension des zones de parenchyme lignifié mais « aucune influence sur le nombre de cellules ligneuses formées ». Il en conclut que ces glucosides « n'in-

terviennent donc pas dans les processus de différenciation ». Cette conclusion fournit ainsi une nouvelle preuve du caractère exclusivement biochimique de la lignification.

III. — Organogénèse

La néoformation d'organes à partir de tissus d'un organe de nature différente: émission de racines par des pousses ou des feuilles, ou de pousses par des racines, a fait l'objet de nombreux travaux. Vu son importance pratique elle avait de tout temps suscité les efforts des praticiens: agriculteurs, jardiniers ou forestiers, et il s'est peu à peu édifié au cours des âges une somme de connaissances empiriques et de recettes pratiques, fondées sur l'observation de la faculté de régénération des organes chez certaines espèces végétales, mais indépendantes de toute considération sur la nature profonde des phénomènes utilisés. Il peut même arriver qu'une technique, en apparence unique, utilise en réalité des phénomènes différents suivant les espèces végétales. La régénération des peuplements forestiers par le traitement en taillis met à profit tantôt la néoformation de bourgeons adventifs, comme c'est le cas pour le hêtre traité en taillis fureté, tantôt le développement de bourgeons proventifs, phénomène de corrélation, fondamentalement différent du précédent, comme c'est le cas pour le charme, les chênes, etc. ou simultanément les deux processus, la formation de pousses adventives pouvant coexister avec le développement de bourgeons proventifs (chênes, hêtres, etc...). De même l'émission de racines par les boutures des peupliers de la section *Algeros* résulte du développement d'ébauches de racines préexistantes alors que le bouturage de pousses des peupliers de la section *Tremula* met en jeu la néoformation de méristèmes radiculaires dans les tissus d'un cal formé à la base de la bouture.

Ces connaissances empiriques comprennent à la fois des notions générales sur les facultés naturelles de bouturage, de marcottage ou de drageonnement des diverses essences et des procédés techniques de multiplication végétative. On sait que des essences comme l'orme, le charme, l'ailanthe drageonnent abondamment, que le bouleau drageonne après abattage, que les peupliers noirs se bouturent sans difficulté alors que la plupart des essences forestières, notamment les chênes, le hêtre, le châtaignier sont rebelles au bouturage. Dans les techniques traditionnelles du bouturage et du marcottage, la nécessité de certaines conditions de milieu avait été reconnue. Ces conditions peuvent correspondre soit aux besoins physiologiques des tissus du végétal (température supérieure à un minimum donné, hygrométrie suffisante), soit à la protection contre les infections bactériennes ou fongiques, d'où l'emploi de substrats

tums filtrants (sable, terre de bruyère) évitant la stagnation de l'eau, ou acides (terre de bruyère) défavorables au développement des bactéries.

Le lent développement de ces techniques devait connaître un renouveau avec la découverte de l'auxine. Après que les travaux de LAIBACH, FISCHNICH, WENT (131, 132), etc... eurent établi l'action de l'auxine sur la rhizogenèse, il y eut une courte période pendant laquelle on put croire que ce type de substances était le facteur rhizogène spécifique, mais il apparut bientôt que si l'auxine augmentait le nombre de racines émises par des boutures d'espèces naturellement capables d'en former, elle ne pouvait induire l'apparition de racines chez les espèces qui n'en produisent jamais. On fut ainsi conduit à envisager l'hypothèse de l'existence d'autres substances qui seraient les facteurs spécifiques de l'organogenèse: rhizocalines et caulocalines et BOUILLENNE (13) montra que l'émission de racines par des hypocotyles de plantules inanitiées résultait de l'intervention de trois facteurs: rhizocaline fixe, rhizocaline mobile et enzyme.

La découverte de l'action favorable de l'auxine sur la rhizogenèse suscita néanmoins de nombreuses recherches en vue d'améliorer le bouturage des espèces ligneuses. Au début, ces recherches furent souvent entreprises avec l'illusion que l'auxine et les hétéro-auxines possédaient un pouvoir rhizogène universel, en quelque sorte miraculeux, et qu'il suffirait de les utiliser à des doses et suivant des techniques convenables pour obtenir le bouturage de toutes les espèces. Les échecs dissipèrent rapidement ces illusions et montrèrent la nécessité de reprendre dans leur ensemble, suivant des méthodes scientifiques, l'étude de problèmes qui, jusqu'alors, n'avaient guère été traités qu'empiriquement et de manière fragmentaire. Ces recherches portèrent en même temps sur l'influence des facteurs physiques (température, hygrométrie), physiologiques (âge des arbres sur lesquels étaient prélevées les boutures, époque de prélèvement des boutures, etc...) et génétiques (faculté comparée de bouturage entre individus différents d'une même espèce et de même âge).

FACTEURS PHYSIQUES.

- a) *Température*: L'ensemble des résultats a montré, comme on pouvait le prévoir, l'importance de la température et surtout de celle du sol. Le plus souvent les températures optimales pour la formation d'un cal et l'émission de racines sont comprises entre 20 et 25°C environ: GRACE (79, 86), pour le bouturage de *Picea excelsa*, maintenait la température du sol entre 21 et 25°C, STOUTMEYER, JESTER et O'ROURKE (189) ont utilisé, pour bouturer *Robinia pseudoacacia*, des températures comprises entre 20° et 26°C. De même MIROV (142) a réussi le bouturage de *Pinus*

ponderosa à des températures comprises entre 21° et 24°C. Dans certains cas, cependant, des températures nettement plus élevées sont nécessaires: 35°C pour *Betula populifolia*, *B. papyrifera*, *Acer saccharum*, *A. rubrum*, *Populus tremuloides* et *P. alba nivea* [AFANASIEV]. KOMMISSAROV (125), dans des essais de bouturage de *Pinus sylvestris*, a obtenu un pourcentage de boutures enracinées de 70 % entre 30 et 35°C, mais nul entre 20 et 25°C.

- b) *Lumière*: STOUTMEYER, CLOSE et O'ROURKE (188) ont montré qu'en général l'éclairage continu accélère l'enracinement mais que pour certaines espèces il existe une photopériode optimale.
- c) *Humidité*: Il est évident que, avant qu'apparaissent les premières racines, les possibilités d'alimentation en eau des boutures sont réduites et qu'il est nécessaire de limiter les pertes d'eau par transpiration. Tous les expérimentateurs ont eu à envisager ce problème et l'ont résolu, soit par les méthodes traditionnelles (ombrage, châssis fermés, etc...), soit en opérant en plein air sous pulvérisation d'eau réglée par minuterie (DORMAN [35, 36]).

FACTEURS BIOLOGIQUES.

a) *Infection des tissus par des microorganismes*. — Les boutures, placées en milieu chaud et humide, sont très exposées à des infections bactériennes ou fongiques. Ce problème est, dans certains cas, presque insoluble et semble être l'un des principaux écueils rencontrés pour le bouturage de certaines essences comme *P. tremula* (Dörr [34]). Le plus souvent, il a été résolu par le choix d'un milieu suffisamment drainé pour éviter la stagnation de l'eau à la base des boutures tout en maintenant une humidité suffisante. En outre l'acidité est défavorable à la pullulation des bactéries et les expérimentateurs s'accordent, en général, à préconiser un sol dont le pH soit compris entre 4,5 et 5,5 environ. C'est, semble-t-il, à la fois en raison de leurs propriétés physiques et de leur acidité que certains substrats tels que le mélange sable de rivière-sphaignes ont fourni les résultats les plus satisfaisants. Certains expérimentateurs ont essayé de combattre les infections au moyen d'antiseptiques. GRACE (82, 84, 85) notamment a utilisé des composés organo-mercuriques (phosphate ou bromure éthyl-mercurique).

b) *Facteurs génétiques*. — L'ensemble des expériences a montré que non seulement les possibilités de bouturage varient considérablement suivant les espèces végétales, mais qu'au sein d'une même espèce, il existe des variations considérables entre races et entre individus. C'est ainsi que A.G. SNOW (181) a constaté pour *P. strobus* que, toutes choses égales d'ailleurs, le pourcentage de boutures enracinées peut varier de 0 à 80 % d'un individu à l'autre. De même BOUVAREL et LEMOINE (15) ont mis en évidence des différences considérables entre clones de *Populus tremula*.

c) *Age de l'arbre*. — Tous les résultats concordent pour montrer que l'aptitude au bouturage décroît très rapidement avec l'âge de l'arbre sur lequel sont prélevées les boutures. Ce phénomène est très marqué chez les Conifères, surtout chez les Pins. DORMAN (35) n'a pu obtenir de formation de racines sur des boutures de *P. caribaea* que lorsqu'elles étaient prélevées sur des arbres âgés au maximum d'une vingtaine d'années. En ce qui concerne *Picea excelsa*, par contre, DEUBER et FARRAR (33) ont encore obtenu des taux d'enracinement de 90 % avec des boutures provenant d'épicéa de 40 ans. La même loi semble s'appliquer aux essences feuillues : KOMMISSAROV (125) a obtenu, toutes choses égales d'ailleurs, un pourcentage d'enracinement de 80 % avec des boutures de *Quercus pedunculata* prélevées sur un chêne de 3 ans, 40 % avec des boutures prélevées sur un sujet de 20 ans.

Il y a lieu de remarquer que chez les essences feuillues les rejets de souche se comportent comme des semis de même âge, fait aisément explicable s'il s'agit de rejets adventifs, mais plus inattendu en ce qui concerne les rejets proventifs, dont le méristème terminal est au moins aussi âgé que le méristème terminal de la flèche et des ramifications de la tige de l'arbre.

d) *Position des boutures dans la cime*. — Ici encore les résultats obtenus par différents chercheurs concordent : toutes choses égales d'ailleurs une pousse prélevée comme bouture a d'autant plus de chance de s'enraciner que sa position dans la cime est plus basse et l'ordre de ramification plus élevé. Cette loi a été notamment constatée par SNOW (181) pour *Pinus strobus*, par GRACE (79, 80) pour *Picea excelsa*, par EDGERTON (41) pour *Acer rubrum*.

e) *Epoque de prélèvement des boutures*. — Dans le cas des essences à feuilles persistantes les meilleurs résultats ont été obtenus :
— soit avec des boutures prélevées à la fin de la période de croissance en longueur des pousses (juin-juillet) ou tout au moins avant l'aoutement complet (août-septembre). C'est ainsi que furent bouturés *Pinus caribaea* par MITCHELL, SCHOPMEYER et DORMAN (143), *P. sylvestris* par KOMMISSAROV (125), *Picea glauca* et *P. excelsa* par FARRAR et GRACE (45, 46, 87) et GRACE (81), *Quercus suber* par KOMMISSAROV (126);
— soit avec des boutures prélevées à la fin de l'automne ou en hiver.

DEUBER et FARRAR (33) ont trouvé que pour *Picea excelsa* la meilleure période de récolte était décembre, avec un pourcentage d'enracinement de 90 %. Par contre, chez *Pinus caribaea*, MITCHELL, SCHOPMEYER et DORMAN (143) n'ont obtenu aucune émission de racines sur les boutures recueillies en hiver.

D'une manière générale, c'est le plus souvent avec les boutures non aoutées en été que le pourcentage d'enracinement est le plus

élevé. La période favorable est parfois très brève: KOMMISSAROV (op. cit.) a constaté que chez le pin sylvestre le pourcentage des boutures enracinées était nul pour les boutures récoltées le 20 juin et le 20 juillet, mais atteignait 70 % pour celles récoltées entre le 5 juillet et le 12 juillet.

En ce qui concerne les essences à feuilles caduques ce sont le plus souvent les boutures non aoûtées qui fournissent les meilleurs résultats et ici encore la période favorable peut être très brève: AFANASIEV (1) a obtenu 30 % d'enracinement avec des boutures de *Betula populifolia* prélevées les 14 et 16 juillet contre 0 % avec les boutures récoltées au début d'août; SNOW, dans des essais de bouturage d'*Acer saccharum* a obtenu le meilleur pourcentage de reprise avec des boutures prélevées le 12 juin, alors que la récolte du 7 juillet ne donnait plus qu'un pourcentage très faible et celle du 19 juillet un pourcentage nul. Pour *Acer rubrum* et *Populus alba nigra* l'époque favorable est plus tardive et se situe au début d'août [AFANASIEV (op. cit.)]. C'est au printemps que les forestiers scandinaves bouturent les drageons développés sur des tronçons de racines de *Populus tremula* (Pl. XXVI, fig. 4).

f) *Dimension des boutures.* — Les résultats obtenus par tous les expérimentateurs concordent en ce qui concerne le diamètre des boutures: les pousses grêles fournissent un pourcentage d'enracinement inférieur à celui des pousses vigoureuses, de fort diamètre.

Quant à la longueur des boutures, les expériences de DEUBER et FARRAR (33) et de GRACE (80, 82) ont montré que, en l'absence de traitement chimique, les boutures longues (10 à 20 cm) fournissent de meilleurs résultats que les courtes (5-10 cm) mais le résultat est inversé si les boutures ont été traitées par des solutions nutritives et des auxines.

g) *Type de boutures.* — Dans la plupart des cas les boutures prélevées dans la pousse de l'année, sans talon de bois de l'année précédente, ont donné les meilleurs résultats. Toutefois, dans leurs essais de bouturage de *Robinia pseudoacacia*, STOUTMEYER, JESTER et O'ROURKE (189) ont constaté que les meilleures boutures étaient celles prélevées sur les pousses de 2 ou 3 ans.

h) *Sexe de l'arbre.* — A.G. SNOW (182), à la suite de recherches sur *Acer rubrum*, avait conclu que, dans le cas d'espèces dioïques, les boutures provenant d'arbres femelles s'enracinaient moins facilement que celles provenant d'arbres mâles, mais EDGERTON (41), reprenant l'étude de la question sur la même essence, a montré que le facteur important est l'abondance de la fructification l'année précédant la récolte des boutures. Le pourcentage d'enracinement, de 50 % après une année de fructification faible, était tombé à 6 % après une année de fructification abondante.

FACTEURS CHIMIQUES.

a) *Solutions nutritives*. — Certains expérimentateurs ont fourni aux boutures des glucides (glucose ou saccharose) et des aliments minéraux (solutions de Hoagland ou de Knop). Les résultats ont été très variables, GRACE (80, 84) a constaté que la solution minérale de Hoagland augmente le pourcentage des boutures enracinées chez *Picea excelsa* mais avec *Taxus cuspidata* il n'a pas décelé d'action significative. Le même auteur a constaté que chez *Picea excelsa* une solution de saccharose à 10 % exerce une action favorable en l'absence d'auxine, mais défavorable en présence d'auxine. D'après CURTIS et CHADWICK le glucose exerce une action favorable sur les boutures non lignifiées, défavorable sur les boutures lignifiées. Un effet faible ou nul a été signalé chez *Acer rubrum* et *A. saccharum* par SNOW (182), par STOUTMEYER, JESTER et O'ROURKE chez *Robinia pseudoacacia* (189), etc...

b) *Auxine*. — Une première conclusion générale se dégage de l'ensemble des essais : si l'auxine peut permettre d'augmenter le pourcentage des boutures enracinées, le nombre et la vigueur des racines, elle n'agit que sur les essences qui, même en l'absence d'auxine, ont la faculté d'émettre des racines. Même dans ces limites, l'action favorable de l'auxine n'est pas absolument générale. DEUBER et FARRAR (33) et GRACE et THISTLE (83) ont montré que pour le bouturage de *Picea excelsa* l'action de l'acide β -indolyl-acétique est défavorable si cette auxine est utilisée en solution aqueuse, mais favorable si elle est appliquée dans du talc. STOUTMEYER, JESTER et O'ROURKE (189) ont constaté que dans le cas du bouturage de *Robinia pseudoacacia* les auxines (acides β -indolyl-acétique, β -indolylbutyrique, α -naphtylacétique, α -naphtylpropionique ou phénylacétique) inhibent la formation du cal mais que, par contre, elles favorisent l'émission de racines si elles sont appliquées à des boutures ayant déjà formé un cal. Dans cet exemple l'action des auxines est spécifiquement rhizogène.

c) *Rhizocalines*. — Si la nature chimique des rhizocalines n'a pu être déterminée, les résultats de plusieurs expériences, venant confirmer les conceptions de BOUILLENNE, montrent l'existence de facteurs naturels de rhizogenèse. WENT (208) a montré que les boutures d'*Acalypha* munies de feuilles forment de nombreuses racines, celles qui ont été effeuillées mais non ébourgeonnées en forment encore une quantité notable, celles qui sont effeuillées et ébourgeonnées n'en émettent plus aucune. J. van OVERBEEK et GREGORY (156) et van OVERBEEK, GORDON et GREGORY (157) ont mis en évidence deux facteurs nécessaires à la formation de racines et le rôle des feuilles dans l'enracinement des boutures. La variété *Hibiscus rosa sinensis* à fleurs rouges se bouture sans difficulté, mais la variété blanche « Ruth Wilcox » est rebelle au bouturage. Cette variété

a pu cependant être bouturée en traitant les boutures par une auxine et en greffant sur elles, jouant le rôle de sujet, des pousses feuillées de la variété rouge. Ces pousses agissent comme donneuses de facteurs autres que l'auxine et qu'on peut considérer comme correspondant à la définition des rhizocalines. La présence de feuilles est nécessaire: les greffons effeuillés n'induisent pas la rhizogenèse chez les sujets. De même la rhizogenèse ne se produit pas si une annelation circulaire est pratiquée au-dessous de la feuille inférieure du greffon. D'autres expériences ont montré que cette action des feuilles n'est pas liée à la photosynthèse, car elle a lieu même à l'obscurité. Ces auteurs ont, en outre, constaté qu'on peut suppléer aux facteurs émis par les feuilles en fournissant aux boutures un glucide et de l'azote, soit sous forme minérale (nitrates), soit sous forme organique (arginine, choline, etc...). Ce fait semble difficile à expliquer et paraît contradictoire avec le fait que l'action de la feuille s'exerce même à l'obscurité.

Il convient de rapprocher de ces expériences les principes du marcottage, où les racines se forment sur des zones de la tige maintenues en milieu humide. On peut penser que les facteurs de rhizogenèse provenant des feuilles se fixent dans ces zones soumises à des conditions particulières. On peut ainsi multiplier végétativement des essences comme le châtaignier dont le bouturage n'a jamais pu être réalisé (SCHAD [172]). Le marcottage de cette essence s'obtient en recouvrant de terre la souche de châtaigniers abattus. Les rejets naissant sur la souche s'enracinent au bout de deux ans. Ce phénomène est d'ailleurs fréquent chez plusieurs essences exploitées en taillis et aboutit, au bout d'un temps plus ou moins long, à « l'affranchissement » de certains rejets.

Ces techniques de marcottage semblent montrer que, chez certaines essences, les feuilles sont bien capables d'élaborer des facteurs de rhizogenèse, mais avec une vitesse très faible et qu'un très long délai est nécessaire pour que la concentration de ces substances en certaines régions de la tige atteigne le seuil d'action. Lorsqu'on tente de bouturer ces espèces, le phénomène est trop lent et les tissus sont envahis par des microorganismes et se nécrosent bien avant qu'une quantité suffisante de rhizocalines ait pu s'accumuler. La technique du marcottage après annelation circulaire, utilisée par DÖPP (34), et qui a permis à DAVID (31, 32) le bouturage du pin maritime semble s'expliquer par la fixation dans le cal qui se forme au-dessus de la zone décortiquée, des facteurs de rhizogenèse provenant des feuilles et dont la migration est artificiellement arrêtée. En même temps d'ailleurs que des rhizocalines l'annelation arrête la migration basipète des aliments organiques élaborés par les feuilles et entraîne leur accumulation dans le cal.

D'autre part à côté des calines, substances provoquant ou stimulant l'organogenèse, on doit tenir compte du rôle de substances inhibitrices. L'auxine, comme GAUTHIERET l'avait montré chez l'or-

me (59, 60, 62) est, au-dessus d'une certaine concentration, inhibitrice de la caulogénèse. LIBBERT (134, 135, 136) a par ailleurs étudié le rôle des inhibiteurs dans la formation des racines adventives.

D'une manière générale, ces recherches sur le bouturage montrent la complexité des phénomènes de rhizogénèse et, si plusieurs faits semblent contradictoires, certains résultats obtenus avec des essences différentes paraissent au contraire traduire des lois générales.

En premier lieu, il semble nécessaire que les boutures disposent de ressources suffisantes en aliments organiques et minéraux, soit que ces aliments proviennent des réserves des tissus des boutures — d'où la supériorité des boutures prélevées sur des rameaux vigoureux ou sur des arbres n'ayant pas fructifié à la saison précédente, — soit qu'ils soient fournis artificiellement comme dans les expériences de van OVERBEEK, GORDON et GREGORY (loc. cit.).

En second lieu, le déclin rapide avec l'âge de la faculté de bouturage suggère l'idée d'un vieillissement des méristèmes terminaux. Cependant le fait que les rejets proventifs, dont les méristèmes terminaux sont aussi âgés que le méristème terminal de l'axe principal, se comportent comme des tiges de semis jeunes, doit faire concevoir ce déclin non comme un véritable « vieillissement », fonction directe de l'âge, mais comme une « fatigue », fonction de l'activité de ces méristèmes depuis leur formation. Ainsi s'expliquerait que la faculté de bouturage soit d'autant plus grande que les boutures proviennent de pousses latérales d'un ordre de ramification plus élevé, l'activité de croissance terminale étant plus faible chez ces pousses. Dans le cas extrême des bourgeons dormants, dont l'allongement annuel de l'axe est égal à l'épaisseur des accroissements annuels du bois, les potentialités des méristèmes subsistent et lorsque, à la suite de l'abattage de l'arbre, ces bourgeons se développent en rejets, ceux-ci peuvent s'enraciner avec la même facilité que des tiges de jeunes semis du même âge.

Enfin les travaux de WENT précédemment cités, de van OVERBEEK, GREGORY et GORDON viennent à l'appui du concept des rhizocalines, facteurs différents de l'auxine et émanant des feuilles ou des méristèmes de la tige. L'étude de l'organogénèse chez les tissus cultivés *in vitro* offre une autre voie qui permet de déterminer les propriétés intrinsèques des tissus indépendamment des facteurs provenant des feuilles ou des bourgeons, et en éliminant des phénomènes étrangers tels que l'infection par des microorganismes.

La plus grande partie des travaux consacrés à cette question ont porté sur les tissus de végétaux herbacés: topinambour, carotte, endive: GAUTHERET (58, 61, 64), CAMUS (18), NOBÉCOURT (151, 152, 153).

Il est utile, en particulier, de noter que SKOOG (175, 176) avait mis en évidence l'action de l'adénine, du phosphate monopotassique et du ribose sur des tiges de Tabac et des segments de racines de raifort en culture.

En ce qui concerne les végétaux ligneux, GAUTHERET (59, 60, 62) avait étudié la néoformation de bourgeons sur les explantats de tissu cambial d'*Ulmus campestris*. Il avait décrit les processus de différenciation aboutissant à la néoformation de méristèmes de tiges, montré que ces méristèmes ne pouvaient se constituer que si les tissus étaient alimentés en glucides, et que le développement des bourgeons en tiges feuillées exigeait un éclaircissement adéquat tant au point de vue de l'intensité que de la composition spectrale. De plus, il avait établi l'action inhibitrice de l'acide β -indolyl-acétique qui se manifeste à partir d'une concentration de 10^{-6} pour devenir totale à 10^{-4} .

MOREL (148) avait constaté la formation de racines par le tissu repiqué de *Pirus communis*, var. Conférence, en soulignant le caractère inattendu de ce phénomène chez une essence rebelle au bouturage. Le milieu utilisé contenait de l'acide α -naphtylacétique à 10^{-6} . BALL (5) a, d'autre part, observé la formation de pousses par les tissus de *Sequoia sempervirens*. CHARDENON et TARIS ont observé la formation de racines sur les isoléments primaires de 4 cultivars de *Populus euramericana* et de *Salix alba* (22).

La formation d'organes par le tissu cambial d'arbres cultivé *in vitro* n'avait donc fait l'objet que de peu d'études. Nous avons, dans ce domaine, observé chez les différentes essences la formation d'organes par les tissus des premiers isoléments ou des tissus repiqués, et fait un certain nombre d'expériences pour comparer le cambium de la tige et des racines, étudier les variations de la caulogenèse suivant les individus et les saisons, et l'action de diverses substances.

En ce qui concerne les tissus repiqués, nous avons observé chez les tissus capables de former des bourgeons ou des racines, les variations de ces propriétés d'une souche à l'autre, l'action de diverses substances chimiques, la possibilité de transmission d'un facteur rhizogène d'une souche naturellement rhizogène à une souche non rhizogène.

DEUXIÈME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

I. — Equipement général du laboratoire Matériel de culture

L'équipement général utilisé, qui constitue le strict minimum indispensable aux recherches entreprises comprend :

- un autoclave
- une balance sensible au 1/10 mg
- un trébuchet
- un appareil à eau distillée en Pyrex
- un réchaud
- un bec Mecker de 30 mm (n° 3)
- des étuves de Roux sans dispositif d'humidification, dont l'une équipée d'un dispositif d'éclairage par tubes luminescents
- des bougies de porcelaine pour stérilisation
- un stock de verrerie courante, notamment :
 - Erlenmeyers en Pyrex de 1 à 3 l
 - Fioles jaugées (50, 100, 500 et 1 000 ml)
 - Pipettes graduées dont une série de pipettes de 1 ml graduées en 0,1 ml
 - boîtes de Petri de 90 mm
 - entonnoirs, etc...
 - scalpels, pinces dont une à branches de 20 cm, ensemenceurs à fil de platine.

Matériel de culture

Pour les cultures, nous avons utilisé des tubes en Pyrex de trois tailles différentes, savoir :

- les tubes de dimensions normalisées : $220 \times \varnothing 20$ mm
 $200 \times \varnothing 25$ mm

(Norme Française B-35.017)

- et les tubes de $175 \times \varnothing 30$ mm adoptés par R.J. GAUTHERET dans son service.

Cette dernière taille convient aux tissus à développement assez rapide (*Populus tremula*, *Prunus avium*). Pour les tissus d'autres

essences, à développement beaucoup plus lent, qui ne sont repiqués que tous les 6 à 8 mois, il y a intérêt à utiliser des tubes où le rapport du diamètre à la longueur soit aussi faible que possible afin de ralentir au maximum l'évaporation de l'eau du milieu. Avec des tubes de $200 \times \varnothing 25$ mm capuchonnés au papier d'étain, placés dans une étuve à 25° sans dispositif d'humidification, la perte d'eau en 4 mois atteint seulement $1,5 \text{ cm}^3$, soit pour un volume de milieu égal à 25 cm^3 , 5 % de ce volume.

Pour les cultures de racines isolées ou pour les colonies volumineuses, nous avons utilisé des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à large goulot.

II. — Méthodes et matériel de prélèvement

Prélèvement du cambium

Pendant la période d'avril au début de juillet les prélèvements ont été pratiqués suivant la méthode de GAUTHERET (63) soit au laboratoire, soit sur le terrain avec les quelques modifications de détail suivantes :

1° Matériel de prélèvement.

A) Sur le terrain :

Flamme. — Les réchauds de camping genre « Radius » à gaz d'essence produisent une large colonne ascendante d'air chaud qui permet d'effectuer des prélèvements dans de bonnes conditions d'asepsie. Comme nos premières recherches avaient été entreprises au lendemain de la guerre, à une période où le matériel à butane était pratiquement introuvable, nous avons essayé ce procédé de remplacement qui nous a donné toute satisfaction et que nous avons ensuite définitivement adopté.

Outillage. — Une *brosse métallique* est très utile pour nettoyer sur une large zone autour de la place de prélèvement la végétation de mousses et de lichens souvent très abondante sur les arbres à rhytidome persistant.

La *plane de tonnelier* est le meilleur outil pour attaquer le rhytidome très épais et très dur des sujets âgés de chêne ou d'orme. Robuste et commodément emmanché il permet, s'il a été bien affûté, de décaper avec beaucoup de précision ce revêtement extérieur jusqu'à la limite des tissus vivants, qui seront ensuite attaqués au scalpel. Choisir une plane d'une longueur en rapport avec le diamètre de l'arbre.

2° Mode opératoire.

Opérer de préférence de très bonne heure le matin, où l'air est plus calme et moins chargé de poussières. Choisir un arbre par-

faitement sain et vigoureux (I), ne présentant aucune blessure du tronc ni de signes de dépérissement de la cime et ne portant bien entendu aucune fructification de champignons lignicoles. La zone de prélèvement ne doit présenter aucune cicatrice d'élagage naturel, ni aucune irrégularité de surface et se trouver à une hauteur commode pour l'exécution du travail.

a) S'il s'agit d'un arbre âgé à rhytidome persistant et épais portant une flore de mousse ou de lichens, enlever cette végétation avec la brosse métallique sur une grande surface autour de la région choisie pour le prélèvement.

b) Mouiller copieusement cette surface à l'alcool et l'enflammer. Le pouvoir isolant du liège du rhytidome protège en effet les tissus vivants sous-jacents contre une élévation de température dangereuse.

c) Décaper le rhytidome à la plane sans entamer les tissus vivants mais sans laisser de tissus morts adhérents. S'il s'agit d'un arbre sans rhytidome (Hêtre ou Charme), laver la surface à l'alcool sans enflammer, puis décaper à la plane les couches externes de l'écorce, riches en scléréides, jusqu'au niveau des tissus sous-jacents moins durs, attaquables au scalpel.

d) Laver la surface décapée à l'alcool et mettre en place, au-dessous de la zone de prélèvement, le bec Mecker alimenté au butane, ou le réchaud à gaz d'essence, sur un support convenable (table pliante).

e) Après s'être lavé les mains à l'alcool et avoir mis un masque, découper avec un scalpel stérile, par des séries d'incisions horizontales et verticales dessinant un quadrillage régulier et allant en profondeur jusqu'au bois, le nombre d'explantats prévu.

f) Enlever avec un scalpel stérile en une seule passe pour toute la surface les couches externes du 1^{er} explantat en bas à droite de la zone de prélèvement. Arracher l'explantat en le saisissant par l'un de ses angles avec une pince stérile et l'introduire dans un tube de culture.

g) Poursuivre l'opération par rangées horizontales de droite à gauche et en remontant, les couches externes de chaque explantat étant chaque fois enlevées d'une seule passe de scalpel immédiatement avant le prélèvement.

(I) Les prélèvements de cambium infligent à l'arbre une mutilation incompatible avec son maintien sur pied. Sauf lorsqu'il était intéressant d'observer les phénomènes cicatriciels de l'arbre, tous nos prélèvements ont porté sur des arbres marqués en délivrance et destinés à être exploités l'hiver suivant.

Si l'air est calme la proportion des cultures contaminées peut ne pas dépasser 20 %.

B) Au Laboratoire:

On opère sur un rondin prélevé sur un arbre fraîchement abattu. Le prélèvement s'effectue suivant la saison soit suivant la méthode de GAUTHERET, avec le même mode opératoire que sur le terrain, soit suivant la méthode de GIOELLI. Cette méthode ne s'applique pas à de très gros arbres, mais elle est à recommander si le diamètre des rondins utilisés ne dépasse pas 25 à 30 centimètres. Elle élimine la plus grande part du risque de contamination par les germes de l'air et permet d'utiliser du matériel provenant de régions éloignées du laboratoire. Pour cette expédition on enduit les sections du rondin dès son tronçonnage avec du mastic à greffer ou un mastic « antifente » utilisé dans les exploitations forestières contre la formation de gerces au pied des grumes abattues. Nous avons pu, par cette méthode, recevoir de régions éloignées, notamment du Maroc, des rondins de diverses essences qui ont fourni des cultures entièrement normales.

Les rondins peuvent d'ailleurs être conservés en cas de nécessité une quinzaine de jours, à condition d'empêcher la dessiccation des tissus en plongeant la base du rondin dans l'eau ou en l'entreposant dans une cave fraîche. Toutefois chez les essences à gros vaisseaux, des microorganismes s'introduisent rapidement dans les vaisseaux et après une dizaine de jours il devient souvent impossible d'obtenir des cultures aseptiques.

Pendant la période de juillet à avril, seule la méthode de GIOELLI est applicable. On transporte au Laboratoire les rondins prélevés sur des arbres fraîchement abattus. Après avoir fait tomber à la brosse métallique les mousses et les lichens se trouvant sur l'écorce, inonder celle-ci d'alcool et l'enflammer. Le rondin est ensuite débité en rondelles de 35 à 40 mm d'épaisseur qui servent au prélèvement des explantats. Pour cette opération nous avons modifié quelques détails de la méthode GIOELLI (77).

Outillage:

- Une rondelle ou planchette de cœur de Chêne ou de toute autre essence à vaisseaux obstrués par les thylles
- Un ciseau à bois de 15 mm de largeur
- Un maillet
- Un fort couteau
- Scalpels et pinces.

Après avoir fait tomber au couteau les tissus morts de l'écorce (liège ou rhytidome suivant les essences), laver rapidement avec un tampon imbibé d'alcool, la rondelle de prélèvement. La table et la planchette de bois dur ayant été lavés à l'alcool, mouiller d'al-

cool et flamber la lame du ciseau, flamber rapidement le maillet, placer la rondelle de bois sur la planchette de bois dur et détacher avec le ciseau un explantat formé d'une mince couche de bois, du cambium et du liber. Avec un scalpel stérile faire tomber par une section tangentielle les couches externes de liber et, par deux sections transversales, deux bandes de tissus de 2 ou 3 mm de largeur aux extrémités de l'explantat de manière à éliminer les tissus sectionnés à la scie ou au couteau pendant la première phase des opérations. Introduire immédiatement l'explantat dans un tube de culture. Poursuivre le prélèvement sur toute la circonférence de la rondelle en stérilisant le ciseau et la surface de la planchette à chaque opération par lavage à l'alcool et flambage.

C) Cultures non aseptiques:

En plaçant à température convenable dans une boîte de Pétri ou un cristalliseur une rondelle ou un court billon coupé dans un tronc, une branche ou une grosse racine d'un arbre, de manière que sa base baigne dans l'eau, on peut obtenir la reprise ou le maintien d'activité du cambium suivant que le prélèvement a lieu en hiver ou en été. Cette prolifération est alimentée par les substances de réserve de l'arbre et il est inutile de fournir des glucides à ces explantats. Il suffit de changer fréquemment l'eau ou la solution minérale utilisée pour éviter les pullulations d'algues ou de bactéries (Pl. XXV, fig. 1).

III. — Milieux de culture

La composition des milieux sera précisée à propos de chacune des essences étudiées.

Les milieux gélosés ont été préparés suivant les méthodes décrites par GAUTHERET, les récipients de culture stérilisés à l'autoclave 40 minutes à 130°C, les milieux de culture 15 minutes à 115°C. Les milieux liquides contenant des substances thermolabiles étaient stérilisés par filtration sur bougie et répartis aseptiquement dans des tubes stériles, munis d'un diaphragme de papier-filtre destiné à servir de support à la colonie suivant la méthode de HELLER (93). Pour faciliter le remplissage des tubes les diaphragmes étaient préalablement percés à l'emporte-pièce de deux trous diamétralement opposés. Si le tube est tenu légèrement incliné sur la verticale pendant le remplissage, l'un des trous permet la sortie de l'air contenu sous le diaphragme pendant que le milieu s'écoule par l'autre.

Cette méthode a été utilisée pour étudier l'action soit de substances thermolabiles et hydro-solubles qui étaient alors incorporées au milieu avant filtration, soit de substances pratiquement insolubles dans l'eau dont une quantité connue, dissoute dans 0,5 ou 1 cm³

d'alcool, d'éther ou d'acétone, était déposée avec une pipette sur le diaphragme de papier après stérilisation du tube muni de son diaphragme. Après évaporation du solvant le milieu stérile était reparti suivant la méthode usuelle.

IV. — Repiquages

La technique suivie est celle mise au point et décrite par GAUTHERET. Un seul point d'importance primordiale est à souligner en ce qui concerne les tissus d'arbres :

en général ces tissus sont extrêmement sensibles aux traumatismes : pressions, froissements ou sections. Ces tissus manipulés sans ménagement sont atteints de nécroses qui gagnent rapidement la masse de l'explantat. Il faut donc éviter les chocs, les pressions excessives avec les pinces, n'utiliser que des lames minces (lames de rasoir) pour sectionner les tissus et surtout réduire au minimum les surfaces de section, qui ne prolifèrent presque jamais. La colonie à repiquer doit être divisée en fragments par le minimum de sections, sans chercher à éliminer totalement les parties nécrosées si elles sont peu étendues.

Les tissus d'*Ulmus* sont constitués par des nodules de parenchyme consistant, agglomérés par un mucilage. Ces tissus se repiquent à l'aide d'une anse de fil de platine.

Après repiquage, chez la plupart des essences, il s'écoule une période de latence plus ou moins longue avant la reprise de prolifération. Cette période peut atteindre 3 ou 4 semaines pour *Castanea vesca* et davantage encore pour *Tilia parvifolia*, *Juglans nigra*, etc... Chez ces essences, la section des tissus semble provoquer un choc qui entraîne une inhibition prolongée. Il y a donc intérêt pour la conservation des souches, à faire des repiquages aussi peu fréquents que possible. Chez beaucoup d'essences l'activité des tissus se maintient d'ailleurs très longtemps sans apparition de nécrose. Les tissus de *Castanea* ou de *Betula* notamment peuvent être conservés jusqu'à 8 mois. Suivant les essences les intervalles entre repiquage ont varié de 40 jours (*Prunus avium*) à 8 mois (*Tilia parvifolia*).

V. — Etude anatomique et cytologique des tissus

Pour l'anatomie des tissus totalement ou partiellement lignifiés, en particulier celle des explantats prélevés en hiver suivant la méthode de GIOELLI, les tissus, frais ou conservés dans le mélange eau-alcool-glycérine, ont été coupés au microtome à glissière de Reichert, vidés à l'hypochlorite et colorés par les doubles colorations bleu de méthylène - rouge de ruthénium ou bichromate de plomb vert-lumière.

Les tissus tendres ont été soit coupés à la main à l'état frais, soit inclus à la paraffine et coupés au microtome. Cette méthode

est indispensable même pour une simple étude anatomique dans le cas des tissus fragiles ou dissociés en nodules comme ceux d'*Ulmus*. Les fixateurs utilisés ont été le Bouin-Hollande modifié suivant Mascré :

— Acide picrique	4 g
— Acétate neutre de cuivre ..	2,5 g
— Formol à 40 %	10 ml
— Acide trichloracétique à 2 %	1,5 ml
— Eau distillée	100 ml

ou le Helly.

Les colorations utilisées ont été l'hématoxyline de Regaud, l'hémalum acide de Mann, combinés ou non avec le vert lumière ou la safranine.

Etude de la lignification des membranes. — Des coupes faites dans les tissus frais ont été soumises aux réactions et colorations classiques, interprétées par beaucoup d'auteurs comme caractéristiques de constituants différents du complexe lignifiant :

Constituant A.

1° Coloration au vert d'iode

2° Réaction de Cross et Bevan

Faire bouillir les coupes pendant 1 h 30 dans une solution alcaline très étendue. Laver soigneusement à l'eau.

Plonger les coupes quelques instants dans un mélange à volumes égaux de solutions décimales de ferri-cyanure de potassium et de perchlorure de fer.

Les membranes contenant le constituant A se colorent en bleu intense.

Constituant B.

Il existe six réactions caractéristiques de ce constituant. Les trois suivantes ont été couramment utilisées :

1° Phloroglucinol chlorhydrique

Traiter les coupes successivement par une solution alcoolique de phloroglucinol à 1 % puis par de l'acide chlorhydrique ($d = 1,19$), dilué de moitié.

Coloration pourpre intense.

2° Paraphénylène diamine

Traiter par une solution alcoolique à 1 % de paraphénylène diamine additionnée d'une trace d'acide chlorhydrique.

Coloration rouge orangé.

3° Indol

Dissoudre quelques cristaux dans l'eau chaude, déposer sur une lame quelques gouttes de cette solution, y placer la coupe. Essorer au papier Joseph puis déposer sur la coupe une ou deux gouttes d'acide sulfurique à 50 %.

Coloration rouge.

Constituant C.

Ce constituant, qui réagit positivement au Cross et Bevan, est caractérisé par la *réaction de Maïle*.

Traiter les coupes pendant 5 minutes par une solution de permanganate de potassium à 1 %. Laver à l'eau puis décolorer en faisant agir de l'acide chlorhydrique à 12 % pendant quelques minutes. Laver à fond à l'eau et ajouter de l'ammoniaque.

Coloration rouge.

Seul le bois des Angiospermes fournit cette réaction caractéristique, celui des Gymnospermes donne une coloration brunâtre peu nette.

Constituant D.

Réaction de R. COMBES.

Traiter les coupes pendant 30 minutes dans une solution d'acétate de plomb au bain marie bouillant. Laver et traiter par quelques gouttes d'acide sulfhydrique. Laver, sécher les coupes, les placer entre lame et lamelle et déposer sur la lame au contact du bord de la lamelle une goutte d'acide sulfurique concentré.

Coloration rouge.

La coloration apparaît au bout d'une minute et fait place ensuite à un noircissement dû à la carbonisation des membranes par l'acide sulfurique. Avec certains tissus, comme ceux des Chênes, cette carbonisation est presque instantanée et il est très difficile d'apprécier le virage au rouge.

Constituant E.

Dissoudre de l'orcinol à saturation dans l'alcool additionné d'acide chlorhydrique.

Chauffer la coupe dans l'eau bouillante et la plonger rapidement dans le réactif.

Coloration violette.

TROISIÈME PARTIE

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I

Observations générales sur les conditions de culture du tissu cambial de diverses essences

Les cultures de tissu cambial réalisées pour l'étude des trois problèmes précédemment énoncés ont fourni parallèlement pour chaque essence des indications générales sur les caractères et le comportement des tissus en culture. En vue d'améliorer et d'accélérer la prolifération de tissus à croissance lente ou sujets à des nécroses précoces, des expériences ont été tentées sur des milieux de composition différente. En particulier la recherche des conditions exigées par les tissus repiqués de chacune des essences étudiées a fait l'objet de nombreux essais. Les résultats de ces expériences sont exposés dans le présent chapitre.

A) Premiers isolements

Seront considérés ici tous les isolements pratiqués soit pendant la saison normale d'activité du cambium *in situ* (du 15 avril au début de septembre), soit pendant la période de repos. Toutefois les données concernant l'inertie des explantats prélevés en hiver trouvent leur place au Chapitre II consacré à la reprise d'activité du cambium en hiver et, en ce qui concerne cette question, seuls les résultats des prélèvements au printemps et en été sont examinés dans le présent chapitre.

Des prélèvements de tissu cambial, échelonnés sur une quinzaine d'années, ont été effectués par la méthode de GAUTHERET, sur les arbres sur pied, soit sur rondins découpés sur des arbres abattus. Ils ont porté sur 21 essences.

TABLEAU I

	Nombre de prélèvements
Salicacées:	—
<i>Populus tremula</i> L.	3
Juglandacées:	
<i>Juglans regia</i> L.	2
<i>Juglans nigra</i> L.	1
<i>Pterocarya caucasica</i> C.A. Mey.	1

Fagacées :

<i>Quercus pedunculata</i> Ehr.	5
<i>Q. sessiliflora</i> Sm.	22
<i>Q. sessiliflora</i> × <i>pedunculata</i>	7
<i>Q. pubescens</i> Willd.	1
<i>Q. suber</i> L.	3
<i>Q. rubra</i> L.	1
<i>Castanea vesca</i> Gaertn.	3
<i>Fagus sylvatica</i> L.	2

Betulacées :

<i>Betula verrucosa</i> Ehr.	1
------------------------------	---

Ulmacées :

<i>Ulmus campestris</i> L.	14
----------------------------	----

Rosacées :

<i>Prunus avium</i> L.	2
------------------------	---

Acéracées :

<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	2
-------------------------------	---

Tiliacées :

<i>Tilia parvifolia</i> Ehr.	1
------------------------------	---

Myrtacées :

<i>Eucalyptus Gumii</i> Hook.	1
-------------------------------	---

Oléacées :

<i>Fraxinus excelsior</i> L.	2
------------------------------	---

Caprifoliacées :

<i>Sambucus nigra</i> L.	1
--------------------------	---

Conifères Pinacées :

<i>Abies Nordmanniana</i> L.K.	1
--------------------------------	---

1° Les cas d'échecs des cultures.

Dans la plupart des cas les tissus mis en culture sur milieu A ou B prolifèrent plus ou moins activement, mais parfois on observe une inertie totale de tout ou partie des explantats. D'autre part, en dehors des contaminations accidentelles survenues au cours des opérations de mise en culture, on constate assez souvent le développement de microorganismes, généralement des bactéries, qui préexistaient dans les tissus de l'arbre.

Nous examinerons en premier lieu les particularités notables de ces échecs.

a) *Inertie suivie ou non de nécrose.* — Chez plusieurs essences il a été observé que dans un même prélèvement et sur un même milieu certains explantats restent inertes. Le plus souvent ces explantats se nécrosent progressivement au bout d'un délai variable, de quelques jours à 3 ou 4 semaines.

De telles nécroses ont été observées chez les essences suivantes :

Populus tremula L. — Un prélèvement du 1^{er} mai 1948 sur un arbre âgé de 15 ans comportant 74 explantats répartis en 4 séries sur milieu B pour la série témoin et sur milieu B additionné d'inositol à 2.10^{-4} et 10^{-3} , de nicotinamide à 10^{-5} ou de ces deux substances a fourni, déduction faite des explantats contaminés (10 au total pour l'ensemble) une proportion d'explantats inertes voisines de 50 % sur les milieux sans inositol, de 20 à 25 % sur les milieux contenant du méso-inositol à 2.10^{-4} et à 2.10^{-3} (1).

Un prélèvement du 5 mai 1952 sur un arbre de 30 ans, comprenant au total 100 explantats répartis sur 10 milieux différant par le glucide utilisé (glucose, saccharose et maltose) et par l'addition de méso-inositol et d'adénine, séparément ou associés, n'a fourni que 2 explantats actifs.

Par contre, dans un prélèvement du 29 mai 1949 sur un arbre de 30 ans comportant deux séries de 24 explantats prélevés respectivement sur le tronc et sur une grosse racine, 5 explantats seulement, prélevés sur le tronc, sont restés inertes. Le milieu utilisé était le milieu B pour les deux séries.

Essences riches en tannins ou autre composés phénoliques. — Lors de nos premiers essais de cultures de tissus effectués de mai à juillet 1947 nous avons observé que les explantats de *Castanea* et *Quercus* restaient, pour la plupart, inertes et se nécrosaient progressivement. Attribuant cette nécrose à une intoxication par les tannins extravasés sur les surfaces sectionnées des tissus, nous avons cherché à précipiter ces tannins en faisant séjourner les explantats quelques jours sur des milieux gélosés contenant de la caféine ou sur de l'eau de chaux stérile. Ces traitements avaient permis de diminuer considérablement la proportion d'explantats inertes. L'emploi de la caféine exige toutefois des précautions car cette substance est elle-même très toxique. La dose ne doit pas dépasser 0,2 % et la durée de séjour des explantats 4 à 5 jours (100).

A cette époque, ne disposant pas d'étuve, nous plaçons les cultures sur une table de laboratoire, où elles étaient soumises aux

(1) Ce fait pourrait s'expliquer par l'action antitoxique du méso-inositol signalée par CHARGRAFF, STEWART et MAGASANIK (24).

fluctuations de la température extérieure. A la suite d'une période froide survenue en juin, où la température n'avait pas dépassé 16° pendant plusieurs jours, les tissus s'étaient nécrosés très rapidement. Au contraire, dès la mise en service d'une étuve, où la température était réglée à 25°C, la proportion d'explantats inertes a considérablement diminué, devenant même presque nulle pour *Castanea vesca* et les chênes autres que *Q. sessiliflora*. Parallèlement, d'autres essais ont montré que l'addition de méso-inositol (de 10^{-4} à 10^{-5}) rendait les tissus plus résistants à la nécrose.

Chez *Quercus pedunculata* Ehr. sur 5 prélèvements effectués en 1947, 1948, 1949 et 1950 à des dates comprises entre le 25 mai et le 20 septembre, sur des arbres âgés de 60 à 90 ans, un seul a présenté 3 explantats inertes (28 juillet 1949, arbre de 60 ans) sur une série de 40. Il en a été de même avec les hybrides *Q. pedunculata* × *sessiliflora* (aucune nécrose dans 6 prélèvements répartis sur les années 1950, 1952, 1954 et 1955, à des dates comprises entre le 28 mai et le 5 août, à partir d'arbres âgés de 55 à 80 ans). Chez *Q. suber* (3 prélèvements) et *Q. rubra* (1 prélèvement) il n'a pas été observé d'explantats inertes.

Les résultats obtenus avec *Q. sessiliflora* Sm. ont été, par contre, moins favorables, même en maintenant la température à 25° ou davantage. Certaines séries de prélèvements ont fourni plus de 50 % d'explantats inertes. Toutefois l'addition d'inositol fait tomber ce pourcentage entre 10 et 20 %.

Sur 11 prélèvements où les explantats étaient cultivés en étuve: quatre séries cultivées sur milieu B ou B + pantothénate de Ca à 10^{-6} ont fourni respectivement 0, 0, 20 % et 45 % d'explantats actifs, l'addition de pantothénate de calcium ne manifestant d'ailleurs aucun effet sur le taux de nécrose par comparaison avec les témoins. L'influence de l'addition d'inositol a été mise en évidence dans un prélèvement fait le 25 juin 1950 sur un arbre de 180 ans qui a donné les résultats suivants:

Milieu	Pourcentage d'explantats actifs
—	—
B	50 %
B + inositol 10^{-5}	55 %
B + inositol 10^{-3}	87 %
B + inositol 10^{-3} + acide nicotinique 10^{-5}	90 %
B + vitamine B ₁ : 10^{-6} , acide pantothénique: 5.10^{-7} , biotine: 10^{-7} , inositol 10^{-3} , chlorhydrate de cystéine: 10^{-5} , acide β -indolyl-acétique: 10^{-8}	80 %

L'action favorable de l'inositol ne se manifeste pas à la concentration de 10^{-5} mais elle est très marquée à 10^{-3} .

Dans les six autres prélèvements aucun explantat inerte n'a été observé même dans les séries témoins sur milieu B.

Chez *Prunus avium* L. un prélèvement du 5 août 1957 sur une grosse racine d'un arbre de 100 ans a fourni 100 % d'explantats inertes, un prélèvement du 21 juin 1957 sur la tige d'un arbre de 15 ans 70 % d'explantats inertes sur milieu B, 80 % sur milieu B additionné d'acide β -indolyl-acétique à 10^{-6} , 50 % sur des milieux contenant de l'inositol à 10^{-3} additionné ou non d'auxine ou d'auxine et d'autres vitamines.

Chez *Ulmus campestris* (14 prélèvements) l'inertie et la nécrose d'explantats n'ont été observées que dans un cas (prélèvement du 2 juin 1952), où la proportion d'explantats inertes a atteint 25 %.

Il n'a pas été constaté de cas d'inertie et de nécrose chez *Sambucus nigra* (1 prélèvement), *Fagus sylvatica* L. (2 prélèvements), *Acer pseudoplatanus* L. (2 prélèvements), *Betula verrucosa* Gaertn. (1 prélèvement), *Tilia parvifolia* (1 prélèvement) *Eucalyptus Gunnii* (1 prélèvement), *Fraxinus excelsior* (2 prélèvements), *Abies Nordmanniana* (1 prélèvement), ni chez les Juglandacées: *Juglans regia* (2 prélèvements), *J. nigra* (1 prélèvement), *Pterocarya caucasica* (1 prélèvement).

Cette inhibition de développement s'observe donc surtout chez des essences riches en dérivés phénoliques, notamment en tannins.

Il est significatif que les tissus *Q. pedunculata*, moins riches en tannins que *Q. sessiliflora* soient beaucoup moins exposés à ces nécroses que ceux de ce dernier.

Une vérification directe de la présence d'une substance toxique dans les milieux de culture de *Q. sessiliflora* a été obtenue par les deux expériences suivantes:

Les 52 explantats d'un prélèvement de *Q. pedunculata* effectué le 4 juillet 1948 ont été divisés en trois séries cultivées sur les milieux suivants:

milieu B

milieu B + acide β -indolyl-acétique 10^{-6}

milieu B ayant servi à une culture d'explantats de *Q. sessiliflora* prélevés le 8 mai 1948 et nécrosés en totalité.

La proportion d'explantats nécrosés a été nulle pour les deux premiers milieux, égale à 90 % sur le troisième.

La même expérience sur explantats de *Sambucus nigra* a fourni les proportions suivantes d'explantats inertes:

0 sur milieu B

90 % sur milieu B ayant servi à la culture de *Q. sessiliflora*.

Seul *P. tremula* constitue une exception qui n'est peut-être qu'apparente, et s'expliquera vraisemblablement quand la nature et les propriétés des dérivés flavoniques décelés dans le bois des *Populus* seront mieux connues. La progression de la nécrose à partir des sections limitant l'explantat est marquée par le brunissement ou le noircissement progressif des tissus. On peut penser que certaines substances phénoliques en solution dans le suc vacuolaire des cellules lésées par la section des tissus s'oxydèrent au contact de l'air en formant des composés toxiques tuant les cellules intactes adjacentes. La mort de ces dernières serait suivie de la libération des composés phénoliques qu'elles contenaient et qui, après oxydation, provoqueraient à leur tour la nécrose d'une nouvelle couche de cellules. Ce mécanisme expliquerait l'action favorable de substances précipitant les tannins extravasés, qui empêchent l'amorçage de cette réaction en chaîne.

D'autre part les tissus sont d'autant plus sensibles à l'intoxication que leur activité est plus ralentie, d'où l'action favorable d'une température voisine de l'optimum. Enfin l'action favorable du méso-inositol a été observée chez *Populus tremula*, *Quercus sessiliflora* et *Prunus avium*.

b) *Contaminations*. — En dehors des contaminations accidentelles survenues pendant les opérations d'isolement, on observe assez souvent la présence d'un même microorganisme dans la majorité ou la totalité des explantats. Parmi ces microorganismes préexistants dans les tissus de l'arbre, on retrouve parfois des agents pathogènes connus. C'est ainsi que l'extension des attaques de *Ceratocystis ulmi* (Hellis et Halsted) Buisman qui suivit les années sèches et chaudes 1947 et 1949, se manifesta dans les cultures de tissu de cette essence par la présence fréquente de ce champignon. Un champignon analogue a été trouvé dans des tissus de *Q. sessiliflora* (isolement du 8 mai 1958) où il était présent dans la totalité des explantats. De telles contaminations entraînent la nécrose généralisée des tissus.

Plus fréquemment ces microorganismes sont des bactéries qui, dans les conditions et sur les milieux utilisés pour la culture des tissus, ont une activité très réduite. Elles forment à la surface du milieu un très mince voile ou une colonie crémeuse et tapissent les fissures du milieu gélosé qui se forment sous la poussée de la croissance des tissus. Cependant leur prolifération est considérablement activée si le milieu contient de l'adénine ou du lait de coco.

De telles bactéries ont été observées occasionnellement dans les tissus de la plupart des essences, mais chez certaines essences, comme le Tremble, elles étaient régulièrement présentes dans la majorité des explantats de tous les prélèvements. Chez toutes les espèces d'Eucalyptus la totalité des explantats était envahie. La faible activité de ces colonies bactériennes n'apporte aucun trouble

sensible aux tissus en culture. Il s'agit visiblement d'organismes vivant en commensaux inoffensifs dans les tissus de l'arbre.

2^e Action de diverses substances sur la prolifération des tissus.

Hormis les cas d'échec qui viennent d'être examinés, les tissus mis en culture prolifèrent plus ou moins activement. L'action d'un certain nombre de substances a été essayée sur divers tissus.

Saccharides. — Quelques essais comparés de cultures sur milieux au glucose à 2 %, au saccharose ou au maltose à 3 % n'ont mis en évidence aucune différence sensible entre les valeurs de ces saccharides comme aliments carbonés.

Auxines. — L'addition d'auxines dans les milieux utilisés aux premiers isollements a donné des résultats très différents suivant les essences.

GAUTHERET (62) avait constaté chez *Ulmus campestris* une stimulation sensible de la prolifération du tissu par l'acide β -indolyl-acétique à partir d'une concentration de 10^{-6} . A la même concentration l'acide α -naphtylacétique exerçait une action encore plus marquée.

Dans le cas d'un prélèvement pratiqué en hiver de tissu de *Q. sessiliflora* $\times$ *pedunculata* (27 février 1952) l'acide β -indolyl-acétique à 10^{-7} et 10^{-6} n'a pas stimulé l'activité du cambium mais a sensiblement activé la prolifération du parenchyme libérien.

Dans un prélèvement de tissu de *Q. pedunculata* (4 juillet 1948) l'acide β -indolyl-acétique à 10^{-6} n'a exercé aucune action. Le même résultat a été observé avec *Q. pubescens* (12 juin 1947).

Avec *Q. sessiliflora* 5 séries d'explantats ont été cultivées sur milieu B, sur milieu B additionné d'acide α -naphtyl-acétique à 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ou d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à 10^{-8} . Seul l'acide 2,4.D a provoqué une légère stimulation par rapport aux témoins. Sur l'hybride *Q. sessiliflora* $\times$ *pedunculata* les acides β -indolyl-acétique et α -naphtylacétique à 10^{-4} (essais des 25 juin 1954 et 27 juin 1955) n'ont pas stimulé la prolifération des tissus mais ont manifesté une action toxique se traduisant par une nécrose précoce.

Les tissus de *Betula verrucosa* n'ont pas réagi à l'acide β -indolyl-acétique, même à la concentration de 10^{-4} . Les tissus de *Castanea vesca* Gaertn., *Juglans regia* L., *Robinia pseudoacacia* L. se sont aussi montrés insensibles à l'action de cette auxine.

Aucune différence d'activité n'a été constatée pendant le premier mois de culture entre quatre séries d'explantats de *Fraxinus excelsior* L. mis en culture sur quatre milieux différents: milieu B sans auxine, même milieu additionné soit d'acide β -indolyl-butyrique à 10^{-5} , soit d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à 5.10^{-7} , soit simul-

tanément de ces deux substances aux mêmes concentrations respectives. Après cette première période, la prolifération des tissus cultivés sur milieu sans auxine a progressivement cessé et ces tissus ont commencé à se nécroser, alors que sur les milieux contenant des auxines le développement se poursuivait.

La même expérience portant sur *Fagus sylvatica* a fourni des résultats analogues. Dans ces deux cas il semble que les tissus placés sur un milieu sans auxine ont proliféré jusqu'à ce que leur réserve d'auxine soit devenue inférieure au seuil d'action. Mais le fait que pendant la première période d'addition d'auxine n'ait pas stimulé la croissance peut faire supposer que les réserves initiales étaient très voisines de l'optimum ou qu'un mécanisme d'équilibre chimique entre auxine et précurseur inactif maintiendrait constante la concentration d'auxine jusqu'à épuisement des réserves de précurseurs.

Vitamines. — BURKHOLDER et MAC VEIGH (17) avaient dosé 8 vitamines : aneurine, lactoflavine, adermine, acide pantothénique, inositol, nicotinamide, biotine et acide folique dans les bourgeons et les pousses d'une vingtaine d'essences, pour la plupart américaines, appartenant notamment aux genres *Quercus*, *Betula*, *Fagus*, *Ulmus*, *Acer*, *Alnus*, *Populus* (section *tremula*), *Tilia*. Chez toutes les essences ces vitamines sont présentes en hiver dans les bourgeons à des doses de l'ordre de 5 microgrammes par gramme de matière sèche pour l'aneurine et la lactoflavine, de 44 à 50 γ suivant les espèces pour l'adermine et la nicotinamide, de 500 à 2 500 γ pour l'inositol, de 3 à 15 γ pour l'acide pantothénique, de 0,5 à 2 γ pour la biotine, de 0,1 à 3 γ pour l'acide folique. La teneur en vitamines augmente en général au cours du développement des bourgeons en pousses pour atteindre 2 à 3 fois, et dans certains cas jusqu'à 5 fois, le taux initial. Pendant cette phase de la croissance la teneur en eau des tissus s'accroît et passe de 40 % environ à 80 %. Les indications données par ces chiffres conduisent à utiliser dans les milieux des concentrations de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} pour l'aneurine, la lactoflavine, l'acide pantothénique, de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} pour la nicotinamide et de l'adermine, de 10^{-4} à 10^{-3} pour le méso-inositol, de 10^{-8} à 10^{-7} pour la biotine et l'acide folique.

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus peut se résumer comme suit :

L'action de protection contre la nécrose exercée par l'inositol a déjà été signalée plus haut.

Des essais sur milieux contenant de l'aneurine à 10^{-6} , de l'acide pantothénique à $5 \cdot 10^{-7}$ ou 10^{-6} , de la biotine à 10^{-7} , de la nicotinamide à 10^{-6} , l'acide folique à 10^{-7} , la pyridoxine à 10^{-6} séparément ou en mélange, n'ont fourni aucun résultat positif chez *Juglans regia* et *J. nigra*, *Quercus sessiliflora*, *Fagus sylvatica*, *Prunus avium*. Chez *Q. suber* L. il semble que l'inositol à 10^{-3} , l'aneurine à 10^{-6} , l'acide pantothénique à 10^{-6} , qui avaient été utilisés

séparément, stimulent l'activité des assises cambiale et péridermique. Cette action positive était surtout marquée pour l'inositol. La biotine à 10^{-7} a aussi stimulé l'activité du cambium, quoique à un moindre degré, mais son action la plus notable s'est exercée sur l'assise péridermique qui a régulièrement proliféré en formant une couche uniforme de liège. Toutefois les essais faits sur cette essence, entrepris à la demande de la Station de Recherches Forestières de Rabat en vue de rechercher les moyens d'améliorer la régénération du liège, sur des échantillons provenant de la forêt de Mamora ont été considérablement perturbés par les contaminations dues à *Hypoxylon mediterraneum*, qui sévit dans cette forêt comme dans beaucoup de suberaies. Le nombre d'explantats restés sains était insuffisant pour permettre de tirer de ces expériences des conclusions statistiques valables, et d'ailleurs ces explantats sains eux-mêmes, provenant d'une tige malade, ne se trouvaient sans doute pas dans un état physiologique normal et pouvaient notamment souffrir d'une carence anormale en vitamines.

Dans l'ensemble, ces essais font donc apparaître :

- 1) en ce qui concerne les auxines — que, parmi les essences dont les tissus ont été cultivés, la plupart se montrent complètement insensibles aux acides β -indolyl-acétique, β -indolyl-butyrique, α -naphthyl-acétique et 2,4-dichlorophénoxyacétique, même à des concentrations assez fortes, supérieures aux concentrations biologiques habituelles. Chez quelques essences la prolifération du tissu est stimulée par ces auxines ;
- 2) que l'action des vitamines est le plus souvent nulle ou très faible. Seule est à noter l'action du méso-inositol qui augmente la résistance à la nécrose. Le cas du chêne-liège dont les assises génératrices ont réagi positivement à l'addition de certaines vitamines serait à étudier sur un matériel non contaminé.

Substances diverses. — En vue d'essais portant sur l'organogenèse, la lignification ou la formation de chlorophylle, certains milieux contenaient des substances définies appartenant à des familles chimiques très diverses : vanilline, isoeugénol, hydrazides, bases puriques et pyrimidiques, pyrrol, etc... Aux concentrations utilisées, comprises entre 10^{-5} et 10^{-4} , ces substances n'ont pas agi sur la prolifération des tissus. Il en est de même pour le chlorhydrate de cystéine à 10^{-5} .

Extraits naturels. — En ce qui concerne les extraits de tissus végétaux, le lait de coco n'a exercé aucune action sensible sur la prolifération du tissu cambial de *Q. pedunculata* $\times$ *sessiliflora* mais, comme l'acide β -indolyl-acétique, a stimulé celle du parenchyme libérien d'explantats prélevés soit en été, soit en hiver. De même divers extraits de tiges de tomate obtenus avec des solvants différents (éther, alcool, eau) n'ont provoqué aucune réaction importante, sauf parfois une stimulation légère.

B) Tissus repiqués

Vitesse de prolifération. — Même les tissus qui se développent le plus activement ont une vitesse moyenne de prolifération inférieure, parfois de beaucoup, à celle des tissus de plantes herbacées telles que le Topinambour, la Carotte ou la Scorsonère. En contrepartie, l'activité de la prolifération se maintient très longtemps et il est donc possible d'espacer beaucoup les repiquages. Il y a lieu de remarquer d'ailleurs que la faible valeur de la vitesse moyenne résulte en partie de la longueur du temps de latence qui s'écoule à chaque repiquage avant que se manifeste la reprise de la prolifération. Ce délai varie de 3 semaines à 1 mois pour *C. vesca* et peut atteindre 3 à 4 mois pour *T. parvifolia*.

Il en résulte que les intervalles des repiquages s'échelonnent normalement entre 3 et 8 mois, pouvant même atteindre 1 an si les pertes d'eau du milieu par évaporation peuvent être suffisamment ralenties par l'emploi de tubes assez longs par rapport à leur diamètre et convenablement capuchonnés.

Action des auxines.

Le comportement des tissus permet de les classer en quatre catégories :

- 1) Tissus capables de prolifération indéfinie sur milieux ne contenant que des aliments minéraux et un glucide.
- 2) Tissus dont la prolifération est nulle ou très faible en l'absence d'auxine mais qui peuvent être cultivés indéfiniment sur des milieux contenant une dose convenable d'auxine : acides β -indolyl-acétique, β -indolyl-butyrique, α -naphtyl-acétique ou 2,4-dichlorophénoxyacétique.
- 3) Tissus dont la prolifération indéfinie n'a pu être obtenue que sur milieu contenant du lait de coco.
- 4) Tissus insensibles aux auxines comme au lait de coco et dont la culture indéfinie n'a pu être obtenue jusqu'à présent sur aucun des milieux essayés.

1^{er} cas. — A la première catégorie appartiennent les tissus de *Castanea vesca* Gaertn. et *Betula verrucosa* Ehr. Une souche de tissu de la première essence, isolée en 1949, a été repiquée 50 fois. Une souche de *B. verrucosa* isolée le 25 juin 1954 a été repiquée 25 fois. En ce qui concerne cette dernière espèce, il faut remarquer que, au premier repiquage, une concentration très élevée d'auxine a été nécessaire pour faire reprendre la prolifération. Seuls les tissus repiqués sur des milieux contenant 10^{-5} d'acide α -naphtyl-acétique ou d'acide β -indolyl-butyrique ont proliféré. A la concentration de 10^{-6} ni ces substances, ni l'acide β -indolyl-acétique n'ont manifesté d'action. Par contre, au deuxième repiquage cette concentration s'est montrée suffisante. Au troisième repiquage (11 juin 1955), sur une série de 20

colonies repiquées sur milieu dépourvu d'auxine, 5 ont proliféré aussi activement que celles des séries repiquées sur des milieux contenant de l'acide α -naphtyl-acétique ou β -indolyl-acétique à 10^{-6} . A partir de ces 5 colonies ont été effectués depuis 8 ans 21 repiquages successifs sur milieux sans auxine. Il y a donc dans ce cas un phénomène très accentué de sensibilisation à l'auxine. Des essais quantitatifs ont montré que non seulement les tissus des deux essences peuvent proliférer sans auxine mais que, en présence de concentrations croissantes d'auxine on n'observe aucune différence par rapport aux témoins jusqu'à ce que soient atteintes les doses inhibitrices puis toxiques.

Pour *C. vesca* l'action des acides β -indolyl-acétique et α -naphtyl-acétique est nulle à 10^{-9} , mais une action inhibitrice commence à se manifester au-dessus de 10^{-7} et devient très prononcée à 10^{-6} . Elle s'est traduite, après 110 jours de culture, par une diminution de l'accroissement de masse du tissu frais égale à 60 % pour l'acide α -naphtyl-acétique, à 54 % pour l'acide β -indolyl-acétique, par rapport aux témoins sur milieu sans auxine.

Le graphique ci-dessous indique les résultats des essais de l'action de concentrations croissantes d'auxine sur ce tissu.

FIG. 1.

Action des acides β -indolyl-acétique et α -naphtyl-acétique sur les tissus repiqués de *C. vesca*.

En abscisses les concentrations, en ordonnées la masse moyenne relative des colonies par rapport aux témoins.

* — α -naphtyl-acétique

o — acide β -indolyl-acétique

Le tissu de *B. verrucosa* est moins sensible et ce n'est que pour des concentrations de l'ordre de 10^{-4} que l'action inhibitrice commence à se manifester.

Ces résultats pouvaient être dus soit à ce que ces tissus sont capables de faire la synthèse de l'acide β -indolyl-acétique à une concentration optimale ou supraoptimale, soit à ce que leur auxine naturelle est une autre substance.

En ce qui concerne *C. vesca*, 68 g de tissu frais ont été extraits à l'eau distillée (méthode de PILET). L'extrait a été chromatographié avec le solvant :

isopropanol	80 %
ammoniaque à 28 %	10 %
eau distillée	10 %

La réaction de SALKOWSKI a été négative sur tout le chromatogramme. Une tache fluorescente correspond au même Rf que l'acide β -indolyl-acétique témoin (Rf = 0,38) mais ne réagissant pas au chlorure ferrique a été éluee et le produit d'élution soumis au test de BONNER (élongation du coléoptile d'avoine (1)). Cette substance s'est révélée inhibitrice. Par contre, le produit d'élution d'une tache fluorescente de Rf 0,85 a manifesté une action positive.

Il apparaît donc que le tissu de cette essence ne contient pas d'acide β -indolyl-acétique, mais une autre auxine naturelle.

A la deuxième catégorie appartiennent les tissus de *Populus tremula* L., *Ulmus campestris* L., *Tilia parvifolia* Ehr., *Prunus avium* L. Les doses d'auxine nécessaires sont assez élevées par comparaison avec celles qui sont actives sur beaucoup de tissus de végétaux herbacés.

Pour *P. tremula* l'acide α -naphthyl-acétique à 10^{-7} n'exerce encore aucune action notable mais à 10^{-6} la prolifération est très active. Le seuil d'action est donc un peu supérieur à 10^{-7} . Il en est de même de l'acide β -indolyl-acétique, dont l'action, à dose égale, est moindre que celle du précédent. L'entretien de deux souches de cette essence, repiquées respectivement 26 et 24 fois, est assuré sur milieu à 10^{-6} d'acide α -naphthyl-acétique.

Le comportement du tissu de *P. avium*, repiqué 20 fois, est entièrement comparable à celui du tremble.

En ce qui concerne le tissu d'*U. campestris*, bien qu'il ne soit pas rigoureusement inerte en l'absence d'auxine, une concentration de 10^{-6} d'acide β -indolyl-acétique ou α -naphthyl-acétique est nécessaire pour obtenir une prolifération active. 5 souches de ces tissus ont été repiquées de 10 à 15 fois.

(1) Les essais biologiques sur ces extraits ont été effectués par Mlle PAUPARDIN dans le Service de M. le Professeur GAUTHERET.

Pour *T. parvifolia*, les seuils d'action des auxines sont encore plus élevés. A 10^{-6} l'action des acides β -indolyl-butyrique et β -indolyl-acétique est nulle, celle de l'acide α -naphthyl-acétique très faible et visiblement à peine supérieure au seuil d'action et il faut des concentrations de l'ordre de 10^{-5} pour obtenir une prolifération assez active pour permettre la conservation d'une souche.

A la troisième catégorie appartiennent les tissus d'*Eucalyptus gomphocephala*, *E. gunnii* et *E. camaldulensis*. Encore l'action du lait de coco est-elle peu intense et la prolifération des tissus reste extrêmement lente.

Enfin, les tissus de Juglandacées (*Juglans* et *Pterocarya*) de *Fraxinus*, *Quercus*, *Fagus*, *Carpinus* et de *Robinia pseudoacacia* n'ont pu être repiqués au delà de quatre ou cinq passages, même en présence de lait de coco.

Action des vitamines. — Les milieux pour repiquages utilisés dès le début de nos recherches dérivait des formules I ou II indiquées par GAUTHERET dans le *Manuel technique de culture des tissus végétaux* (63) et qui contiennent seulement de l'aneurine. En tenant compte des travaux de MOREL (146, 147), ces formules ont été complétées par l'addition d'acide pantothénique à 5.10^{-7} ou 10^{-6} et de biotine à 10^{-7} . D'autre part, en raison de l'action antinécrosante du méso-inositol observée sur les premiers isollements, cette vitamine a été incorporée aux milieux à des concentrations variant de 10^{-4} à 10^{-3} .

Quelques essais sur des milieux contenant diverses concentrations de sels minéraux, notamment avec des milieux à base de solution de HELLER (95) ont montré que les tissus d'arbres étaient très peu sensibles à ces variations de composition.

Les milieux de base adoptés pour le maintien des souches ont donc la composition suivante:

Solution de KNOP diluée de moitié

Solution de BERTHELOT modifiée suivant GAUTHERET: X gouttes par litre

Glucose 2 % (formule III) ou saccharose 3 % (formule IV)

Aneurine 10^{-6}

Pantothénate de calcium 5.10^{-7} ou 10^{-6}

Biotine 10^{-7}

Méso-inositol... 10^{-4} à 10^{-3}

Ces formules étant complétées, le cas échéant, par l'addition d'une auxine.

Des essais de culture de tissus de *P. tremula*, *B. verrucosa*, *C. vesca* sur milieux totalement privés de vitamines ont montré cependant que ces tissus peuvent proliférer sans vitamine. Pour les deux premières essences aucune différence perceptible à l'examen visuel n'a été

constatée entre les tissus cultivés sur milieu III ou IV (additionné d'auxine dans le cas de *P. tremula*) et le milieu correspondant dépourvu de vitamines.

Avec *C. vesca*, la prolifération du tissu se maintient sur milieu sans vitamines, même après 5 passages, mais cette prolifération est moins active que sur milieu III ou IV. Une détermination quantitative a donné les résultats suivants :

	Poids moyen des colonies après 208 jours	Écarts-type
Série sans vitamines —	1 318 mg	276
Série sur milieu III ..	2 018 mg	375

ces résultats sont significativement différents au seuil de 0,01.

Par contre, les tissus repiqués d'une part sur milieu sans vitamines, d'autre part sur quatre milieux contenant chacun une des combinaisons 3 à 3 des 4 vitamines du milieu de base, aux mêmes concentrations que dans ce milieu, ont montré sensiblement la même activité. Ce résultat est sensiblement différent de celui obtenu par Mlle PARIS (159, 160) sur des tissus d'Aubépine qui faisait apparaître une action positive de l'aneurine seule, mais doit être rapprochée des observations du même auteur (158) sur les tissus normaux de carotte, qui, en présence d'acide β -indolyl-acétique sont notablement stimulés par l'action synergique de l'aneurine, de la biotine et du méso-inositol alors que ces vitamines n'exercent pas séparément d'action significative.

Il apparaît donc que chacune de ces quatre vitamines est nécessaire à la prolifération du tissu de *C. vesca* mais que ce tissu peut en faire la synthèse en quantité suffisante pour assurer la prolifération sans atteindre toutefois la concentration optimale. Chacune d'elles peut alors jouer le rôle de facteur limitant.

L'action des autres vitamines a été essayée en ajoutant ces vitamines, séparément ou groupées, au milieu III.

L'acide folique, à des concentrations de 10^{-7} ou 10^{-8} réduit le temps de latence du tissu de *C. vesca* après repiquage, mais en contre-partie des nécroses se manifestent plus tôt si le tissu est maintenu longtemps en culture.

Sur le même tissu, l'acide nicotinique et l'amide nicotinique sont sans action jusqu'à la concentration de 10^{-5} où ils commencent à manifester une action inhibitrice.

La riboflavine, la pyridoxine, l'acide 4-aminobenzoïque aux concentrations de 10^{-7} et 10^{-6} n'ont exercé aucune action sur la croissance. Il en a été de même pour l'acide ascorbique jusqu'à 10^{-5} .

Les milieux complexes contenant ces 10 vitamines ont été essayés sur les tissus de *C. vesca*, *P. tremula*, *R. pseudoacacia*, *F. excelsior*,

Quercus sp., *Juglans regia*, ils n'ont pas donné de résultats différents de ceux des milieux III ou IV, sauf l'action accélératrice de l'acide folique sur la reprise de la prolifération du tissu de *C. vesca*.

Acides aminés. — Le glyco-colle à des concentrations de 10^{-6} et 10^{-5} , l'arginine à 10^{-5} , la glutamine à la même concentration ont été sans action sur les tissus de *T. parvifolia*, *F. excelsior*, *Quercus* sp. Il en a été de même pour la glutamine à 5.10^{-5} sur tissu de *J. regia* et *J. nigra*.

Des milieux complexes semblables à ceux essayés par PARIS, DUHAMET et GORIS (161) sur tissus de carotte, et contenant les dix vitamines déjà citées, une auxine et les 11 acides aminés suivants: glutamine 5.10^{-5} , arginine 10^{-4} , acide aspartique 3.10^{-5} , alanine 5.10^{-5} , cystéine 2.10^{-5} , histidine 2.10^{-5} , leucine 3.10^{-5} , lysine 3.10^{-5} , phényl-alanine 10^{-5} , sérine 10^{-5} , tyrosine 3.10^{-5} n'ont pas activé la prolifération des tissus de *J. regia*, *T. parvifolia*, *R. pseudoacacia*. D'autre part, la tyrosine à la concentration de 10^{-5} , associée à l'acide β -indolyl-acétique ou à l'acide α -naphthyl-acétique a été essayée sur tissus de *Quercus* et de *C. vesca*. Aucune action n'a été observée.

Glutathion. — Aucune action à la concentration de 10^{-5} sur tissu de *T. parvifolia*.

Bases puriques et pyrimidiques. — L'adénine, seule ou accompagnée d'autres bases: guanine, uracile, thymine, cytosine, a été introduite dans divers milieux en présence de vitamines ou d'autres substances en vue d'étudier leur action sur l'organogenèse (cf. Chap. IV). En aucun cas ces substances à des concentrations variant de 10^{-5} à 5.10^{-4} n'ont exercé d'action sur la croissance des tissus de *C. vesca*, *B. verrucosa*, *P. tremula*, *Quercus* sp., *R. pseudoacacia*, *P. avium*, *U. campestris*.

La cinétine a été essayée à la concentration de 10^{-5} soit en absence, soit en présence d'auxine (acide α -naphthyl-acétique à 10^{-6}) sur tissus de *Quercus* sp., *F. excelsior*, *E. gomphocephala* et *E. cladocalyx*, et, à la même concentration, soit en présence de 2,4-D à 10^{-8} , soit en l'absence d'auxine, sur tissus de *C. vesca* et *B. verrucosa*. Dans aucun cas il n'a été décelé d'action de cette base.

Gibberelline. — Les essais n'ont pu être effectués qu'au moyen d'un produit impur à 10 % de gibberelline. A la concentration de 10^{-5} ce produit, incorporé dans le milieu III, en absence comme en présence d'auxine (acide α -naphthyl-acétique 10^{-6}), n'a pas agi sur la croissance des tissus de *P. avium*, *J. sieboldiana* et *J. nigra*, *T. parvifolia*, *U. campestris*. Il y a lieu toutefois de signaler que sur le tissu de *C. vesca* la substance introduite sur milieu sans auxine a provoqué un enrichissement très net en chlorophylle, mais

seule une répétition des essais avec un produit pur permettrait de déterminer si cette action est due à la gibberelline ou à l'une des impuretés qui l'accompagnaient.

Acide traumatique. — BONNER et ENGLISH (12), ENGLISH, BONNER et HAAGEN SMIT (42) avaient montré l'action de l'acide traumatique sur la prolifération des cellules de la gousse de haricot. Les essais sur tissu cambial de *P. tremula*, *C. vesca* et *R. pseudoacacia* n'ont fourni que des résultats négatifs.

Substances cancérigènes. — Le 20-méthylcholanthrène, le 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène, le 2-acétylaminoanthracène n'ont pas agi sur la prolifération du tissu cambial de *C. vesca* (voir Chap. III).

Cependant, étant donné l'insolubilité dans l'eau de ces substances, il n'est pas sûr que, même en opérant suivant la technique décrite précédemment (voir II^e partie), les tissus reposant sur les diaphragmes de papier-filtre, préalablement imprégnés avec une solution de ces corps dans un solvant approprié, aient pu réellement en absorber des quantités suffisantes.

Diéthylthiocarbamate de sodium. — Comme la tyrosine, cette substance a été utilisée comme inhibiteur de phénoloxydase pour éviter la destruction de l'auxine par oxydation (REINERT et WHITE [168]).

Cette substance a été ajoutée à la concentration de 10^{-4} à des milieux contenant de l'acide α -naphtyl-acétique à 10^{-6} ou de l'acide β -indolyl-butyrique à 10^{-5} et 10^{-4} utilisés pour le repiquage de tissus de *P. avium*, *T. parvifolia*, *P. tremula* et *Quercus* sp. Dans aucun cas il n'a été observé de différence avec les cultures témoins.

Incorporé à la même concentration dans le milieu sans auxine (milieu III) utilisé pour la culture de tissu de *C. vesca*, le diéthylthiocarbamate de sodium a exercé une action inhibitrice sensible et même provoqué des nécroses.

1-3 Diphénylurée. — SHANTZ et STEWARD avaient reconnu l'existence de cette substance dans le lait de coco (173) et constaté qu'elle exerce une légère action stimulante sur la croissance du tissu de carotte (186). Cette action est beaucoup plus intense en présence d'hydrolysate de caséine. Sur tissu de pomme de terre la diphénylurée n'agit qu'en présence d'hydrolysate de caséine.

Sur tissus de *Quercus* sp., *C. vesca*, *T. parvifolia*, cette substance, utilisée à la concentration de 10^{-5} , n'a manifesté aucune action.

Produits et extraits naturels de composition inconnue.

Le lait de coco a été utilisé à des concentrations variant de 15 à 36 %, en présence ou en l'absence d'auxine.

Sur tissu de *C. vesca* aucune action n'a été observée. Il en a été de même avec les tissus de *Quercus* sp. en présence d'acide α -naph-

tyl-acétique à 10^{-7} ou en l'absence d'auxine, résultat déjà constaté par BARNOUD (8) avec *Q. sessiliflora*. Ces résultats sont à rapprocher des observations de DUHAMET (39) sur les tissus d'Aubépine et de Saule.

Par contre, les tissus de *J. regia*, de *R. pseudoacacia*, d'*Eucalyptus gomphocephala*, *E. gunnii* et *E. camaldulensis* ont réagi positivement même sans addition d'auxine, alors que la prolifération des témoins, même sur divers milieux complexes contenant une auxine, diverses vitamines et des acides aminés était sensiblement nulle. C'est seulement sur milieux contenant du lait de coco qu'il a été possible de maintenir en culture les tissus de ces *Eucalyptus*. La prolifération reste cependant très lente.

Divers extraits de tige de tomate n'ont pas eu d'action sur la croissance des tissus de *C. vesca* (v. chap. IV).

Il en a été de même avec des extraits de racine d'orme.

Cultures associées de tissus d'essences différentes. — DUHAMET (38, 40) a montré que le tissu de Ronce favorise la croissance des tissus de Scorsonère et qu'un extrait de tissu de Ronce stimulait la prolifération du tissu de carotte, mais inhibait celle du tissu d'Aubépine. Nous avons entrepris quelques expériences analogues sur des tissus d'arbres.

Certains tissus exercent une action nécosante rapide sur les tissus d'autres essences placés à leur contact. C'est le cas du tissu d'*U. campestris* vis-à-vis du tissu de *C. vesca*.

D'autres tissus sont indifférents, comme ceux de *P. tremula* et de *C. vesca* cultivés ensemble.

Le tissu de *C. vesca* stimule légèrement celui de *Quercus* mais sans induire une prolifération assez active pour permettre la culture indéfinie de ce dernier. Il en est de même du tissu de *B. verrucosa* à l'égard des tissus de *J. regia* et *J. nigra*.

Les tissus de *C. vesca* et *B. verrucosa*, l'un et l'autre autotrophes quant à l'auxine, se soudent l'un à l'autre mais sans activation réciproque de leur croissance.

Il apparaît ainsi, à la suite des essais de repiquage de tissu de plus de quinze essences que la culture indéfinie n'a pu être réalisée que pour neuf d'entre elles dont six sur milieux de composition définie et trois sur milieu au lait de coco. La possibilité de culture *in vitro* ne semble pas directement liée à la position systématique des différentes espèces. Si, en ce qui concerne les Salicacées, les travaux de GAUTHERET sur *Salix caprea*, les résultats obtenus par BARNOUD et nous-mêmes sur *Populus tremula*, par CHARDENON et TARIS (22, 23) sur des cultivars différents de *P. euramericana*, peuvent permettre de penser qu'il est possible de cultiver les tissus des arbres de cette famille, les tissus des Fagales ont fourni des résultats très discordants et moins favorables. Alors que les tissus de

Betula verrucosa et *Castanea vesca* sont faciles à cultiver sans apport d'auxines ni de vitamines, les tissus de *Fagus sylvatica* n'ont pu être maintenus en culture et les essais répétés sur tissu de *Quercus sessiliflora*, de *Q. pedunculata* et d'hybrides de ces deux espèces entre elles ou avec *Q. pubescens*, ont abouti à des échecs, à l'exception du résultat publié par BARNOUD sur *Q. sessiliflora*. Il en a été de même avec *Carpinus betulus*.

Il n'existe pas non plus de relation entre la facilité de culture ou l'activité de prolifération du tissu *in vitro* et la rapidité de croissance en diamètre de l'essence dans les conditions naturelles. Le cas le plus frappant est celui des *Eucalyptus*, arbres dont la vitesse de croissance est remarquable et dont il n'a pourtant été possible de maintenir la prolifération du tissu cambial *in vitro* que pour trois espèces et en ayant recours au lait de coco. Il reste donc à explorer un vaste domaine en ce qui concerne les facteurs chimiques nécessaires à l'activité du cambium d'un grand nombre d'espèces forestières.

CHAPITRE II

Reprise d'activité du tissu cambial en hiver

TABLEAUX DES ESSAIS DE CULTURE DE CAMBIUM
PRÉLEVÉ EN HIVER

Dans les tableaux qui suivent, les prélèvements ont été pratiqués suivant la méthode de GIOELLI modifiée telle qu'elle est décrite au chapitre II (Matériel et méthodes).

Les milieux sont désignés par des lettres conformément au type de nomenclature adopté par GAUTHERET (63), savoir :

A : Solution de Knop diluée de moitié - Saccharose 3 % Gélrose q.s. (1)

B : Solution de Knop diluée de moitié - Glucose 2 %

I — Solution de Knopp diluée de moitié + solution oligodynamique de BERTHELOT modifiée suivant GAUTHERET : Saccharose 3 % - Aneurine 10^{-6} - Acide β -indolyl-acétique 10^{-6} .

II — Même composition que I, le saccharose étant remplacé par le glucose à 2 %.

Les abréviations ou symboles suivants sont utilisés pour les substances de croissance ou les vitamines.

I β : acide β -indolyl-acétique — α -N : acide α -naphtyl-acétique — 2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique — B₁ : aneurine (= thiamine) — B₂ : lactoflavine (= riboflavine) — Pa : acide pantothénique — B₆ : adermine (= pyridoxine) — Ino : méso-inositol — H : biotine — Ni : acide nicotinique — B_c : acide folique — PP : amide nicotinique.

(1) Avec l'agar en branche la dose de gélose est de 1,3 %. Nous utilisons depuis quelques années de l'agar en poudre avec lequel la dose de 0,7 % est suffisante pour obtenir la consistance voulue du milieu.

Substances diverses: Ad: adénine — Cy: chlorhydrate de cystéine — van: vanilline.

Extraits végétaux: Co: lait de coco.

TABLEAU II
Genre *Populus*

Nature et Age de l'arbre (1)	Lieu de prélèvement - Forêt de :	Date de prélèvement	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
				Mis en culture	Contaminées	Inertes ou non-croisées	Actifs	
T 35	Villefermev	5-2-49	<u>Populus tremula L.</u>					
			B	10	1	2	7	
			B + pa 10^{-6}	10	1	1	8	
			II + pa. 5.10^{-7}	10	3	1	6	
T 6	Barbeau	7-11-49	B	20	2	2	16	
T 22	Villefermev	12-11-49	B	20	0	20	0	Développement presque nul, limité à la surface libérienne.
T 22	id.	4-12-49	B	20	3	3	14	(même cèpe que le brin précédent.
T 22	id.	4-1-50	B	20	0	6	14	Développement faible
T 35	Villefermev	13-2-55	B	10	0	0	10	
			B + a N 10^{-6}	10	0	0	10	
			B + I 10^{-6}	10	0	0	10	
F 45	Valloire	1-11-56	B	20	0	0	20	
			B + I 10^{-7}	20	0	0	20	)prélèvement après séj. dans l'eau.
			B	15	0	0	15	
F 30	Ristolas (Htes Alpes)	13-10-57	B	20	3	1	16	
			B + I 10^{-7}	20	7	2	11	
F 30	Dierre-la-Croix (I. & L.)	10-10-60	<u>Populus x euramericana</u> cv. régénéré de Tournaine					
			A + pa 5.10^{-7}	20	0	0	20	

(1) T: brin de taillis.

F: tige de futaie.

TABLEAU III
Juglans regia L.

Nature et Age de l'arbre	Lieu de prélèvement Forêt de :	Date de prélèvement	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
				Mis en culture	Contaminés	Inertes ou nécrosés	Actifs	
	Plantation région de Grenoble	7-3-1998	B B + I 10^{-6} B + α 10^{-6}	20 20	5 4	0 0	15 16	prolifération égale-ment active dans les 3 séries.
	id.	14-3-1999	B + Sol Berth $X_2/1$ B_1 : 10^{-6} , Pa 5.10^{-7} , H: 10^{-7} Ino: 5.10^{-4} en présence de tissu de <i>Betula verrucosa</i> . Même milieu sans Pa + Ad 2.10^{-5} en présence de <i>B. verrucosa</i> .	10 10	2 1	0 0	8 9	Développement très actif du cambium

TABLEAU IV
Castanea vesca Gaertn.

Nature et Age de l'arbre	Lieu de prélèvement Forêt de :	Date de prélèvement	Milieu de culture	Nombre d'explantats			
				Mis en culture	Contaminés	Inertes ou nécrosés	Actifs
F 80	Fontainebleau	10-2-49	B	10	0	1	9
			B + pa 10^{-6}	10	0	0	10
			II + pa 5.10^{-7}	10	1	3	6
			B + B_6 $1,25.10^{-4}$				(1)
F 80	Fontainebleau	2-11-49	B	20	2	4	14
F 80		8-12-49	B	20	1	2	18
F 80	id.	14- 1-50	B	10	0	0	10
			B + ni 5.10^{-4}	10	2	2	6
			B + Ino 5.10^{-4}	10	2	1	7
			B + Ino 5.10^{-4} ,	10	2	2	6
			+ ni: 5.10^{-4} }				

Observations:

(1) Formation d'un bourrelet cambial et léger développement libérien. Après passage sur milieu à la caféine, 0,4 %.

TABLEAU VI
Fagus sylvatica L.

Nature et Age de l'arbre	Lieu & Date de prélèvement	Milieu de culture	Nombre d'explantats			
			Mis en culture	Contaminés	Inertes ou nécrosés	Actifs
F 50	Fontainebleau 15-4-50	B	20	0	0	20 (1)
F 60	Fontainebleau 25-1-51	B	20	0	20	0 (2)
F 20	Fontainebleau 12-11-51	B	10	0	0	10
		B + Pa $5 \cdot 10^{-7}$	10	0	0	10
		B + I β 10^{-7}	10	0	0	10
		B + I β 10^{-6}	10	0	0	10 (3)
F 50	Fontainebleau 13-11-58	B	20	0	3	17

Observations :

- (1) Prolifération active.
- (2) Inertie totale des explantats.
- (3) Prolifération du tissu cambial, qui forme un bourrelet périphérique, et du parenchyme libérien. Légère action positive du pantothénate de calcium et de l'acide β -indolyl-acétique.

TABLEAU VII
Carpinus betulus L.

Nature & Age de l'arbre	Lieu et date de prélèvement	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
			Mis en culture	Contaminés	Inertes ou nécrosés	Actifs	
50 F	Fontainebleau 25.1.51	B	20	0	0	20	prolifération très faible
F 50	Fontainebleau 3.12.52	B + B ₁ 10^{-6} , H 10^{-7} } Ino $5 \cdot 10^{-4}$	10	0	0	10	prolifération assez faible
		B + B ₁ 10^{-6} + Pa $5 \cdot 10^{-7}$ { + H 10^{-7}	10	0	0	10	prolifération faible
		B + Pa $5 \cdot 10^{-7}$ + H 10^{-7} { + Ino $5 \cdot 10^{-4}$	10	0	0	10	prolif. très faible
		B + B ₁ 10^{-6} , Pa $5 \cdot 10^{-7}$,) Ino. $5 \cdot 10^{-4}$	10	0	0	10	" assez faible
		B + B ₁ 10^{-6} , Pa $5 \cdot 10^{-7}$,) Ino. $5 \cdot 10^{-4}$, H : 10^{-7}	10	0	0	10	" assez active

TABLEAU VIII
Betula verrucosa Ehr.

Nature & Age de l'arbre	Lieu et Date de prélèvement	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
			Mis en culture	Contaminés	Inertes ou nécrosés	Actifs	
F 35	Fontainebleau 6-1-50	B	20	0	0	20	prolifération active
F 45	Fontainebleau 20-10-50	B	10	3	7	0	
		B + Ino. 10^{-3}	10	3	6	1	
		B + I & 10^{-4}	10	1	9	0	

TABLEAU IX
Ulmus campestris L.

Nature et Age de l'arbre	Lieu de prélèvement	Date	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
				Mis en culture	Contaminés	Inertes ou nécrosés	Actifs	
F 120	Fontainebleau	12.2.49	B B + Pa 10^{-6}	10 10	1 0	0 0	9 10	
F 120	Id.	1.3.49	B	12	0	0	12	
T 33	Malvoisine	9.11.49	B	20	3	0	17	brins de taillis successivement abattus sur une même cœpée.
33	Id.	3.12.49	B (B + Ino. 5.10^{-5})	12 8	1 0	0 0	11 8	
33	Id.	3.1.50	B	20	2	0	18	
33	Id.	6.2.50	B	20	1	0	19	
33	Id.	20.3.50	B	20	1	0	19	
T 30	Id.	16.11.50	B	20	8	0	12	brins de taillis d'une même cœpée
30	Id.	16.12.50	B	10	0	0	10	
30	Id.	5.10.51	B	20	0	0	20	
30	Id.	4.1.52	B	10	0	0	10	
F 50	Villefernoy	13.1.52	B	10	0	0	10	cambium déjà en activité. Prélèvement effectué suivant la méthode de GAUTHIER.
50	Fontainebleau	4.3.59	B	20	0	0	20	
			B + Pa 2.10^{-6}	20	0	0	20	
T 35	Villefernoy	27.2.59	B B + Pa 2.10^{-6}	20 20	0 0	0 0	20 20	

TABLEAU X

Robinia pseudoacacia L.

Age de l'arbre	Lieu de prélèvement Forêt de	Date	Tige de futaie F ou brin de taillis	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
					Nis en cultu- re	Conta- minés	Iner- tes	Ac- tifs	
60	Fontainebleau	10-3-51	F	B	20	0	0	20	Développement actif id. Aucune action de l'acide indol β acétique.
20	id.	31-10-57	F	B	19	0	0	19	
				B + I β 10 ⁻⁵	15	0	0	15	

TABLEAU XI

Tilia parvifolia Ehr.

30	Villefermoy	3-2-51	T	A	20	0	0	0	20	Dévelop ^t très actif.
32	id.	13-2-53	T	B	11	0	0	0	11	Dévelop ^t actif.
				B + van. 10^{-4}	12	0	0	0	12	Légère activation par l'acide α -naphtylacétique
				B + α N 10^{-6}	10	0	0	0	10	
				B + I β 10^{-6}	10	0	0	0	10	
30	id.	28-2-60	T	A + Fa 5. 10^{-7}	20	0	0	0	20	Dévelop ^t lent.

TABLEAU XII

Eucalyptus tereticornis Sm. clone EU 136

3	Station de Recherches Rabet	15-11-59	F	B	18	0	0	18	Dévelop ^t assez actif.
					<u>E. cladocalyx</u> F. r. m. Clone EU 168				
3	id.	15-11-59	F	B	18	0	0	18	Dévelop ^t assez actif
					<u>E. camphocéphala</u> A. D. C.				
3	id.	15-11-59	F	B	18	0	0	18	id.
					<u>E. camaldulensis</u> Dehn. Clone EU 21				
3	id.	15-11-59	F	B	18	0	0	18	id.
					<u>E. camaldulensis</u> Clone EU 23				
3	id.	15-11-59	F	B	18	0	0	18	id.

TABLEAU XIII

Fraxinus excelsior L.

Age de l'arbre	Lieu de prélèvement Forêt de:	Date	Tige de futaie "F" ou brin de taillis "T"	Milieu de culture	Nombre d'explantats				Observations
					Mis en culture	Contaminés	Inertes	Actifs	
35	Villeferme	22-1-56	F	B	10	0	0	10	{ Dévelop ^t assez actif { Bourrelet cambial et { légère prolifération { du liber.
				B + Pa 10^{-6}	10	0	0	10	
				B + pyrrol 10^{-4}	10	0	0	10	
				B + Inc. 10^{-3}	10	0	0	10	
									Cals beaucoup plus volumineux que dans les 3 premières séries.

TABLEAU XIV

Sambucus nigra L.

20	Fontaine-bleau	20-1-49	T	B	20	0	20	0	Dévelop ^t très actif. Très faible développ ^t
20	id.	26-2-49	T	II + Pa $5 \cdot 10^{-7}$	10	0	0	10	
				B	10	0	0	10	

TABLEAU XV

Conifères

Abies pectinata D.C.

Inconnu	Gérardmer	25-9-52		A	20	0	20	0	
				B + Pa $5 \cdot 10^{-7}$	20	0	20	0	

Picea excelsa Link.

90	Fontaine-bleau	22-12-53		B	20	0	0	20	
				B + van. 10^{-4}	20	0	0	20	

Cultures dans l'eau. — Des rondelles de quelques centimètres d'épaisseur sont découpées à la scie dans une tige. La section du tissu cambial est rafraîchie au scalpel sur toute la circonférence. Les rondelles sont placées dans l'eau, immergées jusqu'à la moitié environ de leur hauteur, à la température de 25°C. L'eau est renouvelée tous les 2 ou 3 jours et son niveau est maintenu sensiblement constant par des apports quotidiens.

Les essais suivants ont été réalisés en hiver :

TABLEAU XVI

Essence	Date de prélèvement	Nombre de rondelles	Observations
<i>Betula verrucosa</i>	6 janv. 1951	1	Formation d'une zone de tissu cambial dont l'épaisseur atteint environ 2 mm après 3 semaines. Une série d'explantats prélevés sur la même tige et cultivés aseptiquement sur milieu gélosé a également proliféré assez activement, cf. tableau VIII, p. 379.
<i>Quercus pedunculata</i>	10 janv. 1951	3	Formation d'une zone de tissu cambial dont l'épaisseur atteint environ 2 mm après un mois. 5 séries d'explantats prélevés sur la même tige et cultivés aseptiquement sur différents milieux gélosés ont également proliféré assez activement, cf. tableau V, p. 378.
<i>Fagus sylvatica</i>	25 janv. 1951	2	Formation d'une zone de tissu cambial dont l'épaisseur atteint 1,5-2 mm après un mois. Une série d'explantats prélevés sur la même tige et cultivés aseptiquement sur milieu gélosé n'a manifesté aucune activité, cf. tableau VI, p. 378.
<i>F. sylvatica</i>	12 nov. 1951	1	Formation d'une zone de tissu cambial dont l'épaisseur atteint 1,5-2 mm après un mois. Quatre séries d'explantats prélevés sur la même tige et cultivés aseptiquement sur différents milieux gélosés ont proliféré assez activement.

A ces résultats il y a lieu d'ajouter les quelques observations complémentaires suivantes :

Comportement du cambium dans des conditions climatiques exceptionnelles.

Automne 1949. — L'été chaud de 1949 s'est prolongé par un mois d'octobre lui-même exceptionnellement chaud. Dans le tableau ci-après figurent les données thermométriques et pluviométriques des mois d'août, septembre et octobre 1949, et les valeurs moyennes correspondantes établies pour la même station par une série de 66 années d'observations.

TABLEAU XVII

	Thermométrie					Pluviométrie
	Moyenne mensuelle	Moyenne des maxima	Moyenne des minima	Maximum absolu moy.	Minimum absolu moy.	mm.
Août moyen.....	16,8	22,6	11,2	31,1	5,3	49,7
Août 1949.....	18,6	25,8	11,4	33,7	6	56,5
Sept. moy.	13,88	19,4	8,6	29,7	7,9	54,6
Sept. 1949.....	18,36	24,3	12,4	33,6	5,3	109,5
Oct. moy.	8,8	13,4	4,1	21,1	- 2,8	14,0
Oct. 1949	12,42	17,3	7,5	23	- 5	68,0

La température de septembre a dépassé celle d'un mois d'août moyen. Celle des 26 premiers jours du mois d'octobre pour lesquels la moyenne nycthémerale a été de 14,3°C a dépassé légèrement celle d'un mois de septembre moyen. Pour ces 26 jours la moyenne des maxima, égale à 19° est presque égale à la moyenne de septembre. La température de 17° a été atteinte ou dépassée tous les jours sauf le 7 (16°3) le 17 (16°8), le 19 (16°5), le 21 (16°5) et le 22 (16°3) pendant une durée totale de 122 heures :

Dates:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Durée:	8	1	6	6	5	2	0	7	4	5	8	10	6
Dates:	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Durée:	9	10	10	0	4	0	3	0	0	3	2	13	0

Dans ces conditions climatiques caractérisées à la fois par une température élevée et une pluviosité abondante, l'activité du cambium s'est prolongée jusque vers le 20 octobre chez toutes les essences examinées : *Quercus*, *Fagus*, *Carpinus*, *Tilia*, *Populus tremula*.

De même quelques journées chaudes à la fin du mois de février 1959 ont déclenché la prolifération du cambium chez *U. campestris* (cf. tableau IX).

Reprise d'activité du cambium dans les souches d'arbres abattus en hiver.

Des tissus ont été prélevés en octobre à une quinzaine de centimètres au-dessous de la découpe, sur des souches de chênes (*Q. sessiliflora*) abattus l'hiver précédent. Les chênes choisis étaient âgés d'environ 200 ans. Les bourgeons proventifs ne restant pas actifs au delà d'une centaine d'années chez cette essence, il y avait toute certitude qu'aucune action ne pouvait plus être exercée par ces bourgeons. Dans ces conditions le cambium, alimenté en eau et disposant des réserves glucidiques des racines et de la souche, a formé une assise de tissus de structure identique à celle des tissus en culture (Pl. VII, fig. 1). Cette observation, qui est à rapprocher de celles de R. HARTIG sur les hêtres décapités, montre que le cambium, soustrait à toute influence des bourgeons, peut néanmoins reprendre son activité au printemps.

Persistence de l'état de repos pendant la saison de végétation

On constate fréquemment chez diverses Cupressacées, en particulier chez les *Juniperus*, que le cambium peut rester inactif pendant une ou plusieurs années sur des surfaces plus ou moins étendues. Sur des sections transversales du tronc les limites de ces zones inactives sont marquées par des « points de ramification » (1) des lignes d'accroissement (Pl. XX, fig. 1).

Examen critique des résultats

Les faits principaux qui se dégagent des résultats fournis par les essais de culture de tissu cambial en hiver sont les suivants :

- 1° le plus souvent, et quelle que soit l'époque de prélèvement, le cambium reprend son activité dès qu'il est soumis à une température suffisante et alimenté en eau, en glucides et en matières minérales (106, 107). Les essais portant sur des rondelles placées dans l'eau montrent que dans ces conditions le cambium peut reprendre son activité en même temps qu'interviennent les processus de mobilisation des réserves qui lui fournissent les aliments glucidiques nécessaires ;
- 2° parfois une proportion plus ou moins élevée, rarement la totalité, des explantats ne se développe pas.

L'inertie totale n'a été observée que dans un très petit nombre de cas : un prélèvement sur huit pour *Populus tremula*, un sur quatre pour *Quercus sessiliflora* $\times$ *pedunculata* et chez *Fagus sylvatica*, un sur deux pour *Betula verrucosa*, dans l'unique prélèvement d'*Abies pectinata*, un sur deux pour *Sambucus nigra*, soit cinq cas pour un total de 61 prélèvements sur l'ensemble des essences.

(1) Au sens mathématique du terme.

Beaucoup plus fréquent est le cas où, dans une série d'explantats prélevés sur la même tige, une proportion plus ou moins élevée de ceux-ci reste inerte. Ce phénomène a été constaté dans 5 prélèvements sur 8 chez *Populus tremula*, dans tous les prélèvements de *Castanea vesca*, dans un prélèvement sur 8 chez *Quercus*, dans un prélèvement sur quatre chez *Fagus sylvatica*.

Dans un même prélèvement une faible proportion des explantats seulement peut rester inerte: 4 sur 25 pour *P. tremula* (prélèvement du 5-2-49 à Villefermoy), 3 sur 29 pour la même essence (prélèvement du 13-10-57 à Ristolas), 4 sur 30 pour *C. vesca* (prélèvement du 10-2-49 à Fontainebleau); dans d'autres cas, au contraire, cette proportion peut devenir beaucoup plus élevée et même tendre vers la totalité: 6 sur 14 pour *Quercus pedunculata* (prélèvement du 2-11-49 à Fontainebleau), 22 sur 23 pour *B. verrucosa* (prélèvement du 20-10-50 à Fontainebleau). Entre les deux cas extrêmes: celui où en tous points, le cambium est en état de proliférer dès que la température est suffisante et celui où, dans les mêmes conditions, il reste complètement inerte, il existe donc toutes les transitions possibles. Cette inertie n'intéressant que certains explantats montre que le cambium d'une même tige peut, à un instant donné, ne pas être dans le même état en tous les points. D'autre part, il a parfois été observé une prolifération générale mais très faible: chez *Populus tremula* (prélèvements du 4 décembre 1949 et 4 janvier 1950). *Q. pedunculata* (prélèvement du 2 novembre 1949), *Carpinus betulus* (prélèvement du 26 février 1949, série sur milieu B). Dans le cas du deuxième prélèvement de *C. betulus*, réparti en cinq séries sur des milieux dont 4 contenaient les diverses combinaisons 3 à 3 de quatre vitamines: aneurine, acide pantothénique, biotine, inositol et le cinquième les quatre substances ensemble, les tissus ont faiblement proliféré sur les milieux privés d'aneurine ou d'inositol, un peu plus activement si seul l'acide pantothénique ou la biotine était absent, et assez activement en la présence simultanée des quatre substances.

Dans le cas de *Sambucus nigra*, les explantats cultivés sur milieu B ont très faiblement proliféré. Par contre, sur milieu II additionné d'acide pantothénique, la prolifération des tissus a été très active.

- 3° L'action des auxines accompagnées ou non de vitamines sur les explantats capables de se développer activement sans apport d'auxine ni de vitamines est, en général, peu marquée en ce qui concerne la prolifération du cambium (*Populus*, *Juglans*, *Castanea*, *Quercus*, *Carpinus*, *Robinia*). Par contre, la prolifération du parenchyme libérien peut être sensiblement activée.

- 4° En dehors du cas de *Carpinus betulus* déjà signalé, les vitamines: aneurine, pantothénate de calcium, biotine, inositol, amide nicotinique, lactoflavine, adermine, essayées isolément ou simultanément n'ont pas, en général, manifesté d'action sensible sur la prolifération des tissus. On a pu noter toutefois dans certains cas une légère stimulation de la prolifération sous l'influence de l'acide pantothénique à 5.10^{-7} (*Fagus*), de l'inositol à 10^{-3} (*Fraxinus*), de l'ensemble: aneurine 10^{-6} , pantothénate de Ca 5.10^{-7} , biotine 10^{-7} , inositol 5.10^{-4} (*Quercus*, prélèvement du 9 janvier 1953). Le lait de coco, essayé une seule fois (*Quercus*), a manifesté une action comparable à celle de l'acide β -indolyl-acétique et limitée à la prolifération du parenchyme libérien.
- 5° Les essais de culture de rondelles entières placées dans l'eau ont tous donné des résultats positifs. Le cambium a repris son activité et formé une nouvelle assise de tissus en même temps que l'amidon des parenchymes était mobilisé, permettant la nutrition glucidique du méristème en activité. Cette mobilisation de l'amidon commence dans les zones les plus externes du bois puis s'étend progressivement en profondeur. Dans trois cas (*Quercus*, *Betula* et *Fagus*), les explantats prélevés sur la même tige que les rondelles et cultivés aseptiquement ont, eux aussi, proliféré. Par contre, dans un autre prélèvement de *Fagus* (25 janvier 1951), tous les explantats sont restés inertes alors que le cambium de la rondelle a repris son activité.
- 6° Comme chez les prélèvements effectués en été on observe assez souvent une différence très marquée entre le comportement du tissu cambial et celle du parenchyme libérien. Le cambium peut proliférer seul (*Juglans regia*, 14 mars 1959) ou beaucoup plus activement que le parenchyme libérien (*Castanea vesca*, 10 février 1949, *Fraxinus excelsior*: 22 janvier 1956), mais on peut observer au contraire une prolifération notable du parenchyme libérien associée à une inertie totale ou à une très faible activité du cambium (*Populus tremula*: 12 novembre 1949, *Quercus pedunculata*: 2 novembre 1949). Cette différence de comportement est à rapprocher du fait signalé plus haut que ces tissus peuvent réagir de manière différente à la présence d'auxine ou de lait de coco dans le milieu.

DISCUSSION

Ces résultats montrent en premier lieu qu'il n'existe pas de loi générale en ce qui concerne le déterminisme de la reprise d'activité du cambium. Parmi les essences qui ont fait l'objet de prélèvements, seul *Ulmus campestris* a fourni, pour les 14 prélèvements effectués pendant l'automne ou l'hiver, à des dates et dans des sta-

tions variées, un développement actif de la totalité des explantats. Chez les autres espèces, on observe souvent des résultats très variables d'un prélèvement à l'autre. Sur 8 prélèvements, *Populus tremula* offre un cas d'inertie totale, 5 d'inertie partielle, 2 de développement de la totalité des explantats. Parmi les espèces, étroitement apparentées, du genre *Quercus*, *Q. pedunculata* offre sur 3 prélèvements un cas d'inertie partielle (2 novembre 1949) et 2 cas de développement de tous les explantats (21 septembre 1950 et 10 janvier 1951), *Q. sessiliflora* n'a présenté aucun explantat inerte dans deux prélèvements (10 avril 1950 et 7 décembre 1953), l'hybride des deux espèces a présenté sur 4 prélèvements un cas d'inertie totale (23 janvier 1949) et 3 cas de développement de tous les explantats (27 février 1952, 9 janvier 1953, 20 novembre 1953). Chez *Fagus sylvatica*, 4 prélèvements ont fourni deux cas sans explantats inertes (15 avril 1950 et 12 novembre 1951), un cas d'inertie partielle (13 novembre 1958), un cas d'inertie totale (25 janvier 1951), mais dans ce dernier cas le cambium des rondelles de la même tige placées dans l'eau a repris son activité et formé une assise importante de tissu. Dans les quatre prélèvements de *Castanea vesca* (10 février 1949, 2 novembre 1949, 8 décembre 1949 et 14 janvier 1950), on a observé une faible proportion d'explantats inertes.

Dans les deux prélèvements de *Carpinus betulus*, on a observé une faible prolifération du tissu cambial chez tous les explantats. Les deux prélèvements de *Betula verrucosa* offrent un cas d'inertie totale et un cas de développement de tous les explantats. Il en a été de même pour les deux prélèvements de *Sambucus nigra*. Pour les autres essences, il n'a été observé aucun cas d'inertie chez *Robinia pseudoacacia* (2 prélèvements), *Tilia parvifolia* (3 prélèvements), *Eucalyptus tereticornis* (1 prélèvement), *E. cladocalyx* (1 prélèvement), *E. gomphocephala* (1 prélèvement), *E. camaldulensis* (2 prélèvements), *Fraxinus excelsior* (1 prélèvement), *Picea excelsa* (1 prélèvement). L'unique prélèvement d'*Abies pectinata* n'a fourni aucun explantat actif.

Il convient tout d'abord d'examiner, dans le cas où le tissu de tout ou partie des explantats prolifère, si cette activité peut être expliquée par l'hypothèse de WAREING et LADEFOGED ou par celle de JOST. Le comportement des tissus repiqués (voir Chap. I, III^e Partie) a montré qu'il fallait distinguer trois cas :

- 1° Les tissus de deux des essences étudiées : *Castanea vesca* et *Betula verrucosa* peuvent être cultivés indéfiniment sur des milieux ne contenant qu'un ose et des substances minérales. Il est donc certain que ces tissus sont doués de la faculté de faire la synthèse de l'auxine et de tous les facteurs de croissance nécessaires en quantité suffisante pour assurer une prolifération active et, dans ce cas, l'hypothèse de JOST suffit à expliquer la reprise d'activité de ces tissus.

- 2° D'autres tissus ne peuvent être maintenus en culture que sur des milieux contenant une auxine (*Populus tremula*, *Ulmus campestris*, *Tilia parvifolia*) ou du lait de coco (*Robinia pseudoacacia*, *Eucalyptus* sp.).
- 3° D'autres tissus enfin n'ont pu être maintenus en culture au delà de quelques repiquages, même sur des milieux complexes contenant des auxines, des vitamines et des acides aminés ou du lait de coco (*Juglans*, *Quercus*, *Carpinus*, *Fagus*).

La prolifération du tissu cambial de ces deux dernières catégories exige évidemment l'apport de substances provenant d'autres régions du végétal et la reprise d'activité de tels tissus isolés de l'arbre implique qu'ils disposent de réserves de ces substances. C'est alors l'hypothèse de WAREING qui est seule acceptable.

On doit ensuite examiner le problème posé par les cas où les tissus isolés sont totalement ou partiellement inertes. S'il s'agit d'essences dont le cambium est capable de faire la synthèse de toutes les substances et facteurs de croissance nécessaires à sa prolifération comme *C. vesca* et *B. verrucosa*, on pourrait supposer que l'inertie serait due à la présence d'inhibiteurs qui, dans le cas où une partie des explantats seulement reste inerte, seraient localisés en certains points. Cependant, en ce qui concerne *C. vesca*, il faut faire la réserve que dans certains prélèvements opérés au printemps ou en été, en pleine période d'activité du cambium, on a également observé l'inertie d'une proportion d'explantats du même ordre de grandeur que dans les prélèvements d'hiver. On peut donc expliquer l'inertie observée en hiver par l'action des mêmes substances toxiques qui agissent pendant la période normale d'activité. Dans le cas de *B. verrucosa*, où des inhibiteurs de croissance entraîneraient réellement en jeu, la levée d'inhibition pourrait alors résulter de l'apport de substances provenant des bourgeons, mais les observations de MER conduisent à envisager aussi la possibilité que ces substances puissent diffuser à partir des zones du cambium ne se trouvant pas en état de dormance, la reprise d'activité s'irradiant à partir de plusieurs foyers situés à certains niveaux du tronc.

Pour les essences dont le cambium ne peut faire la synthèse des substances nécessaires, l'hypothèse la plus simple à envisager est que l'inertie des tissus résulte d'une carence portant sur une ou plusieurs de ces substances. Si, comme il a été constaté pour *Sambucus nigra* (prélèvement du 26 février 1949), les explantats cultivés sur un milieu contenant une auxine et des vitamines prolifèrent activement alors que les témoins restent inertes ou presque inertes, il y a bien là une preuve directe que c'est le déficit en l'une au moins de ces substances qui détermine l'inertie. Il en est de même dans le cas du prélèvement de *Carpinus betulus* du 3 décembre 1952, où la prolifération du tissu, très faible sur milieu dépourvu d'aneu-

rine et d'inositol, s'améliore si l'une ou l'autre de ces vitamines sont ajoutées au milieu et devient nettement plus active en présence de quatre vitamines.

De même, cette hypothèse explique aisément le cas des explantats de *Fagus sylvatica*, restés inertes alors que le cambium des rondelles de la même tige prolifère activement: dans l'arbre sur pied, comme dans les rondelles entières prélevées sur la tige, chaque élément de surface du cambium dispose des réserves du tissu libérien et de celles de toute l'épaisseur de l'aubier sous-jacent; dans les explantats, comportant seulement une mince lame de tissus libérien et ligneux de part et d'autre du cambium, celui-ci ne dispose, en ce qui concerne les facteurs de croissance et les auxines, que des réserves se trouvant dans ce faible volume de tissus au moment du prélèvement (1). La quantité disponible de ces substances, insuffisante dans les explantats, a pu dépasser le seuil d'action dans les rondelles, grâce à l'apport des réserves de l'aubier. Il y a lieu de remarquer que la migration des réserves d'auxine de l'aubier vers le cambium participe ainsi à un mouvement général centrifuge intéressant également les glucides solubles provenant de la mobilisation des réserves amylacées. Les exemples nombreux d'inertie partielle, où certains explantats, en proportion plus ou moins élevée, restent inertes, peut s'expliquer par une répartition inégale des substances de croissance entre les différents points de la zone cambiale. Les fluctuations locales des réserves de ces substances de part et d'autre du seuil d'action déterminent l'activité ou l'inertie des explantats prélevés en chaque point. Le cambium utilise des réserves de substances de croissance emmagasinées non seulement dans les tissus contigus du bois et du liber, mais aussi celles accumulées dans toute l'épaisseur de l'aubier en même temps que les réserves trophiques. Avec l'augmentation du diamètre de la tige et l'accroissement corrélatif de l'épaisseur de l'aubier, l'importance des réserves disponibles s'accroît et dans les parties les plus âgées, notamment dans le tronc, l'activité du cambium tend à devenir moins étroitement liée à celle des bourgeons que celle du cambium des ramifications plus jeunes.

A cette interprétation on pourrait objecter que, dans certains essais, l'addition d'auxine et de vitamines ne fait pas apparemment modifier la proportion d'explantats inertes par rapport au milieu témoin sans auxine ni vitamines. Cette objection ne serait valable qu'à la condition qu'il soit certain que le tissu peut être repiqué indéfiniment sur le milieu contenant l'auxine et les vitamines essayées aux concentrations utilisées. Or, cette condition n'est réalisée pour aucun des essais sur *Populus tremula*, le seuil d'action de l'acide β -indolyl-acétique, déterminé ultérieurement, étant compris

(1) Ce fait doit être rapproché de l'observation de BARKER sur *Tilia americana* (6) dont le cambium ne prolifère qu'en présence de tissu ligneux.

entre 10^{-7} et 10^{-6} . En ce qui concerne les autres espèces pour lesquelles il a pu être trouvé un milieu permettant la culture indéfinie, il n'a pas été observé de cas d'inertie. Il semble donc que, dans l'ensemble, le comportement du cambium chez les espèces où ce tissu ne peut faire la synthèse de l'auxine puisse s'expliquer par l'hypothèse de WAREING sans qu'il soit nécessaire d'invoquer l'intervention d'inhibiteurs. Cependant cette dernière hypothèse ne paraît pas devoir être totalement écartée. Le comportement du cambium dans les trois prélèvements successifs opérés sur trois tiges de la même cèpée de *P. tremula* les 12 novembre et 4 décembre 1949 et le 4 janvier 1950 peut faire penser à une levée progressive d'inhibition au cours de l'hiver. De même le comportement différent du cambium et du parenchyme libérien parfois constaté pourrait résulter d'une répartition inégale dans les deux tissus de substances inhibitrices n'ayant pas la mobilité de l'auxine, et dont l'inactivation pourrait se produire soit progressivement *in situ* au cours de l'hiver, soit au printemps sous l'action de substances provenant des bourgeons en activité.

CHAPITRE III

Morphologie et anatomie des tissus en culture

I — PREMIERS ISOLEMENTS

A) Morphologie externe

1^o Prélèvements suivant la méthode de Gautheret.

Cette méthode est utilisée pendant la période de plus grande activité du cambium (15 avril - 15 juillet environ).

On distingue, suivant les espèces, et parfois suivant les prélèvements au sein d'une même espèce, les aspects suivants :

a) dans un premier stade on observe une prolifération sensiblement uniforme de toute la surface cambiale. Il se forme une couche mince (1 à 2 mm) et régulière de tissu. Fréquemment l'explantat, sensiblement plan à l'origine, se courbe et acquiert la forme d'une surface cylindrique, convexe du côté de la face cambiale. Cette déformation résulte de la compression tangentielle qui se développe dans les tissus néoformés et n'est pas équilibrée par une prolifération symétrique de la face libérienne.

Ce processus a été observé chez *Populus tremula*, *Castanea vesca*, *Quercus* sp., *Betula verrucosa*, *Prunus avium*, *Ulmus campestris*. Parfois la prolifération est plus active sur les bords de l'explantat, vraisemblablement sous l'action d'hormones de blessure et il se forme des bourrelets plus ou moins importants (*P. tremula*, *U. campestris*). Dans d'autres cas, au contraire (*Quercus*), les bords de l'explantat se nécrosent et la nécrose tend à s'étendre vers l'intérieur de la face cambiale.

b) dans tous les cas au bout d'un temps variable (1 à 3 semaines le plus souvent), la prolifération cesse d'être uniforme et il se développe en un ou plusieurs points des nodules (Pl. I, fig. 4) de tissu ou des cals plus ou moins volumineux (Pl. I, fig. 1, 2).

Chez les *Quercus* les initiales des rayons épais prolifèrent bien moins activement que les autres et la surface de l'explantat offre un aspect cannelé, le creux des cannelures correspondant aux rayons multisériés. Cette particularité est peut-être liée au fait que les tanins sont localisés dans les cellules des rayons, alors que les cellules du parenchyme longitudinal n'en contiennent pas (Pl. I, fig. 2).

Au début, les tissus néoformés sont le plus souvent compacts, à surface lisse, mais ultérieurement il apparaît fréquemment des files de cellules disjointes (pseudothalles) formant un duvet hyalin. Ces formations peuvent être localisées, formant des touffes disséminées ou, au contraire, constituer un revêtement continu.

c) dans certains cas, la prolifération se localise dès le début pour former un cal plus ou moins volumineux, le reste de la surface cambiale ne présentant aucun signe d'activité et finissant par se nécroser (Pl. II, fig. 2).

d) exceptionnellement les pseudothalles apparaissent dès le début formant des touffes étendues et volumineuses (Pl. II, fig. 1).

Chlorophylle. — Les tissus cultivés à la lumière peuvent acquérir une teinte verte assez intense (*Quercus* sp., *C. vesca*) ou claire (*Populus tremula*, *Fraxinus excelsior*). Dans d'autres cas, ils restent blancs (*Ulmus campestris*, *Eucalyptus* sp.).

Les cals restent souvent blancs même si la couche de tissus précédemment formés verdit. Les pseudothalles sont toujours hyalins.

La prolifération de la face libérienne est le plus souvent faible ou très faible et réduite à des formations de pseudothalles (Pl. XXVI, fig. 2).

Formation d'organes (1). — Seuls les tissus d'*Ulmus campestris* ont formé des bourgeons. Ce phénomène a été observé dans tous les prélèvements de cette essence. Chez aucune essence il n'a été observé de racines.

2° Prélèvement pendant la période du 15 juillet au 15 avril.

Cette période couvre la fin de la saison d'activité du cambium (15 juillet au 15 septembre environ dans le Centre et l'Ouest de la France) et la saison de repos (15 septembre - 15 avril). Pendant cette période d'activité réduite ou nulle le tissu cambial est trop tenace pour qu'il soit possible de séparer du bois des explantats formés de liber et d'une couche de cambium. Seule la méthode de GIOELLI est alors applicable.

L'épaisseur de l'explantat augmente par suite de la prolifération de toute la surface du tissu cambial et il se forme sur son pourtour un bourrelet implanté sur la zone d'affleurement du cambium.

(1) L'étude des phénomènes d'organogenèse fait l'objet du chapitre IV.

Ce bourrelet est d'abord d'épaisseur régulière, mais certaines parties peuvent ensuite proliférer plus activement en formant des cals volumineux (Pl. II, fig. 3). Les néoformations peuvent être constituées de tissus cohérents à surface lisse (Pl. I, fig. 3) ou se couvrir plus ou moins tardivement de touffes de pseudothalles, dispersées ou formant un revêtement continu (Pl. II, fig. 4). La face libérienne prolifère faiblement en formant des pseudothalles. Les tissus ligneux n'offrent le plus souvent aucun indice de prolifération.

Formation d'organes. — Chez les tissus prélevés par la méthode de GIOELLI seuls les tissus d'*U. campestris* de certains prélèvements ont formé des bourgeons.

La formation de racines n'a été observée chez aucune essence.

3° Rondelles ou billons placés dans l'eau.

On observe sur toute la circonférence de la section supérieure un bourrelet de tissus néoformés.

B) Anatomie

1° Prélèvement par la méthode de GAUTHERET.

Les tissus néoformés appartiennent à deux types principaux :

a) Les *tissus consistants* (cals et bourrelets) sont formés essentiellement d'un parenchyme non lignifié pouvant contenir soit des éléments, cyclisés ou non, d'assises génératrices donnant naissance à des cellules lignifiées, soit des îlots isolés de cellules lignifiées.

Le parenchyme néoformé peut être d'emblée dépourvu d'organisation, mais chez *Quercus sessiliflora*, *Q. pedunculata*, *Q. suber* (Pl. III, fig. 1, 2, 3, et Pl. IV, fig. 1, 2, 3), on constate que, dans un premier stade, il se forme une assise de tissu présentant une structure régulière, ne différant du liber normal que par la taille plus faible de ses cellules. En outre, des faisceaux de fibres libériennes à parois plus minces que les fibres normales se différencient encore au sein de ce tissu. Elles sont groupées en zones tangentielles, conformément au plan libérien normal (JACQUIOT [109]). Chez *F. excelsior* L., l'assise de tissu organisé est beaucoup plus réduite et peut même n'exister que sur une partie d'un même explantat ou faire complètement défaut (Pl. V, fig. 3). Chez cette essence, il n'a pas été observé de formation de fibres libériennes.

Dans une même série d'explantats de *F. excelsior* prélevés en juin et cultivés sur milieu sans auxine, deux types très différents de néoformations ont été observés. Dans le premier, le cambium a proliféré exclusivement du côté du liber (face externe) en formant une assise de tissus ne représentant que des vestiges d'organisation. La face interne, au contraire, est restée telle qu'elle était immédiatement après le prélèvement (Pl. V, fig. 3).

Dans le second type, l'assise cambiale a formé vers l'intérieur une assise de parenchyme inorganisé et vers l'extérieur une assise de tissus organisés en continuité avec ceux du liber préexistant (Pl. V, fig. 4).

Que sa formation commence dès la mise en culture ou qu'elle succède à la formation d'une zone de tissu organisé, il se constitue toujours une masse plus ou moins volumineuse de parenchyme. Ce parenchyme, privé d'organisation, renferme en général des éléments d'assises génératrices ou tout au moins des cellules lignifiées (Pl. IV, fig. 1, 2, 3, Pl. V, fig. 2, Pl. VI, fig. 1, 2, 3). Les cellules de parenchyme ont des parois cellulósiques minces, comparables à celles du parenchyme libérien normal. Les cellules lignifiées sont chez certaines espèces homologues des vaisseaux et présentent les mêmes types de ponctuations et de perforations que les vaisseaux normaux. C'est le cas des tissus de *B. verrucosa*, dont les cellules lignifiées sont munies des mêmes ponctuations aréolées que les vaisseaux normaux et possèdent des parois terminales à perforations scalariformes, caractère normal chez cette essence. De même chez *P. tremula*, ces cellules ont le caractère de vaisseaux aréolés de type normal et chez *Fraxinus excelsior* (Pl. XI, fig. 1) on trouve les parois épaisses caractéristiques des vaisseaux de cette essence. Chez d'autres essences, les cellules lignifiées ne présentent plus tous les caractères des vaisseaux normaux ou même en sont totalement différentes. Chez *T. parvifolia* et chez *U. campestris* quelques vaisseaux seulement présentent des épaississements spirales, caractère normal chez ces essences, alors que la plupart en sont dépourvus (Pl. VI, fig. 3).

Dans d'autres cas, les cellules sont munies d'épaississements réticulés et sont comparables aux trachéides des tissus de transfusion. On trouve de telles cellules chez *Q. sessiliflora* (Pl. IV, fig. 1, 3), *Q. suber* (Pl. IV, fig. 2), *Robinia pseudoacacia* L. (Pl. VI, fig. 2), mais ces cellules peuvent coexister avec des cellules à ponctuations aréolées. On peut même trouver des cellules munies vers une extrémité de ponctuations aréolées et, à l'autre extrémité, d'épaississements réticulés. Ces cellules constituent une forme intermédiaire entre vaisseau aréolé et trachéide réticulée, entre lesquels ne semble pas exister de coupure fondamentale.

A quelque type qu'elles appartiennent, ces cellules lignifiées ont des dimensions beaucoup plus faibles que les vaisseaux normaux et sont presque toujours groupées en nodules cyclisés. Leur forme est courte, souvent isodiamétrique. Il n'a jamais été observé de cellules homologues des fibres-trachéides, des fibres-librifformes ni des cellules de parenchyme ligneux.

b) Les *pseudothalles* sont formés de cellules arrondies, ellipsoïdales ou allandoïdes disjointes, formant un tissu lacuneux extrêmement fragile. De telles cellules se trouvent aussi assez souvent à

la surface de cals consistants où elles forment parfois un duvet blanc sur des zones plus ou moins étendues (Pl. X, fig. 3).

2° Prélèvements suivant la méthode de GIOELLI.

La structure des cals formés sur la tranche des explantats présente les mêmes caractères que ceux des cals formés sur les explantats prélevés suivant la méthode de GAUTHERET.

La lame de tissu néoformé par le cambium intact est constituée pour sa majeure partie d'un parenchyme à membranes cellulosesiques, dont la structure est assez régulière, mais on y observe d'importants îlots, souvent cyclisés, de cellules lignifiées. Ces îlots sont souvent disposés suivant une zone qui, dans certains cas, est continue, mais qui est toujours séparée du bois préexistant par du parenchyme non différencié.

Comme dans les néoformations des tissus prélevés suivant la méthode de GAUTHERET, ces cellules lignifiées peuvent présenter les caractères de ponctuations et de perforations des vaisseaux normaux (*B. verrucosa*, *P. tremula*) ou, au contraire, ceux des trachéides des tissus de transfusion. Ces deux formes peuvent coexister dans un même groupe de cellules et on peut même observer des cellules présentant vers une extrémité un réseau d'épaississements réticulés et à l'autre extrémité des ponctuations aréolées circulaires avec, comme stade intermédiaire, des ponctuations aréolées scalariiformes. Ici encore, on peut donc passer par une transformation continue de la trachéide réticulée au vaisseau (Pl. IX, fig. 2).

On observe rarement des tissus résultant de la prolifération de cellules du bois. Ils consistent alors en cellules de même nature que les thylls formés dans les vaisseaux et, lorsque ces vaisseaux ont été ouverts longitudinalement lors du prélèvement, il existe une continuité évidente entre les thylls et le tissu formé extérieurement (Pl. X, fig. 2); ces proliférations sont toujours très limitées. Dans aucun cas il n'a été observé de tubes criblés dans les tissus néoformés.

La face libérienne des explantats présente des formations plus ou moins abondantes de pseudothalles ayant la même structure que ceux formés sur les explantats prélevés suivant la méthode de GAUTHERET.

3° Cultures de rondelles ou de billons placés dans l'eau.

Cette expérience a été réalisée pour trois essences: *B. verrucosa*, *Q. pedunculata*, *Fagus sylvatica* L. (2 prélèvements). Les prélèvements avaient été opérés en hiver (de novembre à janvier). Dans tous les cas les tissus néoformés présentent exactement les mêmes caractères que les tissus formés dans les explantats cultivés *in vitro* (Pl. X, fig. 1).

II — TISSUS REPIQUÉS

La morphologie externe et l'anatomie des tissus repiqués ont pu être étudiée sur neuf essences dont il a été possible d'obtenir la culture indéfinie.

TABLEAU XVIII

Essences	Origine des souches	Désignation de la souche	Nombre de repiquages au 1er Octobre 1962
<u>Populus tremula</u> L.	Forêt domaniale de Villefermy (S. & M.)	Tr V	24
	Valloire (Maurienne)	Tr M	23
<u>Castanea vesca</u> Gaertn.	Forêt domaniale de Fontainebleau	Ca	49
<u>Betula verrucosa</u> Ehr.	- id. -	Be	24
<u>Ulmus campestris</u> L.	Forêt domaniale de Malvoisine	UM	8) souches
	Forêt domaniale de Fontainebleau	UF ¹	8) abandon-
	- id. -	UF ²	8) nées
	- id. -	UF ³	14
	- id. -	UF ⁴	6 souches ab.
	- id. -	UF ⁵	9
	Forêt domaniale de Villefermy	UV	10
<u>Tilia parvifolia</u> Ehr.	- id. -	Ti 3	5
<u>Prunus avium</u> Moench.	Forêt domaniale de Fontainebleau	Pa	22
<u>Baccharis genchodes</u> A.D.C.	Station de Recherches Forestières de Rabat (Maroc)	E.go	9
<u>E. canadensis</u> Dhm.	(- id. - souche B	E.c.B.	6
	(- id. - " R	E.c.R.	6
<u>E. gunnii</u> Hook	- id. -	E.g	6

A) Morphologie externe

1° Consistance. — On peut observer deux types très différents de colonies :

- a) Colonies cohérentes, plus ou moins massives, de consistance plus ou moins ferme.
- b) Colonies sans cohésion.

a) *Colonies cohérentes*: Ces colonies peuvent être massives et compactes, à surface lisse ou faiblement mamelonnée, revêtue ou non d'un tomentum ou de touffes de pseudothalles.

Les colonies de la souche V de *P. tremula* appartiennent constamment à ce type. Elles sont de consistance très ferme, presque dure, à surface mamelonnée, souvent revêtue partiellement d'un tomentum blanc de pseudothalles.

De même, les colonies de *T. parvifolia* sont compactes, à surface glabre, de consistance très ferme.

Dans d'autres cas, les colonies sont constituées de lobes séparés par des incisions plus ou moins profondes ou de nodules reliés entre eux par de minces tractus de tissu, faciles à rompre sous un léger effort.

A ce type appartient le tissu de *C. vesca* dont les colonies, qu'elles aient la forme générale d'un dôme surbaissé, assez épais, ou une forme plus massive et irrégulière, sont entaillées par des sillons qui les séparent en lobes. Ces lobes sont assez grossièrement mamelonnés, à surface glabre. Le tissu est de consistance ferme.

Les colonies de *B. verrucosa* cultivées à la lumière se présentent comme des amas de nodules de 3 à 5 mm de diamètre aisément séparables. Lorsque les cultures sont maintenues à l'obscurité, les colonies deviennent plus massives, mamelonnées en surface et se rapprochent du premier type décrit. Dans tous les cas le tissu est de consistance assez ferme, la surface généralement glabre parfois revêtue partiellement de pseudothalles.

Les colonies de *P. avium* sont également constituées par des nodules séparables, à surface glabre, de consistance assez ferme.

b) *Colonies sans cohésion.* — Les colonies sont formées de très petits nodules de tissu cohérent agglomérés par un mucilage. Ce type de tissu, observé pour la première fois sur les souches M et F₁ d'*Ulmus campestris* (115) a été retrouvé par nous chez les autres souches de la même essence, chez *Eucalyptus camaldulensis* et *E. gunnii*. Il a également été retrouvé par GAUTHERET chez *Pinus strobus* (70), puis par BARNOUD (8) chez *Carpinus betulus* et *P. tremula*.

C'est vraisemblablement aussi une structure de ce type qu'acquiert le tissu de vigne cultivé sur milieu contenant du lait de coco (GAUTHERET [68, 69]).

Variation de consistance des tissus d'une même espèce ou d'une même souche

Les colonies de *T. parvifolia* et *P. avium* ne présentent que de très faibles variations.

Celles de *C. vesca* offrent une variabilité plus grande. La forme générale des colonies peut aller de celle d'un dôme surbaissé assez régulier, s'étalant sur le milieu, à celle d'une masse régulière et anfractueuse, les sillons séparant les lobes pouvant être plus ou moins accusés. Chez *B. verrucosa* les colonies, même cultivées à la lumière, ont d'abord uniformément présenté une forme générale surbaissée, étalée sur le milieu, une consistance assez ferme et élastique,

une couleur blanchâtre. Au 5^e passage une colonie a formé un nodule de tissu chlorophyllien. Aux passages suivants, ces formations sont devenues de plus en plus fréquentes chez les colonies exposées à la lumière et, depuis le dixième repiquage, la plupart des colonies sont formées principalement de nodules de tissu vert, assemblés en une masse globuleuse, s'enfonçant plus ou moins dans le milieu. Toutefois il subsiste toujours une certaine proportion de nodules blancs. La consistance de ces tissus est plus ferme que celle de la forme initiale.

Chez *P. tremula* la variabilité de la souche V est très faible, mais la souche M peut se présenter soit sous forme de colonies compactes analogues à celles de la souche V, soit sous forme de colonies sans cohésion analogues à celles décrites par BARNOUD (8) (1) chez cette même essence. Cette transformation est réversible; en repiquant des fragments d'une colonie compacte, on peut obtenir soit une colonie du même type, soit des néoformations sans cohérence et inversement.

Chez *Ulmus campestris* L. certaines souches présentent à la fois des colonies du type cohérent et compact et des colonies sans cohésion (Souches UF 5 et UV).

2^e Couleur. — A l'obscurité les colonies sont blanchâtres au moins au début de leur développement (*Ulmus*, *Betula*, *Tilia*, *Eucalyptus*) ou de couleur ambrée (*Castanea*, *Prunus*). Celles de *P. tremula* présentent des régions carminées.

A la lumière les tissus d'*Ulmus* et d'*Eucalyptus* restent blancs. Ceux de *Prunus* et *Castanea* se teintent à peine de verdâtre, ceux de *Tilia* et *Fraxinus* deviennent verts, ceux de *P. tremula* deviennent d'un vert assez vif entremêlé de nuances carminées. Dans les colonies de *Betula* certains nodules deviennent d'un vert plus ou moins vif alors que d'autres ne se colorent pas.

Chez plusieurs espèces une partie au moins de la surface des colonies brunit par suite de formation de cellules subérisées. Ce brunissement peut se produire après un certain temps de développement (*U. campestris*, *P. avium*) et caractérise alors les cultures âgées, mais chez d'autres espèces il apparaît aussitôt après le repiquage et semble être une conséquence du traumatisme subi au cours de cette opération. Lorsque le fragment repiqué recommence à proliférer les tissus néoformés sont clairs. Ce phénomène se constate très fréquemment chez *C. vesca* où le brunissement est surtout très accentué sur les surfaces des sections. Il est constant et très marqué chez *T. parvifolia* où tous les fragments repiqués brunissent sur

(1) BARNOUD n'a pas précisé l'origine de sa souche. Il est probable qu'il s'agit d'une race alpine de tremble comme notre souche Tr M. Dans ce cas il y aurait lieu de vérifier si cette propriété est générale chez certaines races alpines de cette essence.

toute leur surface. Les colonies âgées présentent une région centrale brune et une marge claire qui correspond au tissu formé depuis le repiquage. Les colonies d'*Eucalyptus gomphocephala* présentent aussi ce caractère.

Formation d'organes

Certains tissus (*Castanea*, *Prunus*, *Eucalyptus*) n'ont jamais formé d'organes. Les autres (*P. tremula*, *B. verrucosa*, *Tilia parvifolia*, *Ulmus campestris*) ont émis des racines après un certain nombre de repiquages. Cette propriété ne s'est manifestée que pendant quelques repiquages chez *B. verrucosa* et *U. campestris*.

Seuls *P. tremula* (Souche Villefermoy) et *B. verrucosa* ont émis des pousses après plusieurs repiquages et très irrégulièrement (1).

B) Anatomie

1^{re} Tissus cohérents.

Ces tissus sont constitués par une masse de parenchyme cellulosique parsemé d'éléments lignifiés. Ceux-ci peuvent être en rapport avec des éléments disjoints d'assises génératrices le plus souvent cyclisées (*B. verrucosa*, Pl. XI, fig. 3, 4), *C. vesca* (Pl. XIV, fig. 2, 3), constituer des îlots dispersés dans le parenchyme (*P. tremula*, *C. vesca*, *T. parvifolia*, *E. gomphocephala*, Pl. XVIII, fig. 1) ou même s'y trouver à l'état isolé (*B. verrucosa*, Pl. XI, fig. 4, *C. vesca*).

Le tissu de *P. avium* est presque exclusivement formé d'un parenchyme à membranes celluloses, dépourvu d'organisation, la présence de cellules lignifiées étant exceptionnelle.

De même après un certain nombre de repiquages, les cellules lignifiées du tissu de *Castanea* se raréfient puis disparaissent presque totalement.

Comme dans les néoformations des premiers isollements, les cellules lignifiées peuvent présenter les caractères des vaisseaux normaux à ponctuations aréolées, c'est le cas de *P. tremula*, *E. gomphocephala*, *B. verrucosa* (Pl. XI, fig. 3, 4). Dans le tissu de cette dernière espèce les parois terminales sont munies de perforations scalariformes, caractère spécifique normal (Pl. XII, fig. 1). On trouve aussi chez cette essence des cellules lignifiées vésiculeuses et comparables à des thylls. Chez *T. parvifolia* ces vaisseaux diffèrent au contraire du type normal par l'absence d'épaississements spiralés. Chez *C. vesca* les cellules lignifiées présentent le plus souvent des parois à épaississement réticulés et sont à rapprocher des trachéides

(1) Voir Chap. IV.

des tissus de transfusion (Pl. XIV, fig. 2, 3), mais on trouve aussi des vaisseaux à ponctuation aréolées et des formes de passage entre les deux types de cellules. On observe en outre des cellules à parois minces, colorables par le vert d'iode et le bleu de méthylène mais complètement dépourvues de sculptures (épaississements réticulés ou ponctuations). Leur forme ne diffère pas des cellules du parenchyme à membranes cellulosiques constituant la masse des colonies.

Les cellules lignifiées sont souvent groupées en ensembles cyclisés, plus rarement en faisceaux rectilignes. Chez *B. verrucosa* (Pl. XI, fig. 4), on trouve assez fréquemment des segments rectilignes et isolés de vaisseaux, formés de plusieurs éléments.

Dans tous les cas on ne décèle aucune organisation d'ensemble, les groupes de cellules lignifiées étant dispersés au hasard dans le parenchyme, qui lui-même n'offre aucune structure bien définie. Lorsque le tissu comporte des faisceaux, cyclisés ou non, de cellules lignifiées, ils sont souvent associés à des éléments disjoints d'assises génératrices (Pl. XIII, fig. 1) Si le tissu ne comporte pas de cellules lignifiées différenciées ou seulement quelques cellules isolées éparses incluses dans le parenchyme, le tissu s'accroît par multiplication des cellules superficielles (cambium diffus). C'est notamment le cas chez *C. vesca* où on observe une disposition des cellules en files régulières aboutissant normalement à la surface (Pl. XIV, fig. 1) de la colonie. La croissance du tissu résulte de la multiplication des cellules placées vers l'extrémité de chaque file. Lorsque les cellules lignifiées présentent les caractères des vaisseaux normaux, leurs dimensions sont toujours beaucoup plus faibles que celles de ces vaisseaux. Chez *B. verrucosa* (Pl. XI, fig. 4) leur diamètre est d'environ 15 μ , leur longueur d'environ 50 μ , contre des dimensions normales de l'ordre de 45 μ et 500 μ respectivement. De même chez *P. tremula* ces vaisseaux ont un diamètre de l'ordre de 20 μ , une longueur de l'ordre de 120 μ contre 100 et 600 μ respectivement pour les vaisseaux du bois normal. Chez ces deux espèces, le rapport des dimensions des vaisseaux du tissu cultivé *in vitro* à celles du tissu normal oscille entre 1/10 et 1/3.

2° Tissus sans cohésion.

Les nodules du tissu sans cohésion d'*U. campestris* sont formés d'un parenchyme consistant (Pl. XVII, fig. 1) à cellules isodiamétriques. A ces nodules adhèrent des lambeaux de membranes de grandes cellules allongées. Les caractères de ce tissu apparaissent donc comme le résultat de la néoformation de cellules de deux types : cellules isodiamétriques groupées en nodules consistants, eux-mêmes dispersés dans un tissu formé de grandes cellules, qui subit une histolyse donnant naissance à un mucilage. Cette interprétation est confirmée par la présence sporadique de groupes de cellules lignifiées à ponctuations aréolées, ayant les caractères de vais-

seaux, différant toutefois des vaisseaux normaux de l'espèce par l'absence d'épaississements spirals. De plus chez certaines souches (UF₅ notamment), une certaine proportion des colonies est formée principalement de tissu cohérent, les cellules allongées, non lysées, étant fréquemment lignifiées, avec des membranes munies de ponctuations aréolées (Pl. XVII, fig. 2).

3° Evolution de la structure.

La structure des tissus de *B. verrucosa*, *P. tremula*, *U. campestris*, *P. avium* est restée invariable depuis les premiers repiquages. Par contre, le tissu de *Castanea vesca*, riche en îlots de cellules lignifiées et en éléments d'assises génératrices jusque vers le 5^e repiquage, a pris progressivement ensuite le caractère d'un parenchyme dans lequel n'apparaissent que de très rares cellules lignifiées à épaississements réticulés. En même temps les colonies, très massives lors des premiers repiquages, ont présenté fréquemment, après une dizaine de repiquages, la forme d'un dôme surbaissé mince qui s'étend par son bord sur le milieu, évolution analogue à celles observées par BALI (5) dans les cultures de *Sequoia sempervirens* et par BARNOUD (7) dans celles de *Syringa vulgaris*.

4° Tubes criblés.

De même que dans les tissus néoformés des premiers isollements, il n'a jamais été observé de tubes criblés dans les tissus repiqués, constatation qui concorde avec celle précédemment rapportée par GAUTHERET (55).

C) Réserves

Les parenchymes des tissus de *Tilia parvifolia* et de *Betula verrucosa* contiennent des inclusions lipidiques, forme d'accumulation normale chez ces deux essences (Pl. XIX, fig. 1).

Les tissus de *Prunus avium* et d'*Ulmus campestris* contiennent des grains d'amidon qui, dans ce cas également, représentent la forme d'accumulation spécifique normale (Pl. XVIII, fig. 2 et Pl. XIX, fig. 2).

Par contre, il n'en a pas été observé sur les milieux usuels, contenant 2 % de glucose ou 3 % de saccharose, chez *Castanea vesca* et *Populus tremula*. En utilisant des milieux contenant des concentrations croissantes : 2 %, 4 % et 8 % de glucose, il n'a pas été possible de provoquer la formation de réserves amylacées chez le tissu de *C. vesca* sur lequel la concentration de 8 % exerce déjà un effet toxique. Au contraire, sur milieu à 8 % de glucose, le tissu de *P. tremula* accumule d'abondantes réserves amylacées (Pl. XIX, fig. 3).

D) Lignification

Des coupes ont été soumises aux réactions classiques des membranes lignifiées avec les résultats suivants :

TABLEAU XIX

Essences	Milieu	Age des cultures en mois	Constituants et réactions						
			A		B		C	D	E
			Vert d'iode	Cross et Bevan	Phloroglucinol	Indol	Méthyle	Combes	Orcine
<u>P. tremula</u>	B	5	+	+	+	+	-	+	-
	III	5	+	+	+	+	-	+	-
<u>Betula verrucosa</u>	B	6	+	+	+	+	-	+	-
	B	6	+	+	+	+	-	(1)	-
<u>Quercus sp.</u>	B+I β 10 ⁻⁷	6	+	+	+	+	-	(1)	-
	B+I β 10 ⁻⁶	6	+	+	+	+	-	(1)	-
	B+I β 10 ⁻⁶	6	+	+	+	+	-	(1)	-
<u>Castanea vesca</u>	II modifié	6	+	+	+	+	-	(1)	-

(1) Chez ces deux essences, la carbonisation instantanée des membranes n'a pas permis d'observer l'apparition de la teinte rouge caractéristique.

Chez les quatre essences étudiées, la réaction de Maule et celle de l'orcine ont donc été négatives. Quelle que soit l'interprétation chimique, très discutée, de ces réactions, il apparaît donc que la lignification des membranes colorables au vert d'iode, au bleu de méthylène ou à l'hémalum est incomplète.

Aldéhyde syringique et alcool coniférylique. — Du tissu de *C. vesca* a été cultivé sur milieu III additionné d'aldéhyde syringique et d'alcool coniférylique à la concentration de 10^{-4} . Ces substances n'ont manifesté aucune action sur la différenciation cellulaire ni l'organisation du tissu, mais une proportion notablement plus forte de cellules de parenchyme possède des membranes colorables par le bleu de méthylène. Il y a donc eu une action positive marquée sur le processus chimique de lignification.

Quelques essais ont été tentés pour rechercher si la vanilline, l'eugénol ou l'isoeugénol pouvaient être utilisés par les tissus comme précurseurs de lignine.

La vanilline a été essayée à la concentration de 10^{-4} sur les premiers isollements de :

— *Q. sessiliflora* (prélèvements des 13 sept. 1953, 7 déc. 1953, 25 juin 1954, 27 juin 1955).

- *U. campestris* (prélèvement du 7 déc. 1953).
- *B. verrucosa* (29 juin 1954).
- *T. parvifolia* (13 février 1955).
- *P. excelsa* (22 déc. 1953).

Dans aucun cas cette substance n'a modifié la proportion de cellules lignifiées ni les caractères de ces cellules. Il en a été de même pour les tissus repiqués de *C. vesca*.

L'eugénol a été essayé à la concentration de 10^{-5} sur les tissus repiqués de *P. avium* et *C. vesca*, l'isoeugénol à la même concentration sur tissu de *C. vesca*. Ici encore aucune modification de la différenciation et de la lignification des cellules n'a été observée.

Interprétation des résultats

Analyse des facteurs agissant sur la différenciation

De ces résultats il ressort que les tissus formés par le cambium cultivé *in vitro* diffèrent profondément du liber et du bois normal de l'essence. La plupart des types cellulaires (fibres libriformes, parenchyme ligneux, fibres trachéides) n'y sont jamais représentés. Les vaisseaux normaux se rencontrent chez certaines essences mais plus fréquemment les cellules lignifiées sont des trachéides réticulées, analogues à celles des tissus de transfusion et sans équivalent dans le bois normal de l'espèce, ou des types intermédiaires entre ces trachéides et les vaisseaux.

Comme nous l'avons précédemment souligné, le cambium est normalement soumis à des conditions mécaniques, physiques et chimiques définies :

- a) pression radiale égale à $-\frac{T}{R}$, T étant la tension tangentielle de l'ensemble des tissus du liber et de l'écorce, R le rayon de l'arbre ;
- b) protection contre la dessiccation par le liège de l'écorce ;
- c) libre accès des facteurs chimiques émanant de la cime ou des racines de l'arbre.

Pour le tissu cultivé *in vitro* au contraire, ces conditions sont profondément modifiées : la pression radiale est éliminée, la teneur en eau des tissus est fonction de l'équilibre qui s'établit entre leur atmosphère interne et celle du récipient de culture. Enfin toute liaison est coupée avec la cime et avec l'appareil racinaire.

Il est donc intéressant de comparer la structure des tissus formés dans les conditions extrêmes : culture *in vitro* et croissance normale dans l'arbre intact, avec les structures apparaissant dans des conditions intermédiaires :

- 1 --- annulation de la pression radiale, les autres conditions restant inchangées ;

- 2 — maintien de la pression radiale, le cambium étant séparé de la cime mais non des racines ;
- 3 — maintien de la pression radiale, le cambium étant séparé à la fois de la cime et des racines ;
- 4 — action de perturbations chimiques sur le cambium *in situ* dans l'arbre intact.

1 — *Annulation de la pression radiale.* — Cette condition est réalisée sur les bords verticaux d'une blessure interrompant sur une certaine surface la continuité des tissus de l'écorce, du liber et du cambium. Le cambium bordant cette lacune prolifère en formant un bourrelet cicatriciel dont la structure offre un élément de comparaison important. On doit, il est vrai, remarquer que la mise à nu d'une certaine surface du corps ligneux entraîne une dessiccation des tissus et que, par suite, la disparition de la sollicitation mécanique s'accompagne d'une modification des conditions physiques. Toutefois, en même temps que le cambium prolifère, il se reconstitue rapidement, à la surface des tissus lésés du liber, une assise péridermique formant une couche de liège qui protège les tissus néoformés contre la dessiccation et rétablit, à bref délai, des conditions physiques très voisines de la normale.

En considérant le cas simple d'une blessure rectangulaire limitée par deux segments de génératrices du tronc et deux arcs de cercle horizontaux, le cambium des bords verticaux ne subit plus de pression radiale, alors que celui des bords horizontaux reste soumis aux sollicitations mécaniques normales. Les modifications des conditions physiques sont les mêmes dans les deux cas. Au point de vue chimique, l'afflux de substances provenant des autres parties de l'arbre subsiste. La principale modification des conditions chimiques, tout au moins dans certains cas, est la formation d'hormones de blessure.

Les processus de cicatrisation des organes ligneux sont des notions classiques de pathologie forestière. Le développement et la progression du bourrelet cicatriciel ont été décrit par R. HARTIG (90), sa structure par H. de VRIES (195). Cette structure s'éloigne peu de la structure spécifique du bois normal : on y retrouve les types cellulaires caractéristiques de l'espèce. Mais, indépendamment des irrégularités géométriques dues à la courbure imposée aux cellules par les relations de position entre elles et les tissus préexistants non lésés, on observe cependant certaines modifications du plan ligneux. En particulier, la proportion relative des vaisseaux des fibres ou des fibres-trachéides est moindre, celle du parenchyme ligneux beaucoup plus élevée que dans le tissu normal. On n'observe aucune différence anatomique entre les zones latérales et les zones horizontales, supérieure et inférieure, du bourrelet (Pl. XXI, fig. 1).

2 — *Maintien de la pression radiale, le cambium étant séparé de la cime.* — Ces caractères anatomiques du bourrelet cicatriciel, où le cambium reste en liaison avec la cime et le système radiculaire, donnent déjà à penser que la pression radiale à laquelle il est normalement soumis n'intervient pas dans l'organisation des tissus néoformés.

Si maintenant on considère le cambium de la base du tronc d'un arbre abattu, ce tissu reste soumis aux sollicitations mécaniques normales et aussi, si on prend soin de choisir pour les prélèvements un point assez éloigné de la section, aux conditions physiques normales. Il reste relié au système radiculaire mais, à condition qu'il ne se forme aucune pousse adventive ou proventive, est totalement isolé des organes chlorophylliens. Dans ces conditions, l'activité du cambium se maintient pendant plusieurs mois et il se forme une nouvelle zone de tissu. La structure de ces tissus a été étudiée sur des prélèvements pratiqués à l'automne sur des chênes abattus soit au cours de l'hiver précédent, soit au mois de juin. Les arbres choisis étaient âgés de plus de 200 ans, ce qui excluait toute possibilité de développement de bourgeons proventifs, la faculté de produire des rejets s'éteignant vers 100 ans chez les chênes. Il a d'ailleurs été vérifié au moment du prélèvement qu'aucun rejet n'était apparu. Dans les deux cas la structure des tissus néoformés a été trouvée identique à celle observée dans les explantats de la même essence prélevés suivant la méthode de GIOELLI et cultivés *in vitro*. Chez l'arbre abattu en juin, la zone de tissu formé après la coupe succède à la zone normale du bois de printemps, à gros vaisseaux, dont la formation est normalement achevée vers le début de ce mois (Pl. IX, fig. 3).

Chez le chêne abattu en hiver, la zone de tissu néoformé succède directement à la dernière assise de l'accroissement de l'année précédente, caractérisée, suivant la règle générale, par l'aplatissement dans le sens radial des cellules qui la composent. Comme dans le cas des cultures *in vitro*, les îlots de cellules lignifiées sont séparés du bois normal préexistant par du parenchyme non différencié (Pl. III, fig. 1).

3 — *Maintien de la pression radiale, le cambium étant séparé à la fois de la cime et des racines.* — Ces conditions sont réalisées par la culture de rondelles épaisses ou de courts billons prélevés dans la tige d'un arbre et dont la base baigne dans l'eau. Cette expérience a été réalisée chez trois essences: *B. verrucosa*, *Q. pedunculata* et *Fagus sylvatica* L. (2 prélèvements). Les prélèvements ont tous été opérés en hiver (novembre et janvier). Comme il a déjà été exposé précédemment, les tissus néoformés présentent, dans tous les cas, exactement la même structure que les tissus formés dans les cultures *in vitro* ou à la base d'arbres décapités (Pl. X, fig. 1).

4 — *Action de perturbations chimiques sur le cambium in situ dans l'arbre intact.*

Actions parasitaires. — En faisant abstraction des parasites provoquant des nécroses étendues, susceptibles de modifier profondément les conditions physiques où se trouvent placés les tissus non atteints, voire l'équilibre physiologique général du végétal, certaines attaques parasitaires du corps ligneux peuvent se traduire par une action limitée à une modification locale de structure. Dans ce cas, les méristèmes qui édifient des tissus anormaux restent soumis aux mêmes conditions mécaniques et physiques que les tissus qui les entourent et dont l'activité normale se poursuit. Seules les conditions chimiques sont modifiées, généralement à la suite de l'émission par l'organisme parasite de substances capables d'agir sur la multiplication ou sur la différenciation des cellules. Ce processus est à l'origine de la formation des galles, constituées par des masses de tissus entièrement différents des tissus normaux de l'hôte, mais pouvant présenter une organisation bien définie, quoique très différente de celle de l'organe attaqué, comme c'est le cas pour les galles provoquées sur les rameaux d'*Epicéa* par les *Adelges*, et dont la structure rappelle celle des cônes. Beaucoup d'Aphides provoquent des déformations et des anomalies de structure des organes atteints. NYSTERAKIS (154, 155) a montré, dans le cas d'un Aphide qui attaque les rameaux de *Prunus*, que ces insectes instillent dans les tissus de l'hôte de l'acide β -indolyl-acétique qui provoque des déformations de ces rameaux. Il n'a toutefois pas décrit la structure anatomique des organes atteints. Les attaques d'*Agrilus biguttatus* (Coléopt. *Buprestidae*) sur les Chênes ont été étudiées au point de vue anatomique, physiologique et biochimique par JACQUIOT et Mme J. GUILLEMAIN (101, 104, 105, 111). Les larves de cet insecte à cycle vital annuel forent leurs galeries dans le liber des chênes âgés à rhytidome épais. Elles élaborent des substances excitatrices provoquant des anomalies de l'organisation du bois portant sur deux ou trois accroissements annuels (JACQUIOT, 105). Ces substances imprègnent les déjections larvaires accumulées dans les galeries à partir desquelles elles diffusent dans les tissus environnants. J. GUILLEMAIN (88) a extrait de ces déjections et séparé par chromatographie deux substances différentes qui se sont révélées actives sur des tissus en culture et sur des pousses de chêne (111, 112). Leur concentration dans la vermourure est assez élevée pour provoquer la nécrose d'une mince couche des tissus entourant la galerie, mais au delà de cette zone leur action stimule l'activité de l'assise cambiale ou, si la zone nécrosée affecte le cambium lui-même, provoque, par dédifférenciation d'une zone de cellules du parenchyme libérien, la formation d'une assise de remplacement.

Bien que la durée de passage de la larve dans la galerie soit brève, son cycle vital étant d'une année, l'action des substances qu'elle

émet persiste deux ou trois ans, tant que la concentration de ces substances imprégnant les déjections est suffisante.

Au point de vue anatomique, l'attaque a pour conséquence la formation, sur le secteur voisin de la galerie, d'accroissements annuels plus larges, pouvant englober des îlots de liber interne traversés par la galerie, et dont le plan ligneux est sensiblement modifié: le bois anormal est madré et contraste avec le bois normal de droit fil. Les vaisseaux des deux ou trois accroissements annuels précédant l'année de l'attaque sont obstrués par des thylls. Dans le bois anormal formé à la suite de l'attaque, les rayons et le parenchyme vertical prennent une importance relative plus grande. Les rayons minces, au lieu d'être tous unisériés, sont fréquemment bi ou tri-sériés. Les rayons larges, au lieu de former des feuilletts de grande hauteur, se résolvent en cordons cylindriques séparés par des nappes de tissu formées de parenchyme longitudinal et de fibres-trachéides. Les vaisseaux sont rares et souvent obstrués par des thylls. De même les fibres libriformes subissent une régression très marquée sans cependant disparaître complètement. Les lignes d'accroissement sont flexueuses et les zones d'accroissement plus larges que les zones des régions adjacentes non atteintes. L'anomalie porte donc exclusivement sur le plan ligneux et non sur les types cellulaires qui restent normaux. Les substances actives élaborées par la larve, qui imprégnaient la vermoulure des galeries, diffusent et s'épuisent progressivement en 2 ou 3 ans et on observe parallèlement un retour progressif à la structure normale dans le secteur atteint (Pl. XXIII, fig. 1 et 2).

Chez *Fagus sylvatica* nous avons étudié (120) une anomalie anatomique qui, d'après THOMSEN, BUCHWALD et HAUBERG (192) est due à une attaque de *Cryptococcus fagi*, coccide vivant sur l'écorce de l'arbre. Dans ce cas, la durée d'action du parasite est encore plus faible que dans le cas précédent et la perturbation anatomique ne porte que sur une zone étroite d'un accroissement annuel. La formation du bois initial débute normalement puis apparaît la zone de structure anormale à laquelle succède enfin une zone de bois final normal. L'anomalie de structure de la zone perturbée est caractérisée par la disparition des vaisseaux, des fibres et des fibres trachéides, remplacés par du parenchyme irrégulier, et par la dilatation tangentielle des cellules des rayons ligneux (Pl. XXIV, fig. 1). Après le retour à la structure normale, un ralentissement de l'activité cambiale persiste pendant plusieurs années et se traduit par une dépression de la surface du corps ligneux. Cette déformation entraîne finalement la formation d'une fissure verticale de l'écorce, l'invasion d'une certaine surface de cambium par divers parasites et sa nécrose, suivie d'une réaction de cicatrization.

L'extrait obtenu à partir des Coccides recueillis sur un arbre envahi s'est révélé inhibiteur sur l'élongation du coléoptile de blé (1).

Des champignons parasites ont donné lieu à des observations analogues: Mlle J. BERDUCOU (10, 11) a étudié l'action des *Nectria* parasites d'arbres et montré que ces champignons émettent de l'acide β -indolyl-acétique provoquant la formation de chancres. CAPORALI (19) a décrit les déformations provoquées par *Taphrina deformans* (Berk.) Tal. sur les rameaux de pêcher.

Dans les cas qui viennent d'être examinés, les structures aberrantes résultent de l'intervention de facteurs chimiques qui ont pu être isolés, quoique non identifiés, toutes les autres conditions physiques et mécaniques restant inchangées.

Dans le cas de la « graisse du chêne » étudiée par JACQUIOT et VINEY (113), l'origine de l'anomalie est encore visiblement parasitaire, bien que le parasite n'ait pas encore été identifié. L'anomalie de structure débute brusquement dans l'arbre jeune à partir d'une limite d'accroissement et présente certains caractères communs avec les néoformations provoquées par l'attaque d'*Agrilus biguttatus*: stimulation de l'activité cambiale, raréfaction ou disparition des vaisseaux, extension du parenchyme, disparition des fibres libriformes et des fibres trachéides. On note les années suivantes une évolution vers la structure normale mais, à la différence des tumeurs ligneuses causées par *Agrilus biguttatus*, certaines anomalies du plan ligneux persistent, au niveau de l'attaque primitive, pendant toute la vie de l'arbre (Pl. XXIV, fig. 2).

D'autres anomalies, dont certaines sont depuis longtemps classiques, semblent aussi impliquer l'intervention de perturbations chimiques internes, bien que les causes initiales qui font apparaître ces structures aberrantes soient de nature très différente.

De telles formations pathologiques, dont l'apparition est provoquée par divers agents extérieurs: gel, échauffement dû au passage d'un incendie, attaque d'insectes xylophages, présentent des anomalies pouvant parfois aller jusqu'à l'apparition de types cellulaires complètement anormaux pour l'espèce considérée. Ces anomalies n'intéressent qu'une zone d'accroissement ou une partie de cette zone et font rapidement place à la structure spécifique normale. L'assise cambiale n'est pas nécrosée et l'activité des divisions n'est pas modifiée, mais le processus de différenciation est momentanément perturbé. Chez divers Conifères les grands froids provoquent la formation au printemps suivant de cordons de tissu irrégulier, formé de trachéides courtes, occupant dans l'accroissement annuel la même largeur que les tissus normaux contigus et auquel succèdent rapidement des tissus normaux. La Pl. XXI, fig. 1 et 2, en offre un exemple, observé chez *Taxodium distichum*. Dans ce cas

(1) Cet essai a été fait par Mlle PAUPARDIN dans le service de M. le Professeur GAUTHERET.

les tissus irréguliers sont formés par des types cellulaires normaux. Seules les dimensions et la forme des cellules sont modifiées. Les trachéides sont courtes et sinueuses mais pourvues de ponctuations aréolées normales, les cellules de parenchyme, de forme et de dimensions très variables, ont néanmoins des ponctuations normales: ponctuations taxodioides ou cupressoides au contact des trachéides, ponctuations simples entre cellules de parenchyme. Il semble que cette anomalie résulte en fait d'un retard de la différenciation par rapport aux trachéides placées dans le même secteur au-dessus et au-dessous des trachéides aberrantes. Le processus d'élongation de ces dernières ne commence que lorsque ces trachéides normales sont déjà différenciées et lignifiées et forment alors une butée rigide qui s'oppose à l'élongation des cellules retardataires. Celles-ci, au lieu de s'insinuer entre les extrémités des autres en formant de longs biseaux aplatis, viennent buter contre elles, leurs parois terminales prennent une direction transversale et leurs parois longitudinales se déforment sous l'effet de la pression axiale qui agit comme un microflambage localisé.

Une anomalie plus frappante encore peut s'observer chez la plupart des espèces de Conifères, notamment des *Abies*, normalement dépourvus de canaux résinifères: des traumatismes très divers, tels que le passage d'un incendie, provoquant la formation de canaux résinifères (canaux traumatiques) disposés en lignes tangentielles ou obliques (Pl. XX, fig. 2).

Les Eucalyptus enfin offrent fréquemment une anomalie de structure très marquée étudiée par JACQUIOT et Mlle HERVET (114) « les poches à Kinos » qui s'intercalent au sein de tissus normaux sans qu'il y ait ni lésion ni interruption d'activité de l'assise cambiale. Plusieurs assises successives de cellules se différencient en parenchyme ligneux au sein duquel apparaissent des canaux tapissés par une assise génératrice cyclisée. Cette assise forme un certain nombre de couches de cellules de parenchyme comparable par sa structure à un phelloderme et, vers la surface interne du canal, quelques couches de cellules subérifiées. Dans la cavité du canal s'accumulent des produits complexes, mélanges de gommes et de tanins désignés en Australie sous le nom de « Kinos ». Ici encore, cette perturbation de la différenciation et de l'organisation peut être déterminée par des causes variées: attaques de xylophages, ou de mineuses du cambium, incendie, sécheresse prolongée.

Le cas des « poches à Kinos » représente, parmi les anomalies de structure apparaissant en dehors de lésion ou de nécrose de l'assise génératrice, un cas extrême, comportant la formation d'assises génératrices cyclisées et de cellules non lignifiées, caractères qui présentent quelque analogie avec les structures de tissus cultivés *in vitro*.

Qu'elles proviennent de l'émission de substances spécifiques par un parasite ou de divers traumatismes, toutes ces anomalies ont

pour caractère commun de n'être pas liées à une destruction ou à une transformation irréversible de l'assise génératrice. Ces troubles n'intéressant que les processus de la différenciation et non la faculté de division des cellules de l'assise génératrice: même lorsque leur activité est temporairement stimulée, ces cellules retrouvent intégralement leurs potentialités lorsque la cause perturbatrice cesse d'agir et on observe alors un retour plus ou moins prompt vers la structure normale. Ni les conditions mécaniques, ni les conditions physiques, ni les liaisons anatomiques avec l'ensemble de l'organisme n'ayant varié, les tissus subissant des traumatismes ou ces actions parasitaires se trouvent dans des conditions très éloignées de celles auxquelles sont soumis les tissus excisés et cultivés *in vitro*. Ils offrent par conséquent un élément de comparaison particulièrement intéressant avec les structures des tissus en culture.

Comparaison des résultats. — La comparaison des tissus formés par le cambium dans ces conditions très diverses montre ainsi:

- 1° que l'action mécanique de la tension de l'écorce ne joue aucun rôle: la structure d'un bourrelet cicatriciel est la même sur les bords horizontaux d'une blessure, où cette tension subsiste, et sur les bords verticaux, où elle est nulle. De même, la structure des tissus est identique à la base d'un arbre abattu, dans un billon cultivé dans l'eau ou dans des explantats cultivés *in vitro* bien que dans les deux premiers cas le cambium reste soumis à cette tension, alors qu'elle a disparu dans le troisième;
- 2° que, en ce qui concerne les conditions physiques, la comparaison de la structure des bourrelets cicatriciels avec celle du bois normal peut laisser supposer qu'une dessiccation partielle des tissus exercerait une certaine action. Cette action se limite toutefois à une variation des proportions relatives des différents types cellulaires qui, par ailleurs, restent normaux;
- 3° que ce sont les facteurs chimiques qui jouent le rôle essentiel dans l'organisation des tissus néoformés. Parmi ces facteurs, ceux qui pourraient provenir des racines, en admettant qu'il en existe et qu'ils soient nécessaires, ne sont pas suffisants, la structure étant la même à la base d'un arbre abattu ou dans la tige d'un arbre écimé ou ébourgeonné, alors que les liaisons avec le système racinaire sont intégralement maintenues, ou dans un billon cultivé dans l'eau et dans des explantats cultivés *in vitro*, où ces liaisons sont totalement supprimées.

Par contre, la coupure des liaisons avec la cime entraîne la formation d'une structure entièrement aberrante caractérisée par:

- la disparition totale des fibres libriformes, des fibres-trachéides, du parenchyme ligneux et parfois de toute cellule lignifiée (*P. avium*):

- l'apparition fréquente de trachéides réticulées, analogues à celles des tissus de transfusion, sans équivalent dans le bois normal;
- la modification plus ou moins accentuée des vaisseaux. Cette modification peut se limiter à une réduction des dimensions, les caractères des ponctuations et des perforations restant normaux (*B. verrucosa*, *P. tremula*) mais elle peut, en outre, comporter la disparition des épaississements spiralés chez les essences qui en sont pourvues (*U. campestris*, *T. parvifolia*). Plus fréquemment (*C. vesca*, *F. sylvatica*, *Quercus* sp., *P. pseudoacacia*, *F. excelsior*) les vaisseaux présentent à la fois des ponctuations circulaires et des ponctuations scalariformes et constituent ainsi une forme intermédiaire entre les trachéides réticulées et les vaisseaux à ponctuations aréolées normaux;
- l'absence d'organisation d'ensemble du tissu.

Dans le cas de perturbations chimiques d'origine pathologique, dues à l'intervention de facteurs étrangers:

- le plan ligneux peut être modifié plus ou moins profondément mais, en général, les tissus restent organisés. Dans un seul cas (attaque de *Cryptococcus fagi* sur le hêtre) on observe la formation de tissu totalement dépourvu d'organisation.
- certains types cellulaires peuvent disparaître mais ceux qui subsistent sont normaux. C'est en général le parenchyme ligneux qui devient prépondérant alors que les fibres trachéides, mais surtout les fibres libriformes et les vaisseaux, subissent une régression très marquée.

En considérant l'ensemble des structures anormales provoquées par toutes les actions physiques ou chimiques envisagées, on peut remarquer que les différents types cellulaires présentent une sensibilité très différente à ces perturbations:

- les *fibres* et les *fibres-trachéides* sont les éléments les plus sensibles. Elles disparaissent totalement si les liaisons avec la cime sont coupées mais aussi dans les « poches à Kinos » d'*Eucalyptus marginata*, sous l'influence de l'attaque du *Cryptococcus fagi* et au premier stade de la formation de la graisse du chêne. Elles se raréfient dans les bourrelets cicatriciels, après les attaques d'*Agrilus biguttatus*, dans la graisse du chêne à son stade définitif;
- le *parenchyme ligneux* disparaît complètement après coupure des liaisons avec la cime mais prend une importance considérable dans les structures pathologiques: bourrelets cicatriciels, ou néformations d'origine parasitaire dont il est parfois l'unique constituant (attaque de *Cryptococcus fagi*, premier stade de la graisse du chêne, « poches à Kinos »);

- les vaisseaux sont les seuls éléments lignifiés normaux qui subsistent, plus ou moins modifiés d'ailleurs, dans les tissus cultivés *in vitro*. Par contre, ils se raréfient dans les bourrelets cicatriciels, dans les néoformations provoquées par l'*Agriolus biguttatus*, et disparaissent au premier stade de la graisse du chêne, dans les tissus entourant les « poches à Kinol », comme dans ceux qui se forment sous l'action de *Cryptococcus fagi*.

Ces résultats conduisent donc à envisager l'existence de facteurs d'organisation, substances chimiques particulières, élaborées au moins en partie par les organes chlorophylliens, et nécessaires à l'organisation des tissus secondaires. Lorsque leur concentration tombe au-dessous du seuil d'action, les tissus formés ultérieurement sont dépourvus d'organisation. Si les tissus recèlent au moment de leur isolement une réserve suffisante de tels facteurs d'organisation, le cambium édifie pendant un certain temps, et jusqu'à épuisement de ces réserves, des tissus organisés, ainsi qu'il a été constaté chez trois espèces du genre *Quercus* (Pl. III) et chez *F. excelsior* (Pl. V).

Action du greffon sur le sujet. — Il convient, pour confirmer cette hypothèse, de rechercher s'il est possible de maintenir ou de rétablir la formation de tissus organisés dans des organes séparés de la cime ou des colonies tissulaires. L'anatomie des arbres greffés donne une première réponse affirmative à cette question: le cambium d'un sujet de l'arbre greffé continue à édifier des tissus secondaires normaux alors qu'en l'absence de greffon il formerait des tissus aberrants, identiques à ceux obtenus dans les cultures *in vitro*. On doit remarquer, en outre, que les greffes usuelles sont souvent interspécifiques ou même intergénériques (poirier sur cognassier, pêcher sur prunier, etc.) et que néanmoins la structure du sujet reste conforme à sa structure spécifique. Un cas très typique à cet égard est celui d'un châtaignier greffé sur chêne, qui vécut jusqu'à un âge très avancé au jardin botanique de Dijon. La structure du bois du sujet n'offre aucune anomalie et, au niveau de la greffe, on observe dans les tissus, parfaitement soudés, le passage du plan ligneux du chêne, caractérisé notamment par la présence simultanée de rayons ligneux unisériés et plurisériés, à celui du châtaignier pourvu exclusivement de rayons unisériés (Pl. XXII, fig. 1 et 2).

Action des bourgeons. — En ce qui concerne les tissus de végétaux ligneux cultivés *in vitro*, la greffe de bourgeons a été réalisée, comme il avait été rappelé précédemment par CAMUS (18) sur *U. campestris* et par WETMORE (209, 210) sur *Syringa lilac*. Ces auteurs ont constaté dans les deux cas que cette greffe induisait la formation de vaisseaux.

Les tissus de tremble et de bouleau cultivés *in vitro* émettent, dans certaines conditions, des bourgeons qui se développent en pousses. La structure des colonies ayant produit des pousses ne diffère pas de celle des colonies qui en sont dépourvues et qui, comme il a déjà été précédemment indiqué, présente chez ces deux essences des vaisseaux normaux. Cependant la présence des pousses n'induit pas la formation d'autres éléments lignifiés : fibres, parenchyme ligneux (1).

Il était, par ailleurs, intéressant d'étudier l'action des bourgeons sur le tissu de châtaignier qui, après un certain nombre de repiquages, n'offre plus d'organisation, en répétant sur ces tissus les expériences de CAMUS et de WETMORE.

La technique utilisée a été la suivante : à la fin de l'hiver des rameaux de *Castanea* sont coupés en tronçons assez courts pour pouvoir être immergés dans un bécier contenant une solution d'hypochlorite de calcium à 6 %. Après un séjour d'une douzaine d'heures dans l'antiseptique, ils sont rincés à l'eau stérile. Les bourgeons sont sectionnés à leur base et immédiatement placés dans des boîtes de Pétri stériles. Ils sont ensuite dépouillés de leurs écailles — ces organes sont en effet toujours infestés de champignons qui, sans doute protégés par le revêtement cutinisé, résistent au passage dans l'hypochlorite. Malgré ces précautions, une proportion encore élevée de bourgeons peut encore receler des spores et, avant de procéder à la greffe, il est prudent de placer les bourgeons en attente sur un milieu de culture contenant un sucre. Les bourgeons qui, après une semaine, sont révélés exempts de champignons ou de bactéries sont alors utilisés pour l'expérience. La forme des colonies de tissu de châtaignier, généralement divisés en lobes à base étroite et mince, les rend fragiles et il est très difficile d'y pratiquer une entaille pour y loger la base taillée en biseau du bourgeon. De plus, la surface sectionnée des tissus se revêt presque toujours d'une couche de liège et le bourgeon se dessèche, même s'il reste en place. Enfin la croissance des colonies est très irrégulière et il en résulte des déformations qui déplacent le bourgeon et le font tomber. La proportion des cas où le bourgeon reste en place sans se dessécher est à peine de un sur vingt. Lorsque cette condition est réalisée, les types cellulaires normaux réapparaissent dans les tissus. Les fig. 2 de la planche XV et 1 et 2 de la planche XVI montrent des détails de la structure d'une colonie de tissu de *Castanea* sur laquelle une greffe de bourgeon a pu être obtenue. Ce tissu, déjà repiqué 30 fois, ne présentait plus qu'exceptionnelle-

(1) L'apparition du cambium chez ces pousses néoformées est très tardive et commence à peine à leur base après 6 mois. Il n'est donc pas surprenant qu'elles n'exercent pas encore d'action organisatrice sur les tissus de la colonie. Un retard comparable s'observe aussi chez les rejets adventifs et soulève la question du rôle possible d'une *maturation* des meristèmes primaires.

ment des éléments isolés de vaisseaux à épaississements réticulés (Fig. 1, Pl. XIV).

Le tissu porte-greffe comporte, au contraire, des éléments d'assise génératrice, de nombreux vaisseaux, les uns réticulés, les autres aréolés, des fibres trachéides, des fibres libriformes, du parenchyme ligneux et s'il n'apparaît pas encore d'organisation d'ensemble, ces éléments étant présents par îlots dispersés dans le parenchyme, une organisation locale se manifeste dans certains de ces groupes.

Ce résultat confirme donc les observations portant sur la structure anatomique des sujets des arbres greffés et montre que l'organisation des tissus secondaires est déterminée par des facteurs chimiques provenant essentiellement des bourgeons ou des pousses (118).

En ce qui concerne la nature de ces substances, les caractères fournis par des greffes interspécifiques ou intergénériques montrent que les facteurs nécessaires à l'organisation sont communs au moins aux espèces d'un même genre, voire d'une même famille. On est donc conduit à supposer que ces facteurs pourraient se trouver parmi les substances normalement élaborées par les organes chlorophylliens : auxines, vitamines, acides aminés, etc... et à examiner si de telles substances sont susceptibles d'agir, isolément ou en synergie, sur l'organisation des tissus néoformés.

Action des auxines.

En ce qui concerne les auxines, le résultat obtenu par R. J. GAUTHERET sur tissu de *Salix caprea* (66) avait fourni un exemple où l'auxine agit comme facteur d'organisation. L'action de l'auxine a été essayée sur les premiers isolements de diverses essences. Dans certains cas, la présence d'auxine a augmenté l'importance des formations lignifiées. Chez *Fagus sylvatica* les explantats cultivés sur milieu contenant de l'acide β -indolyl-acétique à 10^{-6} présentaient après 2 mois de culture des îlots lignifiés plus étendus que les témoins. Chez *Fraxinus excelsior*, seuls les explantats cultivés sur milieu contenant de l'acide β -indolyl-butyrique à 10^{-5} ont formé des îlots lignifiés. Toutefois, dans les deux cas, l'action de l'auxine est purement quantitative : les formations lignifiées consistent toujours comme en l'absence d'auxine, en îlots de cellules aberrantes : trachéides réticulées pouvant comporter aussi des vaisseaux à ponctuations aréolées, et il n'est apparu aucun des autres éléments normaux : fibre, fibres-trachéides ou parenchyme ligneux. L'auxine n'apparaît donc chez ces essences que comme l'un des facteurs pouvant jouer un rôle dans la différenciation de cellules lignifiées. Avec les autres essences : *Quercus pedunculata*, *Q. sessiliflora*, *Q. suber*, *C. vesca*, l'action de l'acide β -indolyl-acétique a été nulle, mais comme nous l'avons vu précédemment (Chap. I), son action est

également nulle sur la croissance des tissus des espèces du genre *Quercus* et de *C. vesca* et il est même établi pour cette dernière essence que l'auxine naturelle est une autre substance, de nature inconnue. Les mêmes constatations ont été faites sur l'acide β -indolylbutyrique, l'acide α -naphthyl-acétique, l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique.

Parmi les tissus repiqués qui ne peuvent croître sans addition d'auxine, celui de *P. tremula* forme des vaisseaux normaux, ceux de *T. parvifolia* et *U. campestris* des vaisseaux normaux ou ne différenciant des vaisseaux normaux que par l'absence d'épaississements spirales, ceux de *P. avium*, sont, sauf exception, constitués exclusivement de parenchyme à membranes cellulósiques. Chez ceux de ces tissus formant des vaisseaux, il n'est pas possible de déterminer l'action propre de l'auxine sur la différenciation puisque, en l'absence de cette substance, la croissance s'arrête et qu'il ne se forme plus de nouveaux tissus chez les témoins.

Parmi les tissus croissant sans auxine, celui de *C. vesca* ne présente que de rares cellules lignifiées aberrantes et celui de *B. verrucosa* des vaisseaux normaux. Pour la première espèce, la présence d'auxine dans le milieu commence à inhiber la croissance à partir de 10^{-7} et même aux concentrations fortement inhibitrices (10^{-6} et au-dessus) on n'observe aucune modification de la structure. D'ailleurs, comme on l'a vu précédemment, l'auxine naturelle de ce tissu est une substance inconnue, autre que l'acide β -indolyl-acétique. De même chez *B. verrucosa* les acides β -indolyl-acétique et α -naphthyl-acétique n'exercent aucune action sur la croissance jusqu'aux concentrations où ils manifestent une action inhibitrice, ces concentrations étant d'ailleurs plus élevées que pour le tissu de *C. vesca*. Pour aucune concentration on n'observe de modification de la structure par rapport aux témoins cultivés sur milieu sans auxine.

Il apparaît donc que si, dans certains cas, l'auxine a manifestement agi comme facteur d'organisation, dans d'autres cas son action a été nulle. Ces résultats négatifs n'excluent d'ailleurs pas qu'elle soit un facteur nécessaire à l'organisation, mais montrent seulement qu'elle n'est pas un facteur suffisant.

Inversement, l'apport d'auxine sur des tissus se trouvant dans les conditions normales dans l'arbre sur pied et n'ayant subi aucune mutilation provoque des perturbations dans leur structure. Outre les observations de NYSTERAKIS déjà mentionnées sur les déformations des rameaux de *Prunus* induites par l'acide β -indolyl-acétique injecté par des Aphides, il y a lieu de citer à cet égard les expériences de LEROUX (133) sur trois espèces de *Salix*: l'application sur les rameaux, par pulvérisation, d'une solution d'acide α -naphthyl-acétique fait apparaître des structures aberrantes caractérisées notamment par une réduction de la région vasculaire et présentant beaucoup d'analogies avec les structures des tissus cultivés *in vitro*.

Vitamines.

Aucune des vitamines essayées (cf. Chapitre I) sur les tissus de diverses essences n'a entraîné de modification de la structure de ces tissus. Il en a été de même des milieux complexes contenant 9 vitamines: aneurine, riboflavine, adermine, acide pantothénique, biotine, mésoinositol, nicotinamide, acide para-aminobenzoïque, acide folique, essayés sur des cultures de *C. vesca*, *P. tremula* et *B. verrucosa*.

Bases puriques et pyrimidiques.

L'adénine, seule ou associée à la guanine, à la thymine, à l'uracile et à la cytosine, a fait l'objet de nombreux essais en vue d'étudier son action sur la formation des bourgeons (cf. chap. II et chap. IV).

Tous les milieux contenaient, outre ces substances, les quatre vitamines généralement utilisées: aneurine, pantothénate de calcium, biotine et mésoinositol, auxquelles étaient associées dans certains essais une ou plusieurs des autres vitamines: riboflavine, pyridoxine, nicotinamide, acide folique, acide para-aminobenzoïque. D'autres milieux contenaient également du ribose, du chlorhydrate de cystéine, du glyocolle.

L'action de ces milieux complexes a été essayée sur tissus de *P. tremula*, *C. vesca*, *B. verrucosa*, *P. avium*. Les résultats ont été constamment négatifs.

Il en a été de même pour la cinétine essayée à la concentration de 10^{-5} sur tissu de *C. vesca* et *B. verrucosa*.

Substances diverses.

Gibberelline: Le produit utilisé était impur et contenait 10 % de gibberelline. A la concentration de 10^{-5} , soit 10^{-6} de gibberelline, il n'a exercé aucune action sur l'organisation des tissus de *P. avium* et *C. vesca*.

Cancérogènes. — L'action du 20-méthylcholanthrène, du 9.10-diméthyl-1.2 benzanthrène et du 2-acétylaminoanthracène a été essayée sur tissu de *C. vesca* cultivée sur milieu liquide suivant la méthode de HELLER. La substance à essayer dissoute dans l'acétone était introduite en imprégnant les diaphragmes de papier filtre au moyen d'une quantité connue de cette solution à raison de 100 γ par tube, suivant la technique décrite dans la II^e Partie. Après évaporation du solvant, chaque tube recevait 25 ml de milieu liquide préalablement stérilisé. Ce milieu était soit le milieu II, soit le milieu III additionné des substances suivantes: pyridoxine 10^{-6} , nicotinamide 10^{-6} , glyocolle 5.10^{-6} , chlorhydrate de cystéine 10^{-5} , adénine 10^{-4} .

Aucune action sur l'organisation n'a été observée.

Vanilline, eugénol et isoéugénol. — Ainsi qu'il a déjà été indiqué plus haut à propos de la lignification, la vanilline à la concentration de 10^{-4} n'a pas modifié l'organisation des tissus de *Q. sessiliflora*, *B. verrucosa*, *U. campestris*, *T. parvifolia*, *Picea excelsa*, l'eugénol à 10^{-5} n'a pas manifesté d'action sur ceux de *C. vesca* et *P. avium*, ni l'isoéugénol à la même concentration sur ceux de *B. verrucosa*.

Aldéhyde syringique et alcool coniférylique.

Du tissu de *C. vesca* cultivé sur milieu III additionné de ces deux substances à la concentration de 10^{-4} présente une structure identique à celle du tissu témoin: les rares cellules différenciées sont des trachéides réticulées. Cependant une proportion notablement plus forte de cellules de parenchyme possède des membranes colorables par le bleu de méthylène. L'action de ces substances est donc exclusivement chimique.

Pyrrol et phytol: Comme il a été indiqué au chapitre I, le pyrrol à des concentrations de 10^{-5} à 10^{-4} , seul ou associé au phytol, a été introduit dans des milieux contenant, d'autre part, des vitamines, des bases puriques et pyrimidiques, etc... Dans aucun cas ces substances n'ont agi sur l'organisation des tissus de *C. vesca* et *B. verrucosa*.

Substances naturelles complexes. — Les milieux dans lesquels étaient incorporés des extraits de tissus de tige de tomate ou de cambium d'orme en vue de recherches sur l'organogenèse (cf. chap. IV) n'ont fait apparaître aucune modification de structure chez les tissus repiqués de *C. vesca*.

Il en a été de même pour le lait de coco. D'ailleurs, d'une manière générale, d'après certains résultats, déjà cités, de GAUTHIERET et de BARNOUD, le lait de coco paraît plutôt agir dans le sens de la désorganisation et favoriser la formation de tissus sans consistance.

Enfin une expérience a été tentée pour chercher si des substances organisatrices migrant vers la base de rameaux feuillés pourraient être recueillies pour être introduites dans des milieux de culture.

Les rameaux feuillés de châtaignier dont la base plongeait dans des Erlenmeyer remplis d'eau distillée étaient exposés à l'éclairement diurne naturel pendant 15 jours, le niveau de l'eau étant maintenu constant par des additions quotidiennes. Les récipients étaient protégés de la lumière par un enveloppement de papier noir photographique. Après cette période l'eau servait à la préparation du milieu habituel utilisé pour la culture des tissus de châtaigniers: Solution de Knop diluée de moitié, solution oligodynamique de Berthelot, glucose 2 %, inositol 10^{-4} , aneurine 10^{-6} , pantothénate de calcium 10^{-6} , biotine 10^{-7} . Cette solution était stérilisée par filtration sur bougie puis répartie aseptiquement dans des tubes munis

d'un diaphragme de papier suivant la méthode de HELLER et préalablement stérilisés. Les cultures étaient placées en étuve obscure.

Dans ces conditions, la structure des tissus de *C. vesca* n'a pas été modifiée et est restée identique à celle des témoins. Toutefois le résultat n'a pas été complètement négatif car ces tissus présentaient une plus forte proportion de cellules à membranes lignifiées. Les substances émises par les pousses contenaient donc des facteurs de lignification (vraisemblablement syringine ou coniférine) mais, comme dans les expériences de von WACEK et notre expérience décrite plus haut, leur action était strictement chimique; aucune des cellules à membranes lignifiées n'a acquis les caractères de forme et de ponctuation indiquant même une ébauche de véritable différenciation.

Il n'a donc pas, jusqu'à présent, été possible de composer un milieu de culture provoquant chez les tissus la réapparition des types cellulaires normaux du bois. Si l'acide β -indolyl-acétique a manifesté chez deux essences une action positive sur la différenciation, cette action n'a été que quantitative et a eu pour effet d'étendre des formations lignifiées de structure aberrante. Seule la greffe de bourgeons de *C. vesca* sur tissu de la même essence a pu faire réapparaître des types cellulaires normaux ou presque normaux, et une ébauche d'organisation confirmant d'ailleurs des données classiques sur la structure anatomique des sujets des arbres greffés. Dans le cas de la greffe de bourgeons sur le tissu de *C. vesca*, tissu autotrophe quant à l'auxine et aux vitamines, les facteurs chimiques provenant du bourgeon comprennent des substances, encore inconnues, autres que l'auxine, les diverses vitamines, les bases puriques et pyrimidiques ainsi que les diverses autres substances essayées. Parmi les facteurs inconnus se trouvent vraisemblablement des corps très instables, comme le suggère l'insuccès de la tentative faite pour recueillir et incorporer dans un milieu des substances élaborées par des pousses de châtaignier, malgré les précautions prises contre l'action de la lumière et de la température.

Par ailleurs, les effets d'un excès d'auxine tels qu'ils se manifestent lors d'attaques parasitaires ou dans les expériences comportant un apport d'auxine par injection ou enduction, donnent à penser que l'organisation est liée à un équilibre précis des concentrations des différents facteurs actifs, l'excès de l'un d'eux provoquant immédiatement l'apparition de structures aberrantes et, comme le montre la comparaison de diverses structures pathologiques, les différents types cellulaires manifestent alors une sensibilité différente aux diverses perturbations hormonales.

CHAPITRE IV

Formation d'organes par les tissus cultivés in vitro

A — PREMIERS ISOLEMENTS

1° *Formation de racines.* — Dans les 160 prélèvements, répartis sur 30 essences et pratiqués à toutes les époques de l'année, aucun explantat n'a jamais émis de racine.

2° *Formation de bourgeons.* — Sauf une exception: *P. tremula* (prélèvement du 24 nov. 1951; quelques bourgeons sur 3 explantats) la seule essence dont les explantats ont émis des bourgeons est *Ulmus campestris*. Il a été procédé sur des arbres de cette essence, à différentes époques de l'année, dans plusieurs stations et pendant plusieurs années, à 34 prélèvements en vue d'étudier :

- la vitesse d'apparition des bourgeons;
- les variations individuelles;
- les variations d'activité de la caulogénèse au cours de l'année;
- le comportement comparé du cambium du tronc et des racines;
- l'action de quelques substances définies et de certains extraits végétaux.

Pour l'estimation quantitative de l'activité de la caulogénèse, le nombre de bourgeons formés a été rapporté :

— au cm² de surface cambiale émergée pour les explantats prélevés par la méthode de GAUTHERET;

— au cm linéaire du périmètre émergé de l'explantat dans le cas des prélèvements suivant la méthode de GIOELLI, où tous les bourgeons se forment sur le bourrelet cambial (1).

(1) les très rares exceptions constatées (apparition de bourgeons sur la face libérienne) doivent être attribuées à l'existence de bourgeons proventifs.

Il est également utile de considérer le nombre de pousses formé par explantat. Les dimensions des explantats, qu'ils aient été prélevés suivant la méthode de GAUTHERET ou celle de GIOELLI, variant peu autour d'une moyenne de $3 \times 1,5$ cm, le nombre de pousses par explantat fournit une estimation du potentiel de caulogénèse d'une surface sensiblement constante d'assise cambiale, voisine de 4 cm^2 et permet ainsi, dans une certaine mesure, une comparaison entre les explantats prélevés par les deux méthodes.

La formation des bourgeons commence à se manifester, comme GAUTHERET l'avait déjà indiqué, une dizaine de jours après la mise en culture. Le nombre des bourgeons augmente ensuite progressivement. Il est donc nécessaire, pour comparer entre elles des séries différentes d'explantats, de procéder au dénombrement des bourgeons à des époques déterminées après la mise en culture. Des dénombrements successifs sur les explantats d'une même série ont montré que la courbe représentative du nombre des bourgeons formés en fonction du temps tend vers une asymptote et que, après une trentaine de jours pour les cultures d'été, trois mois pour les cultures d'hiver, l'augmentation du nombre des bourgeons devient négligeable. On peut donc considérer que le nombre des bourgeons formés trente jours en été, trois mois en hiver après la mise en culture, donne une mesure suffisamment exacte du potentiel de caulogénèse des explantats. Le graphique ci-dessous indique pour 7 expériences l'augmentation du nombre des bourgeons en fonction du temps :

Variations individuelles. — Les prélèvements de tissu cambial ont été opérés sur des ormes de trois forêts de Seine-et-Marne : Fontainebleau, Villefermoy et Malvoisine.

A Fontainebleau même le matériel provenait de trois stations différentes, situées dans le 4^e, 13^e et 18^e séries de la forêt domaniale, les deux premières étant distantes entre elles de deux kilomètres et distantes d'environ 8 km de la troisième. Chacune de ces stations comporte une population d'ormes complètement isolée de celle des autres par des peuplements formés exclusivement d'autres essences et on pouvait a priori penser que ces populations étaient génétiquement différentes.

La comparaison de l'intensité de la caulogénèse dans les prélèvements opérés sur différents arbres fait apparaître des variations considérables. L'interprétation de ces différences peut partir de trois hypothèses : différences individuelles, variations au cours de l'année, variations d'une année à l'autre pour un même arbre ou une même population.

On constate tout d'abord que dans une même série d'explantats la dispersion des densités de bourgeons par explantat peut être très élevée. Il arrive, dans certains cas extrêmes, qu'un seul explantat

FIG. 2.

En trait continu, courbes correspondant à des prélèvements suivant la méthode de GAUTHIERET. En ordonnées, densité moyenne des bourgeons au cm².

a	prélèvement du 1-7-51	Milieu B
a ₁	prélèvement du 1-7-51	Milieu B
		+ inos 10 ⁻³
b	prélèvement du 3-7-51	Milieu B
b ₁	prélèvement du 3-7-51	Milieu B
		+ inos 10 ⁻³
c	prélèvement du 10-8-51	

En trait discontinu, courbes correspondant à des prélèvements suivant la méthode de GIOELLI. En ordonnées, densité linéaire des bourgeons:

d	prélèvement du 3-1-50	Milieu B
e	prélèvement du 6-11-50	Milieu B

émette un grand nombre de bourgeons, tous les autres n'en produisant aucun ou que, inversement, dans une série dont la plupart des explantats émettent un nombre élevé de bourgeons, un petit nombre d'entre eux, parfois un seul, n'en forment aucun. Les deux exemples suivants illustrent cette variation dans l'espace des propriétés caulogènes du cambium :

— *Prélèvement du 10 juillet 1949* (Fontainebleau) Milieu B —
Nombre de bourgeons par explantat (18 explantats) le 8 août : 49,2, 11,10, 9,10, 2,11, 0,0, 47, 42, 0, 0,9, 9, 11, 0.

Les explantats étant rangés dans l'ordre de prélèvement, il apparaît ainsi que de petites régions, dont la surface est de l'ordre de grandeur de celle de 1 ou 2 explantats, peuvent présenter des propriétés entièrement différentes de celles des régions adjacentes, des « doublets » tels que 47,42, correspondant à un potentiel caulogène très élevé, pouvant se trouver intercalés entre deux doublets 0,0. Dans cette série l'écart-type des nombres de bourgeons par explantat est égal à 19 pour une moyenne de 12,5 au cm^2 .

— *Prélèvement du 9 novembre 1949* Forêt de Malvoisine (Méthode de GIOELLI). Nombre des bourgeons formés sur 16 explantats le 28 janvier 1950 : 8, 46, 30, 32, 22, 23, 21, 17, 23, 25, 29, 32, 2, 0, 0, 0.

Ici encore on constate l'existence d'une zone où le potentiel caulogène est faible ou nul. La moyenne du nombre de bourgeons par explantat est de 19 avec un écart-type de 13,5.

Ces résultats montrent qu'à un même instant le potentiel caulogène du cambium peut, en certains cas, varier dans de larges limites d'un point à un autre, comme peut varier d'ailleurs, ainsi qu'il a été exposé dans un précédent chapitre, son aptitude à proliférer *in vitro*.

En comparant les résultats fournis par les prélèvements opérés sur des arbres de stations différentes, à différentes années et à des époques différentes de la même année et cultivés sur milieu B, on constate des écarts considérables et significatifs sur les moyennes, comme le montre le tableau suivant, où figurent les résultats de 34 prélèvements dans des stations et à des époques variées, toutes les cultures étant faites sur milieu B.

Variations saisonnières. — Ce tableau semble indiquer dans l'ensemble une activité caulogène maximale de mai à août, bien qu'aient été parfois relevées quelques valeurs très faibles (prélèvement à Fontainebleau 18° Sⁿ 30 juin 1962, à Malvoisine 5 mai et 6 juillet 1952) pour certains individus.

Un fait plus net est l'existence d'un minimum du potentiel caulogène en hiver. Il avait été d'abord observé sur des prélèvements

faits à Fontainebleau (4^e S^{ie}), les 12 février 1949 et 7 mars 1949, qui n'avaient fourni aucun bourgeon alors qu'ils provenaient d'une population où tous les prélèvements d'été avaient produit de nombreux bourgeons. Il a ensuite été vérifié sur des brins de taillis prélevés successivement au cours de l'hiver sur chacune des 3 cépées choisies en forêt de Malvoisine dans 3 parcelles contiguës 43, 45 et 47 de la 1^{re} Série. Sur première cépée (p^{lie} 45 de la 1^{re} série) ont été abattus successivement trois brins les 9 novembre 1949, 6 février et 20 mars 1950. Pour le premier prélèvement, le nombre moyen de bourgeons a été de 19 par explantat, soit 5 au cm, pour le 2^e prélèvement de 4 par explantat ou 0,9 au cm, pour le 3^e de 3 par explantat ou 0,8 au cm. Les deux derniers résultats sont significativement différents du premier au seuil de 10^{-5} mais non significativement différents entre eux. Sur la deuxième cépée (p^{lie} 43 de la 1^{re} S^{ie}) ont été abattus quatre brins les 3 décembre 1949, 3 janvier, 4 mars et 20 mars 1950. Le premier prélèvement n'a fourni aucun bourgeon, le deuxième 9 bourgeons par explantat ou 1,6 environ au cm, avec des écarts considérables: sur 21 explantats 12 n'ont formé aucun bourgeon, 9 de 1 à 20 bourgeons, deux respectivement 24 et 28 et un 65 bourgeons, soit un écart-type de 15,5 sur le nombre de bourgeons par explantat ou de 3 par cm. Le troisième prélèvement a fourni un nombre moyen de bourgeons égal à 7,7 par explantat ou 1,6 au cm environ, non significativement différent du second, avec une dispersion moins grande (écart-type: 9). Pour le quatrième prélèvement la moyenne par explantat, voisine de 6, n'est pas significativement différente des précédentes, la densité linéaire des bourgeons restant égale à 1,6 au cm. La dispersion est encore plus faible: écart-type 3 pour le nombre de bourgeons par explantat et 0,8 pour la densité linéaire.

L'hiver suivant une nouvelle série d'expériences a porté sur une 3^e cépée choisie dans une parcelle voisine des précédentes (1^{re} S^{ie}, p^{lie} 47) en forêt de Malvoisine. Les prélèvements successifs ont été opérés les 6 novembre, 16 décembre 1950, 14 mars 1951.

Le premier prélèvement a fourni une moyenne de 8,5 bourgeons par explantat, soit 2 environ au cm avec des écarts-types de 11 et 2,5 respectivement.

Le deuxième prélèvement n'a fourni aucun bourgeon, le troisième une moyenne de 12 bourgeons par explantat ou 3,5 au cm avec une forte dispersion écarts-types 21 et 5 respectivement).

Dans les trois séries de prélèvements successifs opérés sur trois cépées différentes on a donc constaté chez chaque individu la chute temporaire du potentiel caulogène pendant une période se situant entre décembre et février, le minimum étant nul dans deux des cas étudiés.

Il a paru intéressant en outre de rechercher si l'évolution du potentiel caulogène était liée à la migration de facteurs chimiques

dans le corps de l'arbre ou si elle résultait de transformations chimiques ayant lieu *in situ*. Lors des prélèvements des 9 nov. 1949 (parcelle 45) et 3 déc. 1949 (parcelle 43), un billon avait été réservé et conservé en chambre froide à 3-5°C pour faire l'objet d'un prélèvement après environ deux mois de conservation.

Dans le premier cas, ce prélèvement a été opéré le 2 janvier 1950. Il a fourni une moyenne de 9 bourgeons par explantat, contre 19 pour les explantats mis en culture dès l'abattage, avec un écart-type de 7,5. La densité linéaire est de 2,2 au cm contre 5. Ces résultats sont significativement différents au seuil de 0,02 et montrent qu'il s'est produit *in situ* une diminution du potentiel caulogène.

Dans le deuxième cas, le prélèvement sur le billon conservé depuis le 3 décembre 1949 a été effectué le 27 février 1950. Le nombre moyen de bourgeons formé par explantat a été de 5,5 avec une densité linéaire de 1,5 contre 0 pour les explantats mis en culture immédiatement après le prélèvement avec un écart-type de 5,2 pour le nombre de bourgeons et de 1,5 pour une densité linéaire. Ces résultats sont significativement différents au seuil de 10^{-6} . Ils montrent que le potentiel caulogène de la même tige, nul le 3 décembre avait atteint deux mois et demi plus tard, sans échanges possibles avec les racines ou les rameaux de l'arbre, une valeur positive non significativement différente de celle fournie par la tige de la même cépée abattue vers la même époque (4 mars 1950).

En ce qui concerne les variations individuelles, il apparaît que des prélèvements faits à la même époque de l'année peuvent donner des résultats très différents: tous les prélèvements pratiqués pendant la période mai-août dans la 4^e Série de la forêt de Fontainebleau ont montré un potentiel de caulogène élevé ou très élevé (8 à 20 bourgeons par explantat, 3 à 9 au cm²). Il en a été de même pour les prélèvements de la 13^e Série alors que les deux prélèvements de la 18^e Série, deux prélèvements de Malvoisine, et le prélèvement de Villefermoy ont fourni une densité de bourgeons faible ou très faible (0,2 à 3 par explantat). Il est d'ailleurs vraisemblable — ce que suggère l'homogénéité des résultats obtenus dans les stations où ont été opérés plusieurs prélèvements — que cette propriété peut caractériser une population. Il n'est pas sans intérêt de noter que la population d'ormes de la 4^e série de la forêt de Fontainebleau drageonne abondamment, fait qui s'accorde bien avec le potentiel caulogène élevé observé *in vitro*. On peut donc penser que cette population se régénère en grande partie par multiplication végétative et qu'elle constitue en fait un clone.

Potentiel caulogène des racines. — Le cambium des grosses racines a présenté dans plusieurs cas (prélèvements des 11 mai 1947, 26 juin 1949, 10 août 1951 dans la 4^e Série de Fontainebleau) le même potentiel caulogène que celui du cambium prélevé le même

jour sur la tige du même arbre ou sur des tiges du même peuplement à la même époque. Dans d'autres cas, au contraire, le cambium des racines a formé peu de bourgeons (prélèvements des 1^{er} et 10 août 1951 dans les 4^e et 13^e séries respectivement).

Polarité. — Dans le cas de prélèvements suivant la méthode de GAUTHERET, lorsque, conformément à la technique usuelle, les explantats sont dressés verticalement, enfoncés de 0,5 cm environ dans le milieu, les bourgeons semblent répartis au hasard sur la surface cambiale, que l'extrémité distale de l'explantat se trouve située vers le haut ou vers le bas. Il n'existe apparemment aucune polarité. Si, par contre, les explantats sont placés à plat sur le milieu, face cambiale tournée vers le haut, une polarité très nette se manifeste et les bourgeons formés sont accumulés vers l'extrémité distale (Pl. XXV, fig. 3). Cet essai a été réalisé dans deux expériences (prélèvements du 1^{er} juillet 1951 et du 9 mai 1953) où une série d'explantats avait été placée à plat. Ces séries avaient fourni respectivement des densités de 6 et 1 bourgeons au cm².

La caulogénèse est donc liée à des facteurs chimiques mobiles et soumis à une polarité propre, mais cette polarité est d'intensité très faible et, chez les explantats dressés, elle est masquée par d'autres influences, en particulier celle du gradient négatif de l'humidité relative de l'atmosphère interne du tube en fonction de la cote du point considéré. L'humidité à un niveau donné peut en effet être l'un des facteurs physiques agissant sur la caulogénèse, ce qui expliquerait que, lorsque l'extrémité distale de l'explantat est placée vers le haut, niveau le plus sec, les bourgeons ne sont pas groupés vers cette extrémité. Dans le cas où l'extrémité distale est placée vers le bas, on ne constate pas davantage d'accumulation des bourgeons au niveau du milieu, mais on peut alors penser que le courant d'eau ascendant qui s'établit dans l'explantat pour compenser les pertes dues à l'évaporation, d'autant plus intenses que le niveau est plus élevé, entraîne passivement les facteurs de caulogénèse en sens inverse de la sollicitation due à la fois à la polarité et au gradient de l'humidité relative, ce qui provoque la dispersion des points de formation des bourgeons.

ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES

Il a paru intéressant de rechercher si l'action caulogène de l'adénine, mise en évidence par SKOOG (175, 176) sur des segments de tiges de tabac et de raifort, se manifestait aussi sur le tissu cambial d'orme. D'autre part, étant donné le rôle du méso-inositol dans le métabolisme du phosphore (POSTERNAK S. et T., 162, 163, 164), son action a également été essayée sur ce tissu.

Les résultats des expériences portant sur ces deux substances, essayées séparément, figurent dans le tableau suivant :

TABLEAU XXI

Station	Dates (1)	Tige (T) ou racine (R)	Poutre (P) ou taillis (T) et âge	Concentrations en		Nombre de bourgeons formés			σ	P (t)	Observations
				mésos- inosi- tol	adénine.	par ex- plantat	au cm linéaire	au cm ²			
Malvoisine p ^{lle} 43	9-11-49 (2- 1-50)	T	T 33	0 5.10 ⁻⁵	0 0	9 10	2,2 2,2		7,5 9,5	n.s.	Seuil de signi- fications des diffé- ces avec les mésitol 10 ⁻³
p ^{lle} 43	3-12-49 (27- 2-50)	T	T 31	0 5.10 ⁻⁴	0 0	5,5 15	1,5 4,6		5,2 1,3	< 0,05	
Malvoisine p ^{lle} 47	6-11-50	T	T 38	0 10 ⁻³ 0	0 0 10 ⁻⁴	8,5 15,5 27	2 3,8 7		10,5 13,2 26	n.s. < 0,05	
Malvoisine p ^{lle} 47	16-12-50	T	T 38	0 10 ⁻³ 0	0 0 10 ⁻⁴	0 3 14,5	0 0,8 4		0 5,6 16,5	< 0,05 < 0,01	
Malvoisine P ^{lle} 47	14- 3-51	T	T 36	0 0 0 0	0 10 ⁻⁵ 5.10 ⁻⁵ 16 ⁻⁴	12 17 15 12	3,4 4,9 4,1 4,4		20 14,5	n.s. n.s. n.s.	
Fontain. 4 ^e 3 ^{ie} P ^{lle} K ²	1- 7-51	T	P 20	0 10 ⁻³ 0 0	0 0 5.10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	21,5 44 19 22		9 17 8,5 8,5	9,5 6,5 11 12	< 10 ⁻⁹ n.s. n.s.	
	3- 7-51	T	P 20	0 10 ⁻³	0 0	6,5 17		6,5 13,4		< 10 ⁻³	
-d*-	1- 6-51	R	P 60	0 10 ⁻³	0 0	0,1 3		0,1 3	0,4 2,2	< 10 ⁻⁵	
-d*-	2- 6-52	T	P 60	0 10 ⁻³	0 0	13 13		2,4 2,8	5,5 5,5	n.s.	
18 ^e 3 ^{ie} Courbui- son	9- 5-53	T	P 40	0 0 10 ⁻³ 10 ⁻³	0 0 0 0	2,7 2,2 3,2 4,7		0,9 1,4 1,3 2,3	3 1,25 5,25 3	n.s. n.s. n.s.	explantato: dressés à plat dressés à plat
13 ^e 3 ^{ie} P ₁	17-8-55	T	P 35	0 10 ⁻³	0 0	6,2 4,9	1,4 1,1		6 10	n.s.	

Action du mésos-inositol et de l'adénine sur la caulogénèse
du tissu cambial d'*Ulmus campestris*

(1) Si les dates du prélèvement et de la mise en culture sont différentes, la seconde est indiquée entre parenthèses.

(2) σ : écart-type des nombres de bourgeons par explantat.

(3) P (t): seuil de signification des différences avec les témoins — n.s.: non significatif au seuil de 0,05.

Ces résultats montrent que le mésos-inositol est l'un des facteurs de caulogénèse et qu'il joue fréquemment le rôle de facteur limi-

tant, en été comme en hiver. A des concentrations de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} il détermine alors une augmentation pouvant atteindre 300 % de la densité des bourgeons par rapport aux témoins et, dans le cas d'un prélèvement d'hiver où aucun bourgeon n'avait été formé sur les témoins, il a provoqué l'apparition d'un nombre assez élevé de bourgeons. Il est cependant des cas où les résultats ne font pas apparaître de différences significatives au seuil de 0,05 entre les cultures sur milieu additionné d'inositol et les témoins. Le cas du prélèvement du 9-11-49 mis en culture le 2-1-50 peut s'expliquer par la concentration trop faible du méso-inositol. Dans le cas du prélèvement du 6-11-50, où l'action de l'inositol double sensiblement la densité moyenne des bourgeons, le degré de certitude du résultat est considérablement affaibli par la dispersion très élevée du nombre des bourgeons sur chaque explantat. Cette dispersion est accentuée par l'inositol; l'écart-type passant de 10,5 pour les témoins à 13,2 en présence d'inositol, les valeurs extrêmes du nombre de pousses par explantat étant alors 0 et 40 contre 0 et 24 pour les témoins. Dans les prélèvements des 2 juin 1952, 9 mai 1953, 17 août 1955, l'inositol n'a manifesté aucune action.

L'action de l'adénine donne lieu aux mêmes remarques que celle du méso-inositol. Cette action a été étudiée sur 3 séries d'explantats prélevés sur trois brins de la même cèpe d'orme de la forêt de Malvoisine, abattus successivement les 6-11-50, 16-12-50 et 14-3-51. Dans les deux premiers cas, l'adénine a manifesté une action caulogène intense, en particulier dans le prélèvement du 16 décembre, où les témoins n'avaient formé aucun bourgeon. Dans le troisième cas, au contraire, l'adénine aux concentrations de 10^{-5} , 5.10^{-5} et 10^{-4} n'a pas donné de résultats significativement différents des témoins. Il en a été de même pour un prélèvement fait en été le 1-7-51 sur un orme de la forêt de Fontainebleau.

Une autre expérience a porté sur des explantats prélevés sur une racine d'orme de la même parcelle (K_2 , 4^e S^{ne}) de la forêt de Fontainebleau et cultivés sur 7 milieux différents: milieu B, milieu B additionné d'inositol à 2.10^{-4} et 10^{-3} et milieu B additionné des quatre combinaisons possibles des concentrations 2.10^{-4} et 10^{-3} d'inositol et des concentrations 2.10^{-5} et 10^{-4} d'adénine. Les courbes ci-après figurent les résultats obtenus.

Les densités de bourgeons correspondant à 10^{-3} d'inositol et aux concentrations 0, 2.10^{-5} , 10^{-4} d'adénine ne sont pas significativement différentes. L'action de l'inositol seul est positive comme pour les prélèvements des 1-7-51, 3-7-51 et 1-8-51 dans la même station. L'adjonction d'adénine entraîne en présence de la plus faible concentration d'inositol une action inhibitrice qui s'annule approximativement lorsque la concentration de cette vitamine atteint 10^{-3} . Il apparaît ainsi que l'intensité de la caulogénèse est liée au rapport des concentrations de ces deux substances. Lorsque la concen-

tration en adénine dépasse une valeur optimale, elle exerce une action inhibitrice qui s'accroît si la concentration en inositol est suffisamment accrue.

Courbes représentatives de l'action de l'adénine et du méso-inositol sur la caulogénèse chez *U. campestris*.

En ce qui concerne l'action du ribose, deux expériences ont donné les résultats figurant dans le tableau XXII. Dans les deux cas les prélèvements portaient sur des brins de taillis.

TABLEAU XXII

Station	Dates de prélèvement	Concentrations			Nombre de bourgeons		σ (1)
		Inositol	Adénine	Ribose	par explantat	au cm linéaire	
Malvoisine P ^{lle} 46	4-1-52	0	0	0	4,3	0,9	5
		10^{-3}	0	0	6,1	1,4	6
		10^{-3}	10^{-4}	0	4,9	1	5
		10^{-3}	10^{-4}	10^{-4}	4,2	0,9	4
Villefermy	18-1-52	0	0	0	0,2	0,05	
		10^{-3}	0	0	0,8	0,2	
		10^{-3}	10^{-4}	0	1,3	0,35	
		10^{-3}	10^{-4}	10^{-4}	0,7	0,15	

(1) σ : écart-type des nombres de bourgeons par explantat.

Dans chaque expérience les résultats ne sont pas significativement différents au seuil de 0,05 et il semble donc que dans les deux cas la caulogenèse ait été limitée par un facteur autre que les trois substances introduites dans les milieux.

De l'ensemble des expériences, il ressort que l'adénine et l'inositol sont l'un et l'autre des facteurs de caulogenèse. En hiver, ces substances sont fréquemment déficitaires dans les tissus, l'adjonction de l'une ou l'autre d'entre elles provoquant un accroissement significatif du nombre des bourgeons par rapport aux témoins. Dans les expériences du 6-11-50 et du 16-12-50, les effets de l'adjonction d'adénine considérés globalement sont beaucoup plus marqués que ceux de l'inositol, ce qui donne à penser que le déficit en adénine est le plus accentué. Cependant, dans l'interprétation des résultats il convient de remarquer que, même après addition d'inositol ou d'adénine, il reste une certaine proportion d'explantats qui ne forme pas de bourgeons et que l'accroissement global du nombre de bourgeons résulte pour une grande part de l'accroissement de la densité des bourgeons sur une partie des explantats. Dans l'expérience du 6-11-50, 5 explantats sur 12 témoins n'avaient formé aucun bourgeon contre 1 dans la série cultivée sur milieu à l'inositol et 2 sur milieu à l'adénine, les valeurs extrêmes étant 0 et 24 pour les témoins, 0 et 40 pour la série sur inositol, 0 et 80 pour la série sur adénine. Dans l'expérience du 16-12-50, les chiffres correspondants sont, pour des séries de 10 explantats : 0 et 17, 0 et 39 respectivement. Ce fait se traduit d'ailleurs dans le calcul statistique par l'augmentation de la dispersion, l'écart-type, égal à 10,5 pour les témoins dans la première de ces expériences, passant à 13,8 dans la série recevant de l'inositol et 26 dans la série recevant de l'adénine. Il semble donc que pour chaque explantat considéré isolément, le facteur limitant peut être tantôt l'inositol, tantôt l'adénine et, la répartition des explantats entre les milieux étant faite au hasard, un explantat pour lequel le facteur déficitaire est l'adénine ne réagit pas s'il est placé sur milieu contenant de l'inositol ou inversement. Au contraire, dans les expériences faites en été les explantats d'une même série présentent une réaction plus homogène et dans une expérience telle que celle du 1-7-51, où tous les explantats témoins avaient formé des bourgeons, il apparaît nettement que l'inositol est le facteur limitant pour l'ensemble des explantats prélevés. L'addition d'inositol diminue alors sensiblement la dispersion ($\sigma = 6,5$ contre 9,5 pour les témoins).

ACTION D'EXTRAITS DE TISSUS

Pour rechercher si des facteurs de caulogenèse présents dans le tissu cambial pouvaient être extraits et utilisés pour stimuler la caulogenèse de tissus de la même essence, des extraits ont été préparés à partir de cambium prélevé sur un orme de la 4^e Série de

la forêt de Fontainebleau et reconnu comme ayant un potentiel caulogène élevé. Le cambium et le liber, après élimination préalable du rhytidome, étaient découpés en petits fragments. Des extraits ont été préparés :

- a) par simple macération du tissu frais dans l'eau distillée ;
- b) par extraction du tissu frais à l'eau distillée dans un Soxhlet ;
- c) par extraction en Soxhlet du tissu, préalablement desséché sous vide sec :
 - à l'éther de pétrole
 - à l'éther
 - à l'alcool
 - à l'eau.

Les extraits ont été utilisés pour préparer des milieux par addition de quantités convenables de glucose et de sels minéraux de manière à obtenir les mêmes concentrations de ces substances que dans le milieu B.

Aucune action n'a été décelée ni sur l'activité de la prolifération du tissu, ni sur la caulogénèse.

D'autre part, il a paru intéressant de vérifier si, étant admise l'hypothèse de l'existence de rhizocalines, des végétaux formant rapidement de nombreuses racines comme la Tomate pourraient contenir des substances rhizogènes susceptibles d'agir sur d'autres végétaux. Des extraits ont été préparés suivant les techniques qui viennent d'être indiquées à partir de boutures de tiges de Tomate (var. Merveille des Marchés) au moment où se forment de nombreuses ébauches de racines. Ces extraits n'ont exercé aucune influence sur la caulogénèse et n'ont pas provoqué l'apparition de racines. Par contre, on a parfois noté une activation de la prolifération des tissus, due vraisemblablement à l'apport de vitamines ou d'auxine.

Expériences complémentaires sur des segments de tiges ou de racines cultivés dans l'eau

Des rondelles ou des billons de tiges ou de racines cultivés à l'air libre, leur section inférieure étant immergée, suivant la technique précédemment décrite (v. III^e Partie, Chap.II) ont formé des bourgeons sur le bourrelet de tissu néoformé par le cambium suivant la circonférence de la section supérieure du billon, exactement suivant le même processus que sur les explantats prélevés par la méthode de GIOELLI et cultivés *in vitro*. Ces bourgeons, souvent très nombreux, se développent ensuite en tiges feuillées. La fig. 1 de la Planche XXV montre le résultat d'une de ces expériences.

Le 7 août 1949, 2 rondelles de 35 et 25 cm de circonférence ont été prélevées et mises en culture. Le 25 août un bourrelet de tissu

néoformé était constitué sur lequel les bourgeons commençaient à apparaître. Le 28 octobre, la 1^{re} rondelle portait une centaine de pousses. L'autre présentait 43 pousses groupées en 3 zones. Les pousses les plus longues atteignaient 115 mm avec 8 feuilles.

Comportement du tissu cambial sur les bords des blessures résultant du prélèvement des explantats suivant la méthode de GAUTHERET - Action d'inhibiteurs.

Les prélèvements des 11 mai 1947, 4 juillet 1948, 25 juillet 1948, 10 juillet 1949 avaient été opérés sur des arbres sur pied. Ces arbres ont été maintenus sur pied et tenus en observation pendant plusieurs années après le prélèvement. Dans aucun cas il n'est apparu de bourgeons sur le bourrelet de tissu néoformé suivant les bords de la blessure alors que, au contraire, si le prélèvement est opéré au laboratoire sur un billon, et que ce billon soit ensuite cultivé dans l'eau, de nombreux bourgeons apparaissent sur le bourrelet cambial (prélèvements des 1^{er} juillet 1951, 2 juin 1952, 9 mai 1953, 12 mai 1956). Il apparaît ainsi que la formation des bourgeons sur les lèvres d'une blessure est inhibée si le segment de tige ou de racine lésé n'est pas séparé de l'ensemble de l'arbre. Au contraire, sur un segment de tige ou de racine séparé du corps du végétal, des bourgeons évoluant en tiges feuillées apparaissent rapidement. Ces nouveaux organes se forment aux dépens des réserves contenues dans l'élément isolé, auquel il suffit de fournir de l'eau.

La caulogénèse chez l'orme est donc conditionnée par une levée d'inhibition consécutive à la séparation du corps de l'arbre d'un élément de tige ou de racine.

Dans ses recherches, GAUTHERET avait montré que l'acide β -indolyl-acétique exerce à partir d'une concentration de 10^{-6} une action inhibitrice sur la caulogénèse chez *U. campestris*, l'inhibition devenant totale à 10^{-4} . Une expérience sur l'action comparée de l'acide β -indolyl-acétique et de l'acide α -naphthyl-acétique a montré que l'action inhibitrice de ce dernier est presque totale à la concentration de 10^{-6} utilisée dans les milieux de culture des tissus repiqués.

TABLEAU XXIII

Station	Type de tige & Age	Dates	Milieu	Nombre de bourgeons		σ
				par explantat	sur cm	
Fontainebleau 13 ^e S ^{ie} pale y ₂	F 45	12-5-56	B	37	12,8	16
			B+acide β ind. acét. 10^{-4}	0	0	
			B + " (10^{-6}) acide α nap. acét.	1,5	0,5	1,9

Conclusion

La caulogénèse chez le tissu cambial d'orme dépend :

- de facteurs génétiques
- de facteurs soumis à des variations saisonnières.

Il est, d'autre part, évident que dans l'arbre sur pied la formation de bourgeons adventifs est inhibée par des substances provenant de la cime ou des racines et qui disparaissent rapidement lorsqu'un segment de tige ou de racine est séparé de l'arbre.

En outre, en hiver, des facteurs agissant sur la caulogénèse, soit par inhibition, soit par activation, subissent *in situ* des transformations qui font varier le potentiel caulogène d'une même tige au cours de la saison.

En dehors d'une nouvelle vérification de l'action inhibitrice des auxines, déjà mise en évidence par GAUTHERET, l'action de deux facteurs chimiques définis a été mise en évidence. Le méso-inositol semble agir en général comme activateur aux concentrations comprises entre 10^{-4} et 10^{-3} ; mais l'adénine, à des concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-4} peut être activatrice ou inhibitrice suivant le rapport des concentrations d'inositol et d'adénine, et la valeur absolue des concentrations de l'une ou l'autre de ces substances ne suffit pas à déterminer le sens et l'intensité de son action; les expériences où elles n'ont manifesté aucune action doivent, par ailleurs, faire considérer comme probable que d'autres facteurs naturels interviennent.

B — TISSUS REPIQUÉS

Les propriétés des tissus repiqués sont beaucoup plus variées que celles des premiers isoléments. Parmi les tissus dont la culture indéfinie a pu être réalisée, certains n'ont jamais formé d'organes: tout d'abord ceux des *Eucalyptus*: *E. camaldulensis*, *gomphocephala*, *Gunnii*, qui n'ont pu être cultivés que sur milieu au lait de coco, et ceux de *Castanea vesca* et *Prunus avium*, quels que soient les milieux essayés. Les autres tissus: *Populus tremula*, *Betula verrucosa*, *Tilia parvifolia*, *Ulmus campestris* ont formé des racines ou des pousses ou les deux types d'organes. Parmi ces tissus, ceux de *B. verrucosa* peuvent proliférer sans apport d'auxine. Ceux de *P. tremula* et *U. campestris* exigent une concentration de 10^{-6} d'acide α -naphthyl-acétique, ceux de *T. parvifolia* une concentration encore plus élevée: 10^{-5} d'acide β -indolyl-acétique ou β -indolyl-butyrique, 10^{-7} d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique et l'action inhibitrice de ces auxines peut empêcher la formation de bourgeons.

1° *Populus tremula* L.

Trois souches de cette essence ont été étudiées. La première a été isolée à partir d'un tremble de la forêt de Villefermoy (S.-et-M.) dont les propriétés rhizogènes n'étaient pas connues.

Les deux autres souches provenaient de trembles alpins appartenant à des clones dont les propriétés rhizogènes avaient préalablement été étudiées par BOUVAREL et ses collaborateurs. L'un, provenant de Maurienne, était particulièrement difficile à bouturer, l'autre, de Ristolas, se bouturant au contraire assez facilement.

Tous ces tissus sont entretenus sur le milieu suivant : Solution de Knop diluée de moitié, solution de Berthelot modifiée ou solution oligodynamique de Heller, glucose 2 % ou saccharose 3 %, inositol 10^{-4} , aneurine 10^{-6} , pantothénate de calcium $5 \cdot 10^{-7}$, biotine 10^{-7} , acide α -naphtyl-acétique 10^{-6} .

Souche de Villefermoy (Souche V)

Formation de racines. — Les premières racines sont apparues au 3^e repiquage : 5 colonies sur 24 ont émis chacune 2 à 8 racines. Le pouvoir rhizogène s'accroît au 4^e repiquage, et au 5^e repiquage la presque totalité des colonies (30 sur 31) a émis de nombreuses racines. Cette propriété s'est maintenue inchangée jusqu'au 17^e passage à partir duquel on constate une certaine diminution du nombre de racines formées par chaque colonie et de la proportion de colonies émettant des racines. Les racines formées ne manifestent pas de géotropisme net. Celles qui sont émises à la face supérieure de la colonie se développent dans l'air sans s'incurver vers le bas (Pl. XXVII, fig. 5).

Lorsqu'on repique séparément les colonies n'ayant pas émis de racines, les propriétés rhizogènes des nouvelles colonies obtenues ne diffèrent pas de celles des colonies témoins provenant de colonies rhizogènes et il n'a pas été possible par « sélections » successives de subdiviser la souche en souches rhizogène et non rhizogène. Par contre, un phénomène spontané a été l'origine d'une souche modifiée : Au 20^e repiquage une tumeur globuleuse de 2 à 3 mm de diamètre étant apparue sur une racine, à environ 1,5 cm de sa base, cette tumeur fut repiquée sur le milieu d'entretien habituel. Elle se développa en une volumineuse masse de tissu, identique par son aspect aux colonies de la souche initiale et portant de nombreuses racines. A partir de cette colonie a été obtenue une souche dérivée de la première. Cette souche est caractérisée par un pouvoir rhizogène très élevé, comparable à celui que manifestait la souche initiale entre les 5^e et 17^e passages, très supérieur par conséquent au pouvoir rhizogène actuel de cette dernière.

Après 2 repiquages successifs, cette souche dérivée avait pu être suffisamment multipliée pour permettre la comparaison de son pouvoir rhizogène avec celui de la souche initiale. Le dénombrement des racines formées après 3 à 6 repiquages par des colonies

de la souche initiale qui, aux mêmes époques, avait été repiquée respectivement 23 et 26 fois, a donné les résultats suivants :

TABLEAU XXIV

Souche	Nombre de repiquages	Nombre de colonies	Nombre de racines formées			
			Total	moyen par colonie	Ecart-type	
initiale	23	15	30	2	1,7	différence significative au seuil de 10^{-5}
dérivée	3	11	177	16	5	
initiale	26	19	19	1	2	
dérivée	6	16	62	3,5	4	

Ce tableau montre une diminution du pouvoir rhizogène de la souche dérivée entre le 3^e et le 6^e passage, ce pouvoir rhizogène restant cependant supérieur à celui de la souche initiale.

Par sa morphologie externe et son anatomie, la souche dérivée est, en tous points, identique à la souche initiale. Toutefois les racines qu'elles émettent portent parfois des tumeurs ayant les mêmes dimensions et le même aspect que la tumeur apparue sur une racine de la souche initiale et à partir de laquelle a été obtenue la souche dérivée.

L'étude anatomique de ces tumeurs a montré qu'elles présentent la même structure que le tissu de la colonie : parenchyme sans organisation contenant des îlots de vaisseaux de type normal. On pouvait penser que ces tumeurs avaient pour origine l'arrachement et l'entraînement par la racine en voie de croissance d'un fragment de tissu de la colonie principale qui se développerait ensuite en restant adhérent à la surface de la racine. En fait, on constate que jusqu'au niveau de la tumeur la racine renferme un cordon interne de tissu secondaire présentant des vaisseaux aréolés de type normal et assurant la continuité entre le tissu de la colonie et celui de la tumeur. La section basale de la racine possède ainsi une structure comparable à une structure de chimère, dans laquelle coexistent non des tissus d'espèces différentes, mais un tissu primaire et un tissu secondaire de la même espèce (Pl. XXVIII, fig. 1, 2). Dans la partie distale, au delà de la tumeur, on retrouve la structure primaire normale de la racine.

Formation de pousses. — On observe très rarement l'apparition de bourgeons sur certaines colonies. On pouvait penser que l'auxine incorporée dans le milieu inhibait la caulogénèse. Sur milieu sans auxine, la formation de pousses est un peu plus fréquente mais reste néanmoins très irrégulière. Ce n'est d'ailleurs que vers les

10^e, 11^e et 12^e repiquages que les pousses sont apparues en assez grand nombre. Après cette poussée du pouvoir caulogène la formation de bourgeons est redevenue exceptionnelle même en l'absence d'auxine. Au 12^e repiquage 3 séries de 10 colonies avaient été repiquées sur milieu sans auxine et différant par leur teneur en vitamines. Les résultats figurent dans le tableau suivant :

TABLEAU XXV

Série	Vitamines				Nombre de colonies ayant formé des pousses
	Méso-inositol	Aneurine	Pantothénate de Ca	Biotine	
1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁷	0	4
2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁷	10
3	10 ⁻⁴	0	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	5

Ces résultats semblent indiquer une action inhibitrice de l'acide pantothénique sur la caulogénèse. Malheureusement l'affaiblissement et l'irrégularité du pouvoir caulogène aux repiquages suivants n'a pas permis la répétition de l'expérience.

Action de l'adénine. — L'addition d'adénine à la concentration de 10⁻⁵ à des milieux ne contenant pas d'auxine n'a pas stimulé la caulogénèse.

Souche de Maurienne (Souche M)

Cette souche contraste avec la précédente par son très faible pouvoir rhizogène. On a observé à partir du 4^e repiquage l'apparition sporadique de racines. De même le pouvoir caulogène est presque nul. Les propriétés rhizogènes du tissu cambial cultivé *in vitro* correspondent donc bien à la difficulté de bouturage que présente ce clone.

Souche de Ristolas (Souche R)

A l'inverse, cette souche, provenant d'un clone reconnu comme aisé à bouturer, présente un pouvoir rhizogène très élevé. Des racines sont apparues dès le 2^e repiquage et à partir du repiquage suivant la profusion des racines formées est telle qu'elles forment un feutrage dense à la surface du milieu. La croissance du tissu lui-même est très réduite: on obtient en fait une culture d'organes plutôt qu'une culture de tissu.

Cultures associées de tissus de souches différentes

Des expériences de cultures associées de tissus des souches V et M ont été effectuées en déposant un fragment de tissu d'une

des souches sur un fragment de tissu de l'autre de manière qu'ils soient en contact par une face plane résultant d'une section fraîche. Les résultats de ces expériences sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXVI

Ordre des repiquages		Disposition des tissus	Nbre de colonies		Formation de racines					
Souche M	Souche V		mixtes	témoins souche M	Nbre de colonies ayant émis des racines		Nombre de racines			
							Total		Moyen par colonie	
					mixtes	témoins	mixtes	témoins	mixtes	témoins
3	6	M/V	8	6	6	0	27	0	4	0
3	7	M/V	5	8	4	0	15	0	4	0
4	8	M/V	8	7	7	2	22	4	3	0,5
9	9	M/V	7	7	5	1	16	3	2	0,4
10	10	V/M	11	10	6	0	10	0	1,5	0

On voit ainsi que le tissu de la souche rhizogène V induit la formation de racines chez le tissu faiblement rhizogène M quelle que soit d'ailleurs la disposition des tissus.

Il a paru intéressant en outre de rechercher si l'influence rhizogène exercée par le tissu V sur le tissu M pouvait persister après séparation des deux tissus. Les colonies de la souche M ayant formé des racines sous l'action de la souche V dans la 2^e expérience ont été repiquées séparément. Sur les 7 colonies de cette série, 5 ont émis de nombreuses racines.

Cette expérience a été répétée sur les tissus de la souche M ayant émis des racines dans la 3^e expérience. Sur 15 colonies de ce tissu repiquées isolément, 9 ont émis 21 racines. En repiquant à nouveau ces tissus après 4 mois et 16 jours, 15 colonies sur 21 ont émis des racines. Si l'on peut penser que les racines apparues lors du premier repiquage suivant la période de contact avec le tissu V résultent du développement de méristèmes radiculaires formés pendant cette période de coexistence des deux tissus, la persistance de cette stimulation du pouvoir rhizogène au second repiquage semble indiquer que la modification hormonale apportée par le contact avec le tissu V était assez marquée pour agir encore après deux repiquages.

Il a enfin paru intéressant de chercher si les tissus de la souche V pouvaient provoquer l'apparition de racines sur les tissus des premiers isollements d'une autre souche. Lors de l'isolement de la souche R, sur 12 explantats de cette souche, posés à plat, face cambiale vers le haut, sur le milieu, ont été déposés autant de fragments de tissu de la souche V qui en était alors à son 7^e repiquage. Aucune racine n'est apparue sur les tissus néoformés de la souche R, bien que dès le 2^e repiquage les tissus de cette souche aient manifesté un pouvoir rhizogène particulièrement élevé.

Caulogénèse. — En repiquant ce tissu sur milieu sans auxine, on a obtenu la formation de pousses sur 2 colonies sur 14 seulement. Les essais de culture mixte en présence de tissu V repiqué respectivement 13 et 16 fois sur milieux sans auxine avec ou sans acide pantothénique ont été négatifs. Si le pouvoir caulogène de cette souche n'est pas nul, il est si faible qu'il n'est pas possible de procéder à des expériences pouvant fournir des résultats significatifs.

2° *Betula verrucosa* Ehr.

La souche étudiée a été isolée le 25 juin 1954. Les principaux résultats obtenus au cours des repiquages successifs ont été groupés dans le tableau XXVII :

Ces résultats peuvent se résumer ainsi :

Le tissu de *B. verrucosa* a manifesté une sensibilisation rapide aux auxines : au premier repiquage une concentration de 10^{-5} d'acide α -naphtyl-acétique est nécessaire pour provoquer la prolifération active du tissu, alors qu'au 3^e passage une forte proportion des colonies repiquées sur milieu dépourvu d'auxine ont proliféré activement et que, à partir de ces colonies, la souche a été maintenue ultérieurement sur milieu sans auxine. En ce qui concerne l'organogénèse :

- 1° Aucun organe n'est apparu au premier repiquage, malgré les concentrations élevées d'auxine.
- 2° Au deuxième repiquage de nombreuses racines sont formées mais seulement sur la moitié environ des colonies sans qu'apparaisse une corrélation entre la concentration d'auxine et l'intensité de la rhizogénèse. Aucun bourgeon n'a été observé. L'adjonction de bases puriques et pyrimidiques n'a produit aucun effet ni sur l'activité de la prolifération, ni sur l'organogénèse.
- 3° Au troisième repiquage on observe une régression marquée de la rhizogénèse. Dans les séries cultivées sur milieux sans auxine ou contenant 10^{-6} d'acide β -indolyl-acétique ou α -naphtyl-acétique, il n'est plus apparu de racines et seules des colonies repiquées sur milieu contenant 10^{-4} d'acide β -indolyl-acétique en ont formé.
- 4° Au quatrième et cinquième passages le déclin du pouvoir rhizogène s'accroît : au quatrième passage une seule colonie, cultivée d'ailleurs sur milieu sans auxine, a formé des racines et au 5^e passage, 3 colonies sur 10, cultivées sur milieu contenant 10^{-6} d'acide β -indolyl-acétique ont émis des racines. Aux passages suivants il ne sera jamais plus observé de formation de racines.

- 5° La caulogénèse se manifeste à partir du 5^e passage par l'apparition très sporadique de bourgeons. On peut remarquer que cette première apparition de bourgeons coïncide avec la disparition de la rhizogénèse.
- 6° Jusqu'au 11^e passage la formation de bourgeons reste sporadique. Au 11^e passage, dans une série cultivée sur milieu contenant comme seule vitamine du méso-inositol, 3 colonies parmi les plus riches en chlorophylle ont formé quelques bourgeons.
- 7° Cette légère activation de la caulogénèse pouvant être interprétée comme une indication d'une action inhibitrice de l'une des trois vitamines contenues dans les autres milieux, et, d'une manière plus douteuse, d'une action favorable d'un accroissement de la durée et de l'intensité de l'éclairement, ces conditions d'éclairement ont été maintenues au 12^e passage et quatre séries de 20 colonies qui ont été repiquées :
- a) sur milieu sans autre vitamine que le méso-inositol (2^e passage sur ce milieu) ;
 - b) sur 3 milieux dépourvus chacun de l'une des trois autres vitamines : aneurine, pantothénate de calcium, biotine.

Après 3 mois, les résultats ont été les suivants :

TABLEAU XXVIII

Séries	Vitamines				Nombre de colonies ayant formé des bourgeons	Nombre de bourgeons		Ecart-types
	méso-inositol	aneurine	pantothénate de Ca	biotine		total	moyen par colonie	
1	10 ⁻⁴	0	0	0	8	109	5,5	10
2	10 ⁻⁴	0	5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	6	74	3,7	5,9
3	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁷	16	64	3,2	3,2
4	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁷	0	4	17	0,65	1,9

La dispersion du nombre des pousses par colonie est considérable, ce nombre variant de 0 à 31 dans la première série. Les résultats des séries 1, 2, 3 ne sont pas significativement différents entre eux au seuil de 0,05 mais le sont de ceux de la 4^e série.

Une répétition de cette expérience a été tentée au 13^e passage. A partir des colonies de la série 1 précédente ayant déjà subi deux passages sur des milieux ne contenant aucune autre vitamine que le méso-inositol, ont été faites six séries de repiquages :

- a) sur milieu sans autre vitamine que le méso-inositol (3^e passage) à partir de colonies ayant formé des bourgeons ;

- b) sur même milieu à partir de colonies n'ayant pas formé de bourgeons ;
- c) sur milieu contenant du méso-inositol, de l'aneurine et de la biotine à partir de colonies n'ayant pas formé de bourgeons ;
- d) sur milieu analogue contenant une concentration 5 fois plus forte d'inositol et d'adénine ;
- e) sur milieu contenant les quatre vitamines à partir de colonies ayant formé des bourgeons ;
- f) sur ce même milieu à partir de colonies sans bourgeons.

Les résultats après 3 mois de culture figurent dans le tableau suivant :

TABLEAU XXIX

Série	Concentrations en vitamines				Adénine	Nombre de colonies avec bourgeons	Nombre de bourgeons	
	méso-inositol	aneurine	pantothénate de Ca	biotine			Total	Moyen par colonie
a	10^{-4}	0	0	0	0	9	55	5,5
b	10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0
c	10^{-4}	10^{-6}	0	10^{-7}	0	4	12	1,2
d	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-6}	0	10^{-7}	$2 \cdot 10^{-5}$	0	0	0
e	10^{-4}	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-7}	0	6	32	3,2
f	10^{-4}	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-7}	0	0	0	0

Il apparaît que, sauf en ce qui concerne la série c, seules ont formé des bourgeons les colonies provenant de fragments de tissu prélevés sur des colonies ayant formé des bourgeons en précédent passage. On peut donc penser que les bourgeons apparus au 13^e passage provenaient de massifs méristématiques déjà constitués au 12^e passage et non encore visibles au moment du repiquage et que, en outre, le pouvoir caulogène du tissu avait disparu, interprétation qui semble corroborée par le fait qu'au 14^e passage et au passage suivant, aucun bourgeon n'est apparu. Le résultat fourni par la série c, rapproché de ceux des 4 séries du 12^e passage pourrait indiquer que l'aneurine et l'acide pantothénique ont, aux concentrations utilisées, une action inhibitrice, la biotine ayant au contraire une action stimulante.

Ces résultats n'ont pu être vérifiés, les essais ultérieurs sur les mêmes milieux n'ayant donné que des résultats négatifs sauf la formation d'une cinquantaine de pousses par une seule colonie au 19^e passage et de 4 à 6 bourgeons par 2 colonies au 20^e passage, sur milieu ne contenant que du méso-inositol comme vitamine. Un

milieu plus complexe contenant du méso-inositol et des bases puriques et pyrimidiques n'a pas provoqué l'apparition de bourgeons, non plus qu'un milieu à la kinétine essayé au 23^e passage.

Dans l'ensemble, le tissu de *B. verrucosa* a subi une évolution caractérisée par un stade rhizogène assez actif aux 2^e et 3^e passages, s'atténuant progressivement au cours des 4^e et 5^e passages pour disparaître complètement et définitivement au 6^e passage. L'action des auxines sur la rhizogène ne ressort pas très nettement.

La caulogénèse se manifeste à partir du 5^e passage par l'apparition très sporadique de bourgeons. Elle semble coïncider avec la transformation du tissu qui se manifeste à partir du 5^e passage par l'apparition de plus en plus fréquente de nodules de tissu chlorophyllien sur certaines colonies.

Au 12^e passage le pouvoir caulogène du tissu devient très élevé mais dès le 13^e repiquage il est en voie de disparition et ne se manifeste plus ensuite que sporadiquement.

Il n'a pu être mis en évidence aucune action des bases puriques et pyrimidiques, notamment de l'adénine, mais on pourrait soupçonner une action inhibitrice de l'aneurine et de l'acide pantothénique et une action stimulante de la biotine.

3^e *Ulmus campestris*.

Sept souches de cette essence ont été isolées et maintenues en culture pendant 7 à 10 passages.

Le milieu utilisé pour la concentration des souches est composé de: Solution de Knop diluée de moitié, solution oligodynamique de Berthelot X gouttes par litre, glucose 2 % ou saccharose 3 %, méso-inositol 5.10^{-4} , aneurine 10^{-6} , pantothénate de calcium 5.10^{-7} , biotine 10^{-7} , acide α -naphtyl-acétique 10^{-6} .

Quelques essais sur des milieux différents: milieu à base de solution de Heller, milieu au maltose à 3 %, milieux contenant, outre les vitamines précitées, d'autres vitamines: riboflavine, pyridoxine, acide paraaminobenzoïque, acide folique, nicotinamide, acide ascorbique n'ont pas permis de constater de différences avec le milieu habituel. De même il a été vérifié que le chlorhydrate de cystéine n'exerce aucune action.

En ce qui concerne l'organogénèse, la formation de racines a été observée chez 5 souches. Les premières racines sont apparues au 1^{er} repiquage pour une des souches, au second pour 3 souches, au 3^e seulement pour la 5^e souche. La formation de racines ne s'est renouvelée que pendant quelques passages, cinq au maximum. Le tissu d'*U. campestris* formant des bourgeons lors du premier isolement, et la formation de bourgeons étant fréquemment stimulée par le méso-inositol ou l'adénine, plusieurs essais sur des milieux contenant du méso-inositol à 10^{-3} et de l'adénine à 2.10^{-5} et 5.10^{-5} ont été tentés. En aucun cas la formation de bourgeons n'a été observée.

Si donc les propriétés du tissu d'*U. campestris* sont analogues à celles du tissu de *B. verrucosa* en ce qui concerne la rhizogenèse, elles en diffèrent profondément en ce qui concerne la caulogénèse, qui est strictement limitée aux premiers isoléments. Il est possible que ce fait soit en rapport avec l'absence de chlorophylle chez les tissus d'orme, qui restent blancs même sous éclaircissement intense, alors que les tissus des deux essences chez lesquelles la formation de bourgeons a été constatée (bouleau et tremble) sont assez riches en chlorophylle.

4° *Tilia parvifolia* Ehr.

Deux souches de cette essence ont été cultivées. La croissance de ces tissus est très lente et ils exigent une concentration élevée d'auxine: acide β -indolyl-acétique, α -naphtyl-acétique ou β -indolyl-butyrique 10^{-5} à 10^{-4} , acide 2,4 dichlorophénoxyacétique: 10^{-6} . La lenteur de la croissance de ce tissu en fait un matériel peu favorable à l'expérimentation. Les tissus des deux souches ont émis des racines au premier repiquage et cette propriété persiste au 9^e repiquage. Les racines formées sont peu nombreuses: le plus souvent une ou deux par colonie. Elles sont de fort diamètre.

5° *Essais sur les tissus d'autres essences.*

Les tissus d'*Eucalyptus*, qui n'ont pu être cultivés que sur milieu au lait de coco et dont la prolifération est très lente, n'offrent pas de possibilité d'expérimentation.

Les tissus de *Castanea vesca* et de *Prunus avium* ont fait l'objet d'essais sur des milieux très variés, notamment des milieux complexes contenant des vitamines, de l'adénine seule ou accompagnée des autres bases puriques et pyrimidiques (guanine, cytosine, uracile, thymine), de ribose, des acides aminés, etc... En aucun cas ces tissus n'ont formé d'organes.

EXPOSE D'ENSEMBLE DES RESULTATS ET CONCLUSIONS GENERALES

I

Conditions de culture du tissu cambial d'arbres

A) Premiers isolements opérés pendant la saison de végétation.

Les expériences ont porté sur 21 essences dont 2 conifères. En général, le tissu cambial prolifère sur des milieux contenant seulement des sels minéraux et des glucides. L'addition d'auxines (acides β -indolyl-acétique, β -indolyl-butyrique, α -naphtyl-acétique ou 2,4-dichlorophénoxyacétique) n'a exercé une action stimulante sur la prolifération que dans un nombre limité de cas. Les vitamines (aneurine, pantothénate de calcium, biotine, méso-inositol) n'ont pas manifesté d'action. Toutefois, le méso-inositol augmente la résistance à la nécrose.

De même diverses substances: vanilline, isoeugénol, hydrazides, bases puriques et pyrimidiques, chlorhydrate de cystéine, pyrrol, et des extraits de tissu d'orme, de tomate, n'ont pas agi sur la prolifération des tissus.

En ce qui concerne le lait de coco une stimulation de la prolifération du parenchyme, mais non du cambium, a été observée chez *Quercus pedunculata* $\times$ *sessiliflora*.

Des cas d'inertie partielle ou totale accompagnée de nécrose ont été observés chez plusieurs espèces du genre *Quercus*, chez *Castanea vesca*, chez *Prunus avium* et chez *Populus tremula*.

Cette inertie pourrait être due à la présence de composés phénoliques (tannins, flavones). Ces nécroses ont en effet pu être diminuées chez les *Quercus* et *C. vesca* par un traitement des explantats au moyen de substances (caféine, eau de chaux) insolubilisant les tannins.

Le méso-inositol exerce une action antinécrasante marquée.

B) *Tissus repiqués.*

Les tissus étudiés peuvent être classés en quatre catégories :

- 1° Tissus capables de prolifération indéfinie sur des milieux ne contenant que des aliments minéraux et un glucide :

Betula verrucosa Ehr.

Castanea vesca Gaertn.

- 2° Tissus capables de prolifération indéfinie seulement sur des milieux contenant une auxine :

Populus tremula L.

Ulmus campestris L.

Tilia parvifolia Ehr.

Prunus avium L.

- 3° Tissus ne pouvant proliférer qu'en présence de lait de coco :

Eucalyptus gomphocephala A.D.C.

E. camaldulensis Dehnk.

E. gunnii Hook.

- 4° Tissus qui n'ont pu, jusqu'à présent, être maintenus en culture au delà de quatre ou cinq passages, même sur des milieux complexes contenant des vitamines, des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques ou du lait de coco.

Les tissus de la première catégorie se sont montrés insensibles aux auxines jusqu'à ce que soient atteintes des concentrations où ces substances manifestent une action inhibitrice. Le fractionnement d'extraits de tissu de *C. vesca* a, en outre, montré que ce tissu contient une auxine naturelle différente de l'acide β -indolyl-acétique.

L'action des vitamines est en général faible ou nulle. Toutefois une stimulation de la prolifération du tissu de *C. vesca* a été observée sur des milieux contenant de l'aneurine, du pantothénate de calcium, de la biotine et du méso-inositol, alors que ces substances n'exercent isolément aucune action sensible.

D'une manière générale aucune action de milieux complexes contenant diverses vitamines, des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques n'a été observée sur les tissus appartenant à l'une ou l'autre des catégories précitées. De même la cinétine, la gibbérelline, l'acide traumatique, le glutathion, la 1,3-diphénylurée n'ont exercé aucune influence sur la prolifération des tissus, non plus que divers extraits naturels.

Quelques essais de culture associée de tissus d'espèces différentes ont montré que le tissu d'*U. campestris* provoque la nécrose du tissu de *P. tremula* et que les tissus de *C. vesca* et *B. verrucosa* stimulent légèrement la prolifération de tissus qui leur ont été associés. Les tissus de ces deux essences, cultivés ensemble, se soude-
ment l'un à l'autre mais sans activation réciproque de leur prolifération.

On doit, en outre, remarquer que le comportement des tissus en culture est sans rapport constant avec l'activité de croissance de ces tissus *in situ*: les tissus d'*Eucalyptus*, arbres à croissance extraordinairement rapide, sont difficiles à maintenir en culture, ne prolifèrent que très lentement et seulement en présence de lait de coco.

II

Reprise d'activité du cambium

En général le cambium prélevé sur le tronc reprend son activité dès que, pourvu d'aliments glucidiques et minéraux, il est soumis à une température favorable.

Chez quelques essences (*Castanea vesca*, *Betula verrucosa*), cette autonomie du cambium résulte du fait qu'il est capable de faire la synthèse de l'auxine et de tous les facteurs de croissance qui lui sont nécessaires.

Chez la plupart des essences elle résulte de la possibilité d'accumulation dans le cambium et les tissus de l'aubier et du liber des substances de croissance nécessaires, ou de précurseurs de ces substances. La corrélation entre l'activité des bourgeons et celle du cambium se trouve ainsi modifiée par l'intervention d'un « relais » constitué par ces réserves. Si la concentration de ces réserves dépasse un certain seuil, la reprise d'activité du cambium n'est pas directement liée à celle des bourgeons. L'importance quantitative des réserves emmagasinées à un niveau donné de la tige augmente avec le diamètre de la tige à ce niveau et l'autonomie du cambium tend à s'accroître avec l'âge de la tige au niveau considéré. Si la concentration des réserves est insuffisante, le cambium reste, au contraire, directement tributaire des substances de croissance émises par les bourgeons et les jeunes pousses au moment de leur reprise d'activité. En outre, dans certains cas, il paraît possible que l'intervention d'inhibiteurs puisse maintenir le cambium en état de dormance pendant au moins une partie de l'hiver. Il peut arriver chez certaines espèces (Cupressacées) que, dans des zones d'une certaine étendue, le cambium demeure une ou plusieurs années à l'état de repos, soit parce que la concentration en substances de croissance reste constamment inférieure au seuil d'action, même pendant la saison de végétation, soit en raison de la persistance d'inhibiteurs.

La quantité des réserves peut varier dans de larges limites suivant la vigueur de l'arbre, liée elle-même à la station et à l'état du peuplement. Les observations de MER ont mis en évidence une corrélation entre les possibilités d'accumulation des réserves trophiques et des réserves de substances de croissance: chez les arbres vigoureux, à large cime, dont les tissus sont riches en réserves, l'autonomie du cambium est nettement marquée et la reprise de son activité est directement déclenchée par les variations des conditions

physiques externes: élévation de la température de l'air, dégel du sol permettant une alimentation en eau normale. Chez les arbres croissant en peuplement serré et surtout chez les arbres dominés, l'insuffisance des réserves rend le cambium étroitement tributaire de l'activité de la cime. L'état du peuplement agit donc directement sur la vigueur des arbres et leur richesse en réserves. Il agit aussi sur le microclimat forestier. On peut rappeler à ce sujet les observations de REES sur l'influence retardatrice d'un sol froid et humide par rapport à un sol bien drainé, celles de ROMELL et d'IVANOFF sur l'influence de l'éclairement du fût. L'état clair d'un peuplement agit ainsi de trois manières différentes pour accélérer le réveil du cambium: d'une part, les arbres des peuplements éclaircis, à cime mieux développée, élaborent une plus grande quantité de réserves et, conformément aux observations de MER, l'activité de leur cambium n'est plus étroitement tributaire de celle des bourgeons, d'autre part leur tronc, mieux exposé au rayonnement solaire, se réchauffe plus vite au printemps, et enfin le réchauffement plus rapide du sol favorise l'alimentation en eau. En peuplement serré, les arbres sont moins vigoureux, l'intensité du rayonnement solaire dans le sous-bois est plus faible, le tronc des arbres et le sol se réchauffent plus lentement.

La complexité des facteurs intervenant dans le problème de la reprise d'activité du cambium explique les divergences entre les résultats des recherches consacrées à cette question. Les interférences entre les propriétés intrinsèques des tissus de chaque essence, les particularités de la station, les incidences des traitements forestiers, l'état physiologique de chaque arbre à une époque donnée, se traduisent par un comportement différent non seulement suivant l'essence, mais au sein d'une même essence, suivant la station et le traitement forestier, et, dans un même peuplement, d'un individu à un autre, voire, pour un même individu, d'une année à l'autre.

Incidences technologiques

Il est intéressant d'examiner si la corrélation entre la reprise d'activité du cambium et le niveau d'accumulation des réserves, lié lui-même à la densité du peuplement, peut permettre au sylviculteur d'agir sur le phénomène. Dans les peuplements fortement éclaircis et assez âgés la reprise d'activité du cambium peut précéder ou suivre de très près l'éclatement des bourgeons. Dans les peuplements denses, au contraire, le réveil du cambium peut être considérablement retardé. Dans le cas où le réveil du cambium est postérieur à l'éclatement des bourgeons, l'importance de l'intervalle de temps qui s'écoule entre les deux phénomènes paraît extrêmement variable. MER n'avait pas observé de délai supérieur à 15 jours entre l'éclatement des bourgeons et la reprise d'activité du cambium à la base du tronc. Les observations de LADEFOGED qui, pour les essences à zone poreuse, concordent assez bien avec celles de

MER, ont fourni pour certaines essences feuillues à pores diffus et pour certains Conifères des chiffres beaucoup plus élevés : 40 jours pour *Betula pendula*, 45 pour *Larix decidua*. Des délais de cette importance peuvent se traduire par d'importantes modifications dans la structure du bois et, par suite, dans ses propriétés technologiques. A cet égard, il convient de rappeler que les Conifères, les essences feuillues à zone poreuse et les essences feuillues à pores diffus suivent des lois très différentes. Chez les essences à zone poreuse, la zone de bois initial à gros vaisseaux a une largeur sensiblement constante. Les variations de largeur des accroissements intéressent essentiellement le bois final, à vaisseaux plus rares et fins, à tissu fibreux très développé. Chez les arbres à houppier volumineux (chênes « de plein vent », réserves de taillis-sous-futaie) l'assimilation intense entraîne la formation d'accroissements larges à texture (1) forte. Le bois est dense et possède une résistance mécanique élevée. Il convient à la charpente. Les arbres à houppier réduit (arbres de futaie) forment un bois de texture d'autant plus faible que le peuplement est plus serré. Ce bois est tendre, d'une résistance mécanique moins élevée mais possède par contre d'autres qualités : retrait plus faible, facilité de travail, qui le rendent apte à l'ébénisterie, à la menuiserie d'ameublement et au tranchage. Ces variations, connues depuis longtemps des forestiers, sont liées à l'intensité d'assimilation pendant la période de formation du bois final. Sauf chez des arbres à houppier très réduit, la reprise d'activité du cambium précède normalement l'éclatement des bourgeons et dépend exclusivement et directement des conditions climatiques. Ce n'est donc pas en faisant varier la date du réveil du cambium que le traitement forestier agit sur les caractéristiques du bois.

Chez les feuillus à pores diffus, la valeur technologique du bois est à peu près indépendante de la largeur des accroissements en raison de la faible différence anatomique entre bois initial et bois final. C'est seulement pour d'autres considérations : augmentation du volume de la production ligneuse à l'unité de surface, amélioration de la qualité par un élagage naturel actif, que le forestier peut être conduit à choisir entre des éclaircies plus ou moins fortes.

Le problème est tout différent en ce qui concerne les Conifères. Pour une essence donnée, dans une station donnée, la formation du bois final commence à une époque fixe. Il en résulte que les variations de largeur des accroissements sont déterminées essentiellement par les variations de largeur du bois initial. Si la formation du bois initial commence tardivement, la largeur de l'accroissement annuel est faible, mais la texture forte, la largeur du bois final étant sensiblement la même que chez un arbre de même essence dont le réveil d'activité cambiale aurait été plus précoce. Ces va-

(1) La texture est le rapport de l'épaisseur du bois final à l'épaisseur totale de l'accroissement.

riations anatomiques influent non seulement sur la densité et la résistance mécanique du bois lui-même, mais sur les caractéristiques de la pâte à papier qu'il peut fournir. Les trachéides du bois final, en effet, diffèrent par leurs dimensions de celles du bois initial. Les paramètres biométriques (1) pris en considération pour l'industrie du papier: indice de feutrage, coefficient de souplesse varient donc dans de larges limites avec la texture et ces variations entraînent des variations corrélatives des caractéristiques du papier dont la qualité est, en définitive, fonction directe de la texture.

On sait depuis longtemps que le bois des épicéas ou des pins sylvestres provenant des Pays Nordiques ou des hautes altitudes des Vosges ou du Jura présente des accroissements fins et une texture forte, alors que le bois des mêmes essences ayant cru à basse altitude en Europe occidentale présente des accroissements larges et une texture faible. Ces caractères sont la conséquence du réchauffement tardif de la température au printemps dans les stations à climat froid. Cependant, nous avons vérifié que chez le bois de pin sylvestre provenant de peuplements très serrés de stations de plaine, on retrouve les caractères des bois de haute altitude ou de haute latitude: accroissements fins et texture forte. Dans le cas ainsi observé, le retard résultant de l'état très dense du peuplement peut être estimé à un mois environ. Quelle que soit la station, ces caractéristiques résultent de la reprise tardive de l'activité cambiale, qu'elle soit imposée par le climat ou qu'elle soit l'effet de la décision du sylviculteur de n'éclaircir que très faiblement le peuplement.

L'adoption d'une faible intensité d'éclaircie permet donc d'atténuer le défaut des bois des stations de basse altitude et de rapprocher ces caractéristiques de celles des bois des régions froides.

III

Anatomie

- 1° Les tissus issus du cambium cultivé *in vitro* ont, chez toutes les essences étudiées, une structure entièrement différente de la structure normale du bois.

Cette structure est caractérisée par:

- la raréfaction ou la disparition des cellules différenciées à membranes lignifiées, qui n'apparaissent que par îlots, voire par éléments isolés, au sein d'un parenchyme inorganisé à membranes cellulosiques;

(1) Si l est la longueur moyenne des trachéides, d leur diamètre, e l'épaisseur de leurs membranes, l'indice de feutrage est $\frac{l}{d}$, le coefficient de sou-

plesse $100 \frac{d - 2e}{d}$.

- la disparition totale, chez toutes les essences, des fibres libri-formes, fibres-trachéides, cellules de parenchyme ligneux ;
 - chez plusieurs essences la disparition complète, ou presque complète des vaisseaux normaux, les seules cellules à membranes lignifiées étant des trachéides à épaississement réticulés semblables à celles des tissus de transfusion. Si des vaisseaux normaux à ponctuations aréolées subsistent, on observe des formes de passage entre trachéides réticulées et vaisseaux ;
 - chez certaines essences la persistance de vaisseaux de type normal (*P. tremula*, *B. verrucosa*) ou ne différant du type normal que par la régression plus ou moins marquée des épaississements spiralés (*U. campestris*, *T. parvifolia*). Dans tous les cas, ces vaisseaux ont des dimensions beaucoup plus faibles que les vaisseaux normaux du bois.
- 2° La structure des tissus cultivés *in vitro* est identique à celle des tissus formés par le cambium dans tout élément de tige séparé de la cime : base d'un arbre abattu, billon cultivé dans l'eau et à celle que provoquent certaines attaques parasitaires. Elle est très différente de celles des tissus cicatriciels, où les types cellulaires normaux subsistent.
- 3° Il en résulte que l'apparition des structures anormales des tissus en culture ne dépend pas de la disparition de la pression de l'écorce ni des variations des conditions physiques, mais de la coupure des liaisons du tissu avec la cime de l'arbre, entraînant l'arrêt de l'approvisionnement du tissu en facteurs chimiques déterminant la différenciation et l'organisation des tissus néo-formés.
- 4° La greffe de bourgeons sur tissu cultivé *in vitro* comme la greffe sur un sujet d'un greffon de la même essence, ou d'une autre essence ne présentant pas d'incompatibilité avec la première, assure la formation par le sujet de tissus secondaires spécifiques normaux en rétablissant l'afflux des facteurs d'organisation nécessaires. Ces facteurs ne sont donc pas strictement spécifiques, ni même parfois génériques (châtaignier greffé sur chêne).
- 5° L'auxine semble être l'un des facteurs nécessaires à l'organisation.
- 6° Des milieux complexes renfermant les vitamines habituellement présentes dans les pousses et les bourgeons des arbres, et diverses substances : bases puriques et pyrimidiques, chlorhydrate de cystéine, glycocole, pyrrol, etc... n'ont manifesté aucune action sur la différenciation et l'organisation des tissus cultivés. Il existe donc d'autres facteurs d'organisation encore inconnus.

- 7° Les perturbations produites par l'apport d'un excès d'auxine dans les tissus d'organes en cours de croissance dans des conditions normales semblent indiquer que l'organisation des tissus est liée à un équilibre précis entre les concentrations des différents facteurs actifs.
- 8° Lorsque chez certaines essences le tissu cambial séparé de la cime forme régulièrement (*P. tremula*, *B. verrucosa*, *T. parvifolia*) ou occasionnellement (*C. vesca*, *Quercus* sp., *U. campestris*) des vaisseaux, ces vaisseaux, munis de ponctuations aréolées, sont identiques ou semblables aux vaisseaux normaux du bois secondaire de l'essence considérée. La persistance de cette faculté de donner naissance à des cellules typiques des tissus secondaires montre que le cambium, cultivé *in vitro*, conserve son caractère de méristème secondaire.

Dans le cas, très fréquent, où ces tissus comportent des cellules aberrantes, il s'agit de trachéides à épaississements réticulés, telles qu'il s'en trouve dans les tissus de transfusion, et les types cellulaires intermédiaires, observés chez plusieurs essences et caractérisés par la coexistence de ponctuations aréolées et d'épaississements réticulés sur les parois de la même cellule, montrent qu'on peut considérer de telles cellules comme une forme de dégradation des vaisseaux aréolés et les rattacher ainsi aux types cellulaires des tissus secondaires.

Par contre, il n'a jamais été observé dans ces conditions de vaisseaux imparfaits annelés ou spiralés caractérisant le xylème primaire. Ceux-ci ne peuvent réapparaître que si, à la suite de la néoformation de méristèmes de tiges ou de racines, il se développe de nouveaux organes qui offrent alors la structure anatomique normale de l'essence considérée. Il apparaît ainsi qu'il existe une coupure fondamentale entre méristème primaire et méristème secondaire en ce qui concerne tant les types cellulaires issus de ces méristèmes que le potentiel d'organisation.

IV

Organogénèse

- 1° Chez aucune des 30 essences étudiées les premiers isolements n'ont formé de racines.

Seuls les tissus d'*Ulmus campestris* ont formé des bourgeons. Chez cette essence, des bourgeons apparaissent rapidement sur la zone cambiale des parties sectionnées et séparées de l'arbre, mais jamais sur les lèvres des blessures faites sur des organes en place.

- 2° Parmi les huit essences dont les tissus ont pu être repiqués plusieurs fois, cinq : *C. vesca*, *P. avium* et les trois espèces d'*Eucalyptus* n'ont jamais formé d'organes, deux : *Ulmus campestris* et *Tilia parvifolia* ont formé seulement des racines, deux autres : *Populus tremula* et *Betula verrucosa* des racines et des bourgeons.
- 3° Les propriétés d'une même essence peuvent varier considérablement suivant les individus, comme l'ont montré les expériences sur sept souches d'*U. campestris* et trois souches de *P. tremula*.
- 4° En ce qui concerne cette dernière essence, l'aptitude au bouturage est liée directement au pouvoir rhizogène du tissu cambial.
- 5° Le pouvoir rhizogène ou caulogène ne se manifeste qu'après un (*T. parvifolia*) ou plusieurs repiquages (*U. campestris*, *P. tremula*, *B. verrucosa*). Il est souvent temporaire, voire fugace, et ne persiste que pendant quelques passages (*U. campestris*, *B. verrucosa*).
- 6° Facteurs chimiques intervenant dans l'organogénèse :

- a) *Facteurs naturellement présents dans les tissus*. La néoformation de pousses sur les explantats d'orme, les tissus repiqués de *B. verrucosa* et *P. tremula* cultivés sur des milieux ne contenant que des glucides et des aliments minéraux, ou les segments de tige d'orme cultivés dans l'eau, montre que ces tissus ont le pouvoir de faire la synthèse de toutes les substances nécessaires à la caulogénèse. L'induction de la formation de racines chez le tissu faiblement rhizogène de la souche M de *P. tremula* par la mise en contact avec le tissu de la souche V montre que certains de ces facteurs naturels sont transmissibles d'un tissu à l'autre. La mise en évidence de tels facteurs semble venir à l'appui de l'hypothèse des rhizocalines.

A l'inverse, la formation de bourgeons par le tissu cambial d'*U. campestris* séparé de l'ensemble de l'arbre conduit à envisager l'existence d'inhibiteurs de caulogénèse. Le fait que les tissus des premiers isolements ne forment jamais de racines pourrait s'expliquer par un déficit en rhizocalines dans ces tissus, mais le cas des explantats de la souche R de *P. tremula*, chez lesquels le tissu rhizogène de la souche V n'a pas induit la formation de racines, conduit également à l'hypothèse de l'existence d'inhibiteurs dont la concentration diminuerait au cours des premiers repiquages.

L'évolution du pouvoir organogène des tissus au cours des repiquages successifs a été constatée chez toutes les essences. Chez *B. verrucosa* et *U. campestris*, la faculté de pro-

duire des organes est apparue comme un phénomène fugace, ne se manifestant que pendant un nombre très limité de passages. Pour le tissu de *B. verrucosa*, qui n'exige pas l'apport d'auxine, les phases de rhizogenèse et de caulogenèse ne coïncident pas et ces deux phénomènes semblent s'exclure l'un l'autre.

Chez *P. tremula* l'évolution, plus lente et moins marquée, se limite à un affaiblissement du pouvoir rhizogène à partir d'une vingtaine de passages. L'exaltation de la rhizogenèse chez les tissus provenant d'une tumeur de racine pourrait s'expliquer par un enrichissement en rhizocalines au contact direct des tissus des racines où ces substances doivent être normalement présentes.

b) *Facteurs chimiques introduits dans les milieux:*

Adénine: Si dans certaines expériences l'adénine a agi comme facteur stimulant de la caulogenèse sur les tissus d'explantats d'*U. campestris*, elle n'est pas toujours, pour cette essence, le facteur limitant de la formation des bourgeons. Chez *P. tremula* et *B. verrucosa* elle n'a manifesté aucune action.

Auxines: Chez *P. tremula* l'acide α -naphthyl-acétique inhibe presque totalement la caulogenèse à la concentration de 10^{-6} , concentration nécessaire à une prolifération active du tissu. A cette concentration la rhizogenèse est active. En l'absence d'auxine, la prolifération du tissu s'arrête mais des pousses apparaissent.

A la même concentration, cette auxine bloque la caulogenèse chez *U. campestris*.

Vitamines.

Méso-inositol. — Le méso-inositol est apparu comme facteur de caulogenèse pour le tissu d'*U. campestris*.

En dehors du méso-inositol les résultats d'expériences sur tissu de *B. verrucosa* et *P. tremula* paraissent indiquer que l'ancurine et surtout l'acide pantothénique pourraient, à certaines concentrations, jouer le rôle d'inhibiteurs. Ces indications seraient à vérifier sur un matériel chez lequel la caulogenèse serait plus régulière.

L'ensemble de ces faits, rapproché des résultats obtenus par différents expérimentateurs dans les essais de bouturage conduit aux conclusions générales suivantes:

L'organogenèse dépend de facteurs chimiques déterminés, transmissibles par greffe d'un tissu d'une variété rhizogène à une variété non rhizogène de la même espèce comme l'ont montré, après les expériences de greffe de van OVERBEEK et de ses collaborateurs sur *Acalypha*, nos expériences sur tissus de *P. tremula*, et tout récemment les expériences de GAUTHERET (73, 74) sur topinambour.

Parmi ces facteurs les auxines agissent à certaines concentrations comme activateurs sur la rhizogenèse, comme inhibiteurs sur la caulogenèse.

Le méso-inositol a manifesté chez l'orme les propriétés d'une caulocaline. Il en a été de même pour l'adénine lorsque le rapport des concentrations adénine/inositol est compris entre certaines limites (108).

En dehors de ces substances connues, il existe d'autres substances encore inconnues : inhibiteurs de la rhizogenèse chez les explants prélevés sur toutes les essences (*P. tremula*, *B. verrucosa*, *U. campestris*, *T. parvifolia*) dont les tissus forment des racines après un ou plusieurs repiquages, facteurs rhizogènes autres que l'auxine transmissibles de la souche V à la souche M de *P. tremula*, facteurs caulogènes se manifestant après un certain nombre de repiquages chez *B. verrucosa* et *P. tremula*.

Lorsque l'hypothèse de l'existence de calines a été émise, elle semblait impliquer qu'il s'agissait de substances spécifiques de l'organogenèse, de nature chimique entièrement inconnue et qu'on pouvait espérer identifier par l'analyse chimique *qualitative* comparée de végétaux doués de facultés d'organogenèse et de végétaux de même espèce dépourvus de ces propriétés.

Après celle de l'adénine, l'identification du méso-inositol comme caulocaline, le rôle du rapport des concentrations des deux substances, l'existence d'inhibiteurs de caulogenèse autres que l'auxine conduisent à reviser ces conceptions et à considérer que l'organogenèse est déterminée par un équilibre bien défini entre les concentrations d'un certain nombre de substances dont certaines sont déjà connues par ailleurs pour d'autres propriétés : auxines, vitamines, bases puriques et pyrimidiques, etc... Si n substances interviennent dans le phénomène, le point représentant la composition hormonale déterminant l'organogenèse dans un espace à n dimensions doit être intérieur à une hypersurface de cet espace. Il n'est pas nécessaire de supposer que parmi ces calines existeraient des substances de nature chimique encore inconnue, en quelque sorte mystérieuse. Il est possible que toutes les substances ayant un rôle d'activateur ou d'inhibiteur dans l'organogenèse aient déjà été identifiées dans les tissus végétaux, mais seule une analyse *quantitative* comparée des tissus organogènes et non organogènes d'une même espèce peut mettre sur la voie de leur identification et permettre ensuite de reconstituer des milieux de culture susceptibles de provoquer la formation d'organes.

L'intervention dans l'organogenèse de plusieurs facteurs chimiques, dont les concentrations de chacun doivent être comprises entre certaines limites, réduit d'une manière générale la probabilité de néoformation d'organes chez un tissu quelconque. Elle explique le caractère précaire et inconstant de l'organogenèse chez la plupart des tissus, ses variations au cours des repiquages successifs de tis-

sus qui ne semblent pas présenter de variations morphologiques et anatomiques, mais chez lesquels une simple variation dans l'activité de synthèse d'une seule substance suffit à faire cesser la néoformation d'organes. De même le long délai nécessaire au développement des racines sur les marcottes de *Castanea vesca* et de *Pinus pinaster* correspondrait à la lenteur de l'élaboration par les tissus foliaires de substances venant peu à peu s'accumuler au niveau de la base des pousses ou de l'annélation.

On peut ainsi penser que si certaines espèces végétales sont impossibles ou très difficiles à bouturer, ce caractère génétique est de nature physiologique et traduit une composition hormonale extérieure à l'hypersurface critique, mais rien n'oblige à penser qu'il s'agit d'une impossibilité héréditaire absolue, de nature quelque peu mystérieuse, et qu'aucune technique ne parviendrait à surmonter.

Il apparaît ainsi que dans les recherches sur l'organogenèse et, en particulier, sur le bouturage, l'avenir appartient à une collaboration de la biochimie analytique et de la physiologie, la biochimie ayant pour rôle d'établir des bilans analytiques *quantitatifs* de la composition hormonale de tissus organogènes et non organogènes.

Les recherches sur l'organogenèse et, en particulier, sur le bouturage ont été, en général, conduites suivant une méthode synthétique qui consistait à étudier l'effet de substances connues: auxines, vitamines, etc... Outre que cette méthode oblige à mettre en jeu un matériel expérimental énorme dès que le nombre de substances à essayer et, par suite, de leurs combinaisons (1) possibles à diverses concentrations dépasse quelques unités, les critères du choix de ces substances sont souvent incertains et surtout, faute de connaître au préalable la concentration d'une substance active naturellement présente dans les tissus, on risque, soit de fournir un apport insuffisant de ce facteur, soit au contraire de dépasser le seuil d'inhibition et de conclure à tort que cette substance n'a pas d'action sur l'organogenèse ou agit comme inhibiteur.

La première étape de ces recherches devrait donc être l'analyse quantitative comparée du milieu hormonal de souches organogènes et non organogènes d'une même espèce végétale. C'est en s'appuyant sur ces résultats que le physiologiste pourra ensuite composer des milieux synthétiques apportant aux tissus non rhizogènes les appoints nécessaires de substances apparues comme déficitaires dans le bilan analytique afin de reconstituer un milieu hormonal identique à celui de la souche organogène.

(1) au sens de l'analyse combinatoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. AFANASIEV (M.). — 1939 — Effect of indolebutyric acid on rooting of greenwood cuttings of some deciduous forest trees.
Journ. Forest., **37**, p. 37-41.
2. AMILON (J.A.). — 1910 — On tiden för diameter-tillväxtens början hos barrträden och orsakerna härtill.
Skogsvårdsföreningen Tidskrift, **8**.
3. ANTEVS (E.). — 1917 — Die Jahresringe der Holzgewächse und die Bedeutung derselben als Klimatischer Indikator.
Progressus rei botanicae, **V**, 285-386.
4. AVERY (G.S.), BURKHOLDER (P.R.), CREIGHTON (H.B.). — 1937 — Production and distribution of growth hormone in shoots of *Aesculus* and *Malus*, and its probable role in stimulating cambial activity.
Amer. Journ. of Bot., **24**, 51-58.
5. BALL (F.). — 1950 — Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens*.
Growth, 1950, **14**, 295-325.
6. BARKER (W.G.). — 1953 — Proliferative capacity of the medullary sheath region in the stem of *Tilia americana*.
Amer. J. Bot., **40**, 773-778.
7. BARNOUD (F.). — 1955 — Sur la culture du tissu cambial de Lilas (*Syringa vulgaris* L.).
C.R. Ac. Sc., **240**, 2008-10, 16 mai 1955.
8. BARNOUD (F.). — 1958 — Sur la culture de tissu cambial de *Carpinus betulus* L., *Populus tremula* L., *Quercus sessiliflora* Sm.
C.R. Ac. Sc., **242**, 1508-09, 12 mars 1956.
9. BARNOUD (F.). — 1962 — Recherches sur le tissu cambial d'arbres cultivé *in vitro*.
Thèse, Grenoble, 1962.
10. BERDUCOU (Mlle J.). — 1952 — Le rôle de l'acide indol- β -acétique dans la formation des chancres parasitaires chez les végétaux.
C.R. Ac. Sc., **235**, 309.
11. BERDUCOU (Mlle J.). — 1949 — Recherches sur le mode d'action de certains champignons parasites (*Nectria*).
C.R. Ac. Sc., **228**, p. 1052-4.
12. BONNER (J.) and ENGLISH (J. Jr). — 1937 — Purification of traumatin, a plant wound hormone.
Science, **86**, p. 352-3.
13. BOUILLENNE (R.). — 1949 — La Rhizogénèse.
Colloque Internat. du C.N.R.S. sur la morphogénèse (Strasbourg, juillet 1949), XXVIII, pp. 596-628.
14. BOUILLENNE (R.) et WENT (F.W.). — 1933 — Recherches expérimentales sur la néoformation des racines dans les plantules et les boutures de plantes supérieures.
Ann. Jard. Bot. Buitenzorg, **43**, p. 25-202.
15. BOUVAREL (P.) et LEMOINE (M.). — 1957 — Sélection et amélioration des peupliers de la section *Leuce* en France.
VI^e Congrès Intern. du peuplier. Avril 1957. Rapports et communications françaises, p. 56-73.

16. BROWN (H.P.). — 1912 — Growth studies in forest trees. I *Pinus rigida* Mill.
Bot. Gaz., **54**, 386-402.
- BROWN (H.P.) — 1915 — Growth studies in forest trees II *Pinus strobus* L.
Bot. Gaz., **59**, 197-241.
17. BOURKHOLDER (P.R.), Mc VEIGH, ILDA. — 1945 — The vitamine B contents of buds and shoots of some common trees.
Plant Phys. Avr., 1945, **20**, 276-82.
18. CAMUS (G.). — 1949 — Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse.
Rev. Cytol. et Biol. végétale, T. XI, p. 1-199.
19. CAPORALI (L.). — 1958 — Anomalies structurales provoquées par le *Taphrina deformans* (Berk.). Tal. sur les jeunes rameaux de *Prunus persica* L.
C.R. Ac. Sc., **246**, 3180-83, 2 juin 1958.
20. CHALK (L.). — 1927 — The growth of the wood of ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. oxycarpa* Willd.) and Douglas Fir (*Pseudotsuga Douglasii* Carr.).
Quarterly Journ. of Forestry, 1-20.
21. CHALK (L.). — 1930 — The formation of spring and summer wood in ash and Douglas fir.
Oxf. forestry memoirs, **10**, 1930.
22. CHARDENON (Jean) et TARIS (Bernard). — 1960 — Remarques sur la structure des tissus néoformés et l'apparition d'organes spécialisés chez 4 cultivars de *Populus* et chez *Salix alba* cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **251**, n° 19, pp. 2070-71.
23. CHARDENON (Jean) et TARIS (Bernard). — 1960 — Recherches sur la reprise de l'activité du cambium de cultivars de *Populus*, cultivé *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **251**, 120-1, 4 juillet 1960.
24. CHARGRAFF (E.), STEWART (N.R.), MAGASANIK (B.). — 1948 — Inhibition of mitotic poisoning by inositol.
Science, **108**, 556.
25. CHOWDURY (K.A.) et TANDAN (K.N.). — 1950 — Extension and radial growth in trees.
Nature, vol. 165, 732-3, 6 mai 1950.
26. CHRISTISON (D.). — 1889 — On the monthly increase in girth of trees at the Royal Botanic Garden and at Craigie hall, near Edinburgh.
Transact. of the Bot. Soc., 17.
27. COCKERMAN (G.). — 1930 — Some observations on cambial activity and seasonal starch content in sycamore (*Acer pseudoplatanus*).
Proc. Leeds Phil. and Lit. Society. Sci. Sect., Vol. II, Part. II, 64-80.
28. COUSIN (H.) et HERISSEY (H.). — 1908 — Oxydation de l'eugénol par le ferment oxydant des champignons et par le perchlorure de fer; obtention du déhydrodieuégnol.
C.R. Ac. Sc., **146**, 1413-5.
29. DANILOV (M.D.). — 1946 — On the breaking of winter rest by buds of woody plants.
C.R. Ac. Sc. U.R.S.S., **53**, n° 3, 267-9.
30. DAUBENMIRE (R.F.). — 1949 — Relation of temperature and day length to the inception of tree growth in spring.
Bot. Gazette, **110**, n° 3, p. 464-75.
31. DAVID. — 1949 — La réalisation du Bouturage du Pin Maritime.
C.R. Ac. Sc., **228**, n° 12, 1045-7.
32. DAVID (R.). — 1953 — Recherches sur la multiplication végétative du pin maritime.
Botaniste, **37**, n° 6, p. 361-76.

33. DEUBER (C.G.) and FARRAR (J.L.). — 1939 — Rooting Norway Spruce cuttings without Chemical treatment.
Science, **90**, p. 109-10.
34. DÖPP (W.). — 1939 — Versuche über die Bewurzelung von Sprossstecklingen von *Populus tremula* L.
Angew. Bot., **21**, p. 382-91.
35. DORMAN W. KEITH. — 1944 — Naval stores, Yields, Species, Improvement, Propagation.
Office Memorandum - Forest Service Southeastern Exper. Station. 19 nov. 1944.
36. DORMAN W. KEITH. — 1947 — The vegetative propagation of naval stores pines.
3rd Progress report - U.S.A.
Forest Service - Southeastern Forest Experiment Station.
37. Mac DOUGAL (D.T.). — 1930 — Lengthened growth periods and continuous growth.
Proc. Amer. Philos. Soc., **69**, 329-45.
38. DUHAMET (L.). — 1957 — Sur la possibilité de stimuler la prolifération de tissus végétaux en les associant en culture *in vitro* à des tissus appartenant à une autre espèce.
C.R. Ac. Sc., **245**, p. 2359-61, 16 déc. 1957.
39. DUHAMET (L.). — 1957 — Sur la diversité des réactions de quelques tissus végétaux cultivés *in vitro* en présence de lait de coco, d'auxine et de mélange de ces substances.
C.R. Soc. Biol., **151**, 2043-5.
40. DUHAMET (L.). — 1958 — Sur l'existence dans les tissus de Ronce cultivés *in vitro* de substances capables d'exciter ou d'inhiber la prolifération d'autres tissus.
C.R. Ac. Sc., **246**, 1147-50, 6-1-58.
41. EDGERTON (L.J.). — 1944 — Two factors affecting rooting of red maple cuttings.
Journ. of Forestry U.S.A., **42**, p. 678-9.
42. ENGLISH (J. Jr.), BONNER (J.) and HAAGEN SMIT. — 1939 — Structure and synthesis of a plant wound hormone.
Science, **90**, p. 329.
43. FALLOT (Jean). — 1960 — Effet de l'activité des bourgeons de vigne sur la prolifération *in vitro* du cambium.
C.R. Ac. Sc., **251**, n° 22, p. 2575-7, 28 nov. 1960.
44. FALLOT (Jean). — 1958 — Induction par *Bacillus megaterium* de la prolifération *in vitro* des tissus de tiges de *Vitis rupestris* prélevées pendant la période de repos végétatif.
C.R. Ac. Sc., **246**, n° 2, 295-8, 13-1-58.
45. FARRAR (J.) and GRACE (N.H.). — 1942 — Vegetative propagation of Conifers. XI. Effect of type of cutting on the rooting of Norway Spruce cuttings.
Canad. J. Res. Sect. C, **20**, 116-21.
46. FARRAR (J.) and GRACE (N.H.). — 1942 — Vegetative propagation of Conifers. XII. Effects of media, time of collection and indolylacetic treatment on the rooting of white pine and white spruce cuttings.
Canad. J. Res., **20**, Sect. C, p. 203-11.
47. FOWELLS (H.A.). — 1941 — The period of seasonal growth of ponderosa pine and associated species.
Jour. Forestry, **39**, 601-8.
48. FRASER (D.A.). — 1949 — Production of springwood with β -indolyl-acetic acid (Heteroauxin).
Nature G.B., **164**, n° 4169, p. 542.
49. FRASER (D.A.). — 1952 — Initiation of cambial activity in some forest trees in Ontario.
Ecology U.S.A., **33**, n° 2, p. 259-73.

50. FREUDENBERG (K.). — 1952 — Die Entstehung des Lignins in der Pflanze. *Holzforschung* VI, n° 2, p. 37-42.
51. FREUDENBERG (K.). — 1956 — Beiträge zur Erforschung des Lignins. *Angew. Chem.*, **68**, Nr 16, p. 508-12.
52. FREUDENBERG (K.). — 1960 — Biochemische Vorgänge bei der Holzbildung. *Biochemistry of Wood* Pergamon, 121-133.
53. FRIESNER (R.C.), WALDEN (G.A.). — 1946 — A five year dendrometer record in two trees of *Pinus strobus*. *Butler Univ. Bot. Studies*, **8**, 1-23.
54. GAUTHERET (R.J.). — 1934 — Culture du tissu cambial. *C.R. Ac. Sc.*, **198**, 2195-6.
55. GAUTHERET (R.J.). — 1935 — Recherches sur la culture des tissus végétaux. Essais de culture de quelques tissus méristématiques. *Revue de Cytol. et de Cytophysiol. végét.* Mémoire n° 1.
56. GAUTHERET (R.J.). — 1937 — La culture des tissus végétaux, son état actuel, comparaison avec la culture des tissus animaux. Hermann et Cie. Paris.
57. GAUTHERET (R.J.). — 1938 — Sur le repiquage des cultures de tissu cambial de *Salix caprea*. *C.R. Ac. Sc.*, **206**, p. 125-7.
58. GAUTHERET (R.J.). — 1939 — Action de l'acide indol- β -acétique sur les tissus du tubercule de carotte. *C.R. Sc. Biol.*, **130**, 7-9.
59. GAUTHERET (R.J.). — 1940 — Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*U. campestris* cultivé *in vitro*. *C.R. Ac. Sc.*, **210**, 632-4.
60. GAUTHERET (R.J.). — 1940 — Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C.R. Ac. Sc.*, **210**, 744-6.
61. GAUTHERET (R.J.). — 1941 — Sur le repiquage des cultures de tissus d'Endive, de Salsifis et de Topinambour. *C.R. Ac. Sc.*, **213**, 317-8.
62. GAUTHERET (R.J.). — 1942 — Le bourgeonnement des tissus végétaux en culture. *Sciences*, **40**, 95-128.
63. GAUTHERET (R.J.). — 1942 — Manuel technique de culture des tissus végétaux. Masson et Cie Editeurs. Paris.
64. GAUTHERET (R.J.). — 1942 — Recherches sur le développement de fragments de tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Rev. Cytol. Cytophysiol. Vég.*, **6**, 87-100.
65. GAUTHERET (R.J.). — 1949 — La culture des tissus végétaux et les phénomènes d'Histogenèse. Colloque International du C.N.R.S. sur la morphogenèse. (Strasbourg, Juillet 1949) XXVIII, pp. 719-744.
66. GAUTHERET (R.J.). — 1950 — Recherches sur les phénomènes d'histogenèse provoqués par l'action de l'acide indol- β -acétique sur le tissu cambial et le liber de *Salix caprea*. *C.R. Soc. Biol.*, **144**, 13 mai 1950, 622-6.
67. GAUTHERET (R.J.). — 1950 — Action du contact d'un milieu aqueux sur la morphogenèse des cultures de tissu cambial de *Salix caprea*. *C.R. Soc. Biol.*, **144**, 626-9.
68. GAUTHERET (R.J.). — 1952 — Remarques sur l'emploi du lait de coco pour la réalisation des cultures de tissus végétaux. *C.R. Ac. Sc.*, **235**, p. 1321-22.
69. GAUTHERET (R.J.). — 1955 — Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, T. 62, pp. 5-112.

70. GAUTHERET (R.J.). — 1956 — Sur les phénomènes d'histogenèse dans les cultures de tissus de *Pinus strobus* L.
C.R. Ac. Sc., **242**, 3108-3110, 25 juin 1956.
71. GAUTHERET (R.J.). — 1957 — Histogenesis in Plant tissue cultures.
J. Nation. Cancer Institute, **19**, n° 4, oct. 1957, p. 555-90.
72. GAUTHERET (R.J.). — 1959 — La culture des tissus végétaux.
Masson et Cie, Editeurs, Paris.
73. GAUTHERET (R.J.). — 1961 — Action de la lumière et de la température sur la néoformation de racines par des tissus de Topinambour cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **252**, p. 2791-96 (8 mai 1961).
74. GAUTHERET (R.J.). — 1961 — Nouvelles recherches sur la néoformation de racines par des tissus de Topinambour cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **253**, n° 15 (9 oct. 1961), p. 1514-16.
75. GEISBÜHLER (H.) et SKOOG (F.). — 1957 — Comments on the application of plant tissue cultivation to propagation of forest trees.
Tappi, **10**, n° 4 (avril 1957), p. 257-62.
76. GINDEL. — 1947 — Again on cambial activity of Aleppo Pine.
Palest. J. Bot. Rehovot Ser., **6**, 23-6.
77. GIOELLI (F.). — 1938 — Morphologia, istologia, fisiologia e fisiopatologia di meristemi secondari *in vitro*.
Atti Accad. Sci. Ferrara, **16**, 1-87.
78. GOUWENTAK (C.). — 1941 — Cambial activity as dependent on the presence of growth hormone and the non-resting condition of stems.
Nederl. Akademie van Wetenschappen Tijds., **44**, 654-63.
79. GRACE (N.H.). — 1939 — Vegetative propagation of conifers - I. Rooting of cuttings taken from the upper and lower regions of a Norway Spruce tree.
Canad. J. Res., Sec. C, **17**, 178-80.
80. GRACE (N.H.). — 1939 — Vegetative propagation of Conifers - II. Effects of nutrient solution and phytohormones dusts on the rooting of Norway spruce cuttings.
Canad. J. Res., Sec. C, **17**, 312-6.
81. GRACE (N.H.). — 1939 — Vegetative propagation of Conifers - III. Effects of month of collection on the rooting of dormant Norway spruce cuttings.
Canad. J. Res., Sec. C, **17**, p. 376-9.
82. GRACE (N.H.). — 1940 — Vegetative propagation of Conifers - IV. Effects of cane sugar, ethyl mercuric phosphate and indolylacetic acid in talc dust on the rooting of Norway spruce.
Canad. J. Res., Sec. C, **18**, p. 13-17.
83. GRACE (N.H.) and THISTLE. — 1940 — Vegetative propagation of Conifers - V. The effect of indolylacetic acid on the rooting of Norway spruce cuttings.
Canad. J. Res., Sec. C, **18**, p. 122-8.
84. GRACE (N.H.) and FARRAR (J.L.). — 1941 — Effects of talc dusts containing phytohormones, nutrient salts and organic mercurial disinfectant on the rooting of dormant *Taxus* cuttings.
Canad. J. Res., Sec. C, **19**, p. 21-6.
85. GRACE (N.H.). — 1941 — Effects of potassium acid phosphate, cane sugar, ethylmercuric bromide and indolyl-acetic acid in a talc carrier on the rooting of stem cuttings.
Canad. J. Res., Sec. C, **19**, p. 99-105.
86. GRACE (N.H.) and FARRAR (J.L.). — 1945 — Vegetative propagation of Conifers - XIII. Rooting of Norway Spruce cuttings in the greenhouse.
Canad. Jour. Res., **23**, Sec. c, p. 149-65.

87. GRACE (N.H.) and FARRAR (J.L.). — 1945 — Vegetative propagation of Conifers - XIV. Note on seasonal progress of rooting of Norway Spruce cuttings.
Canad. Journ. Res., **23**, Sec. C, p. 190-1.
88. GUILLEMAIN (Mme G.J.). — 1953 — Sur l'identification de la substance de croissance provoquant les tumeurs des chênes attaqués par *Agrilus biguttatus* (Coléopt. Buprestidae).
C.R. Ac. Sc., **236**, p. 978-9.
89. GULBE (L.A.). — 1888 — Über die periodische Aktivität des Kambiums in den Wurzeln unserer Bäume.
Bot. Zentralblatt, **38**, p. 487 et **40**, p. 43.
90. HARTIG (R.). — 1882 — Lehrbuch der Baumkrankheiten.
Julius Springer, Berlin.
91. HARTIG (R.). — 1892 — Über Dickenwachstum und Jahresringbildung.
Bot. Zeit., **50**, 176-80 et 193-96.
92. HARTIG (Th.). — 1857 — Beiträge zur physiologischen Forstbotanik. Über die Vegetationsperioden der Waldbäume und deren Produkte.
Allgemein. Forst- u. Jagdzeitung, 281-96.
93. HELLER (R.). — 1949 — Sur l'emploi du papier-filtre sans cendre comme support de culture des tissus végétaux.
C.R. Soc. Biol. Fr., **143**, n° 5-6, 335-7.
94. HELLER (R.). — 1953 — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux.
Thèse Doct. Sc. Nat. Paris (Masson, édit.).
95. HELLER (R.). — 1954 — Les besoins minéraux des tissus en culture.
Union Intern. Sc. Biol. S¹e B, n° 20, p. 265-81.
96. HENDERSON (F.Y.). — 1935 — Timber and attack by *Lyctus* beetle.
Ann. Bot., CXCVI, oct. 1935, p. 854.
97. HENDERSON (F.Y.). — 1943 — The depletion of starch from the sapwood of the ash (*Fraxinus excelsior* L.) and its relation to attack by powder-post beetles (*Lyctus* spp.).
Ann. Appl. Biol. G.B., **30**, n° 3, p. 201-6.
98. HUBER. — 1945 — Physiologische rhythmien im Baum.
Meteor. Rdsch. Dtsch., nov.-déc. 1945, **1**, 144-7.
99. IWANOFF (L.A.). — 1934 — Vom Einfluss der Stammbeschattung auf die Arbeit des Kambiums.
Journ. Bot. U.R.S.S., **19**, 220-24.
100. JACQUOT (C.). — 1947 — Effet inhibiteur des tannins sur le développement des cultures *in vitro* du cambium de certains arbres forestiers.
C.R. Ac. Sc., **225**, p. 434-6, 8 sept. 1947.
101. JACQUOT (C.). — 1949 — De quelques particularités anatomiques et cytologiques observées dans l'aubier de chênes dépérissants (*Quercus sessiliflora* Sm. et *Q. pedunculata* Ehr.).
C.R. Ac. Sc., **229**, p. 241-3, 18 juil. 1949.
102. JACQUOT (C.). — 1949 — Observations sur la néoformation de bourgeons chez le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **229**, p. 529-30, 5 sept. 1949.
103. JACQUOT (C.). — 1950 — Sur la culture *in vitro* du tissu cambial de châtaignier (*Castanea vesca* Gaertn.).
C.R. Ac. Sc., **231**, p. 1080-81, 13 nov. 1950.
104. JACQUOT (C.). — 1950 — Sur le déterminisme de la formation des tumeurs ligneuses observées chez les chênes attaqués par *Agrilus biguttatus* Fab. (Coléopt. Buprestidae).
C.R. Ac. Sc., **231**, p. 1552-4, 18 déc. 1950.
105. JACQUOT (C.). — 1950 — Des relations entre les attaques d'*Agrilus biguttatus* Fab. et certains cas de dépérissement des chênes.
Rev. Path. Vég. Entom. Agr. Fr., **29**, 172-82.

106. JACQUIOT (C.). — 1950 — Contribution à l'étude des facteurs déterminant le cycle d'activité du cambium chez quelques arbres forestiers.
Rev. For. Fr., 1950, n° 11, p. 605-10.
107. JACQUIOT (C.). — 1951 — Sur les facteurs déterminant la reprise de l'activité du cambium chez diverses essences forestières.
C.R. Ac. Sc., **232**, p. 2350-2, 18 juin 1951.
108. JACQUIOT (C.). — 1951 — Action du méso-inositol et de l'adénine sur la formation de bourgeons par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **233**, p. 815-7, 8 oct. 1951.
109. JACQUIOT (C.). — 1952 — Sur les phénomènes d'histogenèse observés dans des cultures *in vitro* de tissu cambial de Chêne (*Q. sessiliflora* Sm., *Q. pedunculata* Ehr., *Q. suber* L.).
C.R. Ac. Sc., **234**, p. 1468-70, 31 mars 1952.
110. JACQUIOT (C.). — 1953 — Observations sur l'histogenèse et la lignification dans des cultures *in vitro* de tissu cambial de certains arbres forestiers. Influence de quelques hydrazides sur ces phénomènes.
C.R. Ac. Sc., **236**, p. 960-1, 2 mars 1953.
111. JACQUIOT (C.) et Mme GUILLEMAIN-GOUVERNEL (J.). — 1954 — Action sur les tissus de pousses de chêne de deux principes actifs extraits de la vermoulure des galeries d'*Agrilus biguttatus* Fab. Coléopt. Buprestidae).
C.R. Ac. Sc., **238**, p. 924-6, 22 février 1954.
112. JACQUIOT (C.). — 1954 — Action sur des tissus végétaux de facteurs naturels produits par des organismes parasites d'arbres.
Un. Intern. Sc. Biol. S¹ B, n° 20, p. 457-60.
113. JACQUIOT (C.) et VINEY (R.). — 1954 — La Graisse du Chêne.
Rev. Path. Végét. Entom. Agr. Fr., **33**, n° 2.
114. JACQUIOT (C.) et HERVET (Mlle N.). — 1954 — Contribution à l'étude des poches à Kino des Eucalyptus.
Rev. Path. Vég. Entom. Agr. Fr., **33**, n° 4.
115. JACQUIOT (C.). — 1955 — Formation d'organes par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* L. et de *Betula verrucosa* Gaertn. cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **240**, p. 557-8, 31 janv. 1955.
116. JACQUIOT (C.). — 1955 — Sur les besoins en auxine et les caractères morphologiques externes des cultures de tissu cambial de quelques espèces d'arbres.
C.R. Ac. Sc., **243**, p. 510-12, 30 juil. 1955.
117. JACQUIOT (C.). — 1955 — Sur le rôle des corrélations d'inhibition dans les phénomènes d'organogenèse observés chez le tissu cambial, cultivé *in vitro* de certains arbres. Incidences sur les problèmes du bouturage.
C.R. Ac. Sc., **241**, p. 1066-8, 17 oct. 1955.
118. JACQUIOT (C.). — 1957 — Sur l'existence de facteurs d'organisation des tissus secondaires chez certains arbres forestiers.
C.R. Ac. Sc., **244**, p. 1246-9, 25 février 1957.
119. JACQUIOT (C.). — 1958 — Recherches sur la rhizogénèse chez le tissu cambial de *Populus tremula* L. cultivé *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **246**, p. 1489-92, 3 nov. 1958.
120. JACQUIOT (C.). — 1961 — Note préliminaire sur une maladie du bois de hêtre dans l'Est de la France.
Rev. Forest. Fr., n° 3, mars 1961, p. 167-70.
121. JOST (L.). — 1891 — Über Dickenwachstum und Jahresringbildung.
Bot. Zeit., **49**, 485-95, 501-10, 525-31, 541-7, 557-63, 573-9, 589-96, 605-11, 625-30.
122. JOST (L.). — 1940 — Zur Physiologie der Gefassbildung.
Zeitsch. für Bot., **35**, 114-49.
123. KARSTENS (W.K.H.). — 1955 — Observations on the proliferation of stem pith parenchyme *in vitro*. I. General introduction.
Acta bot. neerl., **4**, n° 2, 183-7.

124. KNUDSON (L.). — 1913 — Observations on the inception, season and duration of the cambium development in the American larch (*Larix laricina* (du Roi) Koch).
Bull. Torr. Bot. Club, **40**, 271-93.
125. KOMISSAROV (D.A.). — 1938 — Effect of growth substances upon rooting response of cuttings from pine and other woody species.
C.R. Ac. Sc. U.R.S.S., **21**, n° 9.
126. KOMISSAROV (D.A.). — 1946 — Enracinement des boutures de chêne-liège (*Quercus suber* L.) traitées par des substances chimiques.
Dokl. Akad. U.R.S.S., **52**, n° 4, 357-60.
127. KRABBE (G.). — 1884 — Über das Wachstum des Verdickungsringes und der jungen Holzellen in seiner Abhängigkeit von Druckwirkungen.
Anh. z. d. Abh. Kgl. Akad. Wiss. Berlin, Abteilung I, 1-83.
128. KUNNING (H.) und SÖDING (H.). — 1949 — Über die Wirkstoffregulation der Kambiumtätigkeit.
Z. Nat. Forsch. Bd., **46**, n° 1, p. 55.
129. KÜNNING (H.). — 1950 — Untersuchungen über die Wirkstoffregulation der Kambiumtätigkeit.
Planta, **38**, n° 1, 36-64.
130. LADEFOGED (K.). — 1952 — The periodicity of wood formation.
Dan. Biol. Skr., **7**, n° 3.
131. LAIBACH (F.). — 1935 — Über die Auslösung von Kallus und Wurzelneubildung durch β -Indolylessigsäure.
Ber. dtsh. bot. Ges., **53**, 359-64.
132. LAIBACH (F.) et FISCHNICH (O.). — 1935 — Künstliche Wurzelneubildung mittels Wuchstoffpaste.
Ber. dtsh. bot. Ges., **53**, 528-39.
133. LEROUX (R.). — 1954 — Recherches sur les modifications anatomiques de trois espèces d'Osiers (*Salix viminalis* L., *Salix purpurea* L., *Salix fragilis* L.) provoquées par l'acide naphthalène-acétique.
C.R. Soc. Biol., 27 février 1954, CXL VIII février 1954, p. 284.
134. LIBBERT (E.). — 1957 — Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. III. Untersuchung der Hemmstoffe, mittels derer eine Wurzel die Adventivwurzelbildung beeinflusst.
Zeitschr. f. Bot., Bd **45**, p. 57-76.
135. LIBBERT (E.). — 1957 — Die regulation des Wurzelwachstum durch synthetische und endogene Inhibitoren.
Planta, **50**, p. 25-40.
136. LIBBERT (E.). — 1956/7 — Die hormonale und Korrelative Steuerung der Adventivwurzelbildung Wissensch. Zeitschr. der Humboldt - Universität zu Berlin.
Jg. VI, N3, p. 315-47.
137. LODEWICK (J.E.). — Seasonal activity of the cambium in some northeastern trees.
Bull. New York State College Forestr. Syracuse Univ. Technic. Publ., **23**, 1-52.
138. MER (E.). — 1892 — Réveil et extinction de l'activité cambiale dans les arbres.
C.R. Ac. Sc., **114**, 242-45, 1892a.
139. MER (E.). — 1893 — Moyen de préserver le bois de la vermoulure.
C.R. Ac. Sc., **117**, 694-6.
140. MER (E.). — 1893 — De divers moyens propres à préserver de l'attaque des insectes les écorces et les bois par résorption de leur réserve amylacée.
Mém. Soc. Nat. Agric. Fr., **140**, 233-47.
141. MESSERI (Albina). — 1948 — L'evoluzione della cerchia legnosa in *Pinus halepensis* Mill. in Bari.
Nuov. Giorn. Bot. Ital., LV, n° 1, p. 111.

142. MIROV (N.T.). — 1944 — Experiments in rooting Pines in California.
J. Forestry, **42**, n° 3, p. 199-204.
143. MITCHELL (H.L.), SCHOPMEYER (C.S.) and DORMAN (K.W.). — 1942 — Pedigreed pines for naval stores production.
Science N.Y., **96**, 18 déc. 1942, p. 559-60.
144. MOHL (H. von). — 1844 — Über die Abhängigkeit des Wachstums der dikotylen Bäume in die Dicke von der physiologischen Thätigkeit der Blätter.
Bot. Zeit., **2**, p. 89-92 et 113-116.
145. MOLISCH (H.). — 1908-1909 — Über ein einfaches Verfahren, Pflanzen zu treiben.
Sitz. ber. Kais. Akad. Wissensch. Wien, **117**, 1908 et **118**, 1909.
146. MOREL (G.). — 1944 — Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de vigne.
C.R. Ac. Sc., **219**, p. 36-7, 3 juil. 1944.
147. MOREL (G.). — Action de l'acide pantothénique sur la croissance des tissus d'aubépine cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **223**, 166-168.
148. MOREL (G.). — 1948 — Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux.
Ann. Epiphyties N.S., **14**, 123-234.
149. MÜLLER (D.). — 1939 — Hvorfor springer Eg og Ask saa sent ud? Forskellen mellem ring-og spredtporede Lovtræer.
Dansk. Skovforen. Tidsskr., **28**, p. 158-66.
150. MÜNCH (E.). — 1938 — Untersuchungen über die Harmonie der Baumgestalt.
Jahrb. f. wiss. Bot., **86**, 581-673.
151. NOBECOURT (P.). — 1939 — Sur les radicelles naissant des cultures de tissus de tubercule de carotte.
C.R. Soc. Biol., **130**, 1271.
152. NOBECOURT (P.). — 1946 — Production de nature caulinaire et foliaire sur les cultures de racines en milieu synthétique.
C.R. Soc. Biol., **140**, 953.
153. NOBECOURT (P.). — 1947 — Apparition de pousses feuillées sur des cultures de tissu de Carotte.
C.R. Soc. Biol., **141**, 590.
154. NYSTERAKIS (F.). — 1946 — Nouvelle interprétation de la formation des cécidies.
C.R. Ac. Sc., **222**, p. 1133-4.
155. NYSTERAKIS (F.). — 1948 — Phytohormones et inhibition de la croissance des organes végétaux attaqués par les Aphides.
C.R. Ac. Sc., **226**, p. 746-7.
156. Van OVERBEEK (J.), and GREGORY (L.E.). — 1945 — A physiological separation of two factors necessary for the formation of roots on cuttings.
Amer. J. Bot., **32**, 336-41.
157. Van OVERBEEK (J.), GORDON (S.A.) and GREGORY (L.E.). — 1946 — An analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings.
Amer. J. Bot., **33**, p. 100-7.
158. PARIS (Mlle D.). — 1954 — Action de quelques vitamines hydrosolubles sur les cultures de tissus végétaux.
Union Internationale des Sciences Biologiques. Série B, n° 20. Premier Colloque International sur la Physiologie des cultures de tissus végétaux. Juil. 1954, p. 215-29.
159. PARIS (Mlle D.). — 1958 — Recherches sur la nutrition des tissus normaux d'Aubépine cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **246**, n° 3, p. 449-51, 20-1-58.

160. PARIS (Mlle D.). — 1958 — Action de la vitamine B₁ et de ses deux constituants: pyrimidine et thiazol sur la croissance des tissus normaux d'Aubépine cultivés *in vitro*.
C.R. Ac. Sc., **246**, p. 1251-4, 24 fév. 1958.
161. PARIS (D.), DUHAMET (L.) et GORIS (A.). — 1954 — Action des vitamines et des acides aminés contenus dans le lait de coco sur la prolifération d'une souche de tissu de Carotte.
C.R. Soc. Biol., 27 fév. 1954, CXLVIII, p. 296.
162. POSTERNAK (S.). — 1919 — Sur deux sels cristallisés du principe phospho-organique des plantes vertes.
C.R. Ac. Sc., **168**, p. 1216-19, 16 juin 1919.
163. POSTERNAK (S.) et POSTERNAK (T.). — 1926 — Sur un éther inositolé-triphosphorique naturel optiquement actif.
C.R. Ac. Sc., **186**, p. 261-63, 23-1-26.
164. POSTERNAK (S.) et POSTERNAK (T.). — 1929 — Sur la configuration de l'inosite active.
C.R. Ac. Sc., **188**, p. 1296-98, 13 mai 1929.
165. PRIESTLEY (J.H.). — 1930 — Studies in the Physiology of cambial activity.
The New Phytologist, **29**, 316-54.
166. PRIESTLEY (J.H.), SCOTT (LORD), MALINS (E.). — 1933 — A new method of studying cambial activity.
Proc. of the Leeds Phil. and Litt. Society Scientific section, Vol. II, 365-74.
167. REES (L.W.). — 1929 — Growth studies in forest trees *Picea rubra* Link.
Journal of Forestry, **27**, p. 384-403.
168. REINERT (J.) et WHITE (P.R.). — 1956 — The cultivation *in vitro* of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*.
Physiol. Plant., **9**, 177-89.
169. RICHTER (A.A.) et KRASNOSSELSKAIA (T.A.). — 1945 — A contribution to the Knowledge of winter dormancy in buds of woody plants.
C.R. Ac. Sc. U.R.S.S., **47**, n° 3, 218-9.
170. ROMELL (L.G.). — 1925 — Växttidsundersökningar a tall och gran.
Medd. f. Statens Skogsförsöksanstalt, **22**, 45-124.
171. SACHS (J.). — 1880-1882 — Stoff und Form der Pflanzenorgane.
I-II *Arb. Bot. Inst. Würzburg*, **2**, p. 452-88, 689-718, 1880-1882.
172. SCHAD (C.). — 1949 — Le problème de l'amélioration du châtaignier en France.
C.R. Ac. Agric. Fr., 30 mars 1949.
173. SHANTZ (E.M.) et STEWARD (F.C.). — 1955 — The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea.
Journ. Amer. Chem. Soc., **77**, 6351-6353.
174. SIMON (S.). — 1930 — Transplantationversuche zwischen *Solanum melongena* und *Iresine Lindenii*.
Jahrb. f. wiss. Bot., **72**, 137.
175. SKOOG (F.). — 1949 — Chemical control of growth and organ formation in plant tissues.
Colloque International sur la morphogenèse (Juillet 1949), 545-62.
176. SKOOG (F.). — 1954 — Growth factors, polarity and morphogenesis.
Un. Intern. Sc. biol., S^{me} B, n° 20, p. 1-13.
177. SNOW (R.). — 1933 — The nature of the cambial stimulus.
The New Phytologist, **32**, 288-95.
178. SNOW (R.). — 1935 — Activation of cambial growth by pure hormones.
The New Phytologist, **34**, 347-60.
179. SNOW (R.). — 1935 — Activation of cambial growth by pure hormones.
Nature, **135**, 876.
180. SNOW (R.), LE FANU (B.). — 1935 — Activation of cambial growth.
Nature, **135**, p. 149.

181. SNOW (A.G.). — 1940 — Rooting white pine cuttings.
U.S.A. Dept. Agric. N.E. For. Exper. St. O.P. n° 11, 30 nov. 1940.
182. SNOW (A.G.). — 1941 — Variables affecting vegetative propagation of red and sugar maple.
J. Forest. U.S.A., **39**, p. 395-403.
183. SÖDING (H.). — 1936 — Über der Einfluss von Wuchsstoff auf das Dickenwachstum der Bäume.
Ber. d. Deutsch. Bot. Gesell., **54**, 291-304.
184. SÖDING (H.). — 1937 — Wuchsstoff und Kambiumtätigkeit der Bäume.
Jahrb. f. weiss. Bot., **84**, 639-70.
185. SÖDING (H.). — 1940-41 — Weitere Untersuchungen über die Wuchstoffsregulation der Kambiumtätigkeit.
Zeitschr. f. Bot., **36**, 113-41.
186. STEWARD (F.C.) et SHANTZ (E.M.). — 1956 — The Chemical induction of growth in plant tissue cultures. The Chemistry and mode of action of plant growth substances.
Symposium Wye College, p. 165-186.
Butterworths Scientific Publications London.
187. STOUTMEYER (V.T.), O'ROURKE (F.L.) and STEINERT (Wilner W.). — 1944 — Some observations on the vegetative propagation of honey locust.
J. Forest. U.S.A., **42**, p. 32-6.
188. STOUTMEYER (V.T.), CLOSE (A.W.) and O'ROURKE (F.L.). — 1945 — Rooting greenwood cuttings without sunlight under fluorescent lamps.
Science N.Y., **101**, p. 546.
189. STOUTMEYER (V.T.), JESTER (), O'ROURKE (F.L.). — 1940 — Vegetative propagation of black locust clones by treating hardwood cuttings with growth substances.
J. Forest., **38**, p. 558-63.
190. SWARBRICK (Th.). — 1927 — Studies in the physiology of fruit trees. I. The seasonal starch content and cambial activity of one-to five-year old apple branches.
The J. of Pomology and Hort. Science, **6**, p. 137-57, 1927a.
191. THIMANN (K.V.) et KOEPLI (J.R.). — 1935 — Identity of the growth-promoting and root-forming substance in plant.
Nature, **135**, 101-102.
192. THOMSEN (M.), BUCHWALD (N.F.) et HAUBERG (P.A.). — 1939-1943 — Angreb af *Cryptococcus fagi*, *Nectria galligena* og andre parasiter paa bog.
(Kandrup og Wunsch's bogtrykkeri Kobenhavn, 1939-1943).
193. TRAYNARD (Ph.) et BARNOUD (F.). — 1957 — Biosynthèse de la lignine. Contribution apportée par la méthode de la culture des tissus végétaux *in vitro*.
Holzforschung, XI, n° 3, p. 85-90.
194. de VRIES (H.). — 1876 — De l'influence de la pression du liber sur la structure des couches ligneuses annuelles.
Extr. Archives Néerlandaises. T. XI.
195. de VRIES (Hugo). — 1876 — Über Wundholz.
Flora.
196. von WACEK (A.). — 1954 — Action de la coniférine sur la lignification des tissus cultivés *in vitro*.
Un. Intern. Sc. biol. S¹⁰ B, n° 20, 53-62.
197. von WACEK (A.), HARTEL (H.), MERALLA (S.). — 1953 — Über den Einfluss von Coniferinzusatz auf die Verholzung von Karottengewebe bei Kultur *in vitro*.
Holzforschung, VII, n° 2-3, p. 58-62.

198. WACEK (A. von), HARTEL (O.), MERALLA (S.). — 1954 — Über die Wirkung von Koniferenzusatz auf die Verholzung von Fichtengewebe bei Kultur *in vitro*. II. Der Verholzungs Vorgang.
Holzforschung, VIII, n° 3, 65-7.
199. WAREING (P.F.). — 1949 — Photoperiodism in woody species.
Forestry, Vol. XXII, n° 2.
200. WAREING (P.F.). — 1950 — Growth studies in woody species - I. Photoperiodism in first-year seedlings of *Pinus silvestris*.
Physiol. Plant, 3, p. 258-276, 1950a.
201. WAREING (P.F.). — 1950 — Growth studies in woody species - II. Effect of day-length on shoot growth in *Pinus silvestris* after the first year.
Physiol. Plant, 3, p. 300- , 1950b.
202. WAREING (P.F.) — — Photoperiodic control of leaf growth and the cambial activity in *Pinus silvestris*.
Nature, G.B., 163, n° 4150, 770-1.
203. WAREING (P.F.). — 1951 — Growth studies in woody species - III. Further photoperiodic effects in *Pinus silvestris*.
Physiol. Plant, 4, p. 41-56.
204. WAREING (P.F.). — 1951 — Growth studies in woody species - IV. The initiation of cambial activity in ring-porous species.
Physiol. Plant, 4, p. 546-62.
205. WAREING (P.F.) and ROBERTS (D.L.). — 1956 — Periodic control of cambial activity in *Kobinia pseudoacacia* L.
New Phyt., 55, 289-388.
206. WAREING (P.F.). — 1958 — The physiology of cambial activity.
Journal of the institute of wood Science n° 1, mars 1958.
207. WENT (F.). — 1928 — Wuchsstoff und Wachstum.
Rev. trav. bot. Néerl., 25, 1-116.
208. WENT (F.). — — On a substance causing root formation.
Proceed. Sect. Sci. Kom. Akad.
Wetenschappen, XXXII, n° 1, p. 35-9, Amsterdam.
209. WETMORE (R.H.). — 1954 — The use of « *in vitro* » cultures in the investigations of growth and differentiation in vascular plants.
In « Abnormal and pathological plant growth »,
Upton (N.Y.) Brookhaven nation L.
210. WETMORE (R.H.). — 1957 — In Histogenesis in Plant Tissue Cultures.
J. Nation. Cancer Institute, 19, n° 4, oct. 1957, p. 555-90.
211. WIELER (A.). — 1887 — Beiträge zur Kenntniss der Jahresringbildung und des Dickenwachstums.
Jahrb. f. weiss. Bot., 18, p. 70-132.
212. WIELER (A.). — 1898 — Über die jährliche Periodicität im Dickenwachstum des Holzkörpers der Bäume.
Tharandter forstl. Jahrb., 48, p. 39-139.
213. WILSON (S.E.). — 1933 — Changes in the cell contents of wood and their relation to the respiration of wood and its resistance to Lyctus attack and fungal invasion.
Ann. App. Biol., XX, 661.

PLANCHES

PLANCHE I

FIG. 1.

Populus tremula. Explantat prélevé en été après 2 mois en culture. Tissus néoformés en général colorés en vert avec quelques parties blanches.

FIG. 2.

Castanea vesca. Culture âgée de 3 mois. Tissus néoformés blancs.

FIG. 3.

Quercus pedunculata. Explantat prélevé en été, 15 jours après la mise en culture, de petits mamelons de tissu néoformé apparaissent sur toute la surface, sauf en face des rayons larges.

FIG. 4.

Q. pedunculata. Tissu néoformé après 40 jours sur un explantat prélevé en été. Ce tissu est, surtout vers le haut, assez vivement coloré en vert.

1

2

3

4

FIG. 1.

Quercus sessiliflora. Développement de pseudothalles sur un explantat, prélevé en été, après 2 mois en culture.

FIG. 2.

Populus tremula. Explantat prélevé en hiver suivant la méthode de Gioelli, vu du côté du bois.

Développement d'un cal à partir du cambium sur la tranche de l'explantat.

FIG. 3.

Q. pedunculata. Cal formé sur la partie cambiale d'un explantat prélevé en été. Les autres parties de l'explantat n'ont pas proliféré.

FIG. 4.

Castanea vesca. Vue du côté du bois d'un explantat prélevé en hiver. Bourrelet de tissu néoformé sur tout le pourtour de la partie émergée de l'explantat.

1

2

3

4

FIG. 1.

Quercus sessiliflora. Coupe transversale d'un explantat immédiatement après le prélèvement au début de mai, $\times 150$.

FIG. 2.

Q. sessiliflora. Coupe transversale d'un explantat de la même série 70 jours après la mise en culture.

Le cambium a formé du côté du liber une couche de tissus libériens organisés différant du liber normal par leurs cellules plus petites et la lignification incomplète des fibres libériennes et vers l'extérieur un parenchyme dépourvu d'organisation. $\times 50$.

FIG. 3.

Q. suber. Formation d'une couche de tissus libériens organisés avec fibres à lignification incomplète. $\times 100$.

1

2

3

FIG. 1.

Quercus sessiliflora. Coupe transversale 50 jours après la mise en culture dans un explantat prélevé en été. Vers le centre, massif de cellules lignifiées. $\times 50$.

FIG. 2.

Q. suber. Coupe transversale 28 jours après la mise en culture dans un explantat prélevé en été.

Détail d'un massif de cellules lignifiées, $\times 400$.

FIG. 3.

Quercus sessiliflora. Détail de la fig. 1. $\times 400$.

Vers le centre du massif de cellules lignifiées vaisseaux aréolés de type normal. A la partie inférieure et sur la gauche on observe plusieurs cellules à épaississements réticulés.

1

2

3

Praxinus excelsior

FIG. 1.

Cambium aussitôt après le prélèvement. $\times 80$.

FIG. 2.

Formation ligneuse dans un explantat cultivé sur milieu contenant des auxines: acides indol-butyrique 10^{-5} et dichlorophénoxyacétique 5.10^{-7} . $\times 80$.

FIG. 3.

Néoformations après deux mois en culture dans un explantat cultivé sur milieu B. Formation vers l'intérieur (côté du bois) d'un parenchyme inorganisé à membranes celluloseuses très minces. $\times 80$.

FIG. 4.

Néoformations après deux mois en culture dans un explantat de la même série cultivé sur milieu B. Formation vers l'extérieur (côté du liber) d'une couche de tissu présentant un certain degré d'organisation, en continuité avec le liber préexistant. $\times 80$.

1

2

3

4

PLANCHE VI

FIG. 1.

Populus tremula, 1^{er} isolement cultivé sur milieu B. Ilot cyclisé formé de vaisseaux. $\times 150$.

FIG. 2.

Robinia pseudoacacia, 1^{er} isolement cultivé sur milieu B. Ilot de trachéides à ponctuations aréolées. $\times 350$.

FIG. 3.

Tilia parvifolia, 1^{er} isolement cultivé sur milieu B. Ilot de vaisseaux aréolés dont certains présentent des épaississements spiraux. $\times 250$.

1

2

3

FIG. 1.

Quercus sessiliflora. Coupe transversale à la fin de l'été du tissu néoformé dans la souche d'un arbre abattu l'hiver précédent.

Tissu identique par sa structure à celui formé dans des explantats cultivés *in vitro*. $\times 250$.

FIG. 2.

Ulmus campestris. Tissu néoformé dans un explantat prélevé en août suivant la méthode de Gioelli. Coupe tangentielle.

Vaisseaux à ponctuations aréolées et épaississements spirales et trachéides à ponctuations aérolées. $\times 100$.

1

2

PLANCHE VIII

FIG. 1.

Betula verrucosa. Coupe transversale dans le bourrelet de tissu formé par le cambium sur la périphérie d'un explantat prélevé en hiver. $\times 50$.

FIG. 2.

Quercus sp. Coupe tangentielle dans les tissus néoformés dans un explantat prélevé en hiver. Formations cyclisées de cellules lignifiées. $\times 50$.

FIG. 3.

Quercus sp. Coupe transversale dans la partie moyenne d'un explantat prélevé en hiver.

Formations ligneuses cyclisées comportant des vaisseaux à ponctuations aréolées. $\times 100$.

1

2

3

FIG. 1.

Quercus sp. Coupe tangentielle dans le tissu néoformé dans la partie moyenne d'un explantat prélevé en hiver, $\times 100$.

FIG. 2.

Quercus sp. Détail de la figure précédente. On observe toutes les transitions entre les ponctuations aréolées normales, les ponctuations scalariformes et les épaississements réticulés, $\times 400$.

FIG. 3.

Quercus sessiliflora. Néoformations 3 mois après l'abattage, dans la zone cambiale de la souche d'un chêne coupé en juin.

Aux vaisseaux normaux du bois initial, formés avant l'abattage, succède une zone de parenchyme cellulosique contenant des îlots de cellules lignifiées, structure identique à celle observée dans les explantats cultivés *in vitro*, $\times 50$.

1

2

3

PLANCHE X

FIG. 1.

Quercus sp. Massifs de cellules néoformées à la surface du bois sur un explantat prélevé en hiver. $\times 200$.

FIG. 2.

Fagus sylvatica. Coupe transversale dans la zone cambiale d'un billon coupé en hiver et cultivé dans l'eau. Zone de parenchyme contenant des îlots de cellules lignifiées d'une structure identique à celle observée dans les explantats cultivés *in vitro*. $\times 50$.

FIG. 3.

Quercus sp. Cellules de pseudothalle formé à la surface d'un explantat prélevé en été. $\times 370$.

1

2

3

PLANCHE XI

FIG. 1.

Fraxinus excelsior. 1^{re} isolement — Massif de vaisseaux à ponctuations aréolées dans le cal formé sur un explantat prélevé en été. $\times 350$.

FIG. 2.

Betula verrucosa. Extrémités d'un vaisseau et d'une fibre dans le bois normal. $\times 500$.

FIG. 3.

B. verrucosa. Formation cyclisée dans le tissu repiqué (13^e passage). Vaisseaux aréolés à perforations scalariformes. $\times 100$.

FIG. 4.

B. verrucosa. Vaisseaux rectilignes dans le tissu de la même colonie. $\times 100$.

1

2

3

4

FIG. 1.

Betula verrucosa. Tissu repiqué (13^e passage).
Détail des vaisseaux. Perforation scalariforme de type normal et ponctuations aréolées, $\times 1200$.

FIG. 2.

Tilia parvifolia. Tissu repiqué (2^e passage).
Vaisseaux aréolés dont certains sont munis d'épaississements spiralés, dont d'autres, dépourvus d'épaississements, présentent de ponctuations aréolées tendant vers le type scalariforme, $\times 400$.

1

2

Populus tremula

Fig. 1.

Coupe dans une colonie de tissu repiqué (5^e passage).
Ilot cyclisé de cellules lignifiées. $\times 100$.

Fig. 2.

Détail de la figure précédente.
Vaisseaux à ponctuations aréolées et trachéides réticulées. $\times 500$.

PLANCHE XIV

FIG. 1.

Castanea vesca. Coupe dans le tissu d'une colonie au 49^e passage.
Cambium diffus. Quelques îlots de cellules lignifiées non différenciées. $\times 8,5$.

FIG. 2.

C. vesca. Coupe dans le tissu d'une colonie au 6^e passage.
Nodule de cellules lignifiées et élément cyclisé d'assise génératrice. $\times 200$.

FIG. 3.

C. vesca. Détail de cellules lignifiées dans le même tissu. $\times 1000$.

1

2

3

Castanea vesca

Modification de la structure provoquée par la greffe d'un bourgeon
sur une colonie de tissu au 30^e passage.

FIG. 1.

Ilots de cellules lignifiées présentant un début d'organisation. $\times 85$.

FIG. 2.

Détail d'un groupe de cellules lignifiées. A droite, fibres libriformes. Au centre, trachéides à épaississements réticulés. A gauche, trachéides à ponctuations aréolées. $\times 490$.

1

2

PLANCHE XVI

Castanea vesca

Modifications de structure provoquées par la greffe d'un bourgeon
sur une colonie de tissu au 30^e passage.

FIG. 1.

Fibres libriformes, fibres trachéides et cellule de parenchyme ligneux.
× 1000.

FIG. 2.

Elément d'assise génératrice. × 750.

1

2

PLANCHE XVII

Ulmus campestris. Tissus repliqués.

FIG. 1.

Souche Malvoisine.

Coupe dans une colonie formée de nodules disjoints adhérant entre eux par un mucilage résultant de la lyse des grandes cellules intermédiaires. $\times 150$.

FIG. 2.

Souche Malvoisine.

Coupe dans une colonie formée de tissu cohérent comportant des nappes de vaisseaux aréolés. $\times 100$.

1

2

PLANCHE XVIII

Fig. 1.

Eucalyptus gomphocephala. Nodule de tissus lignifiés dans une colonie de tissu repiqué. $\times 100$.

Fig. 2.

Prunus avium. Grains d'amidon dans les cellules d'une colonie de tissu au 12^e passage. $\times 350$.

1

2

Fig. 1.

Betula verrucosa. Réserves lipidiques (15^e passage). $\times$ 350.

Fig. 2.

Ulmus campestris. Souche U F 5 - 7^e passage. Grains d'amidon. $\times$ 500.

Fig. 3.

Populus tremula. Souche V - 19^e passage.
Culture sur milieu à 8 % de glucose. Grains d'amidon. $\times$ 500.

1

2

3

Fig. 1.

Juniperus communis. Coupe transversale sur la marge d'une zone où l'activité cambiale a été suspendue plusieurs années.

Après une période de 4 ans où l'activité a été nulle ou presque nulle, la croissance est redevenue progressivement égale à celle de la région voisine.
 X 30.

Fig. 2.

Ligne de canaux traumatiques chez *Abies grandis* Lindl.
 X 300.

1

2

PLANCHE XXI

Structures pathologiques

FIG. 1.

Fagus sylvatica. Tissu cicatriciel. Régression des vaisseaux, des fibres et fibres-trachéides au profit du parenchyme ligneux. $\times 100$.

FIG. 2.

Taxodium distichum. Anomalie de structure provoquée par le froid.
Coupe radiale montrant la perturbation de la structure au début d'un accroissement annuel. $\times 40$.

FIG. 3.

Taxodium distichum. Détail montrant la déformation des trachéides qui, par ailleurs, conservent leur caractère de ponctuation normal. $\times 250$.

1

2

3

PLANCHE XXII

FIG. 1.

Greffe du châtaignier sur chêne. Section du tronc au niveau de la greffe. Noter l'accroissement du diamètre du tronc et le rétrécissement de l'aubier au-dessus de ce niveau, le châtaignier ayant une croissance plus rapide et un aubier beaucoup plus étroit que le chêne.

FIG. 2.

Coupe tangentielle au niveau de la greffe. $\times 135$.

En bas, vers le centre, rayon plurisériel caractéristique du chêne. Vers le haut rayons tous unisériels.

1

2

Structures pathologiques

FIG. 1.

Coupe transversale dans le bois d'un chêne (*Q. sessiliflora*) attaqué par *Agrilus biguttatus* Fab.

En bas, vaisseaux du bois initial normal. Ceux de la dernière rangée sont obstrués par des thyllles. Vers le centre, zone de tissus cambial et libériens nécrosés et partiellement lignifiés. En haut, bois formé par une assise cambiale de remplacement. La structure anormale de ce bois est marquée par la régression des vaisseaux et l'extension considérable du parenchyme. $\times 55$.

FIG. 2.

Détail de la zone de bois anormal, constitué presque exclusivement de parenchyme. $\times 300$.

Structures pathologiques

FIG. 1.

Coupe transversale dans le bois d'un tronc de hêtre atteint de « maladie des T », probablement due à la piqûre de Coccides. On observe une perturbation localisée à une zone de l'accroissement annuel et caractérisée par la disparition des vaisseaux, l'extension considérable du parenchyme, la dilatation tangentielle des rayons ligneux. $\times 40$.

FIG. 2.

Graisse du chêne — Coupe tangentielle dans une graisse de chêne (*Quercus sessiliflora* Sm.). On observe une extension considérable du parenchyme ligneux, la raréfaction des fibres et des fibres trachéides, la présence d'un cordon de parenchyme irrégulier dont les cellules rappellent des thyllés. $\times 50$.

FIG. 1.

Développement de pousses sur un billon de tige d'*Ulmus campestris* cultivé dans l'eau, deux mois après la mise en culture.

FIG. 2.

Ulmus campestris. Explantat prélevé en été suivant la méthode de Gautheret 15 jours après la mise en culture. Plusieurs bourgeons sont visibles, dispersés sur toute la surface de l'explantat.

FIG. 3.

U. campestris. Explantat prélevé en été suivant la méthode de Gautheret et posé à plat sur le milieu, face cambiale tournée vers le haut. Tous les bourgeons sont accumulés à l'extrémité distale.

1

2

3

Organogenèse

FIG. 1.

Ulmus campestris. Explantat prélevé en août par la méthode de Gioelli, vu du côté du bois. De nombreux bourgeons sont formés au niveau du cambium sur toute la périphérie de l'explantat.

FIG. 2.

U. campestris. Explantat vu par la face libérienne. Le tissu libérien a proliféré en formant des pseudothalles.

FIG. 3.

U. campestris. Explantat prélevé en hiver vu de profil, face libérienne à gauche. Un bourrelet de tissu formé par le cambium ne porte aucun bourgeon.

FIG. 4.

Populus tremula. Formation de pousses sur un segment de racine placé quelque temps en serre dans une couche de *Sphagnum* humide. Les pousses formées dans ces conditions peuvent être ensuite bouturées.

1

2

3

4

PLANCHE XXVII

Organogénèse des tissus repiqués

Formation d'une racine dans les tissus de :

Tilia parvifolia $\times$ 200.

Fig. 1.

Populus tremula $\times$ 200.

Fig. 2.

Ulmus campestris $\times$ 100.

Fig. 3.

4 — Formation de pousses sur une colonie de *B. verrucosa*.

5 — Formation de racines par une colonie de *P. tremula*.

Nombreuses racines aériennes couvertes de poils absorbants, racines intramatriciellées dont la plupart forment un feutrage dense au-dessous de la surface du milieu et dont l'une atteint le fond du tube.

1

2

4

3

5

PLANCHE XXVIII

Populus tremula
Souche V
Tumeurs de racines

FIG. 1.

Coupe dans une tumeur formée par une racine. Structure identique à celle du tissu repiqué de la même souche. $\times 250$.

FIG. 2.

Coupe longitudinale dans la partie basale d'une racine portant une tumeur. Cordon longitudinal de tissu secondaire dans les tissus primaires de la racine. $\times 150$.

1

2

RÉSUMÉ

La culture de tissu cambial d'une vingtaine d'espèces d'arbres forestiers a été réalisée en vue d'étudier les problèmes du déterminisme de la reprise d'activité du cambium au printemps, de l'organisation des tissus secondaires et de l'organogenèse.

Les expériences ont montré qu'il est toujours possible d'obtenir en culture une prolifération des premiers isoléments. Par contre, la culture indéfinie sur milieu synthétique n'a été possible que pour 6 essences: tremble, bouleau, châtaignier, orme, tilleul, merisier. Parmi ces essences, le bouleau et le châtaignier peuvent proliférer sur des milieux dépourvus d'auxine et de vitamines. Trois espèces d'Eucalyptus n'ont pu être maintenues en culture que sur milieux contenant du lait de coco. Il n'a pu être constitué de milieu, synthétique ou non, permettant la culture indéfinie des autres essences.

Déterminisme de l'activité du cambium.

Pour étudier le déterminisme de la reprise d'activité du cambium au printemps, des prélèvements de cambium ont été opérés à différentes époques de la période de repos hivernal (mi-septembre à mi-avril) sur une vingtaine d'essences. Dans la majorité des cas, ce tissu reprend son activité dès qu'il se trouve soumis à une température suffisante et alimenté en glucides et matières minérales. Dans quelques cas, tous les explantats d'une même série restent inertes, mais plus fréquemment on observe qu'une proportion plus ou moins forte des explantats ne prolifère pas. L'examen détaillé de ces différents cas montre que la reprise de la prolifération du tissu isolé de l'arbre peut s'expliquer:

- tantôt par la propriété du tissu de faire la synthèse de toutes les substances de croissance nécessaires (cas du bouleau et du châtaignier);
- tantôt par l'existence au niveau du cambium de réserves de substances de croissance en quantité suffisante pour permettre la prolifération du tissu pendant plusieurs semaines (cas des autres essences).

Lorsque les tissus mis en culture restent inertes, il peut s'agir d'une insuffisance de substances de croissance, mais dans certains cas aussi de l'action d'inhibiteurs.

Organisation des tissus.

Les tissus néoformés sont inorganisés. Ils consistent en un parenchyme non lignifié pouvant enrober des trachéides réticulées aberrantes ou des éléments de vaisseaux, soit isolés, soit le plus souvent groupés en faisceaux généralement cyclisés. Ces vaisseaux sont parfois conformes au type spécifique normal, bien que toujours de dimensions très réduites; plus fréquemment ils en diffèrent plus ou moins nettement. Très souvent on observe des formes intermédiaires entre les vaisseaux aréolés et les trachéides réticulées. En aucun cas les autres éléments normaux du bois: fibres, fibres-trachéides, parenchyme ligneux n'ont été observés.

La comparaison de ce type de structure avec ceux qui apparaissent dans la souche d'un arbre abattu, dans un rondin dont la base est immergée dans l'eau, dans les bourrelets cicatriciels, dans des arbres attaqués par certains parasites a montré que la structure observée dans les tissus cultivés *in vitro* est identique à celle qui est édifiée par le cambium des souches ou des rondins. La pression tangentielle de l'écorce et les conditions physiques auxquelles est soumis le cambium ne jouent donc aucun rôle dans l'organisation des tissus, qui est déterminée essentiellement par des substances provenant des bourgeons. Il a été vérifié que la greffe de bourgeons fait réapparaître des types cellulaires normaux dans le tissu de la même essence. La comparaison de différentes structures pathologiques a montré une différence de sensibilité marquée des différents types cellulaires aux perturbations hormonales. Les fibres régressent ou même disparaissent complètement dans les bourrelets cicatriciels et les structures provoquées par des parasites. Elles apparaissent ainsi comme le type cellulaire le plus sensible aux perturbations hormonales. Les vaisseaux régressent en général dans la plupart des structures anormales, mais ne disparaissent que rarement. Le parenchyme ligneux prend au contraire un développement considérable.

Organogenèse.

Parmi toutes les essences étudiées, seul l'orme a produit des bourgeons sur les premiers isollements. Chez aucune essence les premiers isollements n'ont formé de racines.

Parmi les tissus qui ont pu être repiqués, ceux de châtaignier, de merisier, d'Eucalyptus n'ont jamais formé d'organes; ceux de tilleul et d'orme ont émis des racines après quelques repiquages; ceux de bouleau ont émis des racines lors des premiers repiquages, des pousses lors des repiquages suivants; la faculté de former des organes a ensuite presque totalement disparu bien que quelques pousses apparaissent encore sporadiquement après 25 passages.

En ce qui concerne le tremble, trois souches ont été étudiées provenant d'arbres dont l'un était très aisé, l'autre très difficile à

bouturer, le troisième de propriétés inconnues. Le tissu de la première souche a émis une profusion de racines dès le 2^e repiquage, celui de la deuxième n'en produit que sporadiquement; celui de la troisième a manifesté des qualités intermédiaires et a produit régulièrement d'assez nombreuses racines à partir du 3^e passage. Si des fragments de tissu de la deuxième souche, non rhizogène, sont cultivés au contact de tissu de la 3^e souche, moyennement rhizogène, des racines apparaissent sur le tissu de la deuxième souche. Cette expérience confirme l'existence de substances rhizogènes autres que l'auxine. D'autre part, des expériences portant sur les explantats d'orme ont montré que, outre l'adénine, dont les propriétés caulogènes avaient déjà été établies sur des plantes herbacées, le méso-inositol est un facteur de caulogenèse et que, de plus, le nombre des bourgeons formés est lié aux proportions relatives de ces deux substances. Par ailleurs, le tissu de tremble de la 3^e souche, cultivé sur milieu sans auxine, ne prolifère plus mais émet un certain nombre de bourgeons. Des expériences portant sur les tissus de tremble et de bouleau ont enfin montré que l'acide pantothénique et la biotine pourraient également agir sur la caulogenèse.

Il apparaît ainsi que parmi les substances organogènes non identifiées, que les auteurs désignent sous le nom de calines, se trouvent des espèces chimiques depuis longtemps connues: adénine, méso-inositol et très probablement acide pantothénique et biotine.

SUMMARY

The culture of cambium tissue from a score of forest tree species has been carried out in view of investigating in the problems of the cambium growth inception in spring, of the organization of secondary tissues and of the organogenesis.

Experiments have shown that it is generally possible to obtain the proliferation of explants. On the other hand subculture on synthetic media was only possible for six species i. e. aspen, birch, chestnut, lime elm, wild cherry. Furthermore three species of *Eucalypts* could be grown on media containing coco nut milk.

Inception of cambium growth in spring. — In most cases cambium excised from a tree in winter resumed its growth provided it was cultured at suitable temperature and supplied with glucidic and mineral nutrients. Further experiments on subcultured tissue have shown that in some species i. e. birch and chestnut cambium can synthesize all necessary growth substances and thus can resume its activity without a stimulus from the buds. In other species cambium tissue can be subcultured only on media containing auxin. Nevertheless, even then, explants excised either in the period of dormancy (October-April) or in the period of normal activity (April-October) can resume or continue their growth if reserves of auxin (or auxin precursors) are present in the tissues. Thus cambium activity is but loosely controlled by buds or leaves which synthesize auxin, owing to the intermediary storage of growth substances. Conversely in some experiments on tress of the same species, no growth could be obtained in a part or in the whole of series of explants, whatever the season they were collected, owing to the shortage or to the uneven distribution of growth substances in the excised tissues or to the presence of inhibitors.

Organisation of secondary tissues. — The anatomical structure of cambial tissue in culture is always abnormal and identical to that of the tissues formed in decapitated trees or in logs the feet of which have been maintained in water. Conversely grafting buds on tissue in culture induces the formation of normal wood cells: vessels, fibers, etc... These results are in full accordance with the formation of normal specific wood in the stock of a grafted tree, and show that the organization of secondary tissues is controlled by specific substances synthesized in buds or in leaves.

Organogenesis. — Cambial tissue in culture can, in some species, form either root or shoot meristems, or both. Experiments on explants of elm cambium have shown that, besides adenin, meso-inositol can entrance bud formation. Experiments on subcultured tissues of birch and aspen have shown that the formation of organs is controlled by several substances, some of which can be transmitted by graft from a tissue to another.

ZUSAMMENFASSUNG

Um Fragen des ursächlichen Zusammenhanges bei der Wiederaufnahme der Kambiumtätigkeit im Frühjahr, der Gewebildung und der Organbildung zu studieren wurden Kulturen von Kambialgeweben angelegt. Es wurden zwanzig verschiedene Holzarten näher untersucht.

Die Versuche haben gezeigt, dass eine Vermehrung von Erstisolierungen in einer Kultur immer möglich war. Eine Kultur über unbeschränkte Zeitdauer in einem synthetischen Milieu wurde jedoch nur bei folgenden sechs Holzarten erreicht: Zitterpappel, Birke, Edelkastanie, Ulme, Linde und Vogelkirsche. Von diesen sechs Holzarten können bei Birke und Edelkastanie Teile von Kambialgeweben auch in einem auxin- und vitaminfreien Milieu wachsen. Drei Eukalyptusarten konnten nur in einer mit Cocosmilch versetzten Kultur am Leben erhalten bleiben. Für die restlichen Holzarten konnten weder ein synthetisches noch ein natürliches Milieu gefunden werden, die eine Dauerkultur gestattet hätten.

Ursächliche Zusammenhänge der Kambiumtätigkeit.

Um die ursächlichen Zusammenhänge über die Wiederaufnahme der Kambiumtätigkeit im Frühjahr zu studieren, wurden während der Winterruhe (Mitte September bis Mitte April) zu verschiedenen Zeitpunkten Kambiumproben an zwanzig verschiedenen Holzarten entnommen. In der Mehrzahl der Fälle nimmt das Kambium seine Wuchstätigkeit auf, sobald es einer bestimmten, genügend hohen Temperatur ausgesetzt und mit Glukosiden und Mineralstoffen ausreichend versorgt ist. In einigen Fällen blieben alle Explanate einer gleichen Reihe ohne Wachstum. In der Mehrzahl der Fälle konnte jedoch beobachtet werden, dass ein mehr oder minder grosser Teil der Explanate kein Wachstum zeigte. Eine genaue Untersuchung dieser Beobachtungen erbrachte eine Erklärung für die Wiederaufnahme des Wachstums von isolierten Baumgeweben:

- das Gewebe bildet selbst alle zum Wachstum notwendigen Stoffe, wie dies bei Birke und Edelkastanie der Fall ist,
- im Bereiche des Kambiums befinden sich ausreichende Reserven an wachstumsnotwendigen Stoffen, die eine Zellaktivität während einiger Wochen ermöglichen. Dies gilt für die restlichen 18 Holzarten.

Zeigt ein Gewebe in der Kultur kein Wachstum, so kann dies auf einem Mangel an Wuchsreserven zurückzuführen sein; in gewissen Fällen aber auch auf eine Einwirkung von Hemmstoffen.

Die Gewebebildung.

Die neugebildeten Gewebe haben keine organische Struktur. Sie bestehen aus einem ligninfreien Parenchym das anormale Tracheiden mit netzartigen Verdickungen oder Gefäselemente umschliessen kann. Diese Tracheiden und Gefässe (Tracheen) treten einzeln oder oftmals auch gebündelt, im allgemeinen jedoch in wecksender Folge auf. Die Gefässe entsprechen fallweise ihrem spezifischen Normalbau, sind jedoch immer wesentlich kleiner und zeigen sehr häufig starke Abweichungen. Zwischen Tracheiden mit netzartigen Verdickungen und Gefässen mit Hoftüpfel (vaisseaux aréolés) lassen sich oftmals Zwischenformen feststellen. Niemals jedoch konnten andere, normale Bauelemente, wie Fasern, Tracheidenfasern oder Holzparenchym beobachtet werden.

Zellgewebe die in Baumstämmen frischgefallter Bäume, an Stämmen deren Basisteil in Wasser getaucht war, an Wundüberwallungen und an Bäumen nach einem Befall durch bestimmte Parasiten gebildet wurden, zeigen die gleiche Zellstruktur als die *in vitro* gezüchteten Gewebe. Tangentialdruck der Rinde und äussere Bedingungen denen das Kambium unterliegt spielen für die Gewebebildung daher keine Rolle. Die Gewebebildung und Gewebedifferenzierung ist ausschliesslich durch Stoffe die aus den Knospen stammen bestimmt. Nach Aufpfropfen von Knospen derselben Holzart konnte eine völlig normale Gewebeneubildung beobachtet werden, wodurch die obige Feststellung gesichert erscheint. Ein Vergleich der verschiedenen pathologischen Zellstrukturen zeigte einen deutlichen Unterschied der Empfindlichkeit bei hormonalen Störungen. In den durch Wundreize oder Parasiten hervorgerufenen Gewebestrukturen nimmt die Anzahl der Fasern ab, oder diese verschwinden vollständig. Die Fasern scheinen deshalb jener Zelltyp zu eine der gegen hormonale Störungen am meisten empfindlich ist. Auch die Anzahl der Gefässe nimmt in der Mehrzahl der anormalen Strukturen ab, si verschwinden jedoch nur selten vollständig. Im Gegensatz dazu findet eine bedeutende Bildung von Holzparenchym statt.

Die Organbildung.

Bei den Erstisolierungen zeigte von allen untersuchten Holzarten nur die Ulme eine Knospenbildung, während eine Wurzelbildung in keinem der Fälle beobachtet werden konnte.

Von der Geweben die überpflanzt werden konnten zeigten sich bei Edelkastanie, Vogelkirsche und Eukalyptus niemals Organbildungen. Bei Linde und Ulme konnten Wurzelbildungen nach einigen Über-

pflanzungen beobachtet werden. Bei der Birke wurden Wurzeln bereits nach den ersten Überpflanzungen festgestellt und nach weiteren Überpflanzungen zeigte sich eine Sprossbildung. Diese Eigenschaft der Organbildung verschwand jedoch in der Folge und es konnte nur mehr eine sporadische Sprossbildung nach 25 Überpflanzungen beobachtet werden.

Bei der Zitterpappel wurden Gewebe aus drei Stöcken verschiedener Herkunft untersucht.

1. Stock mit grossem Ausschlagvermögen
2. Stock mit geringem Ausschlagvermögen
3. Stock mit unbekanntem Ausschlagvermögen

Das Gewebe des ersten Stockes zeigte bereits nach der zweiten Überpflanzung eine verschwenderische Wurzeldildung, während bei Gewebe aus dem zweiten Stock nur eine sehr sporadische Wurzelbildung zu beobachten war. Das Gewebe aus dem dritten Stock nimmt eine mittlere Stelle ein und bildete nach der dritten Überpflanzung bereits sehr zahlreiche Wurzeln. Durch Übertragung von Gewebeteilen des dritten Stockes in eine Gewebekultur des zweiten Stockes, konnte bei Kontakt der Gewebeteile bei Letzterem ein Wurzelwachstum festgestellt werden. Dieser Versuch beweist das Vorhandensein von anderen rizogenen Stoffen als dem Auxin. Versuche bei der Ulme haben gezeigt, dass neben dem Adenin, dessen caulogene Eigenschaften bei krautigen Pflanzen bereits bekannt sind, auch das Mesoinositol ein sprossbildender Faktor ist und dass weiterhin die Anzahl der gebildeten Sprosse vom relativen Verhältnis dieser beiden Stoffe abhängig ist. Im weiteren zeigt das aus dem dritten Zitterpappelstock stammende Gewebe in auxin-freiem Milieu kein Wachstum, bildete jedoch eine Anzahl von Knospen. Versuche mit Geweben von Zitterpappel und Birke zeigten schliesslich, dass auch Pantotheine-Säure und Biotin caulogene Eigenschaften haben.

Es wird hiermit augenscheinlich, dass sich unter den noch nicht näher identifizierten organogenen Stoffen, die von verschiedenen Autoren als Caline bezeichnet werden, bereits seit langem bekannte chemische Verbindungen finden wie zum Beispiel Adenin, Mesoinositol und sehr wahrscheinlich auch Pantotheine-Säure und Biotin.