

## Multiplication végétative *in vitro* de quelques espèces d'ormes

Noëlle DORION, P. DANTHU et C. BIGOT

avec la collaboration technique de B. GODIN, J. LEBŒUF, et M. CASENAVE

*Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture,  
Chaire de Physiologie Végétale Appliquée,  
4, rue Hardy, F 78009 Versailles Cedex*

### Résumé

La multiplication végétative *in vitro* a été mise au point sur plusieurs espèces d'ormes (*U. effusa* Willd., *U. campestris* Mill., *U. pumila* L., *U. americana* L.) et clones, dits hybrides hollandais, dans le but de propager rapidement soit des sujets naturellement tolérants à la graphiose soit des sujets sélectionnés par hybridation ou par la voie des cultures cellulaires.

Les explants primaires (tigelles ou boutures de nœuds) sont, après enracinement avec ou sans AIB 0,5 mg/l, multipliés par micropropagation. Deux méthodes ont été établies : l'une par microboutures de nœuds et d'apex (7 200 plants/an), l'autre par décapitation et ramification axillaire (80 plants/an) quand la première est inefficace (*U. americana*).

Les possibilités de multiplication dépendent des capacités d'enracinement ; on a observé : un effet clonal (nécessité ou non d'AIB 0,5 mg/l), une influence de l'état de maturité du pied mère, une moindre aptitude des nœuds par rapport aux tigelles, et une augmentation du potentiel rhizogène au fil des repiquages *in vitro*.

La conservation *in vitro*, en chambre froide (7 °C, 7 W/m<sup>2</sup> pendant 8 h), a été possible pour des plantes enracinées (maximum 21 mois).

L'acclimatation en serre s'est effectuée sans difficulté (18/20 °C). Après 3 à 5 mois en serre, les jeunes plantes (50 cm) ont été installées en pépinière et se développent conformément à l'espèce.

### 1. Introduction

Toutes les espèces européennes et américaines appartenant au genre *Ulmus* sont sensibles à la graphiose (Dutch elm disease), maladie menaçant ce genre d'une disparition totale. A condition qu'elles soient sexuellement compatibles avec *U. campestris*, deux espèces auraient pu constituer une source de résistances transmissibles à l'orme champêtre, l'orme de Sibérie (*U. pumila* L.) et l'orme de Chine (*U. parvifolia* Jacq.). Or, la première est attaquée, en France, par le champignon pathogène (*Ceratocystis ulmi*) ; quant à la seconde, sa floraison tardive (août-septembre) ne permet pas d'envisager un programme d'hybridation avec l'orme champêtre (sauf par un maintien temporaire en survie du pollen de l'une ou l'autre espèce). Cependant s'agissant de végétaux ligneux, l'existence d'une longue période de juvénilité avant la floraison est un handicap supplémentaire.

On est donc conduit à exploiter plusieurs voies de recherche faisant intervenir les cultures *in vitro* pour :

- la multiplication en masse d'arbres naturellement tolérants ;
- la multiplication d'individus régénérés à partir de suspensions cellulaires soumises à l'action des toxines (NORDIN et STROBEL, 1981 ; TAKAI et RICHARDS, 1978).

Dans les deux cas, la multiplication *in vitro* constitue la base d'une diffusion rapide pour les génotypes retenus. Toutefois le contrôle de la tolérance des plants provenant de culture *in vitro* est impératif avant toute diffusion. Les différents objectifs évoqués font l'objet d'études depuis trois ans au laboratoire.

La néoformation a déjà été obtenue dans le genre *Ulmus*. Ainsi, en 1975, DURZAN & LOPUSHANSKI ont décrit les premiers l'obtention de jeunes plantes d'ormes américains en provenance de suspensions cellulaires établies à partir de cals d'hypocotyle. De même, KARNOSKY *et al.* (1982) ont aussi signalé la possibilité d'isoler de nombreux sujets à partir de cals hypocotyloires. Toutefois des méthodes mises au point à partir d'organes juvéniles ne s'appliquent pas obligatoirement à des tissus sélectionnés à l'état adulte. Notons enfin que l'établissement d'une callogénèse au cours de la multiplication (ce qui est signalé par CHALUPA en 1979 pour *U. campestris*, *U. effusa* et *U. scabra*) peut avoir pour conséquence d'entraîner une hétérogénéité et l'apparition de déviants ayant perdu la caractéristique recherchée.

Cette note a pour objet de rapporter les conditions permettant de maîtriser sans callogénèse les étapes de la multiplication *in vitro* depuis le prélèvement de l'explant primaire (sur le terrain, en serre ou *in vitro*) jusqu'à l'élevage des plantes filles en serre et leur installation en pépinière. Les résultats présentés portent sur *U. effusa* Willd., *U. americana* L., *U. pumila* L. ainsi que *U. campestris* Mill. et ses hybrides naturels ou issus d'hybridations contrôlées tels que « Dodoens », « Commelin », « Plantijn » et « Groenveld » (clones dits hollandais).

## 2. Matériel utilisé et techniques expérimentales

Le matériel destiné à l'introduction *in vitro* est constitué :

- de graines provenant du Gurten kulm de Berne, et récoltées soit sur un orme hybride (*U.X. campestris* Mill., noté OmBe). soit sur un orme diffus (*U. effusa* Willd., noté OlBe) ;

- de boutures de nœud lignifiées ou herbacées selon la période de prélèvement et récoltées :

- *en plein air* à divers moments (hiver, été, automne), et occupant différentes positions sur l'arbre (cime, drageon, rejet de tronc ou de souche), pour *U. campestris* (OCBi, OCBa) et les clones hollandais (tabl. 2),

- *en serre* sur des rameaux en fin de croissance (*U. americana* OAmO et OAm xa4, *campestris* OCBa, et « Commelin ») ;

- de pousses herbacées résultant de la croissance naturelle (printemps) ou d'un forçage en serre de boutures de nœud (*U. campestris* OCBy et OCBi, *pumila* OPo', *americana* et hybrides hollandais).

Les plantes mères, élevées en serre (2 à 3 ans), sont cultivées en conteneurs de 3 litres sur un substrat constitué de tourbe enrichie (TKS2 1/3), de terre franche (1/3) et de sable (1/3), fertilisé par un engrais à libération lente (Type osmocote 15, 11, 15). Les plantes reçoivent un éclairage d'appoint de 14 W/m<sup>2</sup> (lampe Phytoclaude 400 W) assurant une photopériode constante de 16 h. La température maximale est de 28 ± 4 °C en été, minimale de 18 ± 2 °C en hiver. Les boutures de nœuds, constituées d'un fragment de tige lignifiée et d'un bourgeon axillaire, sont placées pour le forçage en terrine contenant du sable désinfecté au cryptonol, et maintenues 15 à 30 jours en atmosphère confinée avant le prélèvement de la pousse herbacée provenant de chaque axillaire. Dans certains essais, les plantes mères et les pousses herbacées issues des boutures de nœuds ont été traitées par une solution de Benlate (600 mg/l) en pulvérisation, 48 h avant le prélèvement.

### 2.1. Introduction et culture *in vitro*

Pour la désinfection, explants et samares fraîchement récoltés sont d'abord immergés 30 sec. dans l'alcool à 70°, puis 5 à 30 mn selon la fragilité du matériel (20 mn pour les samares) dans une solution d'hypochlorite de calcium (50 à 100 g/l) additionnée de tween 80 (100 ppm). Les explants sont ensuite rincés 3 fois dans l'eau distillée stérile. Après extraction, les graines sont introduites *in vitro* avec le seul tégument interne.

Les cultures ont été réalisées dans des boîtes de Pétri (Ø 10 cm), ou en tubes (Ø 22 mm) obturés par des capuchons translucides de type Bellco.

Le milieu de base est constitué des macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilués au 1/2 ou au 1/4, des microéléments de HELLER (1953) sans chlorure ferrique, de fer sous forme chélatée (MURASHIGE et SKOOG, 1962), des vitamines de MOREL et WETMORE (1951), et de saccharose (10 g/l), auxquels ont été ajoutés 5,5 g/l d'agar (OSI<sup>(1)</sup>). Sauf pour les graines, le milieu de base a été complété par une auxine (acide indolylacétique AIA, ou acide indolbutyrique AIB 0,5 ou 1 mg/l), ou une cytokinine (isopentényladénine 2 IP à 0,5 mg/l ou benzylaminopurine BAP à 0,3 et 0,5 mg/l). Dans certains cas, du charbon actif<sup>(2)</sup> a été apporté au milieu de culture (2 g/l) ainsi qu'un antibiotique (Rifampicine 50 ou 100 mg/l). Le pH a été ajusté à 5,5 avant autoclavage (110 °C, 20 min.). Les cultures ont été placées dans une chambre climatisée à la température de 25 °C le jour et 22 °C la nuit, en jours de 16 h, sous une intensité lumineuse moyenne de 21 W/m<sup>2</sup><sup>(3)</sup>.

### 2.2. Multiplication *in vitro*

Deux méthodes de multiplication ont été utilisées : la première (fig. 1) consiste à bouturer les nœuds et les zones apicales ; la seconde passe par l'entrée en croissance *in situ* des méristèmes axillaires préexistants sur les tigelles enracinées *in vitro*, par suppression de la dominance apicale (fig. 2) ; un gradient de vigueur décroissante apico-basal est noté dans ce dernier cas pour les ramifications. Ces dernières sont mises à leur tour en enracinement, puis traitées de la même manière.

(1) O.S.I. : Omnium Scientific International, Agar agar Ref. 1540.

(2) Charbon actif MERCK, Ref. 2186.

(3) Eclairage fluorescent composé de tubes de 40 W en mélange : Lumière du jour (Philips), Truc Lite (Durotest), Grolux (Sylvania).

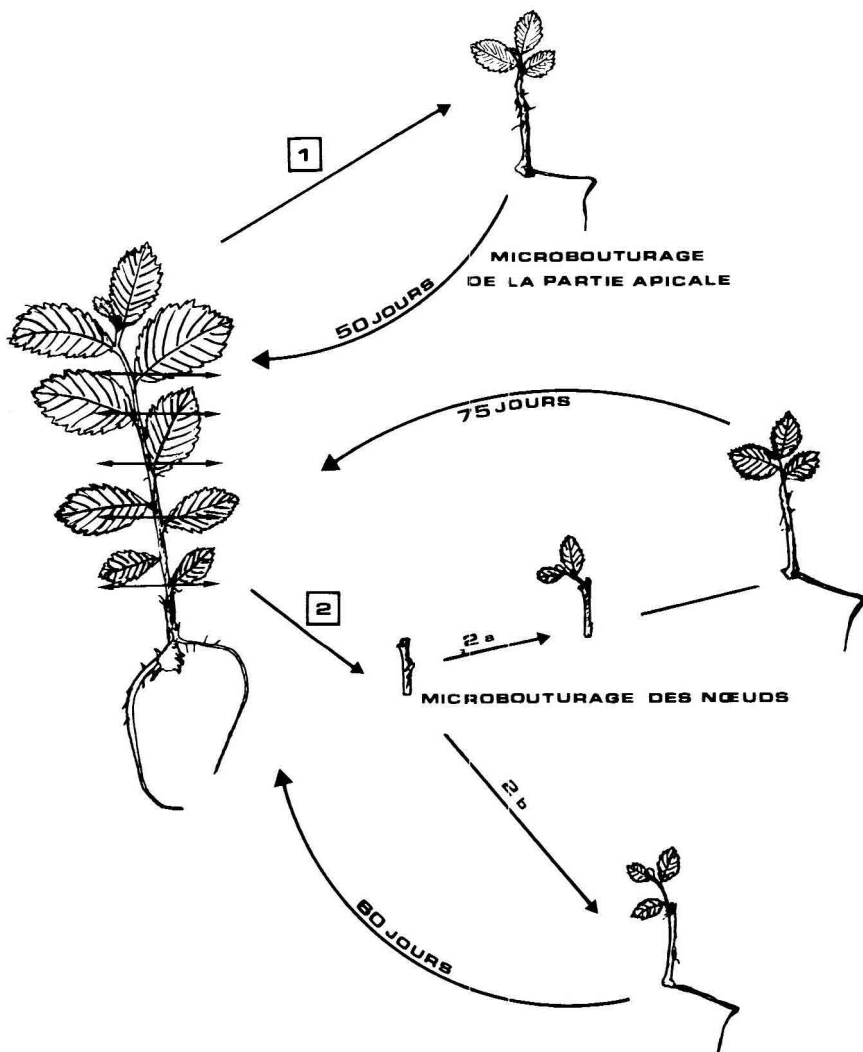


FIG. 1

*Multiplication végétative in vitro par microbouture d'apex et de nœuds.*  
*In vitro vegetative reproduction by micropropagation of the apex and nodes.*

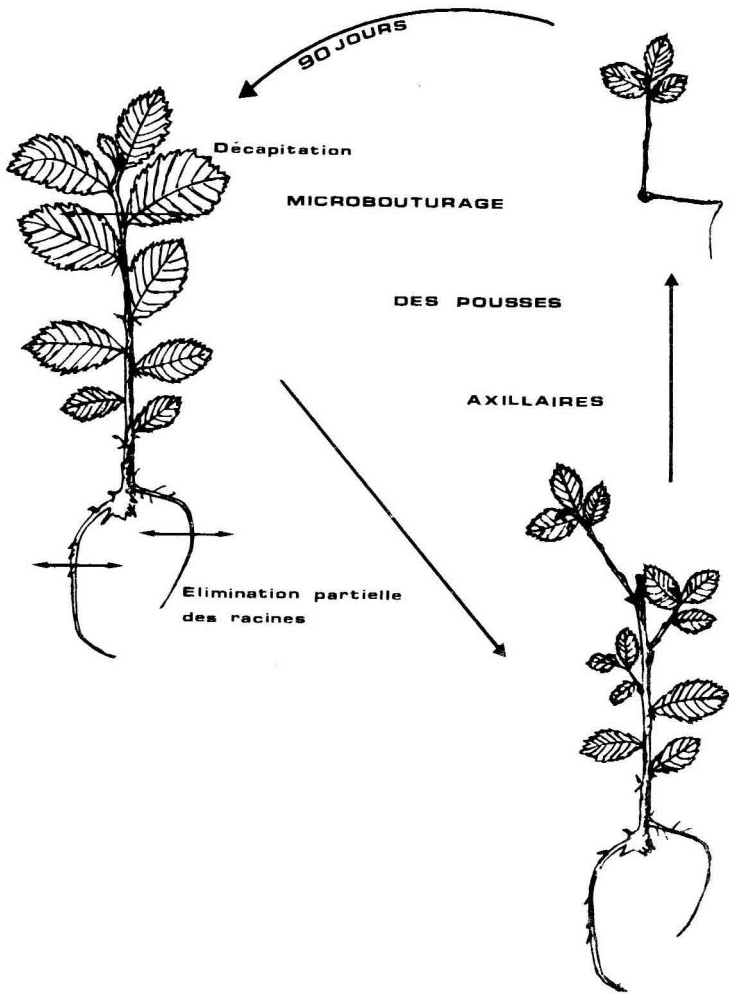


FIG. 2

*Multiplication végétative in vitro par ramification des souches enracinées.*  
*In vitro vegetative reproduction by ramification of rooted shoots.*

### 2.3. Conservation et levée de dormance

Pour les essais de conservation, ou de levée de dormance, les plantes, à différents stades de développement, ont été installées pendant des temps variables dans une chambre froide (7 °C, 8 h d'éclairage sous 7 W/m<sup>2</sup> (3)), puis replacées pour les observations, en serre pour les plantes en pots, en chambre de culture pour les plantes *in vitro*.

### 2.4. Acclimatation

Les plantes enracinées *in vitro*, ont été extraites et placées dans des godets contenant de la tourbe enrichie (1/2) et du sable (1/2). Elles ont d'abord été placées à 18/20 °C en mini serre pendant 10 à 15 jours avec un éclairage d'appoint de 14 W/m<sup>2</sup> puis transférées à l'air libre.

## 3. Résultats

### 3.1. Mise en culture

#### 3.1.1. Désinfection

Les contaminations exogènes et endogènes ont toujours considérablement limité l'introduction *in vitro* des explants ; les pertes observées sont variables avec le type d'explant mis en culture, l'époque et le lieu de prélèvement (tabl. 1). Ainsi en plein air, la prise d'échantillons doit s'effectuer sur des pousses en croissance. Dans le cas de rameaux en fin de croissance, les contaminations sont toujours très importantes mais variables selon les capacités de croissance des axillaires. Ceux qui se développent activement peuvent être soustraits aux infections après élimination de l'explant primaire. Les prélèvements pratiqués sur du matériel préparé en serre (plante mère ou bouture de nœud) donnent toujours de meilleurs résultats. Cependant, l'efficacité des traitements est fonction de la durée de désinfection. Pour « Commelin » par exemple, un traitement de 20 mn dans l'hypochlorite de calcium à 7 p. 100 permet d'obtenir un taux d'infection inférieur à 5 p. 100, alors qu'il atteint 33 p. 100 après un traitement de 10 mn. Toutefois, dans le cas des parties apicales de rameaux, la désinfection doit être limitée à 10 mn pour éviter la nécrose des explants. Le pourcentage moyen d'infection est alors de 11 p. 100 (7/66). Bien que l'addition de 100 mg/l de Rifampicine au milieu de culture limite les contaminations bactériennes (de 29 à 7 p. 100) quand le traitement par l'hypochlorite est court (10 mn), le pourcentage d'infection varie peu puisqu'il diminue seulement de 42 à 24 p. 100.

Il apparaît donc que le prélèvement des bourgeons axillaires sur des pieds mères cultivés en serre est la méthode qui présente le moindre risque de contamination.

#### 3.1.2. Croissance des explants primaires

##### 3.1.2.1. Explants nodaux

L'addition d'une auxine (AIA 0,5 mg/l ou AIB 0,5 mg/l) et/ou d'une cytokinine (2 IP 0,5 mg/l ; BAP 0,3 ou 0,5 mg/l) ne stimule pas la croissance des pousses

TABLEAU 1

*Perte par contamination (p. 100) observée selon le type d'explant, l'époque et le lieu de prélèvement.*

*Loss by contamination (p. 100) observed depending on the type of explant, season and sample location.*

Type d'explant	Stade	Prélèvement		% contaminations
		Epoque	Lieu	
Bourgeons axillaires . . . . .	Rameau ligneux	Automne	Plein air	100 p. 100
	Rameau en fin de croissance	Eté	Plein air	80 à 100 p. 100
	Rameau en fin de croissance		Serre	0 à 40 p. 100
Pousses feuillées . . . . .	Croissance naturelle	Printemps	Plein air	25 p. 100
	Croissance forcée	Hiver	Serre	16 à 70 p. 100

préformées dans les bourgeons. De plus, les combinaisons auxine-cytokinine, de même que les cytokinines utilisées seules, entraînent une callogénèse active au niveau des sections ; l'axillaire est alors rapidement recouvert par les nouveaux tissus et inhibé. En présence d'auxine aucun cal n'est observé, et on note une légère inhibition puisque 16 p. 100 des bourgeons s'allongent en présence d'AIB (0,5 mg/l) et 22 p. 100 en présence d'AIA (0,5 mg/l) contre 34 p. 100 sans régulateur. Lorsque l'axillaire reste inhibé ou présente un débourrement tardif, (76 p. 100 des bourgeons dans le cas de « Commelin »), on observe à la partie supérieure de la tige la néoformation de pousses au niveau du cambium (fig. 3). Ces pousses (1,4 en moyenne par explant) pourraient être utilisées pour augmenter la quantité de tigelles introduites en multiplication dans la mesure où, issues de néoformations, leurs caractéristiques physiologiques (tolérance à la graphiose, en particulier dans le cas de « Commelin ») ou morphodynamiques ne seront pas modifiées.

### 3.122. *Pousses herbacées*

A partir d'extrémités apicales feuillées (apex + 1 à 2 feuilles développées), la croissance est dépendante de l'aptitude de chaque clone à l'enracinement (capacité génétique + capacité ontogénique déterminée par l'âge du pied mère). Ainsi, les 2 clones d'*U. americana* introduits *in vitro* s'enracinent sans apport d'auxine, de même que quelques apex du clone OCBi. Toutefois, les explants de ces deux espèces provenaient soit d'arbres jeunes (2 à 3 ans) soit de rejets de souches qui pourraient présenter des potentialités juvéniles (FRANCIET, 1981). Les clones hollandais « Vegeta » et « Plantijn » (âge > 5 ans) s'enracinent aussi sans régulateur de croissance, en 10 jours. Par contre, la rhizogénèse est plus difficile à obtenir dans le cas de « Commelin » ; après un mois, le taux de réussite est seulement de 43 p. 100 (17/40) en présence d'AIB 0,5 mg/l.

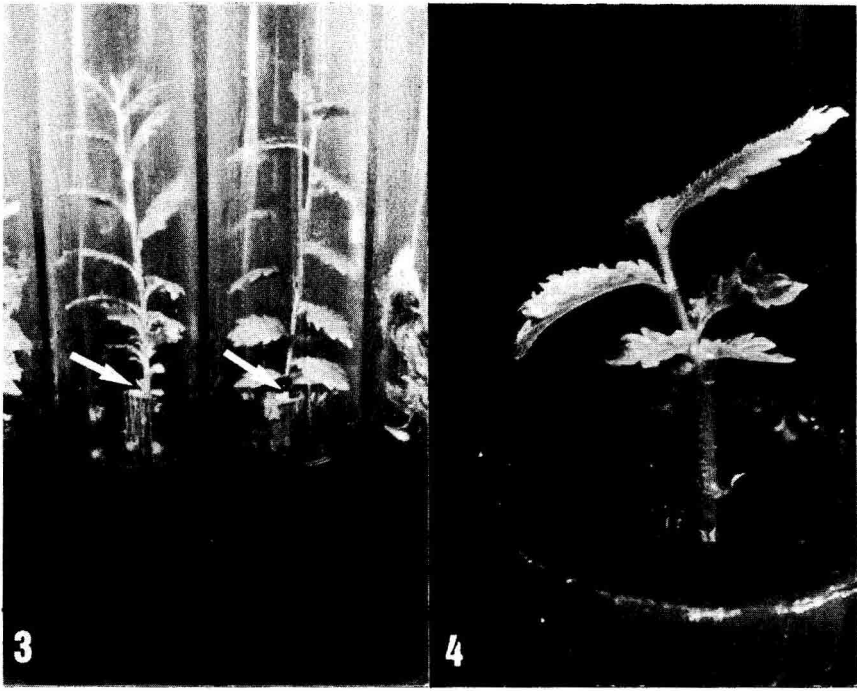


FIG. 3

*Aspect des pousses néoformées au niveau du cambium (→) : clone OCBa.*  
*Characteristics of neoformed shoots at the cambium level : clone OCBa.*

FIG. 4

*Entrée en croissance des bourgeons axillaires sur boutures de nœud (OCBa) après 28 jours.*  
*Beginning of growth of the axillary buds on nodal cuttings (OCBa) after 28 days.*

### 3.123. *Micropropagation in vitro*

Les méthodes de multiplication ont été mises en place à partir des sujets enracinés issus des manipulations précédentes ou de germinations *in vitro*.

Les tentatives pour obtenir une méthode de multiplication par développement d'axillaires ont échoué en raison d'une callogénèse intense à la base des explants due à la présence de la cytokinine (BAP 0,5 mg/l). Seule une multiplication par fractionnement de plantules (fig. 1 et 2) a donc été établie.

#### *Parties apicales*

L'enracinement est favorisé par la dilution des macroéléments (MS/4) et dans certains cas par un apport de charbon actif (2 g/l). On a pu noter en outre (tabl. 2) :

- *un effet spécifique* : 90 p. 100 d'enracinement pour *U. pumila* contre 58 p. 100 pour un *U. campestris* de même âge ;

TABLEAU 2

*Influence de divers facteurs sur l'enracinement après 40 jours de quelques clones d'ormes cultivés in vitro depuis plus d'un an (essais réalisés sur des effectifs > 12).*

*The influence of various factors after 40 days, on the rooting of some elm clones cultivated in vitro for more than a year (trial carried out on a population > 12).*

Espèce et clone	Origine	AIB mg/l	Culture (*) <i>in vitro</i>	Enracinement %
<i>U. campestris</i>				
OCBa . . . . .	Rejets de tronc 1 an	0	2 ans	60
OCBi . . . . .	Rejets de souche 2 à 3 ans	AIB 0,5	1 an	58
OCBy . . . . .	Drageons 3 à 5 ans	AIB 0,5	2 ans	13
<i>U. X. campestris</i>				
OmBe m . . . . .	Graine	0	1 an	100
OmBe k . . . . .	Graine	0	1 an	90
OmBe l . . . . .	Graine	AIB 0,5	1 an	71
<i>U. effusa</i>				
OIBe f . . . . .	Graine	0	1 an	88
OIBe g . . . . .	Graine	AIB 0,5	1 an	50
<i>U. pumila</i> Opo'	Arbuste 4/5 ans	0	1 an	90
Hybrides hollandais				
« Dodoens » . . . .	Arbuste > 3 ans	AIB 0,5	1 an	73
« Dodoens » . . . .	Arbuste > 3 ans	0	1 an	9
« Vegeta » . . . . .	Arbuste > 3 ans	0	1,5 an	94
« Commelin » . . .	Arbuste > 3 ans	0	1,5 an	87

(\*) Culture in vitro : temps passé en multiplication (6 à 7 subcultures/an).

• *un effet clonal* pour *U. campestris* l'enracinement est de 13, 58, 60 p. 100, selon le clone considéré ;

• *un effet de l'état de maturité des pieds mères*, puisque pour *U. campestris* et hybrides (*U. X. campestris*), les clones issus de germination *in vitro* se sont mieux enracinés (71 à 100 p. 100) que ceux issus des drageons et rejets (13 à 60 p. 100) ;

• *un effet des régulateurs de croissance*. Ainsi 7 clones se sont enracinés spontanément, pour les 5 autres l'AIB a facilité la rhizogénèse. Ce résultat est particulièrement net pour « Dodoens ».

Enfin on a noté une augmentation importante de l'aptitude au bouturage au fur et à mesure des cycles de multiplication *in vitro*. Ainsi pour OCBa, sans régulateur de croissance, le p. 100 d'enracinement à 50 jours passe de 50 à 100 entre 1 et 3 ans de culture *in vitro* (6 à 7 subcultures par an). De même pour « Commelin », ce pourcentage s'accroît de 42 à 87 p. 100 entre 2 et 18 mois et l'exigence en AIB disparaît.

Les plantes enracinées, issues du bouturage des parties apicales, ont été réintroduites dans le cycle de multiplication ou passées en pépinière après une phase d'acclimatation en serre (> 5 mois).

### 3.124. Microbouturage des nœuds isolés

Deux phénomènes ont été pris en compte : l'allongement du méristème axillaire, et l'enracinement du nœud porteur.

L'entrée en croissance des axillaires se manifeste pour 50 à 90 p. 100 des nœuds, 20 à 30 jours après l'isolement (fig. 4), l'élongation se poursuit activement après l'enracinement du nœud porteur. L'allongement moyen après 46 jours pour OCBa est de  $31,8 \pm 11,8$  mm pour les nœuds enracinés, contre  $11,7 \pm 5,1$  mm pour les non enracinés. Les pousses allongées sont réinsérées directement dans un cycle de multiplication après 60 jours environ. Pour les axillaires des nœuds non enracinés, la croissance est obtenue après séparation de l'axe porteur et microbouturage. On a en effet observé que la rhizogénèse est plus facile à obtenir sur les parties apicales que sur les nœuds pour lesquels l'addition d'AIB 0,5 mg/l est le plus souvent nécessaire (tabl. 3).

TABLEAU 3

*Comparaison de l'aptitude à l'enracinement des apex et des nœuds isolés après 40 jours de microbouturage et un an de culture in vitro.*

*A comparison of rooting aptitude for the apex and isolated nodes after 40 days of micropropagation and one year of in vitro culture.*

Clone	% d'enracinement des parties apicales	% d'enracinement des nœuds	
	AIB 0 mg/l	AIB 0 mg/l	AIB 0,5 mg/l
OCBa . . . . .	60	9	33
OmBe m . . . . .	100	17	71
OmBe k . . . . .	90	22	31
OiBe f . . . . .	88	17	75
Opo' . . . . .	90	71	42

TABLEAU 4

*Evolution de l'aptitude à l'enracinement in vitro, au cours du temps, chez deux clones OCBa et OmBe m.*

*Changes in the rooting aptitude in vitro, with time, for two clones, OCBa and OmBe m.*

Clone	Temps passé en multiplication	Temps depuis le microbouturage	% d'enracinement	
			AIB 0,5 mg/l	AIB 0 mg/l
OmBe m . . . . .	12 mois	40 jours	71	17
	36 mois	30 jours	55	83
	36 mois	40 jours	91	100
OCBa . . . . .	10 mois	50 jours	54	70
	36 mois	50 jours	100	83

Dans le cas de « Dodoens », l'enracinement des nœuds reste faible : 14 p. 100 même en présence d'AIB ; toutefois, on peut aussi constater que plus le nombre de cycles de multiplication *in vitro* augmente, plus les nœuds s'enracinent facilement (tabl. 4).

#### *Efficacité de la multiplication*

En associant le microbouturage des parties apicales et des nœuds, on peut, en un an environ, espérer obtenir à partir d'une tigelle, 7 200 (4,4<sup>6</sup>) plantules enracinées si on retient les conditions suivantes :

- Enracinement des parties apicales : 100 p. 100 ;
- Débourrement des nœuds : 90 p. 100 ;
- Enracinement des nœuds : 80 p. 100.

Toutefois ces chiffres ne peuvent être obtenus pour certains clones, en particulier *U. americana* (OAmO et OAm xa4) ainsi que « Plantijn » et « Groenveld » pour lesquels le développement des axillaires est faible ou nul sur nœud isolé dans nos conditions d'expériences. Dans ce cas les plantes *in vitro* peuvent être décapitées pour lever la dominance apicale, puis repiquées avec leur système racinaire (fig. 2). Il est alors possible d'obtenir en 40 jours, en moyenne, environ 2,5 ramifications par plante de 7 à 8 nœuds ; l'addition d'une cytokinine (2 IP 0,5 mg/l) n'améliore pas l'intensité de la ramification. Selon le schéma proposé (fig. 2), le rendement théorique de la multiplication n'est dans ce cas que de 81 (3<sup>4</sup>) plantes enracinées par an, ce mode de propagation est donc beaucoup moins efficace que le précédent. Toutefois, on peut envisager de passer progressivement au procédé de microbouturage de nœuds si comme on l'a vu par ailleurs la réactivité des explants augmente au cours de la culture *in vitro*.

#### 3.125. *Conservation des plantes in vitro*

La constitution d'un conservatoire de génotypes implique de limiter la fréquence des repiquages, manipulations difficiles à assurer pour un grand nombre de clones, et pouvant conduire à des variations non contrôlées. Quelques résultats préliminaires sur la conservation en chambre froide ont été obtenus, bien que les effectifs mis en expériences soient faibles. On a pu noter que pour des plants mis au froid après enracinement la survie est de 21 mois environ. 7 à 10 jours après le retour dans la chambre de culture, un repiquage avec une multiplication par bouture de nœuds peut être pratiqué. Pour les clones les plus résistants (OCBa et OCBi 100 p. 100 de survie) le coefficient de multiplication a été de 4 à 5 après 18 mois. Si les plantes ne sont pas enracinées au moment de la mise au froid, l'état dormant paraît souhaitable ; cependant la conservation (« Dodoens ») n'a pas été prolongée au-delà de 9 mois : en effet les bourgeons commencent leur croissance en chambre froide ; il est alors nécessaire de les repiquer pour éliminer la partie basale lignifiée, toutefois dans ce cas les tiges herbacées sont trop courtes pour être multipliées.

#### 3.126. *Acclimatation et croissance*

L'acclimatation des plants issus de culture *in vitro* a été effectuée sans difficulté dans les conditions décrites plus haut. Deux facteurs importants interviennent dans la reprise de croissance : le stade de développement au passage en serre et l'effet clonal.

Lorsque les plantes sont acclimatées pendant une phase d'arrêt de croissance (formation d'initium foliaire sans allongement), l'acclimatation est possible, mais les

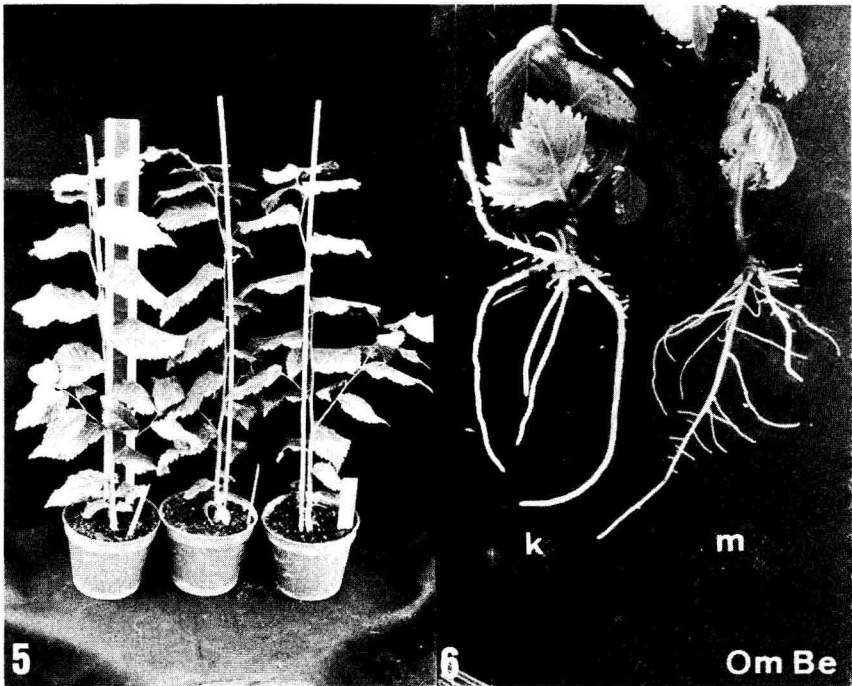


FIG. 5

*Plantes du clone OmBe k après acclimatation en serre (5 mois).  
Clone OmBe k plants after acclimatization under glass (5 month).*

FIG. 6

*Aspect des systèmes racinaires de deux clones d'U. X campestris issus de 2 graines  
prélevées sur le même arbre et multipliés in vitro (OmBe m et k).  
Character of the rooting systems of two clones of U. X campestris coming from 2 seeds  
gathered from the same tree and reproduced in vitro (OmBe m and k).*

plantes entrent rapidement en repos (formation d'un bourgeon terminal avec écailles) même en jours longs. Cet état s'est maintenu pendant 6 mois. Un passage de 2 mois en chambre froide permet la reprise d'élongation dans la semaine qui suit le retour à 20 °C.

Lorsque les plantes sont acclimatées en phase de croissance active, l'allongement se manifeste rapidement (15 jours). Après 3 à 5 mois les plantes atteignent une hauteur moyenne de 50 cm (fig. 5). Toutefois, on peut observer quelques variations suivant les clones. Ainsi, le clone OmBe m présente, après 1 mois 1/2, une croissance moyenne de  $30,33 \pm 3,50$  cm, deux fois plus importante que le clone OmBe k ( $17,0 + 2,4$  cm). Ce résultat pourrait être en corrélation avec le type d'enracinement de chacun des clones ; en effet OmBe m présente un système racinaire fasciculé, très ramifié, alors que celui de OmBe k est formé de quelques racines peu ramifiées à tendance callogène (fig. 6). Quelques sujets issus de culture *in vitro* (OCBi) ont été installés en pépinière et poursuivent depuis 3 ans un développement apparemment normal.

#### 4. Discussion

Deux méthodes de multiplication *in vitro* ont été établies ; la première utilisant le fractionnement de sujets enracinés est envisageable pour les clones présentant une forte réactivité dès l'introduction *in vitro* ; la seconde utilisant l'aptitude à la ramification des plantules décapitées, beaucoup moins efficace, est applicable aux clones à réactivité faible, pour lesquels les nœuds isolés ne présentent, dans les conditions de culture utilisées, ni croissance des méristèmes axillaires, ni enracinement. Ces méthodes de multiplication provenant exclusivement du développement de méristèmes préformés, ne devraient pas conduire à un pourcentage de variation supérieur à celui obtenu par les méthodes de multiplication végétative traditionnelles.

Il faut noter que ces deux méthodes excluent l'utilisation de cytokinines pour stimuler le développement des axillaires, alors que ce procédé est employé efficacement pour d'autres espèces ligneuses comme par exemple le merisier (RIFFAUD et CORNU, 1981). Dans le cas des ormes une prolifération intense de cals est induite par les cytokinines, tant au niveau de l'introduction des explants primaires *in vitro* que dans la phase de multiplication. CHALUPA (1979) rapporte des résultats analogues sur plusieurs espèces d'ormes avec des doses de BAP de 0,1 à 2 mg/l.

En ce qui concerne l'utilisation d'auxines en vue de stimuler la rhizogénèse (en particulier AIB 0,5 mg/l), la réaction des explants dépend à la fois :

— du génome puisque les clones étudiés présentent des exigences vis-à-vis de l'AIB très nettement différentes dans le cas de matériel juvénile (issu de germination), comme cela a été observé par exemple avec les *Vaccinium* (FISCHER-DAZY *et al.*, 1984) ;

— de l'état physiologique, puisqu'on a pu mettre en évidence :

1) une exigence différente vis-à-vis de l'auxine pour des boutures de nœud utilisées soit en culture primaire, soit en repiquage *in vitro*. Dans le premier cas, les axillaires peuvent se développer sans rhizogénèse à partir de l'explant et l'auxine n'est pas nécessaire, contrairement aux observations faites sur *Gardenia* par exemple (DUMANOIS *et al.*, 1984). Dans le second cas, l'allongement de l'axillaire est consécutif à l'enracinement qui nécessite le plus souvent la présence d'AIB. Il est probable que le niveau de réserves des explants (éléments nutritifs et régulateurs) est la cause principale de ces différences ;

2) une modification des capacités initiales de rhizogénèse au cours de la multiplication, l'auxine devenant inutile après quelques repiquages. Ce phénomène peut s'expliquer par un effet rajeunissant des cultures *in vitro* (BOXUS, 1978 ; ZIMMERMANN, 1980) qui se traduit par une augmentation du potentiel d'enracinement (SRISKANDARAJAH *et al.*, 1982 ; DUMANOIS *et al.*, 1984).

Actuellement, les méthodes de multiplication végétative rapportées dans cet article ont déjà permis :

— une mise en conservatoire de 19 clones dont certains (5 clones hollandais) présumés plus tolérants à la graphiose ;

— une multiplication intensive de certains clones (établissement de pied-mères *in vitro*).

Toutefois, ces méthodes pourraient devenir plus performantes dès la phase d'introduction *in vitro* des explants primaires, soit par une meilleure maîtrise des conditions de prélèvement, soit par un accroissement du nombre des tigelles à l'origine des cycles de

multiplication. L'utilisation des pousses néoformées à partir du cambium des tiges sectionnées, pourrait être aussi un moyen efficace d'augmenter la quantité initiale de plantules. Il faut noter que cette potentialité des explants primaires a été rapportée depuis longtemps par GAUTHERET (1940a et b) sur des fragments de cambium isolé, et par JACQUIOT (1949, 1977) au niveau de la portion cambiale d'explants plus complexes (tige ou cambium + bois et liber) soustraits à la dominance de la cime. Toutefois, cette possibilité n'est réellement intéressante que dans la mesure où les tigelles néoformées présentent un développement conforme à la plante mère.

Reçu le 3 juillet 1986.

Accepté le 17 mars 1986.

### Remerciements

Les auteurs remercient vivement M. Pinon (C.R.F., Nancy) pour leur avoir fourni le matériel nécessaire à l'introduction *in vitro* des variétés hollandaises sélectionnées par le P<sup>r</sup> Heybroeck, et M. Cornu (INRA, Orléans) pour les exemplaires d'*U. pumila* et *U. americana*.

Les auteurs remercient également E. Nawoj pour la mise en page de ce travail.

### Summary

#### *The in vitro reproduction of some elm species*

Because of their vulnerability to Dutch elm disease, European and American elms are in danger of disappearing. Also, improvement of tolerance by hybridisation is delicate (because of the rarity of resistant genotypes, the necessity for interspecific crosses, and the length of the juvenile period).

The use of *in vitro* cultures allows :

- mass reproduction of naturally tolerant trees ;
- the reproduction of individuals regenerated in cellular suspensions resistant to the toxins of the pathogen (*Ceratocystis ulmi*).

In this case a method of *in vitro* vegetative reproduction was perfected on clones of various elms derived from many species (*u. effusa*, *pumila*, *americana*, *campestris*) and from Dutch hybrids (Dodoens Vegeta, Plantijn, and Groenveld).

#### *Growing conditions*

The cultural medium for reproduction, consisted of the diluted macroelements of Murashige and Skoog (MS/2 and MS/4), the microelements of Heller, chelated iron (Fe EDTA), the vitamins of Morel and Wetmore, saccharose 10 g/l. and also active charcoal 2 g/l.

Depending on the trial, the medium was completed by the addition of an auxin (IAA, IBA, 0.5 or 1 mg/l) or a cytokinin (2 I P 0.5 mg/l or BAP 0.3 and 0.5 mg/l). The cultures were placed in a controlled environment chamber (25 °C Day/22 °C Night) with 16 hour days (21 W/m<sup>2</sup>).

#### *Cultures*

Contamination is a limiting factor in *in vitro* development. The best results were obtained either by sampling herbaceous shoots growing in the open air or after forcing under glass, or using the explants (apical parts or nodal cuttings) coming from the parent stool grown under glass. Sterilisation with Ca hypochlorite for 10 to 20 minutes, combined with a treatment of the parent stool with Benlate (600 mg/l) 48 hours before sampling, limited infection to 5 or 11 p. 100.

The axillary growth of the nodal cuttings develop without growth regulators, the cytokinins produce an intense callusing which cannot be used. When the development of the axillaries is slow (76 p. 100) the neoformed shoots (1.4/explant) begin to grow at the cambium level.

The herbaceous shoots are mainly rooted without growth regulators. For certain clones like « Commelin », rooting was moderate (43 p. 100) even using IBA 0.5 mg/l.

#### *In vitro micropropagation*

As soon as the samples have rooted following the above manipulations, or *in vitro* germination, two reproductive systems were established : the first, by splitting the plantlets, and the second by a ramification of the decapitated plantlets for the clones which produced necrotic nodes after isolation.

Elongation of the shoots, indispensable for reproduction, depends on the rooting of the explant. With reference to this subject one can observe :

- a clonal effect, 7 clones rooted spontaneously, for the others an addition of IBA is beneficial ;
- an influence of the level of maturity of the parent stools (a juvenile effect) ;
- an aptitude towards root formation, less for the nodes than for the apical parts ;
- an amelioration of rooting capacity during *in vitro* reproduction.

#### *Maintenance of plants in vitro*

Results were obtained for the clones maintained at 7 °C with 8 hours of light (7 W/m<sup>2</sup>). After rooting, the plants were maintained for 21 months. The first reproduction was carried out 7 to 10 days after returning to 25 °C. Maintenance was also possible (9 months) for the non-rooted tigelles with a dormant terminal bud.

#### *Acclimatization and growth*

Acclimatization was carried out in mini-glasshouses at 18/20 °C for 10 to 15 days. If growth stopped, treatment for 2 months in a cold chamber was necessary to break the inhibition. The mean elongation obtained was from 50 cm after 4 months, but varied according to the clones and the state of their rooting systems. After planting, the elms from *in vitro* culture seemed to develop normally.

The methods perfected allowed us to obtain about 7.200 (for the first) and 81 (for the second) rooted plantlets per year, without the risk of variation (absence of callus).

They have already been used for :

- the conservation of sensitive, or more or less tolerant clones (the Dutch clones) ;
- the stockage of parent stools for the preparation of cellular suspensions.

However, the phase of introduction *in vitro* still needs to be improved. The use of neoformed shoots on cambium could be envisaged to increase the number of the initial plantlets, if the system would not generate variations.

### Références bibliographiques

- BOXUS P., 1978. *In vitro multiplication of woody species*. Publié par la station des cultures fruitières et maraichères, Chaussée de Charleroi 234, 5 800 Gembloux, Belgique, 300 p.
- CHALUPA Y., 1979. *In vitro* propagation of some broad-leaved forest trees. *Comm. Inst. Forest. Czechoslov.*, **11**, 159-170.
- DUMANOIS C., GODIN B., BIGOT C., 1984. Multiplication végétative *in vitro* de *Gardenia jasminoides* Ellis. *J. Plant Physiol.*, **116**, 389-407.
- DURZAN D.J., LOPUSHANSKI S.M., 1975. Propagation of American elm via cell suspension cultures. *Can. J. For. Res.*, **5**, 273-277.
- FISCHER-DAZY A.C., GODIN B., BIGOT C., 1984. Variabilité des capacités organogènes *in vitro* observées à partir de matériel juvénile dans le cas de quelques myrtiliers américains (*Vaccinium* sp.). 4<sup>e</sup> Colloque sur les recherches fruitières, Bordeaux, 63-75.
- FRANCKET A., 1981. Rajeunissement et propagation végétative des ligncux. *Ann. Rech. Sylv.*, 11-40.

- GAUTHERET R., 1940a. *Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'Ulmus campestris cultivé in vitro*. C.R. Acad. Sci., Paris, **210**, 632-634.
- GAUTHERET R., 1940b. *Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'Ulmus campestris cultivé in vitro*. C.R. Acad. Sci., Paris, **210**, 744-746.
- HELLER R., 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux, cultivées *in vitro*. *Ann. Sci. nat.*, Paris, **14**, 1-223.
- JACQUIOT C., 1949. *Observations sur la néoformation de bourgeons chez le tissu cambial d'Ulmus campestris cultivé in vitro*. C.R. Acad. Sci., Paris, **229**, 529-530.
- JACQUIOT C., 1977. Néoformations de bourgeons à partir de cambium d'*Ulmus campestris* et d'autres espèces. *Bull. Soc. Bot. France*, **124**, 141-143.
- KARNOSKY D.F., MICKLER R.A., LANGE D.D., 1982. Hormonal control of shoot and root induction in hypocotyl callus cultures of american elm. *In vitro*, **18**, 275.
- MOREL G., WETMORE R.H., 1951. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, **38**, 141-143.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- NORDIN J.H., STROBEL G.A., 1981. Structural and immunochemical studies on the phytotoxic peptidorhamnomanann of *Ceratocystis ulmi*. *Plant. Physiol.*, **67**, 1208-1213.
- RIFFAUD J.L., CORNU D., 1981. Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt. *Agronomie*, **1**, 633-640.
- SRISKANDARAJAH S., MULLINS M.G., NAIR Y., 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Sci. Lett.*, **24**, 1-9.
- TAKAI S., RICHARDS W.C., 1978. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: isolation, and some properties of cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopathol. Z.*, **91**, 129-146.
- ZIMMERMANN R.H., 1980. *Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture: application and feasibility*. Publié par l'Université du Maryland, Betsville, 106 p.