

RAPPORT D'ÉTAPE 87 DU PROJET Pé 85-1

CULTURE *IN VITRO* D'ESSENCES FORESTIERES

TITULAIRE du PROJET:

Daniel Lord, professeur
Département des Sciences fondamentales
Université du Québec à Chicoutimi
555, Boul. de l'Université
Chicoutimi (Québec)
G7H 2B1

MEMBRE de l'EQUIPE:

Line Brissette, biologiste (professionnelle)
Laurence Tremblay, biologiste (assistante)
Marc Caron, biologiste (étudiant de 2^{ième} cycle)
Denis Walsh (étudiant de 1^{er} cycle, biologie)

RESPONSABLE TECHNIQUE MER:

Dr. Charles-Gilles Langlois
Service de la recherche

1^{er} MAI 1987

1. BUT du PROJET.

L'objectif général de ce projet est d'augmenter la probabilité d'obtention de plants complets d'épinette noire par la vitroculture de bourgeons végétatifs prélevés sur des arbres suffisamment âgés pour avoir démontré leurs qualités phénotypiques et/ou génotypiques supérieures.

2. RETOMBEES SOCIO-ECONOMIQUES et ETAT de la SITUATION.

L'intérêt d'atteindre un tel objectif vient du fait que la reproduction végétative permet l'exploitation de la variabilité non-additive d'une population en clonant les individus jugés les plus intéressants (Hasnains et Cheliak 1986). Cette variabilité résulte des combinaisons spécifiques de gènes chez un individu ou une famille. Comme elle peut excéder 50% de la variabilité totale, ce critère d'amélioration doit être considéré dans tout programme visant à augmenter la qualité des arbres peuplant les forêts de demain. A plus court terme, la maîtrise d'une telle technique *in vitro* signifie la multiplication des meilleurs individus obtenus lors de croisements antérieurs (il y a 10 à 20 ans). A plus long terme, elle signifie aussi une meilleure qualité de reboisement par l'emploi de plants de qualité supérieure ne provenant que d'individus pré-sélectionnés selon certains critères bien précis.

Avant d'en arriver là, plusieurs obstacles devront être franchis. Le principal obstacle réside dans le fait que la sélection phénotypique de conifères "supérieurs" ne devient possible qu'au moment où les individus ont atteint l'âge de 10 à 15 ans au minimum, alors que la difficulté de reproduire les arbres de façon végétative augmente grandement avec l'âge. La vitroculture ayant un effet de réjuvenation en soi, elle apparaît comme une technique appropriée pour la reproduction végétative des conifères âgés.

La vitroculture des conifères a surtout fait appel jusqu'ici à l'utilisation de tissus embryonnaires prélevés directement dans la graine ou peu après la germination. Chez les arbres plus âgés, plusieurs types de tissus ont été essayés avec différents résultats. Dans le genre *Picea*, seule l'utilisation de bourgeons végétatifs dormants d'épinette noire (*P. mariana* (Mill.) BSP) a, à notre connaissance, permis l'obtention de plants complets par culture *in vitro* de matériel non-embryonnaire. Une centaine de plants ainsi obtenus à partir de bourgeons prélevés à la pépinière provinciale de Duchesnay sur des plants âgés de 5 ans font maintenant l'objet d'une étude sur leur comportement à plus long terme à la pépinière provinciale d'East-Angus. A l'heure actuelle, leur apparence est semblable à celle des plants issus de semis du même âge. La technique mise au point permet donc d'obtenir des plants viables. Cependant, son efficacité et sa reproductibilité demeurent des plus faibles. Pourquoi et comment augmenter l'efficacité et la reproductibilité d'une année à l'autre, d'un matériel à l'autre? Ce travail se propose de répondre à ces questions.

3. RESULTATS SCIENTIFIQUES ou TECHNIQUES ESPERES.

Les causes à l'origine du manque d'efficacité et de reproductibilité de la technique de culture *in vitro* de conifères peuvent être multiples. Cependant, il est reconnu que la morphogénèse dans les tissus cultivés *in vitro* est en bonne partie contrôlée par les niveaux de substances de croissance, autant ceux contenus dans l'explantat que ceux ajoutés au milieu de culture. De plus, il est possible que la plupart des autres facteurs qui influencent le succès de la vitroculture agissent sur ces niveaux, lesquels n'ont par ailleurs qu'été très peu étudiés jusqu'ici. Pourtant, les niveaux de ces substances, qu'il s'agisse d'auxines, de

gibbérellines, de cytokinines ou d'acide abscissique, varient continuellement dans le temps (Quoirin *et al.* 1974), sinon dans l'espace et selon l'âge. Par exemple, Fouret *et al.* (1986) ont trouvé une relation entre la teneur en AIA et en ABA mesurée par des techniques immunologiques et la capacité rhizogénique de tissus cultivés *in vitro* prélevés initialement sur des *Sequoia sempervirens* Endl. de différents âges. L'ensemble de ces considérations nous amène à formuler l'hypothèse de départ suivante:

La connaissance de l'état quantitatif en substances de croissance endogènes est fondamentale lorsque vient le temps de mettre les bourgeons en culture ou de transférer les explantats d'un milieu à un autre, car cet état varie en fonction de plusieurs facteurs.

Par exemple, l'âge du plant donneur, son génotype, la localisation du bourgeon sur l'arbre, les pré-traitements sur le plant donneur, la composition des milieux de culture (et particulièrement le type et la concentration des substances de croissance utilisées), les conditions environnementales et autres sont autant de facteurs qui influencent sûrement cet état, au même titre que l'âge (Fouret *et al.* 1986) ou le temps (Quoirin *et al.* 1974). Jusqu'à quel point? Comment? A quel moment? ne sont que quelques-unes des questions dont les réponses permettraient de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la vitroculture des conifères, et d'ainsi accroître l'efficacité et la reproductibilité de la méthode. Cette hypothèse, laquelle exige une méthode précise de dosage des substances de croissance pour sa vérification, nous a amené à définir les objectifs spécifiques suivants:

3.1 Développer la méthodologie pour être en mesure de quantifier, en tout moment, certaines substances de croissance dans l'explantat.

Les premiers travaux ont porté sur l'acide indole-acétique (AIA), une substance de croissance naturelle dans les plantes. L'acide naphthalène-acétique (ANA), une substance de croissance synthétique de type auxinique utilisée dans les milieux de culture afin jouer le même rôle que l'AIA, celle-ci ayant souvent tendance à se dégrader, est également étudiée dans le cadre d'un projet de maîtrise. Par après, une autre substance de croissance naturelle dans les plantes, l'acide abscissique (ABA), fera l'objet du même type de travaux, puis une autre substance de croissance synthétique employé en vitroculture, soit la benzylaminopurine (BAP).

3.2 Evaluer l'effet exercé par certains facteurs sur l'efficacité de la méthode de culture *in vitro* de bourgeons d'épinette noire.

Conformément au rapport d'étape 1986, les facteurs suivants ont été les premiers étudiés: génotype, âge du plant donneur, pré-traitement au froid, composition du milieu de culture en substances de croissance et durée de contact de l'explantat avec les divers milieux utilisés. La production du maximum de tiges à partir d'un bourgeon mis en culture est le principal facteur de comparaison entre les divers traitements.

3.3 Quantifier l'effet exercé par ces facteurs sur les niveaux des substances de croissance.

Lorsque la méthode de quantification des substances de croissance sera au point, il sera alors possible de vérifier comment les facteurs mentionnés à la section 3.2 influencent la concentration hormonale dans les bourgeons. Cela devrait ensuite permettre d'adapter la composition hormonale des milieux de culture à une situation ponctuelle dans laquelle se retrouve le bourgeon ou l'explantat à un moment donné de son développement. Bien

entendu, cette composition dépend aussi de l'étape subséquente de morphogénèse; elle devrait varier selon que le but de cette étape consiste à induire des tiges ou des racines, ou à permettre l'accroissement en longueur des tigelles ou des racines.

Nous sommes conscient que d'autres facteurs que les substances de croissance ont un rôle important à jouer dans les différentes étapes de vitroculture. Cependant, ces dernières semblent avoir été moins étudiées que les autres, alors que leur rôle s'avère sûrement l'un des plus importants. L'atteinte du troisième objectif spécifique dépendant essentiellement de l'atteinte du premier, nous n'allons traiter que du travail fait, des résultats obtenus et du travail à faire pour les deux premiers objectifs.

4. TRAVAIL FAIT ET A FAIRE ET RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES DEUX PREMIÈRES ANNÉES DE SUBVENTION.

4.1 Objectif 3.1.

L'objectif visé présentement consiste donc à quantifier l'AIA et l'ANA dans des bourgeons dormants mis en culture. Il existe diverses techniques pour mesurer les substances de croissance dans les végétaux, sauf qu'elles ont été développées pour des applications où la quantité de matériel végétal disponible à l'extraction n'est pas limitative. Dans le cadre de ce projet, il est impératif de se rapprocher le plus possible de l'unité de départ, à savoir le bourgeon végétatif. Pour cette raison, la technique choisie doit être précise et flexible, et son coût par détermination ne doit pas être excessif. Une évaluation serrée des diverses méthodes possibles nous a fait opter pour une méthode immunologique de type ELISA dans le cas des déterminations de routine. La validité de cette méthode sera régulièrement évaluée par une méthode analytique plus lente et plus onéreuse qui fait appel à un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG-SM). Il faut toutefois noter que cet appareil n'est arrivé que depuis peu de temps à l'UQAC. Sa mise en opération vient tout juste de se terminer. Notre travail a donc porté jusqu'ici sur l'adaptation des méthodes immunologiques pour l'AIA et l'ANA, sur l'accomplissement pour l'AIA des premières étapes reliées à ces méthodes, et sur la définition d'un protocole de dosage de ces mêmes substances avec un CG-SM.

Le rapport de mai 1986 (Lord *et al.* 1986) a fourni l'ensemble du cheminement bibliographique qui nous a conduit à choisir l'ELISA comme méthode de détection. Ce rapport montrait aussi la théorie sous-jacente à cette technique, particulièrement pour son utilisation dans la détection et la quantification de l'AIA. Les travaux effectués depuis ce temps ont trait aux 3 éléments suivants: 1) L'extraction de l'AIA des bourgeons et la purification de ces extraits, 2) la production du matériel essentiel aux tests ELISA, et 3) le test de validation d'ELISA avec le CG-SM.

4.1.1 Extraction et purification.

La difficulté majeure que nous avons identifiées pour l'utilisation d'une méthode de détection et/ou de quantification d'une substance de croissance donnée réside dans l'établissement d'une méthode adéquate d'extraction des substances de croissance à partir de si petites quantités de matériel végétal (Cohen *et al.* 1986). Les travaux réalisés par Weiler (1981), Bandurski et Schulze (1974, 1977), Pengelly et Meins (1977) et Pengelly *et al.* (1981, 1982) décrivaient des protocoles d'extraction et de purification par solubilité pour de grandes quantités de tissus. Ils ont servi à l'élaboration d'un protocole d'extraction de l'AIA à partir de petites quantités de tissu. Cette adaptation des protocoles

a nécessité en premier lieu une étude de faisabilité dont l'objectif était d'évaluer la possibilité d'adapter les techniques décrites. Ceci a conduit à des manipulations expérimentales quant à la réalisation de micro-extractions liquide-liquide et l'ajustement de pH d'infimes quantités d'extraits. Les premiers essais de quantification d'AIA à partir de ces extraits de bourgeons seront réalisés lorsque le test ELISA pour l'AIA sera au point.

Des protocoles de purification par chromatographie (HPLC et/ou colonnes d'immunoaffinité) minimisant les erreurs dues aux nombreuses manipulations seront élaborés afin de vérifier si l'on peut réduire au plus strict minimum les interférences potentielles de produits non-désirés avec les anticorps poly- ou mono-clonaux anti-AIA.

L'extraction de l'ANA des bourgeons, comme celle d'ABA et de BAP plus tard, fera appel aux mêmes principes de base en regard de leur extraction, sauf que les adaptations des protocoles pour ces substances restent à faire.

4.1.2 La production du matériel essentiel aux tests ELISA.

Les quatre (4) lapins immunisés à l'UQAC en septembre 1987 avec le conjugué AIA-BSA ont produit des sérums permettant des tests ELISA anti-AIA. Les dilutions optimales de sérum vont de 1:1000 à 1:4000. Les premiers essais pour établir une courbe standard sont concluants en partie, certains ajustements restant à faire afin d'avoir une très grande confiance dans nos courbes standards. Les tests de réactions croisées seront faits lorsque nos courbes standards seront fiables.

Une modification au protocole de liaison de l'AIA avec la BSA (Lord *et al.* 1986) a permis de rendre l'ANA immunogène. 21 lapins furent donc immunisés au début de l'automne 1986 à l'UQAM selon trois protocoles différents: a) l'un de 6 mois sans rappel (début septembre 1986), b) l'un de 4 mois avec rappel à toutes les 2 semaines (début septembre 1986), et c) l'autre de 8 semaines avec rappel à toutes les semaines (début octobre 1986, saignés: mi-décembre 1986). Les trois (3) protocoles permettent une production d'anti- conjugué ANA-BSA. Indépendamment de la méthode, les quantités d'anticorps produites sont généralement semblables (tout dépendant du lapin). La méthode c) est donc la plus avantageuse parce que plus courte.

La méthode ELISA de compétition choisie requiert la présence d'ANA lié à de la phosphatase alcaline, celle-ci agissant comme révélateur. Les premiers essais de synthèse de conjugués ANA-phosphatase alcaline détectables par nos sérums n'ont pas donné les résultats escomptés. Nous explorerons deux voies afin de résoudre ce problème: a) établir une nouvelle stratégie de synthèse de ce conjugué ou bien b) modifier le type d'ELISA, évitant ainsi une telle synthèse.

En plus de ces travaux d'obtention d'anticorps polyclonaux, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux anti-AIA (Idetek inc.) qui nous permettent de faire des tests plus spécifiques. Nous avons modifié le protocole de Idetek inc. ce qui nous permet d'avoir des plaques ELISA aussi optimales que la compagnie mais plus économiques. Certaines contraintes de disponibilité de matériel chez les fournisseurs font que les premières quantifications d'AIA dans des bourgeons d'épinette noire seront faites vers le mois de juin.

4.1.3 Le test de validation d'ELISA avec le CG-SM.

Rappelons que ce test servira de valideur aux résultats obtenus par les méthodes immunologiques. Le protocole complet d'utilisation reste à faire. Il devrait être grandement basé sur celui de Pengelly *et al.* (1981) et Pilet et Saugy (1987).

Nous savons déjà qu'il nous faudra synthétiser des marqueurs radioactifs (AIA-d₅ et ANA-d₇) afin d'évaluer les pertes durant les manipulations. Ces synthèses devraient prendre au moins un mois complet de procédures. La validation des premiers tests immunologiques de quantification de l'AIA ne devrait donc pas être réalisée avant la fin du mois d'octobre 1987.

4.2 Objectif 3.2

L'expérimentation décrite pour l'objectif 3.2 dans le rapport d'étape de mai 1986 (Lord *et al.* 1986) a quelque peu changé depuis ce temps. Il ne s'agit pas de bouleversements majeurs, mais plutôt d'une concentration de nos efforts sur des points bien précis qui apparaissaient moins évidents auparavant. Diverses raisons expliquent ces décisions: a) certaines discussions avec notre responsable technique et M. Gilles Vallée du MER, b) les résultats mitigés de notre première série de mises en culture et leur analyse, et c) le congrès BIOFOR qui a eu lieu à Victoria, B.C., en novembre 1986.

Le changement le plus important vient de la décision de travailler avec du matériel végétal amélioré en plus de notre travail avec le matériel habituel. De plus, le lieu d'origine de ce dernier n'est plus unique, ce qui nous rendra moins dépendant des conditions du matériel retrouvé à un endroit donné au Québec; tel était le cas lors de l'année de culture 1986. Les prélèvements de l'automne 1986 en vue de la saison de culture 1987 ont eu lieu à Duchesnay et à Normandin. Au premier endroit, des arbres de 17 ans faisant partie d'un test de provenance, ainsi que des arbres de 2 ans (2-0) provenant de parcelles cultivées pour la production de plants en racines nues ont été récoltés. A Normandin, les prélèvements ont eu lieu sur des arbres d'environ 10 ans faisant partie d'un peuplement sélectionné qui devait servir à l'établissement de vergers à graines, ainsi que sur des plants de 3 ans (1.5-1.5) venant aussi de parcelles cultivées pour la production de plants en racines nues. L'abondance du matériel obtenu et la légère réorientation décidée en vue d'atteindre plus rapidement notre objectif général (tout en comprenant mieux les facteurs en cause) ont fait que certaines expériences se sont ajoutées à celles prévues dans le rapport d'étape de mai 1986, alors que d'autres ont été modifiées ou éliminées à la suggestion des diverses personnes rencontrées et des lectures et discussions que nous avons effectuées. Voyons donc la situation actuelle en ce qui concerne la partie culture de tissus proprement dites.

4.2.1 Résultats de l'année 1986.

Au cours des années 83 et 84, une méthode a été mise au point pour la culture *in vitro* de l'épinette noire (Brissette 1985). La méthode permettait d'obtenir l'induction de bourgeons adventifs sur environ 75% des bourgeons (tiges embryonnaires) mis en culture. Le nombre de bourgeons adventifs sur les tiges embryonnaires induites variait de 1 à 3, de telle sorte qu'une tige adventive était obtenue pour chaque tige embryonnaire mise en culture. L'enracinement était habituellement d'environ 20% sauf dans une expérience où la réduction de la période de contact avec la cytokinine avait permis d'obtenir l'enracinement

de 50% des tiges. L'enracinement de certaines tiges s'était même produit spontanément sur le milieu sans hormones, sans qu'il n'y aie eu de traitement d'enracinement préalable.

Les expériences de 1985-1986 ont été établies en se basant sur ces données. Pour diverses raisons, certaines modifications ont cependant été apportées à la méthode déjà établie:

1. la période d'induction a été réduite de 8 à 4 semaines, car c'est dans une expérience utilisant cette période qu'un taux d'enracinement élevé avait été observé. Ce choix se justifiait par le fait que nous étions particulièrement intéressé par cet aspect au début de nos expériences à Chicoutimi;
2. les bourgeons destinés à la mise en culture ont été prélevés environ aux mêmes dates à Normandin plutôt qu'à Duchesnay, sur des arbres de 3 ans plutôt que 5 ans;
3. la concentration d'agar du milieu utilisé pour l'induction des bourgeons adventifs avait été augmentée de .5% à .7%, car les bourgeons s'enfoncent dans le milieu à .5%;
4. le pH des milieux de culture a été mesuré avant l'addition d'agar et de sucrose, car nous ne disposions pas d'une électrode pouvant être immergée dans un milieu gélosé chaud;
5. les conditions environnementales, particulièrement la température ambiante, pouvaient différer légèrement entre l'endroit où la méthode a été mise au point (Université Laval) et nos locaux à l'UQAC.

Les résultats obtenus en 1985-1986 avec les arbres prélevés à la pépinière de Normandin sont très différents de ceux obtenus durant les trois années précédentes avec les arbres prélevés à la pépinière de Duchesnay. Nonobstant les modifications décrites ci-haut, la même technique de culture développée par Culture In Vitro Inc. pour les arbres de Duchesnay en 1984 et 1985 (Brissette 1985) a été appliquée aux bourgeons des arbres de Normandin: induction durant 4 semaines sur milieu de Campbell et Durzan (CD) additionné de BAP 10^{-6} M et d'ANA 10^{-7} M suivie d'ANA 10^{-7} M seul pour les 4 semaines suivantes. Si cette combinaison procurait en moyenne, après une année de culture, 1 plant enraciné pour chaque 2 bourgeons prélevés à Duchesnay (Brissette 1985), le même traitement appliqué aux plants de Normandin n'a pas permis l'obtention d'un seul plant enraciné. En fait, l'induction des bourgeons adventifs était même plutôt rare. Ces résultats expliquent le terme "reproductibilité laissant à désirer" que nous avons employé à la fin de la section 2.

Le taux d'induction de bourgeons adventifs a été satisfaisant dans une seule expérience. Celle-ci a été effectuée pour évaluer l'influence de la position des bourgeons ou tiges embryonnaires sur la production de bourgeons adventifs (tableau 1). Tous les bourgeons d'un arbre ont été mis en culture sur le même milieu en notant leur position sur l'arbre. La durée d'induction était de 5.5 semaines. Cette expérience réalisée fin avril-début mai avec des arbres prélevés à Normandin n'a pas donné des résultats suffisants pour conclure sur l'effet de la position; un seul génotype a produit des bourgeons adventifs en quantité appréciable (tableau 1). La combinaison BAP 10^{-5} M et ANA 10^{-7} M semble préférable, bien qu'un grand nombre de cals sont induits en plus des bourgeons adventifs, ceux-ci brunissant très souvent sans démontrer l'élongation suffisante pour les séparer de leurs tiges embryonnaires. Au sujet de la position des bourgeons, il ne semble pas y avoir

TABLEAU 1: Résumé des résultats obtenus dans l'expérience sur la position des bourgeons.

Milieu	Nb de tiges embryonnaires en culture	Nb de génotypes	Nb de tiges embryonnaires induites	Nb de bourgeons adventifs	Nb de méristème induit
BAP 10^{-6} ANA 10^{-7} M	96	2	2	-	2
BAP 10^{-6} ANA 10^{-8} M	73	2	4	-	4
BAP 10^{-5} ANA 10^{-7} M	48	1	31	127	0

de différences entre les bourgeons terminaux et latéraux, ni entre les bourgeons des parties supérieures et inférieures de l'arbre.

Certaines tiges embryonnaires mises en culture ne se sont pas développées (figure 1) mais sont demeurées vertes, tandis d'autres se sont desséchées et sont mortes (figure 2). L'élongation des primordiums n'a été observée qu'en de rares occasions (figure 3). Ce phénomène est généralement le signe d'une induction insuffisante, causée soit par une concentration hormonale trop faible, soit par une période d'induction trop courte. Plusieurs tiges embryonnaires sont demeurées très gonflées, surtout à l'apex, tandis que les primordiums demeuraient petits (figure 4). Les zones très gonflées avaient une apparence vitreuse, c'est à dire qu'elles étaient pâles avec de grosses cellules brillantes et d'apparence aqueuse. Dans d'autres cas ce sont les primordiums induits (p.i.) qui devenaient trop gonflés (figure 5), de telle sorte que les bourgeons adventifs se trouvaient éloignés de la tige embryonnaire et ne pouvaient poursuivre leur développement de façon normale. Dans certains cas les bourgeons étaient induits sur la face interne (f.i.) des primordiums et dans d'autres cas sur leur face externe (f.e.) (figure 6), alors que la position idéale est située au sommet des primordiums. Un début de développement du méristème apical a été observé à maintes reprises (figure 7). L'induction de bourgeons adventifs (B.) et le développement du méristème apical peuvent survenir sur la même tige embryonnaire (figure 8). L'élongation des aiguilles (a.) du méristème apical s'est produite en de rares occasions.

Suite à l'obtention de ces résultats, diverses hypothèses ont été émises pour les expliquer, la planification des expériences 86-87 ayant été réalisée en conséquence. Les hypothèses étaient les suivantes:

1. De mauvaises manipulations.
2. Le génotype (provenance Normandin vs provenance Duchenay)
3. L'état physiologique des plants-mères.
4. Période de mise en culture non idéale.
5. La diminution de la période d'induction de 8 à 4 semaines.

Le premier élément peut être éliminé dès le départ comme cause potentielle, car toutes les vérifications d'usage ont été faites. Il est vrai que la fin de l'année 1985 et l'année 1986 ont permis l'implantation du premier laboratoire de recherche dédié à la mise en culture de matériel vivant à l'UQAC, avec tout ce que cela signifie du point de vue délais dans l'obtention et la préparation de locaux adéquats, la commande et l'obtention de

l'appareillage et du matériel requis, l'entraînement du personnel, etc. Cependant, aucun patron de problèmes n'a pu être décelé jusqu'ici. Par exemple, il n'y a pas de lots de milieux de culture qui ont systématiquement fait mourir tous les bourgeons qui y ont été placés. Il n'y a pas non plus de journées de mise en culture qui peuvent être identifiées comme ayant donné des résultats réellement plus mauvais que d'autres.

L'effet génotypique semble ressortir des expériences réalisées de janvier 1986 à octobre 1986, même s'il ne s'agissait que de différences entre des individus d'une même provenance (unité de gestion de Roberval, canton Charlevoix, no 82 034 A). Par exemple, une expérience a été réalisée en vue de vérifier l'importance de la concentration de l'ANA dans le milieu d'induction. Cinquante-six génotypes différents ont été utilisés afin de minimiser le plus possible l'influence de cette variable (tableau 2). Douze bourgeons de chaque génotype ont été prélevés, dont 4 terminaux et 8 latéraux, pour un total de 672 bourgeons mis en culture. Seuls les bourgeons de 24 génotypes sont demeurés vivants, à différents pourcentages selon les milieux.

Les bourgeons d'épinette noire provenant de plants récoltés au Lac St-Jean n'ayant pas produit autant de bourgeons adventifs que ceux provenant de la région de Québec, il est apparu important d'étudier plus précisément cet effet génotypique. Une telle variation génotypique a déjà été observée en cultures de tissus de conifères, les embryons de *Pinus contorta* de diverses régions de la Colombie-Britannique ne produisant pas tous des bourgeons adventifs aux mêmes fréquences (Von Arnold et Ericksson 1981). Différents génotypes provenant des divers endroits de récolte de l'automne 1986 (voir précédemment) ont été mis en culture depuis décembre 1986 sur 4 milieux différents: le milieu basal de Campbell et Durzan avec concentration hormonale variable (BAP 10^{-5} et 10^{-6} M ainsi que ANA 10^{-7} et 10^{-8} M). Le nombre des milieux n'a pas besoin d'être très élevé, puisque

TABLEAU 2: Résumé des résultats obtenus dans l'expérience sur l'addition d'auxines et d'anti-auxines.

Milieu	Nb de tiges en culture	Nb de génotypes	Nb de tiges demeurées vivantes		Nb de bourgeons
			rép. 1	rép. 2	
BAP 10^{-6} M	96	8	0	2	-
BAP 10^{-6} ANA 10^{-8} M	96	8	6	2	-
BAP 10^{-6} ANA 5×10^{-8} M	96	8	22	13	1
BAP 10^{-6} ANA 10^{-7} M	96	8	4	12	2
BAP 10^{-6} TIBA 10^{-8} M	96	8	11	13	-
BAP 10^{-6} TIBA 10^{-7} M	96	8	2	22	-
BAP 10^{-6} TIBA 10^{-6} M	96	8	1	0	-

Note: 1- Pour chaque génotype, 4 bourgeons terminaux et 8 latéraux ont été prélevés et mis en culture.

2- Les bourgeons ont été répartis également après 4 semaines sur 4 milieux différents:

1) Sans hormones, 2) ANA 10^{-8} M, 3) ANA 5×10^{-8} M, et 4) ANA 10^{-7} M.

l'effet génotypique n'est que peu masqué par l'effet des milieux (Glock et Gregorius 1986). Les bourgeons ont subi une période d'induction de 4, 6, 7 et 8 semaines puisque la durée optimale varie selon la date de récolte et la période de mise en culture. Nous discuterons des premiers résultats de cette expérience à la section 4.2.2.

Le troisième élément est plus difficile à analyser, car il n'existe pas encore de paramètres précis pouvant indiquer que l'automne 1985 ait pu être une mauvaise année de récolte pour des bourgeons à mettre en culture. De même, il est difficile de juger de l'état du plant-mère lors de la récolte. Les meilleurs sujets au point de vue longueur et structure de plants sont prélevés, mais ce choix demeure des plus subjectifs. Certaines observations effectuées lors de la période de mise en culture 1987 semblent toutefois indiquer que les plants provenant des différentes régions ne sont pas toujours au même état lors de la période de prélèvement sur le terrain. Par exemple, les bourgeons des plants de 2 ans prélevés le 10/11/86 à Duchesnay étaient beaucoup plus turgescents que ceux des plants de 3 ans prélevés deux jours plus tard à Normandin. Pourtant, dans les deux cas il s'agissait de plants cultivés en racines nues dans une pépinière du MER. D'où viennent ces différences? De régies différentes de culture (fertilisation, irrigation, etc.) ou d'un climat différent, donc d'un état physiologique différent lors de la période de prélèvement? Ces questions restent sans réponses pour l'instant. Cependant, pour nous, la vraie question devient la suivante: quelle est l'incidence de ces différences sur le développement ultérieur des bourgeons cultivés dans les mêmes milieux et conservés sous les mêmes conditions? Cette réponse pourrait être obtenue en bonne partie lors de l'analyse des résultats de la saison de culture 1987.

D'autre part, certains traitements infligés aux plants-mères peuvent influencer les résultats en culture de tissus. Par exemple, la taille et le bouturage répété ont un effet rajeunissant sur les plants-mères et leurs explants ont une plus grande aptitude à la morphogénèse (Franclét 1983). Le Dr. Gilles Vallée du MER nous a procuré une dizaine de génotypes rajeunis par la technique de bouturage. L'aptitude à la micropropagation pourra être comparée entre les plants-mères de Duchesnay âgés de 17 ans et les plants rajeunis.

Le quatrième élément concerne la période de mise en culture. Celle-ci s'était déroulée de février à avril en 1986. Les expériences de 1987 ont été échelonnées de novembre à avril dans le but de déterminer le meilleur moment pour la mise en culture. D'après Selby et Harvey (1985), la production de bourgeons adventifs est à son maximum après une période d'entreposage au froid de 5 mois environ. Nous étudierons donc en profondeur l'effet de l'entreposage des bourgeons à 5 °C avant la mise en culture. Une hypothèse a été émise au fait que cette stimulation serait principalement due à une variation dans les niveaux d'auxine, d'ABA et d'une autre substance de croissance (Quoirin et al. 1974). Une expérience sera réalisée avec diverses concentrations d'ABA en plus de la BAP (cytokinine) et de l'ANA (auxine). L'intérêt d'étudier l'ABA tient également du fait que cette substance de croissance joue un rôle important dans tout ce qui a trait à la dormance, et du fait que Smeltzer et Cello (1982) ont noté une stimulation de la formation de bourgeons adventifs avec de très faibles concentrations d'ABA (0,03 à 0,3 mg/l). Fouret *et al.* (1986) ont aussi noté une relation entre l'ABA et la rhizogénèse de matériel cultivé *in vitro*.

Contrairement à ce qui avait été présenté en mai 1986, nous n'avons pas étudié systématiquement l'effet de la date de récolte en même temps que l'effet de l'entreposage au froid. Il nous apparaît prématuré d'étudier l'effet de la date de récolte à ce stade-ci de nos investigations.

En ce qui concerne la durée de la période d'induction, 3 durées seront étudiées: 4, 6 et 8 semaines. Ceci devrait permettre de répondre partiellement à la cinquième hypothèse.

4.2.2 Premiers résultats de 1987.

Depuis décembre 1986, plus de 3 000 bourgeons ont été mis en culture dans le but de vérifier plus en profondeur les cinq hypothèses émises précédemment, et plus particulièrement les hypothèses 2, 4 et 5. Plusieurs génotypes de chacune des provenances ont été mis en culture. Dans certains cas les tiges embryonnaires ont été mises en culture avec la couronne, mais dans la majorité des cas, la couronne n'était pas prélevée.

Nous avons effectivement observé des différences génotypiques d'un individu à l'autre après les trois premiers mois d'expérimentation de la saison 1986-1987, mais il ne semble pas y avoir de différence dans l'aptitude à l'induction de bourgeons adventifs entre les épinettes de Duchesnay et celles de Normandin. Il reste donc à déterminer pourquoi est-ce que les épinettes de Normandin produisent plus de bourgeons adventifs cette année que l'année dernière. Les observations du mois de février 1987 des bourgeons induits a permis d'émettre une sixième hypothèse pour expliquer notre insuccès de 1986. Celui-ci semblait en effet vouloir se répéter en 1987 car, malgré le fait que les bourgeons adventifs induits étaient plus nombreux, ils avaient presque tous un développement similaire à ceux de l'an dernier. Ils étaient très petits, sur des primordiums trop gonflés, et leur développement s'effectuait au ralenti. Une vérification du protocole expérimental et l'étude de la littérature a fait ressortir cette sixième hypothèse, laquelle dit que **l'augmentation de la dureté de l'agar** pourrait être en bonne partie responsable des résultats mitigés obtenus cette année et l'an dernier.

L'enfoncement des bourgeons dans l'agar des milieux à .5% de concentration nous avait amené à augmenter la concentration à .7% et ce, dès les premières mises en culture de la saison 1986. Comme la concentration .5% d'agar n'était utilisée que pour l'induction (12 semaines), le repiquage des tiges isolées se faisant sur un milieu solidifié par .7% d'agar, nous ne croyions pas que cette modification pouvait influencer nos résultats de façon significative. D'ailleurs, la majorité des auteurs solidifie les milieux de culture avec .7 ou .8% d'agar (Aitken *et al.* 1981; Boulay et Francllet 1977; Chrétien et Vieth 1983; Coleman and Thorpe 1977; Campbell and Durzan 1976; David *et al.* 1982; Flinn *et al.* 1986). Cependant, Bornman (1985) a trouvé qu'il y aurait une corrélation inverse entre l'absorption de la BAP et la dureté de l'agar, alors que Von Arnold et Erikson (1984) ont trouvé que le taux de croissance diminue rapidement lorsque la concentration d'agar augmente.

L'hypothèse d'une concentration en agar trop élevée lors de la période d'induction nous apparaissant plausible, elle a été diminuée à .5%. Tous les bourgeons déjà en culture ont été repiqués. La durée du séjour des bourgeons sur l'agar dur (.7%) variait de 4 à 12 semaines. Suite à cette opération, les aiguilles de plusieurs bourgeons adventifs induits se sont mis à allonger. De nouvelles mises en culture utilisant des bourgeons provenant à la fois d'arbres jeunes et âgés ont aussi été effectuées sur des milieux à .4%, .5% et .6% d'agar afin de déterminer la concentration la plus favorable. Les expériences ont été réalisées dans deux types de contenants (tubes ou pétris). La durée de la période d'induction varie entre 4 et 8 semaines. Il avait été impossible de vérifier cette cinquième hypothèse plus tôt, car le développement ralenti des bourgeons sur le milieu à .7% d'agar ne nous permettait pas d'arrêter l'induction après 4 semaines.

Les résultats préliminaires de ces derniers travaux indiquent que la concentration d'agar joue un rôle important dans l'induction de bourgeons adventifs chez l'épinette noire. La poursuite des expériences permettra de mieux cerner l'importance de ce facteur. Les bourgeons adventifs induits sont actuellement dans une phase d'élongation sur le milieu à .5% d'agar., certains étant même prêts à être isolés de l'explantat original. Cette étape n'avait pas pu être réalisée sur le milieu d'agar .7%, donc en 1986.

D'autre part, les bourgeons adventifs dont il est fait mention proviennent de tiges embryonnaires prélevées sur des arbres jeunes (1 à 3 ans). Un taux de mortalité élevé a été observé chez les bourgeons prélevés sur des arbres âgés (10 et 15 ans). Cependant, la mise en culture d'**aiguilles** prélevées lors du débourrement sur des bourgeons de boutures d'arbres de 15 ans a permis d'obtenir des bourgeons adventifs. Il est encore trop tôt pour prédire s'ils pourront s'allonger et devenir des tigelles et éventuellement des plantules. Cette expérience nous permettra de vérifier plus à fond la quatrième hypothèse.

5. PROGRAMMATION DES ACTIVITES A PLUS LONG TERME.

5.1 Atteinte des objectifs spécifiques.

Objectif 3.1: avril 1988 pour AIA;
septembre 1988 pour ANA;
septembre 1989 pour ABA.

Objectif 3.2: mai 1987 pour les expériences de la saison de culture 1986;
mai 1988 pour les expériences de la saison de culture 1987.

Plusieurs aspects peuvent être étudiés à l'intérieur de cet objectif. Le choix de ces aspects dépend d'un certain nombre d'éléments, dont le résultat des expériences précédentes. Il est donc plus difficile de planifier à long terme pour cet objectif. Le lien de plus en plus intime qui se créera entre les aspects reliés spécifiquement à l'un ou l'autre de ces deux objectifs, lien qui a conduit à la définition de l'objectif 3.3, aidera aussi à choisir les aspects à étudier dans le cadre de l'objectif 3.2.

Objectif 3.3: avril 1990.

5.2 A plus long terme.

- Détection et quantification précise pour d'autres substances de croissance naturelles et synthétiques ayant un intérêt en vitroculture de conifères.
- Localisation des sites tissulaires, sinon cellulaires, de fixation des substances de croissance introduites dans les milieux de culture, vraisemblablement par un mélange de techniques d'immunocytochimie, d'autoradiographie et de microscopie électronique.
- Interactions entre les substances de croissance endogènes et celles ajoutées au milieu de culture.
- Etudes d'autres espèces de conifères.

6. BIBLIOGRAPHIE.

- Aitken, J., K.J. Horgan et T.A. Thorpe. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.*, 11: 112-117.
- Bandurski, R.S. et A. Schulze. 1974. Concentration of indole-3-acetic acid and its esters in *Avena* and *Zea*. *Plant physiol.*, 54: 257-262.
- Bandurski, R.S. et A. Schulze. 1977. Concentrations of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant physiol.*, 60: 211-213.
- Bornman, C.H. 1985. Hormonal control of growth and differentiation in conifer tissue *in vitro*. *Biol. Plant.*, 27: 249-256.
- Boulay, M. et A. Franclet. 1977. Recherches sur la propagation végétative de Douglas: *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Possibilités d'obtention de plants viables à partir de la culture *in vitro* de bourgeons de pieds-mères juvéniles. *C. R. Acad. Sc. Paris, série D*: 1405-1407.
- Brissette, L. 1985. Etude sur la production d'épinette de norvège (*Picea abies* (L.) Karst) et d'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B&S.P.) par culture *in vitro*. Rapport au MER, Service de la régénération forestière, 30 p.
- Campbell, R.A. et D.J. Durzan. 1976. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. *Can. J. For. Res.*, 6: 240-243.
- Chrétien, L. et J. Vieth. 1983. Étude histologique de cals de *Picea pungens* Engelmann issus de culture *in vitro*. *Rev. Can. Biol. Exptl.*, 49: 39-43.
- Cohen, J.D., K. Bialek, J.G. Buta, A.N. Reed et J.P. Slovin. 1986. Comparison of a commercial Elisa assay for indole-3-acetic acid with quantitative GC/MS analysis (Abstract). *Plant physiol.*, 80: 33.
- Coleman, W.K. et T.A. Thorpe. 1977. *In vitro* culture of Western redcedar (*Thuja plicata* Donn.). 1. Plantlet formation. *Bot. Gaz.*, 138: 298-304.
- David, A., H. David et T. Mateille. 1982. *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles. *Physiol. Plant.*, 56: 102-107.
- Flinn, B.S., D.T. Webb, W. Georgis. 1986. *In vitro* control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Can. J. Bot.*, 64: 1948-1956.
- Fouret, Y., Y. Arnaud, R. Maldiney, B. Sotta et E. Miginiac. 1986. Relation entre la rhizogénèse et la teneur en auxine et acide abscissique chez trois clones de *Sequoia sempervirens* Endl. issus d'arbres d'âge différent. *C. R. Acad. Sci. Paris, t. 303, Série III, no 4*: 135-138.
- Franclet, A. 1983. Rejuvenation: theory and practical experiences in clonal silviculture. P. 96-134 *In Proc. 19th meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part 2: Clonal Forestry: its impact on tree improvement and our future forest.* L. Zsuffa, R.M. Rauter et C.W. Yeatman (eds.). Toronto.
- Glock, H. et H.R. Gregorius. 1986. Genotype-environment interaction in tissue cultures of birch. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 477-482.
- Hasnains, S. et W. Cheliak. 1986. Tissue culture in forestry: economic and genetic potential. *For. Chron.*, 62: 219-225.
- Lord, D., L. Brissette et M. Caron. 1986. Culture *in vitro* d'essences forestières. Rapport d'étape au MER, Service de la régénération forestière, 75 p.
- Pengelly, W.L., R. S. Bandurski et A. Schulze. 1981. Validation of a radioimmunoassay for indole-3-acetic acid using gas chromatography-selected ion monitoring-mass spectrometry. *Plant physiol.*, 68: 96-98.
- Pengelly, W. L., P. Hall, A. Schulze et R. S. Bandurski. 1982. Distribution of free and ester indole-3-acetic acid in the cortex and stele of *Zea mays* mesocotyl. *Plant physiol.*, 69: 1304-1307.

- Pengelly, W.L. et F. Meins. 1977. A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta*, 136: 173-180.
- Pilet, P.E. et M. Saugy. 1987. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. *Plant Physiol.*, 83: 33-38.
- Quoirin, M., T. Gaspar et P. Boxus. 1974. Substances de croissance endogènes liées à la reprise des méristèmes de *Prunus accolade* en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sc. Paris, série D*, 281: 1309-1311.
- Selby, C. et B.M.R. Harvey. 1985. The influence of natural and *in vitro* bud flushing on adventitious bud production in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud and needle cultures. *New Phytol.*, 100: 549-562.
- Smeltzer, R.H. et L.M. Cello. 1982. Tissue culture method for asexual propagation of Pine trees and medium for use therewith. United States patent, 4 354 327.
- Von Arnold, S. et T. Eriksson. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, 59: 870-874.
- Von Arnold, S. et T. Eriksson. 1984. effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 3: 257-264.
- Weiler, E.W. 1981. Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable [125 I]- and [3H] derivatives as radiotracers. *Planta*, 153: 319-325.

7. PUBLICATIONS.

- Lord, D. 1986. Une forêt à bâtir. Document présenté dans le cadre d'une rencontre avec les média de la région du Saguenay-Lac St-Jean, 1er mai. 13 p.
- Brissette, L. et D. Lord. 1986. La vitroculture de l'épinette noire. Conférence présentée au colloque "L'amélioration génétique des forêts", 54e conférence de l'ACFAS, Univ. de Montréal, 12 mai (sous presse).
- Lord, D. et L. Brissette. 1986. Compte-rendus du congrès BIOFOR tenu à Victoria, B.C., du 18 au 20 novembre 1986. Rapport interne UQAC, Décanat des études avancées et de la recherche. 2 décembre
- Lord, D. 1986. Micropropagation *in vitro* et production en récipients de l'épinette noire. Conférences du Centre de Recherche en Biologie Forestière, à être donnée le 16 décembre.

LISTE DES FIGURES:

Figure 1: Tige embryonnaire non développée.

Figure 2: Tige embryonnaire dont l'apex est séché.

Figure 3: Tige embryonnaire dont les primordiums ont allongé.

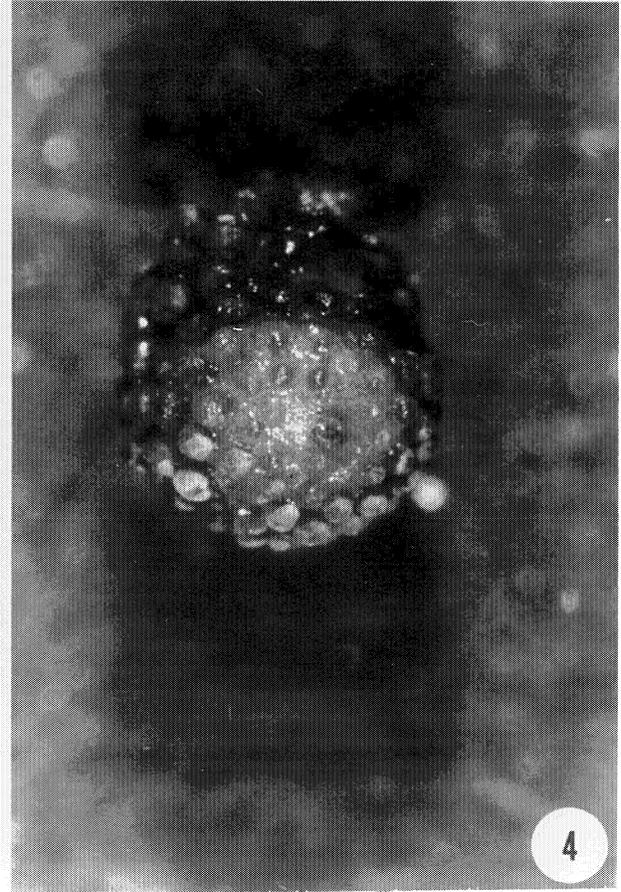
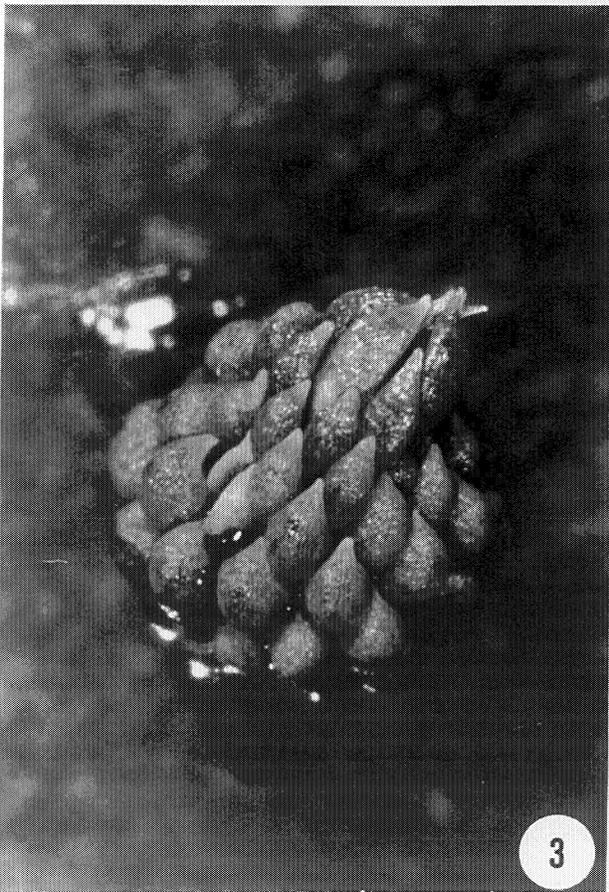
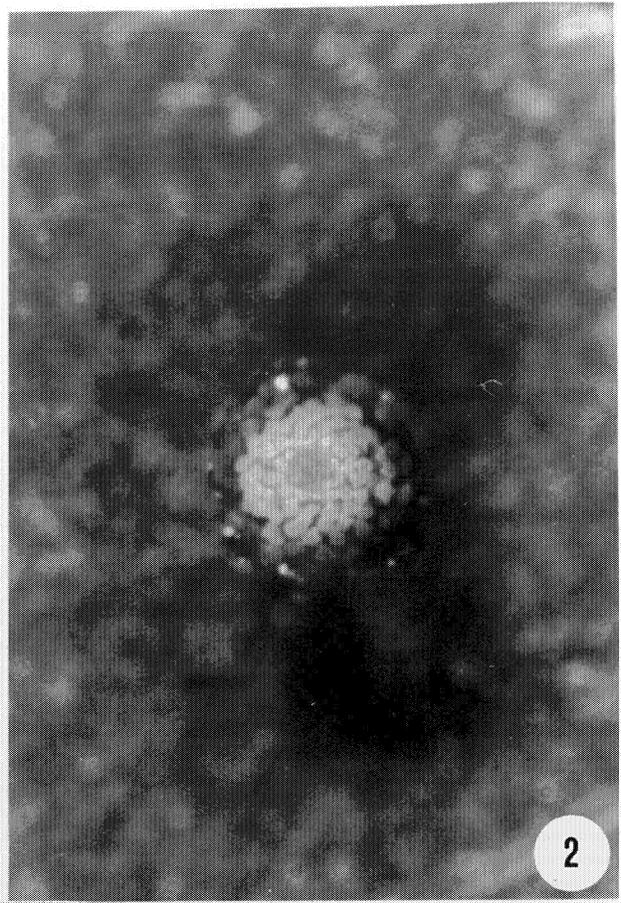
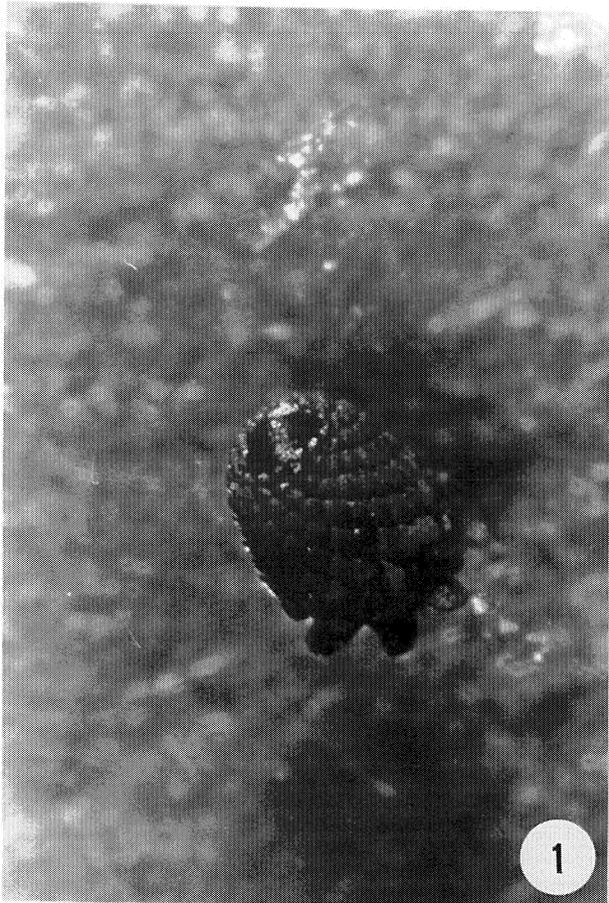
Figure 4: Tige embryonnaire dont l'apex est très gonflé.

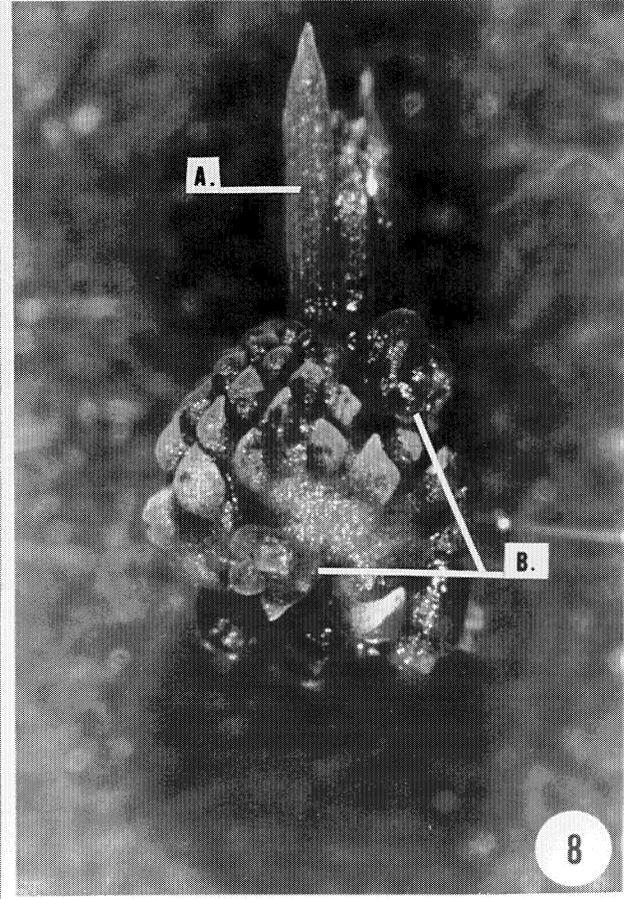
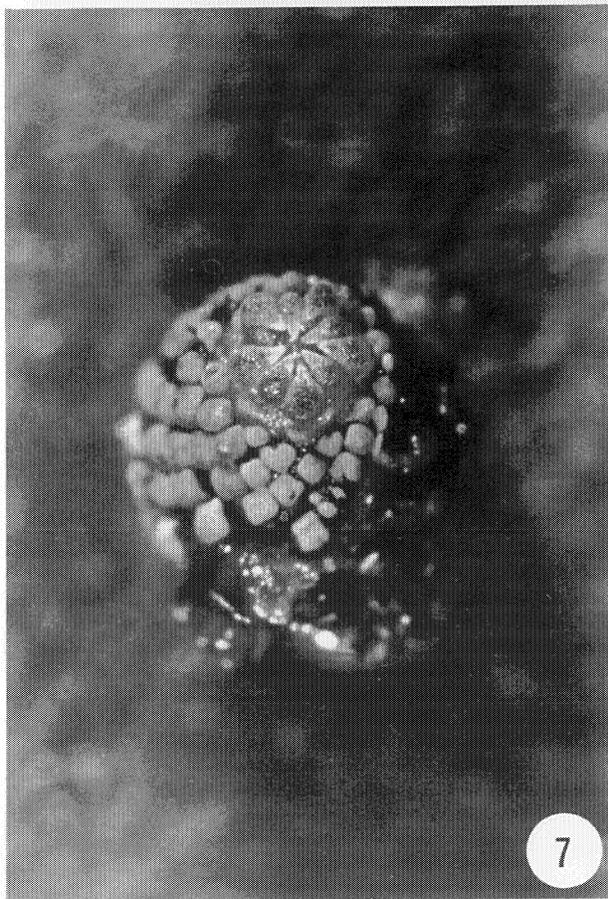
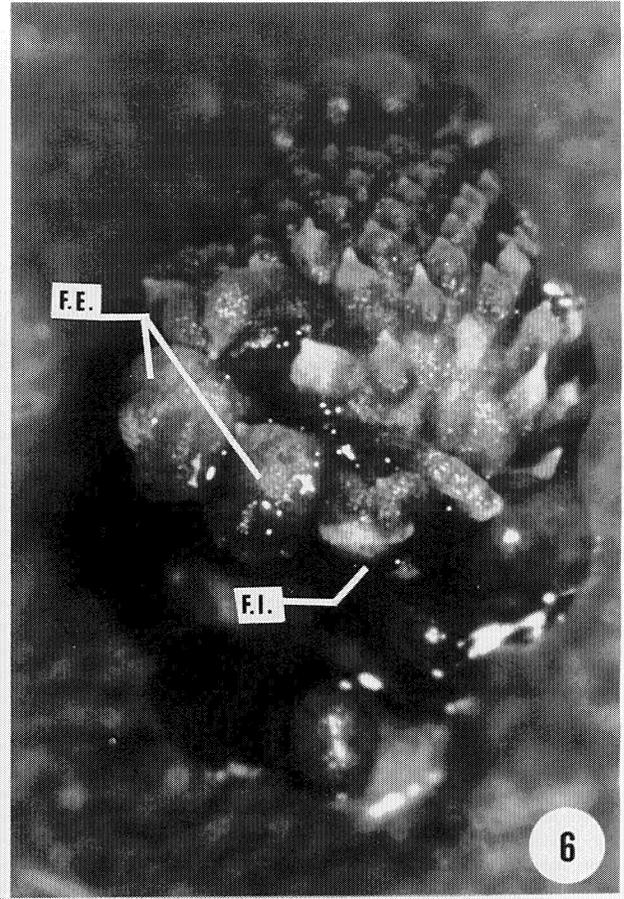
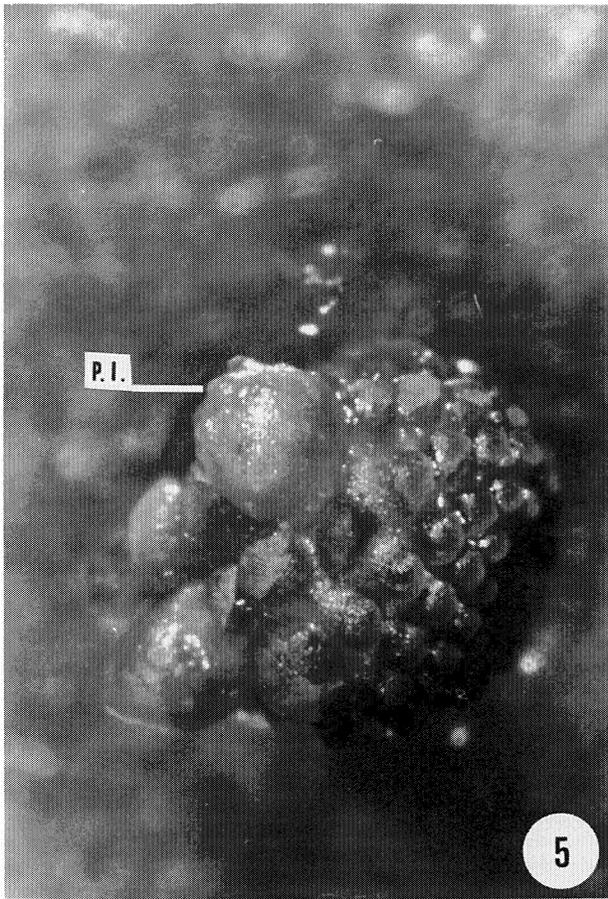
Figure 5: Primordiums induits (P.I.) très gonflés après 16 semaines de culture.

Figure 6: Bourgeons adventifs sur la face interne (F.I.) et la face externe (F.E.) des primordiums.

Figure 7: Développement du méristème apical.

Figure 8: Élongation des aiguilles (A.) du méristème apical et bourgeons adventifs (B.)





ANNEXE 1

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES ENTREPRISES LORS DE LA SAISON DE CULTURE 1987

1. Période de mises en culture (prétraitement au froid)
 - génotypes: Duchesnay jeunes et Normandin jeunes.
 - milieux: BAP $10^{-6}M$ et ANA $10^{-7}M$.
 - concentration d'agar: 0.7%.
 - nombre de bourgeons: avec couronne: 280.

2. Concentrations hormonales (BAP, ANA, ABA)
 - génotypes: Duchesnay jeunes et âgés et Normandin jeunes et âgés.
 - milieux: 12 milieux avec diverses concentrations de ces 3 hormones.
 - concentration d'agar: 0.7%.
 - nombre de bourgeons: avec couronne: 1021.
sans couronne: 319.

3. Arbres âgés:
 - génotypes: Duchesnay et Normandin.
 - milieux: BAP $10^{-6}M$ et ANA $10^{-7}M$.
 - concentration d'agar: 0.7%.
 - nombre de bourgeons: avec couronne: 153.
sans couronne: 153.

4. Rôle de l'auxine:
 - génotypes: Duchesnay jeunes et âgés et Normandin jeunes et âgés.
 - milieux: BAP $10^{-6}M$ + ANA $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-7}M$ ou sans ANA.
 - concentration d'agar: 4 semaines sur 0.7%, puis sur 0.5%.
 - nombre de bourgeons: avec couronne: 360.
sans couronne: 360.

5. Influence du bouturage:
 - génotypes: Duchesnay bouturés.
 - milieux: BAP $10^{-6}M$ et ANA $10^{-7}M$.
 - concentration d'agar: 4 semaines sur 0.7%, puis sur 0.5%.
 - nombre de bourgeons: avec couronne: 50.
sans couronne: 50.

- En plus des bourgeons, de la culture d'aiguilles a été effectuée:
53 tubes x 3 à 5 aiguilles par tube.

6. Influence de la dureté de l'agar:
 - génotypes: Duchesnay jeunes et âgés et Normandin jeunes et âgés.
 - milieux: BAP $10^{-6}M$ et ANA $10^{-7}M$.
 - concentration d'agar: 4 semaines sur 0.7%, puis sur 0.5%.
 - nombre de bourgeons: 544

TOTAL DES MISES EN CULTURE DEPUIS DÉCEMBRE 1986:
PLUS DE 3 000 BOURGEONS.