Etudes exploratoires du bouturage semi-ligneux du châtaignier

Preliminary studies in chestnut propagation by softwood cuttings

H. BREISCH

CTIFL/CIREA, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre Inter-régional d'Expérimentation Arboricole, Centre de Lanxade, 24130 Prigonrieux
Tél : 05 53 73 07 32 • Fax : 05 53 61 66 45 • Email : breisch-ctifl-cirea@ctifl.fr

Résumé : Des travaux sur le bouturage semi-ligneux du châtaignier ont été menés pendant 6 années (1994 à 1999) et ont permis de préciser quelques éléments techniques. Les pieds-mères étaient cultivés en conteneurs dans une chambre de culture avec une lumière faible (70 à 90 µmol/s/m^2) et une température contrôlée (20°C) pour obtenir des pousses étiolées. Les boutures étaient traitées par trempage plus ou moins long au moyen de fongicides et d'hormones. Le fongicide krésoxim-méthyl a confirmé son effet mimétique de l'AIB en augmentant le taux d'enracinement. Ces travaux ont porté sur du matériel végétal en diffusion : la variété directe Marigoule et les porte-greffes Marsol et Maraval. De plus, ils ont permis de sélectionner des individus issus de semis d'hybrides inter-spécifiques, ayant une assez bonne aptitude au bouturage. Ces derniers ont été plantés en verger.

Mots clés : châtaignier, *Castanea sativa*, *Castanea crenata*, *Castanea mollissima*, bouturage semi-ligneux, hormones, krésoxim-méthyl, sélection clonale, *Phytophthora*

Abstract : *Studies on the propagation of chestnut softwood cuttings were conducted over 6 years (from 1994 to 1999) and made it possible to clarify some technical points.*
Mother plants were grown in containers in a growth chamber with low lighting (70 to 90 µmol/s/m^2) and controlled temperature (20°C) to obtain etiolated shoots.
The cuttings were either dipped into a fungicide for various lengths of time or hormone-treated.
The kresoxym-methyl fungicide confirmed its AIB-mimetic effect characterised by an increase in the rooting rate.
These studies used commercial plant material : the direct Marigoule variety and the Marsol and Maraval rootstocks which showed a rather good response to propagation by cuttings. Furthermore, they were used to identify progenies from inter-specific hybrid seedlings which showed a good aptitude for cutting propagation. The latter were planted into orchards.

Keywords : *chestnut tree, Castanea sativa, Castanea crenata, Castanea mollissima, softwood cuttings, hormones, kresoxim-methyl, clonal selection, Phytophthora*

1 Introduction

Les producteurs de châtaignes sont de plus en plus nombreux à vouloir replanter du châtaignier. Mais ils se heurtent à une pénurie générale de plants de qualité malgré les efforts conjoints des organismes techniques (INRA, Ctifl, SPV, CIREA, SEFRA) et de certains pépiniéristes.

Actuellement, on recherche :

- des variétés sélectionnées dont certaines ont intérêt à être multipliées sur leurs propres racines.
- des porte-greffes clonaux sélectionnés pour leur tolérance au *Phytophthora* (Salesses *et al.*, 1993) et leur bon comportement agronomique avec les variétés fruitières : affinité au greffage (Breisch, 1992), productivité...
- du matériel végétal indemne de *Cryphonectria parasitica* (chancre de l'écorce) au point de greffe, de *Phytophthora cinamomi* et *P. cambivora* provoquant des nécroses aux racines et au collet, et de Chestnut Mosaïc Virus (ChMV, maladie virale).
- du matériel végétal dont les qualités sont garanties par la Certification.

Cette situation de pénurie est due au fait que le châtaignier est difficile à multiplier végétativement. Le marcottage en cépée (cf Photo n°1), seule technique couramment employée, est longue à mettre en place et coûteuse en main d'œuvre notamment à cause du travail « d'étranglement » (cf Photo n°2) sans lequel aucune racine n'apparaît. Elle répond donc mal à une demande importante en quantité et en qualité comme par exemple pour du matériel indemne de virose. En d'autres termes, cette technique est mal adaptée au lancement d'un nouveau matériel ou d'un matériel assaini par thermothérapie ou par culture de méristème.

Photo n°1 : Marcottière de châtaigniers hybrides au Ctifl Lanxade (photo Ctifl)

Photo n°2 : Marcottage, étranglement manuel à l'aide d'une agrafe, de la base de la tige (photo Ctifl)

C'est ce constat qui a poussé le CTIFL à mettre au point des techniques de multiplication plus rapides et plus fiables. Deux pistes ont été explorées : d'une part la culture *in vitro*, par l'équipe de Navatel au Centre de Balandran, et d'autre part le bouturage semi-ligneux mené au Centre de Lanxade. Des résultats obtenus entre 1994 et 1999 et concernant cette dernière technique sont présentés dans cette communication.

2 Objectifs et thèmes abordés

Les objectifs principaux sont de 3 ordres :

- multiplier facilement des porte-greffes et des variétés sur leurs propres racines.
- multiplier plus rapidement que par la technique traditionnelle du marcottage en cépée avec étranglement.
- réduire le prix de revient par rapport à la culture *in vitro*.

Entre 1994 et 1995, différents sujets ont été abordés. Ils concernent :

- la conduite des pieds-mères.
- la préparation des boutures.
- l'enracinement et la conduite des boutures enracinées.

3 La conduite des pieds-mères

3.1 La nature des pieds-mères

Il s'agissait dans tous les cas de jeunes châtaigniers hybrides obtenus selon différents modes de multiplication :

- marcottes obtenues en cépées : porte-greffes Marsol et Maraval.
- jeunes plants issus de multiplication *in vitro* : Marsol et Maraval.
- semis de 1 ou 2 ans et dont on souhaite des copies végétatives : de la variété hybride Précoce Migoule (*Castanea crenata* x *C. sativa*) et du *Castanea mollissima* CA 75.
- scions greffés dont on veut obtenir un enracinement de la partie "greffon", comme par exemple Marigoule et Bouche de Bétizac ou bien du matériel sortant de thermothérapie comme les candidats porte-greffes INRA CA 21, CA 60 et CA 117.

3.2 La conduite des pieds-mères

Les pieds-mères sont plantés en conteneurs de 7 litres dans un substrat à base de sable, pouzzolane, terreau de feuilles de chêne, terre. Durant la période de croissance et de prélèvements entre mars et mi-août, ils sont installés dans une chambre de culture à température régulée à 20°C pour ne pas favoriser de maladies telluriques (*Pythium*, *Phytophthora*). Ils ne reçoivent pas de fertilisation et ne sont arrosés qu'une fois par semaine.

Ils sont replacés dans leur tunnel d'origine de mi-août à début mars où ils reçoivent une fertilisation complète pour plantes acidophiles en août-septembre. Aucun traitement phytosanitaire n'est appliqué sur les pieds-mères.

Pour tenter de maintenir les pieds-mères dans un état juvénile propice à la réussite de la multiplication végétative (Garcia *et al.*, 1981 ; Rinallo *et al.*, 1987), les pieds-mères sont rabattus chaque année, en février, en laissant des chicots pour favoriser le départ de nombreuses pousses.

3.3 L'étiolement du pied-mère

D'après Vieitez et Ballester (1988a et 1988b), chez le genre *Castanea*, la rhizogenèse des boutures est inhibée par la présence de polyphénols, des dérivés de l'acide ellagique, et la présence de ces inhibiteurs est fortement diminuée lorsque la plante mère croît dans une ambiance lumineuse réduite.

Dans la chambre de culture, l'éclairage est uniquement apporté par des tubes fluorescents de 36 W (blanc industrie), 18 heures par jour, placés à 1 m au-dessus des conteneurs et distants d'environ 20 cm les uns des autres.

La recherche du meilleur niveau d'éclairement a abouti par tâtonnement à 15 à 20 W/m^2 (mesurés au moyen d'une sonde PAR) ou 70 à 90 µmol/s/m^2, ce qui représente un compromis entre croissance et étiolement excessif. Par exemple à 10 W/m^2 (46 µmol/s/m^2), les feuilles sont trop fines et les boutures ne sont pas viables.

4 La préparation des boutures

4.1 Prélèvement

Les boutures sont prélevées lorsque les tiges ont atteint une longueur de 40 à 50 cm. On laisse sur le pied-mère un chicot avec 2 feuilles. Ces tiges sont ensuite coupées en tronçons d'un entre-nœud soit environ 8 cm de long ou 2 entre-nœuds lorsque ceux-ci sont trop courts. Le tronçon apical n'est pas utilisé pour le bouturage car il s'est montré trop fragile.

4.2 Hormonage

De nombreuses publications montrent que si l'apport d'hormones exogènes peut améliorer le taux d'enracinement des boutures, cela n'est pas forcément un facteur décisif (Chapa *et al.*, 1990).

Nous nous sommes contentés d'appliquer une préparation commerciale en poudre : Rootone® F. La détermination de la dose à apporter a fait l'objet d'essais préliminaires : par exemple pour éviter une brûlure de la tige, il a fallu tapoter la bouture pour éliminer l'excès de poudre (cf Tableau n°1).

Préparation : trempage de la bouture humide dans la poudre	**Résultats obtenus**
Rootone® F : trempage normal	La partie de la tige trempée est brûlée
Rootone® F : trempage normal puis tapotée	Pas de brûlure, bons résultats
Rootone® F : dilué à 50% avec du talc et tapotée	Pas de brûlure mais résultats irréguliers
Boutormone trempage normal	Aucun résultat, pas d'enracinement

Tableau n° 1 : Essai de dosage de préparations hormonales en 1996
Rootone® F (poudre) : 0.65‰ d'alpha-naphtylacétamide, 0.13‰ de 2-méthyl-1-naphtylacétamide, 0.32‰ d'acide 2-méthyl-1-naphtylacétique et 0.56‰ d'acide beta-indol-butyrique.
Boutormone (poudre) : 0.1% d'AIB (Rhône-Poulenc Espaces Verts).

4.3 Utilisation de fongicides

Nous avons délaissé le thirame réputé pour son action anti-germinative pour utiliser un fongicide plus ou moins systémique et polyvalent : le penconazole. Quelques essais doses ont été réalisés en 1995 et 1996. L'essai de 1995 (cf Tableau n°2) a précisé une fourchette de 0.33 ml/l à 1 ml/l de Topaze® (100 g/l de penconazole) pour une durée de 5 minutes. L'essai de 1996 a fait varier la dose de Topaze® de 0.05 ml à 0.60 ml pendant 5 minutes. A la dose de 0.60 ml on a observé des brûlures sur quelques variétés : Marigoule et Bouche de Bétizac.
L'ensemble de ces résultats nous a amené à utiliser à partir de 1997 un bain contenant 0.15 ml/l de Topaze® pour un trempage des boutures entières de 5 minutes.

Dose de Topaze®	**Durée du trempage**	**Résultats obtenus en 1995**
1 ml/l	30 mn	Tout est brûlé
1 ml/l	15 mn	Tout est brûlé
1 ml/l	5 mn	Une partie des boutures est brûlée
0.33 ml/l	5 mn	Pas de brûlures mais quelques pourritures

Tableau n° 2 : Essai de dosage du fongicide Topaze® en 1995

En 1999, notre attention s'est portée sur une nouvelle molécule de la famille des strobilurines : le krésoxim-méthyl. Alliage® qui contient 50% de krésoxim-méthyl est un fongicide utilisé contre la tavelure du pommier et celui-ci a un effet mimétique de l'auxine AIB (Ypema et Gold, 1999). Nous avons pratiqué un trempage de quelques secondes dans une solution à 0.2 g/l d'Alliage®, avant le traitement avec Rootone® F. Les résultats de 1999 sont plutôt encourageants (cf Tableau n°3).

Mais cette protection fongicide s'est avérée insuffisante, il y a eu des attaques de *Botrytis* qui ont nécessité des pulvérisations de 35 g/l de Cryptonol liquide (140 g/l d'oxyquinoléine).

	Clones	**Pourcentage d'enracinement (essai 1999)**	
		Protocole classique : Topaze® et Previcur® N	**Protocole : Alliage® et Previcur® N**
Essais réalisés le même jour : 8 juin	75-15	49.0	64.7
	75-48	43.5	70.1
Essais réalisés à 2 dates différentes : 8 juin pour le protocole classique et 8 juillet pour le protocole Alliage®	48-20	44.6	32.9
	75-30	23.8	55.6
	75-39	50.0	73.3
	CA 21 G2c	12.9	66.7
	CA 60 L3a	46.7	42.9
	Moyenne	**38.6**	**58.0**

Tableau n° 3 : Essai comparatif des préparations Alliage® et Topaze® en 1999

4.4 Le rinçage des polyphénols

Partant du constat que certains polyphénols se comportent comme des inhibiteurs de la rhizogenèse (Vieitez et Ballester, 1988a et 1988b), il nous est apparu légitime de les éliminer au maximum.

L'essai a été fait en 1997 avec de l'hypochlorite de calcium $Ca(ClO)_2$ par un trempage de 5 ou 20 minutes dans une solution à 20 g de cristaux par litre d'eau.

Les résultats, bien qu'intéressants, ne sont pas significatifs (cf Tableau n°4).

Clones	Durée du trempage dans 20 g/l de $Ca(ClO)_2$	Boutures traitées	Boutures enracinées en Septembre 1997		Boutures survivantes en Avril 1998	
			Nombre	Pourcentage d'enracinement	Nombre	Pourcentage de survie
48-14	5 mn	50	34	68.0	26	52.0
48-14	20 mn	43	22	51.2	15	34.9
48-19	5 mn	70	38	54.3	24	34.3
48-19	20 mn	50	39	78.0	22	44.0

Tableau n° 4 : Essai de trempage des boutures dans une solution d'hypochlorite de calcium en 1997

Il n'a pas été tenté de trempage plus long, ce qui compliquait l'expérience dans la mesure où l'hypochlorite de calcium n'est pas stable dans l'eau au-delà de 30 minutes.

Au printemps 1998, une nouvelle expérience a été testée avec l'hypochlorite de calcium. Un effet positif de la dose et de la durée de trempage est observé sur 5 clones, par contre le résultat est très mauvais pour les autres (cf Tableau n°5).

Clones	Ca(ClO)2 : 10g/l pendant 20mn			$Ca(ClO)_2$: 5g/l pendant 5 mn		
	boutures en place	Boutures enracinées	Pourcentage d'enracinement	boutures en place	boutures enracinées	Pourcentage d'enracinement
CA 21 G1c	33	21	63.6	44	3	6.8
CA 60 G1k	87	0	0	28	0	0
48-14	26	4	15.4	36	1	2.8
48-19	25	0	0	53	9	17
48-20	22	15	68.2	36	13	36
75-15	35	21	60	27	5	18.5
75-30	59	12	20.3	41	4	9.7
Total/moyenne	**287**	**73**	**25**	**265**	**35**	**13**

Tableau n° 5 : Essai de trempage des boutures dans une solution d'hypochlorite de calcium en 1998

5 La mise en place et la conduite des boutures

5.1 Substrat et pots

Connaissant la sensibilité du châtaignier à l'asphyxie, on a recherché un substrat plutôt bien aéré.

La solution adoptée au début de l'étude, donnant des résultats assez bons, a été conservée : fertil pot® de 6 cm de diamètre (cf Photo n°3), avec un substrat neuf (à défaut d'être stérilisé) composé de tourbe (2 vol) + sable (1 vol) + vermiculite (1 vol).

Les pots sont placés dans des caissettes plastiques à fond ajouré puis humidifiés avec la solution de Previcur® N.

Photo n°3 : Bouture de Maraval enracinée dans un Fertil pot® (photo Ctifl)

5.2 Humidification des pots après repiquage

Après installation des boutures dans les fertil pot®, ceux-ci sont arrosés avec une solution fongicide destinée à la désinfection du substrat : 15 ml de Previcur® N (722 g/l de propamocarbe HCI) pour 4 l d'eau, pour 108 pots.

5.3 Ambiances

Les caissettes de boutures sont rapidement placées sous une tente (initialement en plastique et donc pratiquement étanche, puis à partir de 1998, en matériau non tissé, poreux, isolant et translucide), aménagée sur une banquette à l'intérieur d'une serre.

L'humidité de l'air est maintenue saturée par un système de brouillard artificiel Defensor puis Fog System intermittent.

Une nappe chauffante électrique est placée sous les caissettes pour tenter d'obtenir une température de 25°C.

L'éclairement a été réduit en 1999 grâce à une toile à ombrer noire placée au-dessus de la tente pendant une période de 4 semaines correspondant à l'induction des racines. Par la suite l'éclairement est augmenté en enlevant progressivement la toile.

La toile à ombrer permet aussi d'éviter une élévation trop forte de la température sous la tente en été. Le matériau poreux non tissé qui recouvre la tente limite aussi la température en permettant une évaporation. Au-delà de 35°C, des dégâts sont possibles. La température moyenne de l'air varie en général entre 22 et 24°C.

6 Elevage - Acclimatation

Les boutures enracinées sont rempotées en conteneurs plastiques de 1.5 l lorsque les racines dépassent du fertil pot®. Les conteneurs sont maintenus sous la tente jusqu'à ce qu'une nouvelle tige se soit développée à partir d'un bourgeon. A ce stade les pots sont sortis de la tente et placés dans une serre normale(cf Photo n°4). Ils reçoivent alors une fertilisation complète sous forme liquide.

La période hivernale reste une période difficile pour les jeunes boutures. Il semble que l'on ait intérêt à ce que la période de dormance, avec des températures froides mais jamais négatives, soit de l'ordre d'un à deux mois maximum.

Les boutures élevées sous abri, n'étant pas entrées en dormance dans les conditions extérieures, s'avèrent extrêmement sensibles au gel. Il faut en tenir compte pour les manipulations.

Photo n°4 : Bouture de Maraval en phase d'acclimatation en pot de 1.5 l sous serre (photo Ctifl)

7 Aptitude au bouturage

7.1 Variétés et porte-greffes en diffusion

Marigoule CA 15, Marsol CA 07 et Maraval CA 74 ont un comportement au bouturage assez satisfaisant et démontrent qu'une possibilité de production commerciale est envisageable. Celle-ci est d'ailleurs déjà réalisée par les Etablissements J. Coulié (19600 Chasteaux).

La variété Bouche de Bétizac CA 125 s'est montrée extrêmement récalcitrante au bouturage. Les quelques boutures enracinées obtenues (une vingtaine) n'ont pas survécu au-delà d'un an pour la moitié d'entre elles et de deux ans pour le reste. Il semble que cette variété produite sur ses propres racines (SPR) ait une sensibilité particulière aux maladies telluriques (*Phytophthora*, *Pythium*…).

7.2 Matériel issu de thermothérapie

La thermothérapie est destinée à éliminer la maladie de la mosaïque ChMV (Desvignes et Breisch, 1992). Ces travaux ont été réalisés par Desvignes et Cornaggia, Ctifl Centre de Lanxade.

Parmi les clones expérimentés :

- les clones CA 21 G1c et CA 21 L2f ont donné d'assez bons résultats.
- les clones CA 60 G1k, CA 60 L3a, CA 117 F2b et CA 117 F3a n'ont rien donné.

7.3 Autre matériel cloné

Il s'agit de clones étudiés en tant que candidats porte-greffes :

- CA 94 présente une aptitude moyenne mais il a été peu étudié.
- CA 785 présente une bonne aptitude au bouturage.

7.4 Matériel sélectionné à partir de semis

Des semis réalisés à partir de Précoce Migoule CA 48 (hybride *Castanea crenata* x *Castanea sativa*) et du châtaignier chinois CA 75 (*Castanea mollissima*) ont fait l'objet d'une sélection clonale sur la base de leur aptitude au bouturage et de leur viabilité en acclimatation sur substrat non désinfecté (cf Tableau n°6).

Origine	Première sélection bouturage	Causes d'élimination	Dernière sélection	Note de vigueur au verger sur 5
20 semis de Précoce Migoule CA 48	48-14	néant	48-14	5
	48-19	néant	48-19	4
	48-20	néant	48-20	5
40 semis de *Castanea mollissima* CA 75	75-12	Aptitude au bouturage insuffisante		
	75-14	Forte mortalité en élevage		
	75-15	néant	75-15	2
	75-30	néant	75-30	3
	75-39	néant	75-39	5
	75-48	néant	75-48	4
	75-50	Aptitude au bouturage insuffisante		

Tableau n° 6 : Sélection clonale dans une population de semis d'hybrides inter-spécifiques

8 Conclusion

La production de variétés sur leurs propres racines et de porte-greffes de châtaigniers hybrides par bouturage semi-ligneux est possible au niveau commercial. La marge de progrès est importante.

Le bouturage semi-ligneux fait intervenir un très grand nombre de facteurs. Il est difficile de les contrôler tous.

La conduite des pieds-mères est une partie importante du processus : conditions d'étiolement, vigueur moyenne, pousses non érigées.

Au niveau de la préparation des boutures, un vaste champ reste à explorer concernant d'une part l'extraction de certains polyphénols inhibiteurs de la rhizogenèse et d'autre part le traitement hormonal des boutures.

La mise en place des boutures ne pose pas de problème majeur. Cependant la protection phytosanitaire, l'homogénéité de l'humidité et l'ombrage sont des points qui demandent à être affinés.

La sélection clonale sur la base de l'aptitude au bouturage mériterait d'être poursuivie car elle montre de très grosses différences de comportement d'un clone à un autre et laisse entrevoir des perspectives intéressantes surtout si on prend soin de s'adresser à des lignées à forte présomption de résistance au *Phytophthora*.

Remerciements

A Jean-Claude Navatel (Ctifl Balandran) et à Alain Baudry (LRPV Bordeaux) pour leurs précieux conseils, à Jean Coulié et à Jean-François Linard pour leur collaboration.

Bibliographie

BREISCH H., 1992, Châtaignier, des porte-greffes résistants à la maladie de l'encre, *Infos-Ctifl*, 87, 39-42

CHAPA J., CHAZERANS P., COULIE J., 1990, Multiplication végétative du châtaignier, amélioration par greffage de printemps et bouturage semi-ligneux, *L'Arboriculture fruitière*, 431, 41-48

DESVIGNES J.C., BREISCH H., 1992, Caractérisation de la mosaïque du châtaignier, *Infos-Ctifl*, 82, 43-46

GARCIA M.T., BALLESTER A., VIEITEZ E., 1981, Estudio de las sustancias de crecimiento aisladas de estaquillas juveniles de *Castanea sativa* Mill., en relacion con la rizogenesis, *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, 40 (7-8), 1235-1241

RINALLO C., GELLINI R., FABBRI A., 1987, Studies on rhizogenesis in *Castanea sativa* Mill. cuttings, *Advances in Horticultural Science*, 1, 27-33

SALESSES G., RONCO L., CHAUVIN J.E., CHAPA J., 1993, Amélioration génétique du châtaignier. Mise au point de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre, *L'Arboriculture Fruitière*, 458, 23-31

VIEITEZ J., BALLESTER A. 1988, Endogenous rooting inhibitors in mature chestnut cuttings, *Acta Horticulturae*, 227, 167-169

VIEITEZ F.J., BALLESTER A., 1988, Effect of etiolation and shading on the formation of rooting inhibitors in chestnut trees, *Phyton Argentina*, 48 (1-2), 13-19

YPEMA H.L., GOLD R.E., 1999, Kresoxim-methyl. Modification of a naturally occuring compound to produce a new fungicide, *Plant Disease*, 83 (1), 4-19