



**HAL**  
open science

# Prédiction de la capacité rhizogène de boutures de frêne commun (*Fraxinus excelsior*) par des approches morphologique, biochimique et spectrométrique

Chloé Richard

## ► To cite this version:

Chloé Richard. Prédiction de la capacité rhizogène de boutures de frêne commun (*Fraxinus excelsior*) par des approches morphologique, biochimique et spectrométrique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04788836

**HAL Id: dumas-04788836**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04788836v1>**

Submitted on 18 Nov 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année universitaire : 2023 - 2024 Spécialité : Horticulture Spécialisation (et option éventuelle) : Seeds and Plants Propagation (SEPPRO)	<b>Mémoire de fin d'études</b> <input checked="" type="checkbox"/> d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) <input type="checkbox"/> de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) <input type="checkbox"/> de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2) <input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)
---	---

**Prédiction de la capacité rhizogène de boutures de frêne commun (*Fraxinus excelsior*) par des approches morphologique, biochimique et spectrométrique.**

Par : Chloé RICHARD

**Soutenu à Angers, le 13 septembre 2024**

**Devant le jury composé de :**

Président : Olivier LEPRINCE

Maître de stage : Arnaud DOWKIW

Enseignant référent : Gilles GALOPIN

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Philippe GRAPPIN

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers



## Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

### Confidentialité

Non  Oui si oui :  1 an  5 ans  10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible <sup>(1)</sup>.

Date et signature du maître de stage <sup>(2)</sup> :  
(ou de l'étudiant-entrepreneur)

**A la fin de la période de confidentialité**, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

### Droits d'auteur

L'auteur<sup>(3)</sup> **Chloé Richard** autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui  Non

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement<sup>(4)</sup>
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif)  accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur :

### Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui  Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement<sup>(4)</sup>
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation de l'Institut Agro Rennes-Angers s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon maître d'apprentissage, Arnaud DOWKIW, pour tous ses enseignements au cours de ces deux ans d'alternance. Egalement, je remercie mon enseignant tuteur, Gilles GALOPIN, d'avoir partagé ses connaissances sur le bouturage et la juvénilité des plantes ligneuses, ainsi que pour son accompagnement. Je souhaite remercier Nassim BELMOKTHAR, Nathalie BOIZOT et Orlane TOUZET de la plateforme Phénobois pour leur appui technique lors des manipulations de laboratoire et de l'analyse des données, ainsi que pour leur bonne humeur et leur soutien sans faille qui m'a aidé à garder le sourire pendant ces longues journées de travail. J'ai eu la chance de pouvoir encadrer Léonie VISOMBLAIN, stagiaire de BTS Biotechnologies 1<sup>ère</sup> année, qui a été d'une grande aide pour la réalisation des manipulations de laboratoire, un grand merci à elle. Je remercie GBFor (Unité Expérimentale Génétique et biomasse forestières Orléans), et particulièrement Clémentine BOURDERIAU, Louise MELOT et Patrick POURSAT pour la gestion des plants en serre, ainsi que Mathieu BLIARD, Alexis ROYNE, Victor LARSONNIER, Pascal THEVRET et Guillaume BODINEAU pour la gestion de la parcelle plein champ (clôture et débroussaillage). Merci à Béatrice Courtial, Benoit Nusillard, Jérôme Rousselet, et Marie-Anne Auger-Rozenberg de l'URZF (Unité de recherche Zoologie forestière) pour l'identification barcoding et les conseils de gestion de *Bradysia impatiens*. Je remercie Laura VIMENET et Tess DELAPIERRE pour la relecture de mon mémoire. Je remercie INRAE Val de Loire et BioForA (Unité mixte de recherche Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt) pour la mise à disposition des équipements de travail, et les formations en analyses statistiques. Enfin, je souhaite remercier tous les collègues des unités BioForA et GBFOR pour leur accueil chaleureux et leur sympathie qui a ensoleillé ces deux années de travail.



## Table des matières

Introduction :.....	1
1 Matériel et méthodes :.....	6
1.1 Expérimentation plein champ :.....	6
1.1.1 Matériel végétal :.....	6
1.1.2 Dispositif expérimental :.....	6
1.2 Expérimentation en serre :.....	7
1.2.1 Matériel végétal :.....	7
1.2.2 Dispositif expérimental :.....	7
1.3 Méthodes et notations communes aux deux expérimentations :.....	8
1.3.1 Mesure du plastochrone chez les plants témoins :.....	8
1.3.2 Mesure de l’allongement chez les plants témoins :.....	8
1.3.3 Notations des boutures et prélèvement des échantillons :.....	8
1.3.4 Spectrométrie proche infrarouge portable :.....	9
1.3.5 Préparation des échantillons et matière sèche.....	9
1.3.6 Spectrométrie proche et moyen infrarouge de laboratoire (PIR et MIR).....	9
1.3.7 Dosage des sucres solubles.....	10
1.3.8 Test d’enracinement des boutures.....	10
1.4 Traitement et analyses des données.....	11
2 Résultats :.....	14
2.1 Expérimentation plein champ :.....	14
2.1.1 Influence de la famille sur les mesures morphologiques, biochimiques et spectrométriques.....	14
2.1.1.1 Production de bouture et croissance.....	14
2.1.1.2 Approche morphologique :.....	15
2.1.1.3 Approche biochimique :.....	16
2.1.1.4 Approche spectrométrique :.....	17
2.1.2 Prédiction de l’enracinement des boutures.....	18
2.1.2.1 Effectifs et influence de la famille sur l’enracinement :.....	18
2.1.2.2 Approche morphologique :.....	19
2.1.2.3 Approche biochimique :.....	20
2.1.2.4 Approche spectrométrique :.....	21
2.2 Expérimentation en serre :.....	22
2.2.1 Influence des pincements sur les mesures morphologiques, biochimiques et spectrométriques.....	22
2.2.1.1 Production de boutures.....	22
2.2.1.2 Approche morphologique :.....	23
2.2.1.3 Approche biochimique :.....	24



2.2.1.4	Approche spectrométrique : .....	25
2.2.2	Prédiction de l'enracinement des boutures .....	26
2.2.2.1	Effectifs et influence du pincement sur l'enracinement : .....	26
2.2.2.2	Approche morphologique : .....	27
2.2.2.3	Approche biochimique .....	28
2.2.2.4	Approche spectrométrique : .....	29
2.3	Prédiction des sucres par la spectrométrie : .....	30
3	Discussion .....	31
3.1	Estimation des quantités de sucres solubles contenues dans les tissus des boutures par une étude des spectres infrarouges .....	31
3.2	Enracinement des boutures : .....	32
3.3	Prédiction de l'enracinement et de la mortalité des boutures .....	32
3.4	Evaluation de l'influence de la génétique d'un plant au niveau famille sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites.....	34
3.5	Evaluation de l'influence de deux modalités de pincement sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques (caractéristiques de juvénilité), sur la durabilité du plant, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites .....	34
4	Perspectives.....	35
	Bibliographie.....	37
	Annexes .....	1
	Annexe 1 : Plan de plantation de l'expérimentation plein champ.....	46
	Annexe 2 : Paramètres de l'HPLC pour le dosage des sucres solubles. ....	47
	Annexe 3 : Chromatogramme obtenu par le dosage en HPLC sur un échantillon de tige.....	47
	Annexe 4 : Effets des huit modalités spectrales sur les spectres PIR mesurés avec l'appareil portable sur les feuilles fraîches des boutures de l'expérimentation plein champ. ....	48



## **Liste des abréviations**

PIR : proche infrarouge (spectrométrie)

MIR : moyen infrarouge (spectrométrie)



**Liste des tableaux**

Tableau 1 : Synthèse bibliographique des taux de réussite de bouturage ex vitro de <i>F. excelsior</i> .....	2
Tableau 2 : Indicateurs de la juvénilité sélectionnés pour les essais de 2024. ....	4
Tableau 3 : Effectifs de l'expérimentation plein champ.....	6
Tableau 4 : Effectifs de l'expérimentation en serre. ....	7
Tableau 5 : Nombre de boutures produites au cours de l'expérimentation plein champ.....	14
Tableau 6 : Allongement et plastochrone des plants témoins de l'expérimentation plein champ. ....	14
Tableau 7 : Expérimentation plein champ. Enracinement des boutures.....	18
Tableau 8 : Boutures produites au cours de l'expérimentation en serre.....	22
Tableau 9 : Expérimentation en serre. Enracinement des boutures. ....	26
Tableau 10 : R <sup>2</sup> sur les données d'entraînement des PLS-R de prédictions des sucres solubles. ....	30



**Liste des figures :**

Figure 1 : A) Répartition des âges chronologique et ontogénétique au niveau de l'arbre. (B) Juvénilité ontogénétique retrouvée à la base d'un rameau suite au débourrement d'un bourgeon .....	2
Figure 2 : Schéma du concept de mouvement morphogénétique. ....	3
Figure 3 : Expérimentation plein champ. Un plant après recépage à 5 cm. ....	6
Figure 4 : Expérimentation plein champ. Pincement à un métamère des plants testés. ....	6
Figure 5 : Expérimentation plein champ. Pied-mère de la famille 6x8 après 34 jours de récolte des boutures par pincements à un métamère. ....	6
Figure 6 : Expérimentation en serre. Pied-mère avant (A) et après (B) recépage à 3 cm.....	7
Figure 7 : Expérimentation en serre. Modalités de pincements appliquées .....	7
Figure 8 : Expérimentation en serre. Pied-mères après 31 jours de récolte des boutures. ....	7
Figure 9 : Expérimentation en serre. Disposition des plants sur le tablard en serre.. ....	8
Figure 10 : Expérimentation en serre. Pied-mère sur le tablard de la serre.....	8
Figure 11 : Préparation des boutures, récupération des échantillons de feuilles et de tiges et synthèse des mesures effectuées. Communs aux deux expérimentations. ....	9
Figure 12 : A) Un explant de l'expérimentation en serre avant préparation. B) Une bouture préparée de l'expérimentation en serre.....	9
Figure 13 : Boutures dans les godets de vermiculite en plaque. ....	10
Figure 14 : Echelle de notation de l'enracinement des boutures pour les deux expérimentations. ....	10
Figure 15 : Expérimentation plein champ. Corrélations entre les mesures morphologiques. ....	15
Figure 16 : Expérimentation plein champ. Boxplots des mesures morphologiques présentant des différences significatives entre familles (6x8, 45x31, 45x21).....	15
Figure 17 : Expérimentation plein champ. AFD des données morphologiques selon la famille.....	15
Figure 18 : Expérimentation plein champ. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) en fonction des familles des pied-mères : 6x8, 45x31 et 45x21.....	16
Figure 19 : Expérimentation plein champ. Boxplot de la teneur en eau en fonction des familles des pied-mères : 6x8, 45x31 et 45x21.. ....	16
Figure 20 : Expérimentation plein champ. AFD des données biochimiques selon la famille. ....	16
Figure 21 : Expérimentation plein champ. ACP sur les spectres PIR de laboratoire sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. ....	17
Figure 22 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres PIR de laboratoire, pour la prédiction des familles des pied-mères.....	17
Figure 23 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres MIR de laboratoire, pour la prédiction des familles des pied-mères.....	18
Figure 24 : Expérimentation plein champ. Boxplots des mesures morphologiques présentant des différences significatives entre les classes d'enracinement. ....	19
Figure 25 : Expérimentation plein champ. AFD des données morphologiques selon l'enracinement..	19
Figure 26 : Expérimentation plein champ. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) en fonction des classes d'enracinement.....	20
Figure 27 : Expérimentation plein champ. Boxplot de la teneur en eau en fonction des classes d'enracinement. ....	20
Figure 28 : Expérimentation plein champ. AFD des données biochimiques selon l'enracinement. ....	20
Figure 29 : Expérimentation plein champ. ACP sur les spectres de PIR portable sur les feuilles fraîches du bas des boutures selon la survie. ....	21
Figure 30 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres de PIR portable pour la prédiction des classes de survie des boutures.. ....	21
Figure 31 : Expérimentation plein champ. ACP sur les spectres de MIR selon les classes de survie ....	22
Figure 32 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres de MIR pour la prédiction des classes de survie des boutures.....	22
Figure 33 : Expérimentation en serre. Corrélations entre les mesures morphologiques. ....	23



Figure 34 : Expérimentation en serre. Boxplots des mesures morphologiques présentant des différences significatives entre les modalités de pincement des pied-mères.....	23
Figure 35 : Expérimentation en serre. AFD des données morphologiques selon le pincement .....	23
Figure 36 : Expérimentation en serre. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) en fonction des modalités de pincement des pied-mères.....	24
Figure 37 : Expérimentation en serre. Boxplot de la teneur en eau en fonction des modalités de pincement des pied-mères.....	24
Figure 38 : Expérimentation en serre. AFD des données biochimiques selon le pincement.....	24
Figure 39 : Expérimentation en serre. ACP sur les spectres de PIR laboratoire selon le pincement....	25
Figure 40 : Expérimentation en serre. PLS-DA sur les spectres de PIR laboratoire pour la prédiction des modalités de pincement des pied-mères.....	25
Figure 41 : Expérimentation en serre. ACP sur les spectres de MIR selon le pincement.. ..	26
Figure 42 : Expérimentation en serre. PLS-DA sur les spectres de MIR laboratoire pour la prédiction des modalités de pincement des pied-mères.....	26
Figure 43 : Expérimentation en serre. Boxplot du nombre de folioles des feuilles de l'apex de la bouture en fonction des classes d'enracinement. ....	27
Figure 44 : Expérimentation en serre. AFD des données morphologiques selon l'enracinement.....	27
Figure 45 : Expérimentation en serre. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) en fonction des classes d'enracinement. ....	28
Figure 46 : Expérimentation en serre. Boxplot de la teneur en eau en fonction des classes d'enracinement. ....	28
Figure 47 : Expérimentation en serre. AFD des données biochimiques selon l'enracinement. ....	28
Figure 48 : Expérimentation en serre. ACP sur les spectres de PIR laboratoire.....	29
Figure 49 : Expérimentation en serre. ACP sur les spectres de MIR selon l'enracinement.. ..	29



## Introduction :

L'amélioration forestière a pour objectif de créer et sélectionner des arbres de haute qualité agronomique, adaptés à divers environnements et tolérants aux stress biotiques. Avec la mondialisation, les échanges internationaux ont augmenté, accroissant la propagation des phytopathogènes (Anagnostakis, 2001). Le critère de tolérance aux maladies a donc une forte importance aujourd'hui et particulièrement dans le domaine forestier où les variétés développées doivent être efficaces sur le long terme. Il est nécessaire de produire des variétés durables, capables de résister et de croître correctement jusqu'à la récolte qui a lieu entre 15 ans et 150 ans après la plantation suivant les essences (CNPF). Les programmes d'amélioration conduits à INRAE concernent de nombreuses essences : peuplier, pin, douglas, mélèze, frêne commun et bien d'autres.

En France, les trois espèces de frênes indigènes, *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus angustifolia* et *Fraxinus ornus* (Wallander, 2008) se placent ensemble comme 5<sup>ème</sup> essence feuillue de France *ex aequo* avec le charme et le chêne pubescent en termes de volume de bois sur pied, et occupent 5,5 millions d'hectares (IGN, 2023). Le frêne commun, *Fraxinus excelsior*, est l'espèce cultivée par les forestiers et la seule pour laquelle il existe un programme d'amélioration. Elle est appréciée pour son bois blanc teignable, solide, durable et souple (Leclercq, 1975 ; Nepveu, 1992). Il est notamment utilisé dans la fabrication de meubles et de manches d'outils pour sa capacité d'absorption des chocs (Boshier et al., 2005).

Malheureusement, *F. excelsior* est aujourd'hui menacé par la chalarose, une maladie causée par l'ascomycète *Hymenoscyphus fraxineus*. Le dépérissement des frênes a été décrit en Europe de l'est dans les années 90 et 2000 (Przybył, 2002), et le champignon responsable n'a été identifié qu'en 2006 en Pologne (Kowalski, 2006), puis son origine asiatique a été découverte encore 6 ans plus tard (Zhao et al., 2012). D'abord nommé *Chalara fraxinea*, le pathogène a depuis été reclassé et renommé *Hymenoscyphus fraxineus* (Baral et al., 2014). En 2023, le dépérissement est tel que 17% des frênes français présentaient plus de 25% de branches mortes dans leur houppier (IGN, 2023).

Les ascospores du champignon, transportées par le vent, infectent les frênes en été. Le mycète provoque des nécroses foliaires, puis des nécroses corticales sur les rameaux qui entraînent le dépérissement du houppier. Il infecte aussi le collet, provoquant une nécrose en forme de flamme qui mène rapidement à la mort de l'arbre, dès qu'elle circonscrit le collet (Przybył 2002 ; Kowalski et Lukomska, 2005 ; Husson et al., 2012 ; Skovsgaard et al., 2010). Les frênes les plus jeunes et les plus petits sont plus fortement affectés par les symptômes (Marçais et al. 2017). *Hymenoscyphus fraxineus* passe ensuite l'hiver sur le rachis des feuilles tombées au sol. Les apothécies forment les ascospores au début de l'été suivant (Gross et al., 2012 ; Kowalski & Holdenrieder, 2009 ; Queloz et al., 2011).

Face à ce déclin, les programmes d'amélioration se concentrent sur la sélection de frênes peu sensibles à la chalarose. Le mécanisme permettant aux frênes d'être peu sensibles n'est pas très bien connu, il n'est pas possible de définir s'il s'agit de résistance ou de tolérance. Dans le présent article, le mot choisi pour parler d'une faible sensibilité à la chalarose est le terme « tolérance ».

Les généticiens forestiers, et en particulier ceux d'INRAE, ont commencé par étudier la part des facteurs génétiques dans la sensibilité à la maladie, ce que l'on appelle l'héritabilité au sens large ( $H^2$ ), puis sa transmissibilité d'une génération à la suivante, l'héritabilité stricte ( $h^2$ ). Les premières estimations de ces paramètres laissaient entrevoir la possibilité de créer des vergers à graines regroupant des géniteurs sélectionnés pour leur moindre sensibilité (Muñoz et al., 2016). Cependant, une nouvelle estimation de l'héritabilité stricte l'a établie à 0,2 (Dowkiw et Tumino, communication personnelle). Cette valeur, plus faible que la précédente, rend la production de frênes tolérants à la chalarose par graines trop aléatoire.

La multiplication végétative résout ce problème en produisant des plants génétiquement identiques au pied-mère sélectionné, donc exprimant les mêmes qualités à environnement égal. Cependant, les plantations clonales manquent de variabilité génétique, ce qui les rend vulnérables aux

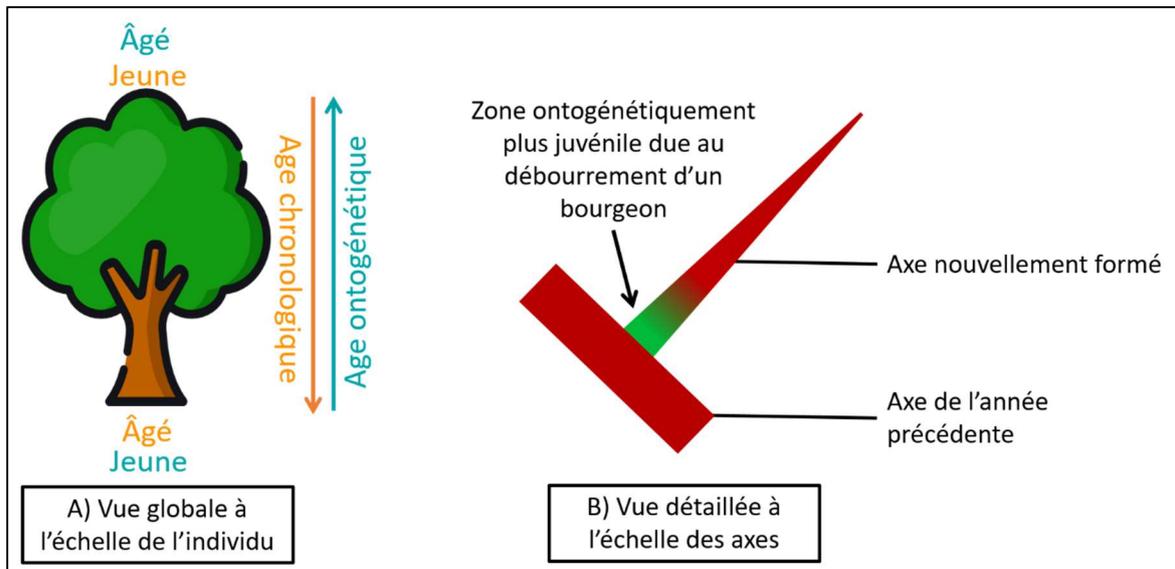


Figure 1 : A) Répartition des âges chronologique et ontogénétique au niveau de l'arbre. (Production personnelle d'après Crabbé, 1998) B) Représentation de la juvénilité ontogénétique retrouvée à la base d'un rameau suite au débourrement d'un bourgeon (Production personnelle d'après Krenke, 1940 ; Francllet, 1983 ; Monteuis et Bon, 1998)

stress biotiques et abiotiques inattendus (Namkoong, 1984 ; Roberds et Bishir, 1997). Il est donc indispensable de multiplier le plus de géotypes possible afin de déployer des variétés multiclones.

Il existe différents modes de multiplication végétative, dont les plus utilisés en production de plants ligneux sont la greffe et le bouturage. La greffe fonctionne bien sur le frêne mais présente des inconvénients : elle est plus coûteuse que le bouturage car elle nécessite un porte-greffe, et produit un arbre avec un collet et des racines de géotype différent. Cela pose problème pour les essais clonaux car il devient impossible d'évaluer la sensibilité au collet du géotype testé. De plus, un programme d'amélioration spécifique aux porte-greffes serait nécessaire pour la création variétale.

Le bouturage serait donc la méthode de multiplication la plus adéquate. Il peut être réalisé *ex vitro* ou *in vitro*. Pour rendre la technique utilisable par un maximum de pépiniéristes, le bouturage *ex vitro* est privilégié car il ne nécessite pas de matériel spécifique et est bon marché, comparé au bouturage *in vitro*.

*F. excelsior* est malheureusement connu pour être récalcitrant au bouturage. Nous avons tenté de synthétiser les quelques études sur le bouturage du frêne mais elles ont produit des résultats hétérogènes, des taux d'enracinement très bas, ou des résultats difficiles à reproduire (tableau 1). L'âge du pied-mère apparaît cependant comme un facteur de réussite : le taux d'enracinement des boutures diminue avec l'augmentation de l'âge des plants non taillés. Silveira et Cottignies (1994) ont obtenu moins de 6% d'enracinement avec des boutures de plants de 4 à 7 ans tandis que Sallé-Tourné (1988) et Stutz et al. (1983) ont atteint respectivement 60 et 71% avec des pieds-mères de 2 ans.

Tableau 1 : Synthèse bibliographique des taux de réussite de bouturage *ex vitro* de *Fraxinus excelsior*. \* = variations selon les dates de prélèvements de boutures, les hormones exogènes appliquées, le type de bouture ou les conditions de culture.

Référence	Nature du pied-mère	Taux d'enracinement
Stutz et al., 1983	Semis âgés de 2 ans	71%
	Rejets de souche de 2 ans, sur souches de 6 ans	61%
	Rejets de souche de 5 ans, sur souches de 50-70 ans	58%
Sallé-Tourné, 1988	Semis âgés de 3 ans	0 à 45,5% *
	Semis âgés de 2 ans	53,5% à 60% *
	Rejets de souche lignifiés	0%
Silveira & Cottignies, 1994	Plants âgés de 4 à 7 ans	0 à 6% *
Jinks, 1995	Arbres matures en haie	16 à 66% *
Douglas, 2001	Taillis	30 à 46% *
	Jeunes semis ou issus de bouturage <i>in vitro</i>	50 à 92% *
Douglas et al., 2017	Plants âgés de 6 ans taillés régulièrement en haie (issus de bouturage <i>in vitro</i> )	53,5 à 94,38% *

Les ligneux ne sont pas caractérisés par un âge, mais par plusieurs âges, tels que l'âge chronologique (temps écoulé depuis la création du plant) et l'âge ontogénétique (avancée vers la maturité sexuelle) (Crabbé, 1998) (fig. 1, A). Ces âges ne sont pas homogènes sur un arbre, les derniers bourgeons formés sont plus jeunes chronologiquement parlant, mais sont ontogénétiquement parlant plus âgés que des bourgeons situés à la base de l'arbre (Monteuuis et Bon, 1998). En effet, ces derniers ont été formés lorsque l'arbre était plus jeune (selon les trois âges), et ils ont conservé cette juvénilité ontogénétique, bien que, le temps passant, leur âge chronologique a augmenté. Cette répartition de haut en bas n'est pas linéaire, il existe des points plus juvéniles au sein de zones plus matures. Un bourgeon qui vient de débourrer est ontogénétiquement plus juvénile que la branche qui le porte, grâce à la période de dormance qu'il a subi avant de se développer (fig. 1, B) (Krenke, 1940 ; Franclot, 1983 ; Crabbé, 1998 ; Monteuuis et Bon, 1998).

C'est la juvénilité ontogénétique qui influence la réussite du bouturage car c'est elle qui est liée aux capacités morphogénétiques, telles que la capacité rhizogène (Nozeran, 1978 ; Nozeran, 1985). Ainsi, le terme « juvénile » employé au cours de cet article fait référence à la juvénilité ontogénétique.

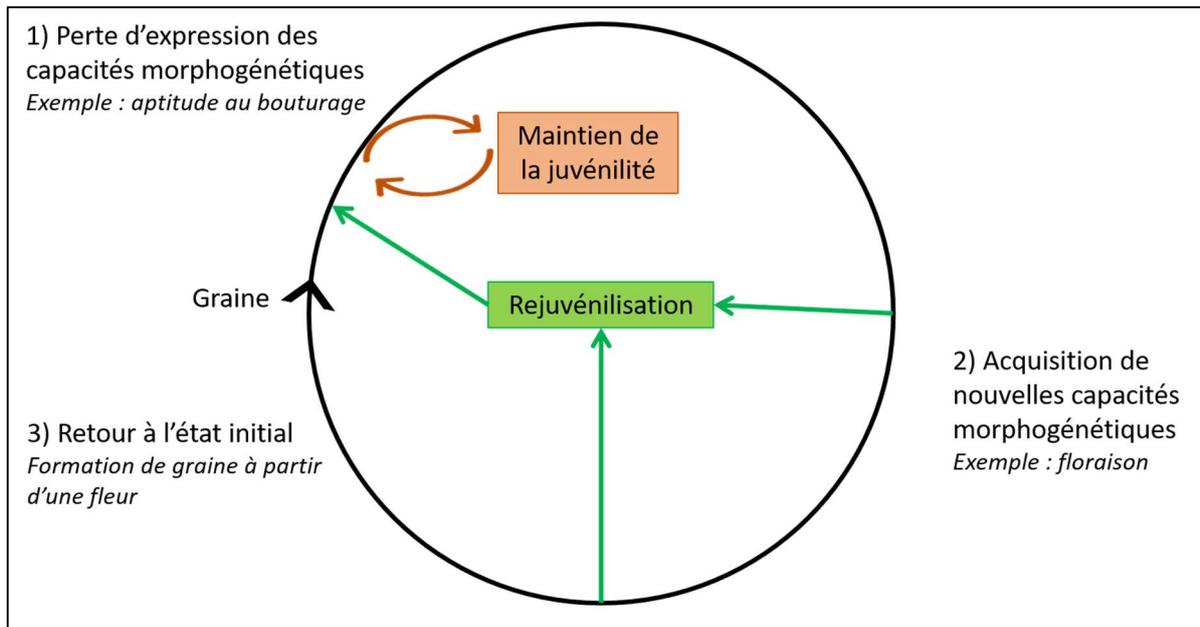


Figure 2 : Schéma du concept de mouvement morphogénétique. Schéma réalisé par C. Richard, repris de G. Galopin, adapté de Nozeran, 1978, Nozeran et al., 1982 et Nozeran, 1985.

L'évolution de la juvénilité au cours de la vie de l'arbre peut se voir sous forme d'un cycle (fig. 2), il s'agit du concept de mouvement morphogénétique (Nozeran, 1978 ; Nozeran et al., 1982 ; Nozeran, 1985). Suite à la germination, une plantule juvénile émerge de la graine, et possède toutes ses capacités morphogénétiques. Au cours de son développement, dès les premiers jours, la plantule perd petit à petit ses capacités, telles que l'aptitude au bouturage (Nozeran et al., 1982). Une fois la plante plus développée, elle réacquiert de nouvelles capacités, comme la floraison, qui vont lui permettre de se reproduire de façon sexuée. A l'issue de la floraison et de la fécondation, une graine est formée : ainsi un élément juvénile a été formé à partir d'un organe mature et il y a un retour au début du cycle (Nozeran et al., 1982).

Il est possible de retrouver les capacités morphogénétiques initiales, en particulier l'aptitude au bouturage, sans passer par la formation de graine. Ce retour à la juvénilité s'appelle la rejuvénalisation (Francllet, 1983 ; Francllet et al., 1987 ; Nozeran et al., 1982). Il s'agit d'un phénomène naturel, que l'on retrouve lors de la formation de drageons par exemple (Nozeran et al., 1982) Ce phénomène peut être déclenché ou amplifié par un recépage des plants, provoquant le développement de bourgeons dormants formés tôt dans la vie de la plante et donc restés à un état très juvénile. La juvénilité de ces bourgeons est d'autant plus forte que la période de dormance a été longue, car le méristème, en se réduisant avec le temps, recouvre par la même occasion des propriétés propres à la juvénilité (Nozeran et al., 1982 ; Monteuis et Bon, 1998). Une fois la juvénilité retrouvée, il faut l'entretenir très régulièrement à l'aide de pincements (taille en vert), sinon la plante va la perdre à nouveau au cours de sa croissance libre. Il est plus aisé de maintenir la juvénilité que de rejuvénaliser une plante, c'est pourquoi l'assiduité dans les pincements doit être absolue.

Ce concept a été appliqué à la production de boutures par Galopin et al. en 1996. Cette méthode développée sur *Hydrangea macrophylla* se nomme le microbouturage et a été adaptée à d'autres ligneux tels que *Mandevilla sanderi* et *Ostrya carpinifolia* (Boutebtoub, 2009 ; Galopin et al., 2010). Les plants sont recépés afin de produire des pousses juvéniles, puis bouturés, et les boutures enracinées deviennent des micropied-mères pour la production de boutures. Les pincements d'entretien de la juvénilité des micropied-mères sont effectués en laissant un ou plusieurs métamères de chaque pousse sur le plant. Un métamère est une unité de croissance, il est composé d'un entrenœud, d'un nœud, d'un ou plusieurs bourgeons axillaires et feuilles (White, 1979 ; Barlow, 1989). Chez le frêne, le métamère porte deux feuilles et deux bourgeons axillaires.

Cette méthode de retour et de maintien de la juvénilité a permis de bouturer efficacement pour une production en pépinière d'*Hydrangea* et bien d'autres. Il a été décidé de tester cette méthode sur *Fraxinus excelsior*. Cette piste de travail avait été explorée en 2023 à l'INRAE d'Orléans et avait produit des résultats encourageants sur le maintien de la juvénilité de jeunes semis (Richard, rapport de M1) et sur la rejuvénalisation de plants clonaux à l'aide de recépage (Richard, non publié).

L'étape préliminaire avait été de définir un caractère morphologique facilement observable permettant de quantifier l'état de juvénilité d'un frêne. Une observation de semis, confirmée par la bibliographie, avait permis de définir que le nombre de folioles par feuille des frênes était plus faible chez des sujets juvéniles que chez des sujets adultes. En effet, les premières vraies feuilles des semis comptaient un ou trois folioles, puis ce nombre augmentait au fur et à mesure jusqu'à atteindre environ onze à treize folioles par feuille chez les adultes (Collin et al., 1994 ; Tapper, 1992 ; Wardle, 1961). Wardle, en 1961, indiquait que les feuilles pouvaient atteindre neuf à onze folioles dès la deuxième année pour les plants les plus vigoureux.

Suite à cette première observation, deux essais avaient été menés en 2023. Le premier testait trois modalités de pincements récurrents sur de jeunes semis de quelques semaines issus de germination *in vitro* et cultivés en chambre de culture. Les plants avaient été pincés dès que possible de façon à récolter une bouture de deux métamères et à laisser un, deux ou trois métamères sur le pied-mère, selon les modalités. 68 à 93% des boutures se sont enracinées, sans différence significative entre les modalités. Ce taux d'enracinement très élevé était encourageant et semblait



confirmer l'hypothèse que des boutures juvéniles de *F. excelsior* étaient capables de s'enraciner. Bien qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en avant entre l'enracinement des boutures des trois modalités, il avait été observé, dès la première taille, un nombre de folioles par feuilles plus faible chez les plants pincés à 1 ou 2 métamères plutôt qu'à 3 métamères. Cependant, la limite de cet essai est que les plants bouturés étaient des jeunes semis et non des plants rejuvenilisés, or à terme l'objectif est bien de cloner des arbres adultes sélectionnés pour leur tolérance à la chalarose. De plus, aucune différence significative dans l'enracinement n'avait pu être mise en avant, ni aucune corrélation entre l'enracinement et le nombre de folioles, ceci étant peut-être dû à l'absence de contrôle de la variabilité génétique des plants qui avait pu masquer les effets des pincements.

Le deuxième essai testait trois modalités de recépage, à 3, 6 et 9 cm du collet, sur des plants clonaux, issus du bouturage *in vitro* d'un génotype en 2021 et élevés en chambre de culture. Des boutures de deux métamères avaient été prélevées en pinçant dès que possible les plants en laissant un métamère sur le pied-mère. Le recépage à 3 cm au-dessus du collet avait permis la production de boutures avec une capacité rhizogène significativement meilleure (22 % d'enracinement) qu'un recépage à 6 ou 9 cm (respectivement 8,9% et 4,2% d'enracinement). Cependant, cet essai avait été réalisé sur un seul génotype et est donc difficilement généralisable.

Les essais 2023 ont permis de montrer que le recépage ou les pincements pouvaient avoir un effet bénéfique sur le nombre de folioles par feuille et/ou sur l'enracinement ; mais que le frêne semblait murer et perdre sa capacité rhizogène très rapidement, d'où l'importance de tailler court (recépage bas et pincements très réguliers). De plus, ces essais ont montré que le nombre de folioles n'est pas une mesure suffisante pour prédire l'enracinement d'une bouture (pas de corrélation trouvée). Il est nécessaire de définir d'autres prédicteurs de l'enracinement et de la juvénilité.

Afin d'améliorer la prédiction en 2024, d'autres caractéristiques de la juvénilité ont été identifiées dans la bibliographie. Une sélection a été réalisée en fonction de la pertinence des indicateurs sur le frêne, et des possibilités techniques d'INRAE (tableau 2). Ces indicateurs de la juvénilité ont été rassemblés en deux approches : biochimique et morphologique.

Tableau 2 : Indicateurs de la juvénilité identifiés dans la bibliographie et dans les essais précédents et sélectionnés pour les essais de 2024.

Approche	Caractère	Juvenile	Mature	Valeur mesurée/ calculée	Références
<b>Morphologique</b>	Caractères foliaires	Moins de folioles par feuille pour le frêne Surface foliaire	Plus de folioles par feuille pour le frêne Surface foliaire	Comptage de folioles Taille de la feuille	Basheer-Salimia, 2007 ; Galopin et al., 1996 ; Wardle, 1961 ; essais 2023
	Croissance = Organogénèse + Allongement	Organogénèse rapide et allongement important	Organogénèse lente et allongement court	Plastochrone Longueur des entre-nœuds	Mazalewski, 1978 ; Meilan, 1997 ; Basheer-Salimia, 2007
<b>Biochimique</b>	Teneur en sucres solubles / non structuraux	Faible, au jour de prélèvement de la bouture, dans tous les tissus	Plus importante, au jour de prélèvement de la bouture, dans tous les tissus	Dosage HPLC	Da Costa et al., 2013 ; Druege, 2009 ; Haissig, 1989 ; Ling et Zhong, 2012
	Teneur en eau relative	Forte	Faible	Pesée avant et après lyophilisation	Basheer-Salimia, 2007



Au-delà de la bibliographie, il a été décidé d'ajouter une approche spectrométrique par des mesures de spectres proche et moyen infrarouge. Bien qu'aucune référence ne relie capacité rhizogène et spectre infrarouge chez le frêne, cette technique en plein développement à INRAE permet de prédire de nombreux caractères chez les plantes, y compris la tolérance à la chalarose chez *F. excelsior* (Villari et al., 2018 ; Belmokhtar et al., 2023) même si des validations sont encore nécessaires.

Les hypothèses à vérifier ont été : (1) il est possible de prédire la probabilité d'enracinement d'une bouture grâce à une caractérisation morphologique et/ou biochimique et/ou la prise de spectre proche et moyen infrarouge; (2) la génétique d'un plant au niveau famille influe sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites ; (3) le type de pincement appliqué influe sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques (caractéristiques de juvénilité), sur la durabilité du plant, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites; (4) la quantité de sucres solubles contenue dans les tissus de la boutures peut être estimée par une étude des spectres infrarouges. Ce dernier objectif est un objectif technique qui vise à alléger le nombre de manipulations dans la perspective de futurs essais. Cela permettrait d'éviter les étapes d'extractions et de dosages des sucres, qui sont coûteuses en matériel et en temps.

Cette fois, la diversité génétique du matériel végétal a été prise en compte et de deux manières : (i) en appliquant des modalités de pincements et de recépage prédéfinies à du matériel génétiquement varié mais dont l'apparement est connu (expérimentation plein champ) ; (ii) en travaillant à génotype constant, sur un clone, qui s'est vu appliquer diverses modalités de pincements réguliers (expérimentation en serre)



Figure 3 : Expérimentation plein champ. Un plant après recépage à 5 cm. Photographie prise le 24/04/2024 par Chloé RICHARD.

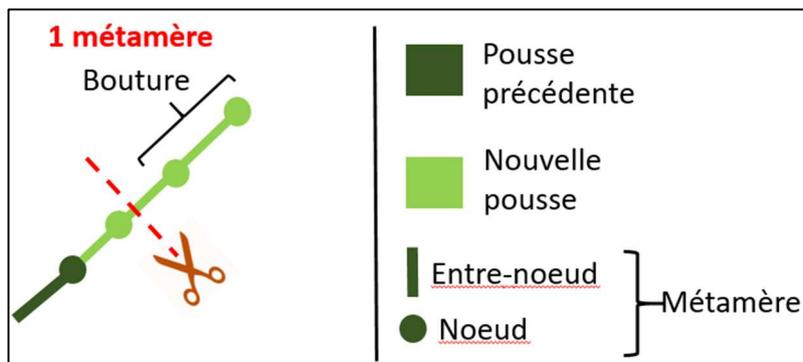


Figure 4 : Expérimentation plein champ. Pincement à un métamère des plants testés. Production personnelle.



Figure 5 : Expérimentation plein champ. Pied-mère de la famille 6x8 après 34 jours de récolte des boutures par pincements à un métamère. Photographie prise le 05/07/2024 par Chloé RICHARD.

## 1 Matériel et méthodes :

### 1.1 Expérimentation plein champ :

#### 1.1.1 Matériel végétal :

En 2018, des graines de *F. excelsior* récoltées sur divers arbres du Verger à Graines des Ecoulouettes (Pépinières Lemonnier à Ecouves, 61) avaient été semées à l'INRAE Val de Loire d'Orléans. Les 420 frênes qui en ont été issus ont été plantés en pleine terre en pépinière. Ceux-ci ont été plantés en cinq lignes, où les trois premières lignes et demi sont les plants issus d'un arbre mère appelé numéro 45, et la dernière ligne et demi partagées entre les plants issus de l'arbre mère numéro 6 et d'un autre, dont aucune descendance n'est incluse dans l'essai. Au sein de chaque descendance maternelle, les plants ont été plantés de façon aléatoire. Le plan de plantation est disponible en annexe 1. Afin d'éviter les dégâts dus à la faune sauvage (chevreuils, sangliers, lièvres...), la parcelle a été clôturée. Les plants n'avaient jamais été taillés. Ils ont été fertilisés une fois par an avec de l'engrais libération longue ProTurf 21-5-6+2,5CaO+2,5MgO d'ICL.

Le 25 avril 2024, tous les plants de la parcelle ont été recépés à 5 cm au-dessus du collet (fig. 3) à l'aide d'un sécateur électrique. Les axes secondaires dépassant les 5 cm ont eux aussi été coupés. Cette hauteur de recépage était la même que celle utilisée par Douglas et al. en 2013, pour l'entretien des pied-mères de frênes issus de bouturage *in vitro* avec lesquelles des taux d'enracinement de 50 à 100% avaient été atteints.

En 2019, tous les plants de la parcelle avaient été génotypés et une recherche de paternité a été effectuée. Ainsi, il a été possible d'identifier trois familles de plein-frères de 11 plants chacune. Deux des trois familles étaient issues du même arbre mère (tableau 3).

#### 1.1.2 Dispositif expérimental :

Afin de comparer la croissance des trois familles après un recépage, trois plants par famille ont été choisis comme « témoins », recépés mais non pincés. Les 8 autres plants, dits « testés », ont été recépés et pincés afin de prélever des boutures (table 3).

Tableau 3 : Effectifs de l'expérimentation plein champ.

Croisement - Famille		Effectifs de l'essai	
Arbre mère	Arbre père	Témoin non pincé	Pincé à 1 métamère
6	8	3	8
45	31	3	8
45	21	3	8

Les plants témoins ont été suivis de la façon suivante : deux axes de chaque plant ont été choisis et notés parmi les nouvelles pousses développées suite au recépage. Une fois par semaine, la longueur et le nombre de métamères de ces axes ont été notés, et un spectre proche infrarouge a été pris sur une feuille de l'avant-dernier métamère. L'étude de cette empreinte infrarouge avait pour objectif de tester s'il était possible de percevoir la perte de juvénilité d'un plant au cours de sa croissance à travers le spectre infrarouge de l'une de ses feuilles.

Les plants testés ont été observés deux fois par semaine. Chaque fois qu'une pousse atteignait trois métamères, elle était coupée avec une épinette de façon à laisser un métamère sur le plant et à récupérer une bouture de deux métamères (fig. 4). Ce type de pincement était appelé ici le pincement à un métamère. Un pied-mère en fin d'expérimentation est présenté en figure 5.



A)



B)

Figure 6 : Expérimentation en serre. Pied-mère avant (A) et après (B) recépage à 3 cm. Photographies prises le 24/04/2024 par Chloé RICHARD.

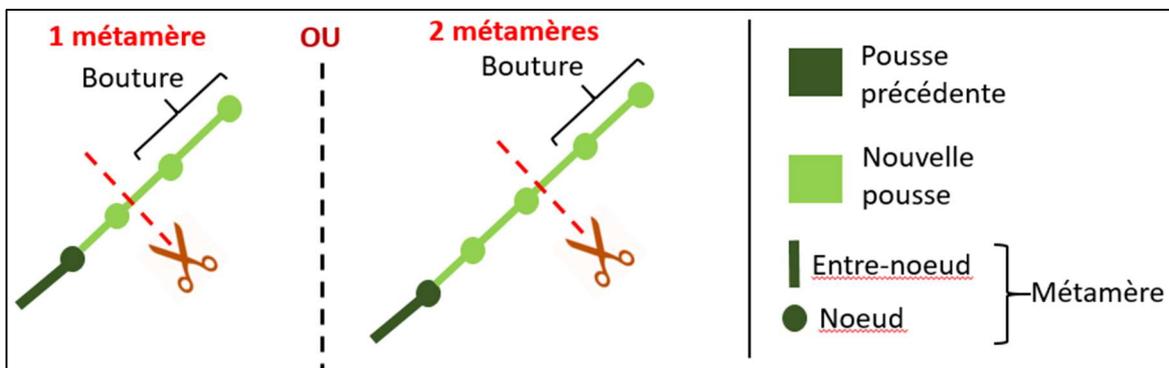


Figure 7 : Expérimentation en serre. Modalités de pincements appliquées : pincements à un métamère et pincements à deux métamères. Production personnelle.



Figure 8 : Expérimentation en serre. Pied-mères après 31 jours de récolte des boutures. A) Pied-mère pincé à un métamère. B) Pied-mère pincé à deux métamères. Photographies prises le 27/07/2024 par Chloé RICHARD.

## 1.2 Expérimentation en serre :

### 1.2.1 Matériel végétal :

Un génotype de *F. excelsior* qui avait été sélectionné dans une plantation expérimentale à Fontenois (70), a été multiplié par greffe puis bouturé *in vitro* à l'Institut Für Pflanzenkultur à Schnega, Allemagne, en 2021<sup>1</sup>. Les vingt plants ainsi obtenus avaient été acclimatés à INRAE début 2022. Ils ont été plantés en pot de 2,5L, ont poussé en serre ou en extérieur sous ombrière, sans être taillés. En mars 2023, les plants avaient été recépés à 3, 6 ou 9 cm et des boutures avaient été régulièrement prélevées de mars à juin (données non publiées). A la fin de cet essai, 14 plants avaient survécu.

Ces 14 plants ont été utilisés pour les essais de 2024. Après avoir passé l'hiver et le début du printemps en extérieur sous ombrière. Ils ont été rentrés en serre le 23 avril 2024 et repotés en pot de 3L dans du terreau Klasmann-Deilmann BP-Substrat 276GF.

La serre était une serre verre non chauffée, équipée d'une ventilation et d'un cooling qui se déclenchaient au-delà de 25°C. Les pots étaient arrosés de façon à maintenir le terreau à saturation. Une fois par semaine, la conductivité du substrat de chaque pot était mesurée à l'aide d'un conductimètre Groline Soil Test de Hanna Instrument. Pour maintenir la conductivité entre 0,8 et 1,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , les plants ont été fertilisés au besoin avec de l'Universol Green (23/6/10 + 2,7MgO) à 2g/L.

Les plants ont été recépés à 3 cm le 24 avril 2024 (fig. 6). Les axes secondaires ont eux aussi été coupés à 3 cm, s'ils dépassaient cette hauteur. Le recépage à 3 cm a été choisi à partir des résultats de l'essai de 2023, menés sur les mêmes plants, où les pied-mères recépés à 3 cm avaient produits des boutures à taux d'enracinement significativement plus élevé (22% d'enracinement) que les pied-mères recépés à 6 ou à 9 cm (8,9% et 4,2% respectivement).

### 1.2.2 Dispositif expérimental :

Deux modalités de pincements récurrents ont été testées. La moitié de l'effectif (7 plants) a été pincée à un métamère, c'est-à-dire qu'une pousse dépassant les trois métamères à vraies feuilles était coupée en laissant 1 métamère sur le plant, de façon à produire un explant de deux métamères. L'autre moitié de l'effectif (7 plants) a été pincée de façon à laisser deux métamères sur le plant en produisant un explant de deux métamères également (fig. 7). Les plants ont été observés deux fois par semaine et les boutures ont été prélevées lors de ces observations, dès qu'une pousse atteignait une taille suffisante. Un plant pincé à un métamère et un pincé à deux métamères sont présentés en figure 8.

Les plants ayant été précédemment utilisés pour un essai de recépage, les anciennes modalités ont été équitablement réparties entre les deux nouvelles modalités de pincement (table 4). Les plants ont été disposés sur un tablard en serre de façon à répartir les modalités sur la surface disponible (fig. 9 et fig. 10).

Tableau 4 : Effectifs de l'expérimentation en serre.

Modalité de recépage 2023	Effectifs totaux	Modalité de pincement 2024	
		1 métamère	2 métamères
3 cm	6	3	3
6 cm	5	2	3
9 cm	3	2	1
<b>Total</b>	14	7	7

<sup>1</sup> Cela ne sous-entend pas que la technique du bouturage soit maîtrisée dans ce laboratoire, puisque seul ce génotype, parmi les 10 confiés par INRAE, a été cloné avec succès au bout de trois années d'essais.

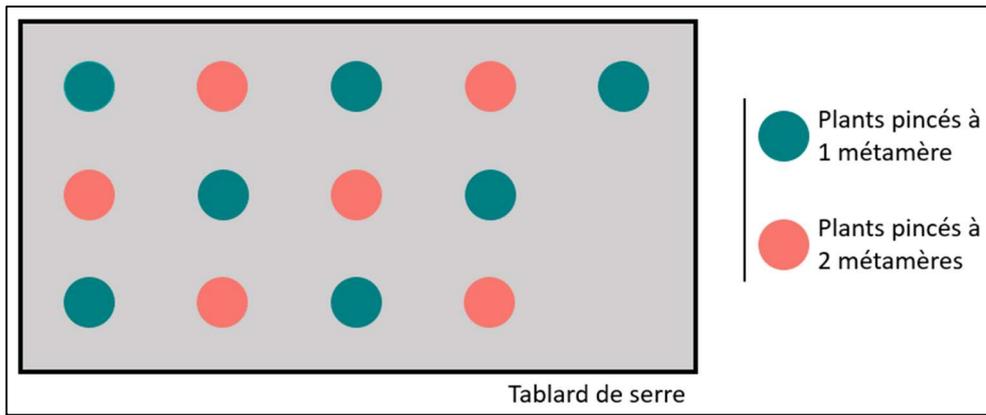


Figure 9 : Expérimentation en serre. Disposition des plants sur le tablard en serre. Production personnelle.



Figure 10 : Expérimentation en serre. Pied-mère sur le tablard de la serre. Photographies prises le 27/06/2024 par Chloé RICHARD.

### 1.3 Méthodes et notations communes aux deux expérimentations :

#### 1.3.1 Mesure du plastochrone chez les plants témoins :

La croissance d'un plant est caractérisée par l'organogénèse (la formation des différents organes de la plantes) et par l'allongement (agrandissement des organes). L'organogénèse a été décrite par le plastochrone apparent. Celui-ci a été calculé a posteriori grâce au comptage du nombre de métamères. Le plastochrone est le temps entre la formation de deux paires de feuilles successives (Askenasy, 1880 ; Schmidt, 1924 ; Esau, 1965 ; Meicenheimer, 2014). Ici, il est question de plastochrone apparent car il a été mesuré morphologiquement et non lors de la formation des primordia foliaires dans le bourgeon.

Un métamère était comptabilisé à partir du moment où les feuilles se décollaient de l'apex. Les rameaux proleptiques induits par un recépage sont couramment caractérisés par des premiers métamères écailleux (sans feuilles mais avec des écailles), suivis de métamères à cataphylles, c'est-à-dire portant des feuilles modifiées, et ensuite des métamères à vraies feuilles. Les métamères écailleux ne présentent pas d'entre-nœuds allongés (Caraglio et Barthélémy, 1997). Les métamères à cataphylles ont été comptabilisés de la même façon que les métamères à vraies feuilles : du moment qu'il y avait présence d'une surface photosynthétiquement active (un limbe) ceci était considéré comme une feuille. Seuls les métamères écailleux, ne portant pas de feuilles ont été écartés des notations et n'ont pas été comptabilisés. Ce suivi a permis de calculer le plastochrone comme dans cet exemple : 10 métamères ont été formés en 30 jours, ce qui correspond à un plastochrone apparent de  $30/10 = 3$  jours.

#### 1.3.2 Mesure de l'allongement chez les plants témoins :

L'allongement des plants témoins a été calculé grâce à la mesure hebdomadaire de la longueur des axes. La longueur des axes a été mesurée de la base de l'axe jusqu'à l'apex, en excluant les feuilles. A la fin de l'essai, une valeur moyenne d'allongement a été calculé par famille, en cm/j.

#### 1.3.3 Notations des boutures et prélèvement des échantillons :

A chaque pincement, une bouture a été prélevée et un numéro unique lui a été assigné. Des boutures ont été choisies aléatoirement pour être notées, et les autres ont simplement été comptées pour chaque plant via le numéro unique assigné, puis jetées.

Les boutures sélectionnées ont été emballées dans un sac en papier kraft et placées dans une glacière. Une fois toutes les boutures prélevées, le tout a été rapporté au bureau, où la température était plus stable qu'à l'extérieur.

Les deux feuilles du métamère basal de la bouture ont été coupées et gardées. L'une a fait l'objet des mesures morphologiques suivantes : le nombre de métamères (`nb_folioles`), la longueur sans le pétiole (`longueur_feuille`) et la largeur (`largeur_feuille`) de l'une des deux feuilles ont été mesurées. La longueur (`longueur_foliole`) et la largeur (`largeur_foliole`) de la foliole terminale ont été mesurées également.

Un spectre proche infrarouge a été réalisé sur cette même feuille. L'entre-nœud au bas de la bouture (échantillon de tige) a été coupé et un spectre proche infrarouge a été pris. L'échantillon de tige a ensuite été placé dans un tube de 7 mL en plastique et plongé immédiatement dans de la glace. La préparation de la bouture (retirer les feuilles et couper l'entre-nœud au bas de la bouture) est résumée dans la figure 11 et des photographies de boutures sont présentées en figure 12.

La notation morphologique sur la bouture consistait à compter le nombre de folioles par feuille de l'apex (`nb_folioles_apex`) et à relever la longueur (`longueur_tige`) et les diamètres basaux de la tige. La section de tige étant ovale, deux diamètres, fin (`diametre`) et large (`diametre_large`), ont été mesurés.

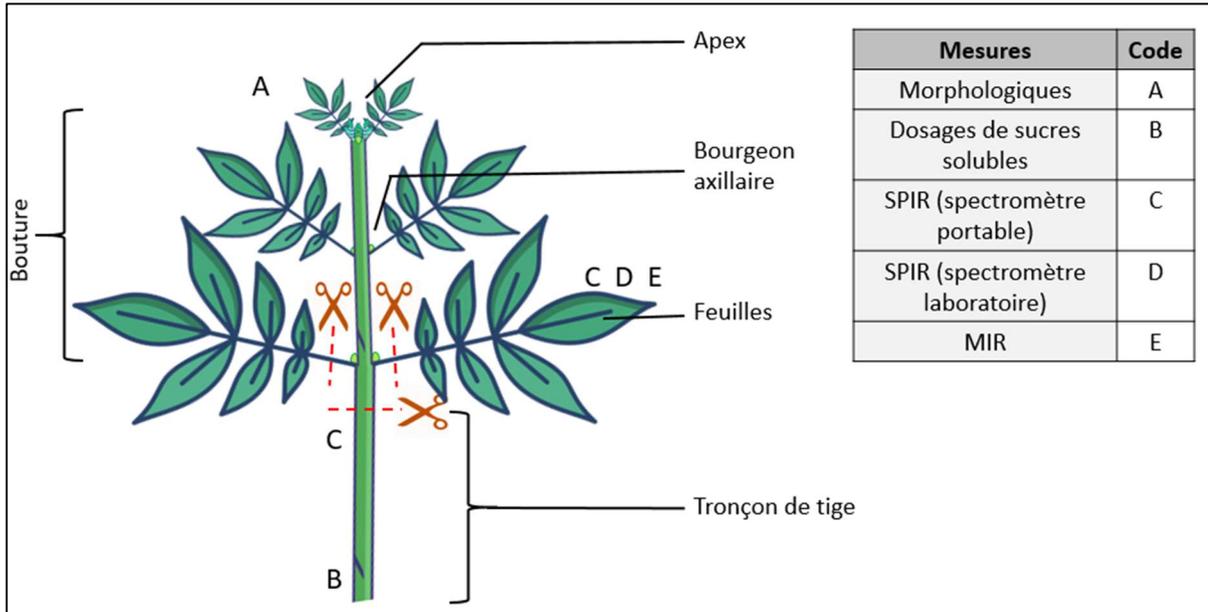


Figure 11 : Préparation des boutures, récupération des échantillons de feuilles et de tiges et synthèse des mesures effectuées. Communs aux deux expérimentations. Production personnelle.



A)



B)

Figure 12 : A) Un explant de l'expérimentation en serre avant préparation. B) Une bouture préparée de l'expérimentation en serre. Photographies prises le 04/06/2024 par Chloé RICHARD.

#### 1.3.4 Spectrométrie proche infrarouge portable :

Les analyses de spectrométrie proche infrarouge portable ont été réalisées en collaboration et avec les équipements de la plateforme Phénobois. La spectrométrie proche infrarouge (PIR) n'est pas explicative, elle ne permet pas de quantifier précisément des groupes de molécules. Cependant, son efficacité dans la mise en place de modèle de prédiction est très bonne, du fait de la complexité du spectre et de la redondance des informations qu'il contient. De plus, elle est peu coûteuse et peut se faire à l'aide d'un appareil de terrain, ce qui la rend utilisable chez les pépiniéristes. Les mesures sur tissus frais ont donc été faites à l'aide de l'appareil portable MicroNIR relié à un ordinateur avec le logiciel MicroNIR PRO. La gamme spectrale était de 908 à 1676 nm avec un pas de 6,2 nm.

Pour les mesures sur les feuilles des boutures, trois scans par feuille ont été réalisés sur les faces supérieures des trois dernières folioles. Le spectralon, utilisé pour réaliser le blanc de l'appareil, a été placé derrière les folioles pour standardiser les mesures. Les spectres pris sur les feuilles des plants témoins ont été réalisés sans détacher les feuilles du plant.

Pour la mesure sur la section de tige de bouture, une tranche de 0,5 mm d'épaisseur environ a été prélevée du côté proximal de l'échantillon de tige. Cette tranche a été déposée sur le spectralon et trois scans ont été réalisés du même côté de la section.

#### 1.3.5 Préparation des échantillons et matière sèche

Les échantillons de tige et de feuilles issus des boutures ont été emmenés au laboratoire et les feuilles ont été congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les tiges ont été pesées, découpées en tronçons de 2 mm environ, et congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons ont été lyophilisés pendant 50h à 0,770 mbar. Les tiges lyophilisées ont été pesées afin de connaître leur teneur en eau initiale (taux\_humidite).

#### 1.3.6 Spectrométrie proche et moyen infrarouge de laboratoire (PIR et MIR)

Les analyses de spectrométrie infrarouge de laboratoire ont été réalisées en collaboration et avec les équipements de la plateforme Phénobois. Les feuilles fraîches analysées avec l'appareil de spectrométrie PIR portable ont été de nouveau analysées en PIR, cette fois avec un appareil de laboratoire et sous forme de poudre. Cela permet des mesures plus standardisées et plus complètes avec une gamme spectrale plus large que sur le terrain. La prédiction est donc potentiellement meilleure. Afin de compléter l'analyse infrarouge, des spectres MIR ont été réalisés.

Les feuilles ont été broyées au broyeur à bille MM 400 de Retsch pendant 1 min à 30 Hz à l'aide d'une bille Retsch de 7 mm de diamètre, dans un tube Eppendorf de 5 mL. Juste après broyage, les échantillons ont été placés dans la même salle que les spectromètres. Les mesures ont été réalisées le lendemain afin de laisser le temps aux échantillons de s'équilibrer à l'ambiance de la pièce (température contrôlée de  $20^{\circ}\text{C}$  et hygrométrie contrôlée de 37%). Les échantillons pesant plus de 20 mg ont été analysés en PIR et MIR, et ceux avec une masse inférieure ont seulement été analysés en MIR, qui nécessite moins de matière que le PIR. Pour la PIR, les échantillons ont été placés dans des vials en verre de Perkin-Elmer et la mesure a été prise au travers de ce vial. Les spectres PIR ont été réalisés avec le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Frontier de Perkin-Elmer équipé de l'accessoire NIRA pour la prise de spectres proche infrarouge. Sa gamme spectrale était de 1000 à 2500 nm ( $10\,000$  à  $4\,000\text{ cm}^{-1}$  en nombre d'onde) avec un pas de 0,2 nm ( $2\text{ cm}^{-1}$  en nombre d'onde). Soixante-quatre scans ont été réalisés par échantillon. Les spectres MIR ont été pris avec le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Spectrum 400 de Perkin-Elmer équipé de l'accessoire Universal-ATR permettant la prise de spectres moyen infrarouge sur des échantillons en poudre. Sa gamme spectrale était de 2 500 à 15 385 nm ( $2\,500$  à  $650\text{ cm}^{-1}$  en nombre d'onde) avec un pas de 0,2 nm ( $2\text{ cm}^{-1}$  en nombre d'onde). Quatre scans ont été réalisés par échantillon.



Figure 13 : Boutures dans les godets de vermiculite en plaque. Photographie prise le 27/06/2024 par Chloé RICHARD.

M : mortes prématurément	A : pas de cal ni racine	D : racine
		
B : cal de cicatrisation	C : cal de prolifération	
		

Figure 14 : Echelle de notation de l'enracinement des boutures pour les deux expérimentations. Photographies prises par Chloé RICHARD.

### 1.3.7 Dosage des sucres solubles

Les dosages de sucres solubles ont été réalisés en collaboration et avec les équipements de la plateforme Phénobois. Le protocole d'extraction des sucres solubles à partir d'échantillons végétaux a été établi par Nathalie Boizot, adapté de Bonhomme et al., 2010. Le principe a consisté en des extractions éthanoliques à chaud successives, suivies d'une purification sur colonne charbon actif/poly(vinylpyrrolidone) pour éliminer les polyphénols extraits en même temps que les sucres.

En amont de l'extraction, des colonnes de purification ont été préparées. 200 mL de charbon actif ont été mélangés avec 200 mL d'éthanol à 80%, et laissés à sédimenter 16h à 4°C. Le même procédé a été appliqué en remplaçant le charbon actif par du poly(vinylpyrrolidone), ou PVPP. Le lendemain, après remise en suspension des solutions, 800 µL de solution de PVPP ont été ajoutés dans un corps de seringue de 2 mL. Une fois le liquide écoulé, 400 µL de solution de charbon actif ont été ajoutés. Les colonnes ont été stockées à 4°C avec le bout trempant dans de l'éthanol 80%.

Les fragments de tiges ont été broyés au broyeur à bille MM 400 de Retsch. Environ exactement 30 mg d'échantillon de tige ont été introduit dans un tube Eppendorf 2 mL. Si l'échantillon pesait moins de 30 mg, la totalité de l'échantillon a été analysée.

Une première extraction a été réalisée en ajoutant à chaque échantillon 1 mL d'éthanol 80% et 1 mL de solution à 0,75 mg/mL de galactose/éthanol 80%. Le galactose, absent des échantillons, a servi de témoin interne. Le tout a été incubé 30 min à 80°C avec une agitation de 900 rpm au ThermoMixer. Après centrifugation 5 min à 21 000 g, le surnageant a été transféré dans une colonne de purification. Le liquide s'est écoulé par gravité dans le tube collecteur. Une deuxième extraction a été effectuée en remettant le culot en suspension avec 1 mL d'éthanol 80% et en incubant à nouveau à 80°C à 900 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été versé sur la colonne après centrifugation. Enfin, une dernière extraction a été réalisée de la même façon. Une fois que le surnageant a été complètement élué, les tubes collecteurs ont été mis à concentrer à l'évaporateur sous-vide ThermoScientific SpeedVac SPD120 pendant 20 heures. Les tubes ont été bouchés et stockés à 4°C.

Les résidus secs ont été dilués dans 100 µL d'eau ultra pure pour les échantillons de masse sèche initiale inférieure à 10 mg, et dans 200 µL d'eau ultra pure pour les autres. Après une agitation de 30 minutes à 900 rpm, tout le liquide a été transféré sur une colonne de filtration Interchim SPIN 850 en PVDF, de porosité 0,45 µm. Le tout a été centrifugé 2 min 30 à 10 000 rpm pour faire passer le liquide au travers. 100 µL ont ensuite été déposés dans un vial en verre équipé d'un réducteur de volume. Les échantillons ont été analysés en HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) avec la chaîne HPLC VWR-HITACHI Chromaster couplée au détecteur DEDL afin de doser les sucres solubles présents. Les paramètres utilisés sont décrits en annexe 2. Les sucres présents et dosés dans l'échantillon ont été le stachyose, raffinose, saccharose, glucose, fructose, myo-inositol et le mannitol. Le galactose ajouté lors de l'extraction était absent des échantillons de tige, il a servi de témoin interne pour évaluer les pertes lors de l'extraction et corriger les doses de sucres mesurées. Afin de convertir l'aire des pics obtenus en masse de sucre, une solution mix des huit sucres a été préparée. Cette solution contenait 2 µg/µL de chaque sucre dosé. Pour obtenir des gammes étalons, 5, 10, 20, 30 et 40 µL de solution ont été injectés dans l'HPLC afin de doser respectivement 10, 20, 60 et 80 µg de chaque sucre.

### 1.3.8 Test d'enracinement des boutures

La bouture a été insérée dans un godet de vermiculite humide en plaque (fig. 13) dans une mini serre Stewart Premium. La mini serre a ensuite été placée en chambre de culture à 20°C, avec un éclairage d'environ 90 µmol/m<sup>2</sup>/s, 16h par jour. Une vaporisation manuelle d'eau a été réalisée régulièrement dans chaque mini-serre. Cinquante jours après la plantation des boutures, celle-ci ont été déterrées et observées. Une note d'enracinement a été attribuée à chaque bouture : A pour les boutures n'ayant produit ni cal ni racine, B pour celles présentant un cal de cicatrisation (petit cal), C pour les cals de prolifération (cal massif), et D pour la présence d'au moins une racine (fig. 14). Les boutures dépérissant avant la fin des 50 jours ont été retirées des mini-serres afin de limiter la propagation de ravageurs et maladies et ont été notées M pour la classe d'enracinement.



## 1.4 Traitement et analyses des données

Les effectifs de pied-mères étaient faibles, le nombre de boutures dans certaines classes d'enracinement l'étaient également, et les données ne suivaient pas la loi normale, il a donc été décidé de ne travailler qu'avec des tests non paramétriques. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel R Statistical Software (v4.4.1, R Core Team, 2021). La manipulation des tableaux (filtres, opérations) a été réalisée à l'aide des packages du « tidyverse » (v2.0.0, Wickam et al., 2019). Les packages complémentaires utilisés sont cités pour chaque analyse.

### Croissance des plants témoins

L'allongement et le plastochrone apparent de chaque famille des plants témoins de l'expérimentation plein champ ont été comparés à l'aide de tests de Kruskal-Wallis. Les différences ont été considérées comme significatives au seuil d'erreur de 5%. La médiane par famille a également été calculée (médiane de 6 valeurs d'accroissement et de plastochrone, puisque deux axes par plant ont été notés et que chaque famille comptait trois plants témoins).

### Calcul de la masse de sucres solubles

L'injection de la solution mix a permis d'obtenir des gammes étalons. Les aires des pics correspondants à chaque sucre ont été obtenues sur le chromatogramme. Un exemple de chromatogramme est donné en annexe 3. L'équation de droite de la gamme étalon a été utilisée pour calculer la masse de sucre injectée pour chaque échantillon à partir de l'aire des pics selon la formule suivante (1) :

$$m_i = \frac{A - b}{a} \quad (1)$$

Où «  $m_i$  » est la masse de sucre injectée en  $\mu\text{g}$ , «  $A$  » est l'aire du pic, «  $b$  » l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage et «  $a$  » la pente de cette droite d'étalonnage.

Cette masse de sucre contenue dans le volume d'injection a ensuite été rapportée par gramme de matière sèche de l'échantillon, selon cette équation (2) :

$$m = \frac{m_i * V_{rep}}{V_{inj} * m_e} \quad (2)$$

Où «  $m$  » est la masse de sucre en  $\mu\text{g}$  par mg de matière sèche de l'échantillon, «  $m_i$  » la masse de sucre injectée en  $\mu\text{g}$ , «  $V_{rep}$  » le volume d'eau utilisée pour la solubilisation des sucres extraits, «  $V_{inj}$  » le volume de la solution de sucre injecté dans l'HPLC et «  $m_e$  » la masse initiale de l'échantillon utilisé pour l'extraction.

Pour les échantillons où la valeur mesurée de galactose était inférieure à la valeur théorique, alors la masse de chaque sucre dosé a été corrigée selon la formule suivante (3) :

$$m_c = \frac{m * GalT}{GalD} \quad (3)$$

Où «  $m_c$  » est la masse de sucre corrigée en  $\mu\text{g}$  par mg de matière sèche de l'échantillon, «  $m$  » la masse de sucre non corrigée, «  $GalT$  » la masse de galactose théorique dans le volume injecté et «  $GalD$  » la masse de galactose dosée dans le volume injecté obtenu par la formule 1.



### **Approche morphologique**

Les corrélations entre variables morphologiques ont été calculés et représentés à l'aide du package « corrplot » (v0.92, Wei et Simko, 2021). Certaines variables fortement corrélées ont été retirées pour faciliter les analyses suivantes.

Les boxplots de chaque variable ont été tracés en fonction des trois facteurs étudiés (familles pour l'expérimentation plein champ, pincements pour l'expérimentation en serre, et classes d'enracinement pour les deux). La comparaison entre modalités de facteurs a été effectuée par des tests de Kruskal-Wallis et de Dunn, ou de Wilcoxon pour la comparaison des deux modalités de pincement. Les p-value des tests de Dunn ont été corrigées selon la méthode de Holm pour les comparaisons multiples deux à deux, et les différences ont été considérées comme significatives au seuil d'erreur de 5%. Les tests de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon ont été réalisés avec un package de base et ceux de Dunn avec le package « FSA » (v0.9.5, Ogle et al., 2023).

Des Analyses Factorielles Discriminantes (AFD) ont été réalisées sur l'ensemble des données morphologiques en discriminant par facteurs. L'AFD est une méthode descriptive, mais à la différence de l'Analyse en Composantes Principales (ACP), il s'agit d'une méthode supervisée qui cherche à maximiser les différences intergroupes. Elle est utilisée lorsque les groupes sont connus à l'avance, ce qui est le cas dans ces études. L'AFD crée des axes discriminants dont le nombre maximal est  $k-1$ , où  $k$  est le nombre de groupe dans le facteur étudié. Dans le cas de l'étude des deux modalités de pincements de l'expérimentation en serre, les AFD ne présentent donc qu'un seul axe discriminant, représenté en abscisse sur les graphiques. L'axe des ordonnées a été créé pour répartir les points aléatoirement sur cet axe et ainsi améliorer la lisibilité des graphiques. Il ne doit donc pas être pris en compte lors de l'interprétation des graphiques d'AFD ayant pour groupes discriminants les pincements. Les AFD ont été réalisées à l'aide du package « ade4 » (v1.7.22, Thioulouse et al., 2018).

### **Approche biochimique**

La médiane de chaque sucre soluble a été calculée pour chaque modalité des trois facteurs étudiés et ont toutes été représentées dans un diagramme en barres empilées. La teneur en eau a été représentée à part, par un boxplot. Les différences entre modalités de facteurs dans les teneurs en sucres et en eau ont été évalués de la même façon que pour l'approche morphologique avec les tests de Kruskal-Wallis ou de Wilcoxon et de Dunn.

Des AFD sur les teneurs en sucres solubles et en eau ont été réalisées de la même façon que pour l'approche morphologique.

Tous les graphiques des approches morphologiques et biochimiques ont été tracés avec le package « ggplot2 » (v3.5.1, Wickham, 2016), additionné dans certains cas du package « ggrepel » (v0.9.5, Slowikowski, 2024).

### **Approche spectrométrique**

Les spectres PIR récoltés au laboratoire et sur le terrain ont été traités avec sept prétraitements mathématiques. Ceux-ci ont servi à éliminer les bruits de fond, les perturbations environnementales et à faire ressortir certaines particularités des spectres afin de mieux les discriminer. Après cette étape, huit modalités spectrales ont ainsi été obtenues : « raw », les spectres bruts sans transformation, « snv » les données normalisées centrées-réduites pour minimiser d'éventuelles variations indésirables entre spectres, « msc » la méthode de correction multiplicative de la réflexion diffuse (multiplicative signal correction), « dt » l'opération de detrend qui permet d'enlever la tendance d'augmentation d'absorbance lorsque les nombres d'ondes diminuent, « der1 » dérivée première des données brutes, « der2 » dérivée seconde des données brutes, « snv\_der1 » dérivée première des données normalisées et « snv\_der2 » dérivée seconde des données normalisées (Bertrand et Dufour, 2006). Les huit modalités spectrales des spectres PIR pris avec l'appareil portable sur les feuilles fraîches des boutures de l'expérimentation plein champ sont présentés en annexe 4.



Des Analyses en Composantes Principales (ACP) pour chaque facteur ont été réalisées sur les huit modalités spectrales, à l'aide du package « ade4 » (v1.7.22, Thioulouse et al., 2018). Les individus hors normes ont été retirés.

A la suite des ACP, des modèles de prédiction ont été testés avec la méthode de la Partial Least Square pour les classes (PLS-DA). La prédiction de l'enracinement a été testée sur toutes les classes d'enracinement (M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine), et également sur les classes de survie, en fusionnant les classes A, B, C et D en une classe boutures arrivées à terme nommée T. La qualité de cette prédiction a été évaluée à l'aide d'une validation croisée et de l'édition d'une matrice de confusion. Tout d'abord, le jeu de données a été divisé aléatoirement entre un ensemble de données d'entraînement et un ensemble de données de test. La validation croisée sur les données d'entraînement a permis de calculer l'erreur moyenne de classification du modèle et de choisir le couple prétraitement et nombre de variables latentes de la PLS-DA qui minimisait cette erreur. Ces paramètres ont été utilisés pour la mise en place du modèle de prédiction. Ce modèle a produit deux matrices de confusion, une sur les données d'entraînement et une sur les données test. Ces matrices ont donné le résultat de la classification des données effectuée par la PLS-DA, ainsi que la précision de cette classification (comprise entre 0 et 1) et le coefficient Kappa associé. Ce coefficient compare la classification effectuée par le modèle à une classification au hasard. Un coefficient Kappa de 0 correspond à une répartition proche du hasard, et un Kappa de 1 correspond à une matrice sans aucune erreur. La matrice de confusion des données test a permis de vérifier la précision réelle du modèle sur des données qui n'ont pas servi à sa création.

Des régressions Partial Least Square (PLS-R) ont été réalisées afin d'évaluer la prédiction de la composition en sucres de la matière sèche de la tige des boutures par la spectrométrie. Après séparation du jeu de données en données d'entraînement et de test, la validation croisée a permis d'évaluer le modèle par le calcul du coefficient de régression ( $R^2$ ) et de l'erreur quadratique moyenne de prédiction (Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP). Le couple prétraitement des spectres et nombre de composantes de la PLS-R a été choisi de façon à maximiser le  $R^2$  et à minimiser la RMSEP d'entraînement. Le modèle créé a ensuite été testé sur l'ensemble test, ce qui a donné le  $R^2$  de test. La validation de la précision des modèles de prédiction a été réalisée à partir des  $R^2$  d'entraînement et de test, pour lesquels il a été défini la valeur seuil de 0,7 au-delà de laquelle la prédiction a été considérée comme significative, dans cette démarche exploratoire. Le package utilisé pour les PLS-DA et PLS-R a été « caret » (v6.0.94, Kuhn, 2008).

Les spectres MIR ont été restreints à la gamme spectrale de 5 555 à 12 500 nm ( $1800$  à  $800\text{ cm}^{-1}$ ) car il s'agit de la zone la plus riche en informations. Ils ont ensuite été analysés de la même façon que les spectres de PIR (Prétraitements, ACP, PLS-DA et PLS-R).



## 2 Résultats :

63,7% des boutures notées de l'expérimentation plein champ et 82,2% des boutures en serre ont été dégradées avant la fin des 50 jours d'enracinement par des larves de *Bradysia impatiens* (identification par barcoding). La classe d'enracinement des boutures mortes prématurément (M) a pris beaucoup d'ampleur. Ainsi les effectifs des autres classes ont été considérablement réduits, affectant les résultats des expérimentations. Quelques boutures ont également été touchées par des contaminations fongiques, qui restent néanmoins minoritaires.

### 2.1 Expérimentation plein champ :

#### 2.1.1 Influence de la famille sur les mesures morphologiques, biochimiques et spectrométriques

##### 2.1.1.1 Production de bouture et croissance

Les premières boutures ont été prélevées le 24 mai 2024 et les dernières le 27 juin 2024.

Au long des 34 jours de l'expérimentation plein champ, 462 boutures ont été prélevées. Parmi celles-ci, 179 boutures sélectionnées par échantillonnage aléatoire ont été notées. Au seuil d'erreur de 5%, le nombre de boutures produites par pied-mère n'est pas significativement différent entre les trois familles (test de Kruskal-Wallis, p-value = 0,84). En médiane, un pied-mère a produit 18 boutures en 34 jours (Tableau 5).

L'étude des plants témoins a conclu qu'il n'y avait pas non plus de différence significative d'allongement ou de plastochrone apparent entre les familles (test de Krukak-Wallis : p-value = 0,64 et p-value = 0,32). En médiane, les axes des plants s'allongeaient de 1 cm/j, et un nouveau métamère était formé (apparition d'une nouvelle paire de feuille) au bout de 6,6 jours (Tableau 6).

Tableau 5 : Nombre de boutures produites au cours de l'expérimentation plein champ (durée : 34 jours).

Famille	Nombre médian de boutures par pied-mère	Nombre total de boutures produites	Nombre total de boutures notées
45x21	14,5	154	55
45x31	22,5	168	59
6x8	18	140	65
Total	18	462	179

Tableau 6 : Allongement et plastochrone médian des plants témoins de l'expérimentation plein champ.

Famille	Allongement médian (cm/j)	Plastochrone médian (j)
45x21	1,3	5,7
45x31	1	6,6
6x8	0,9	8,2
Total	1	6,6

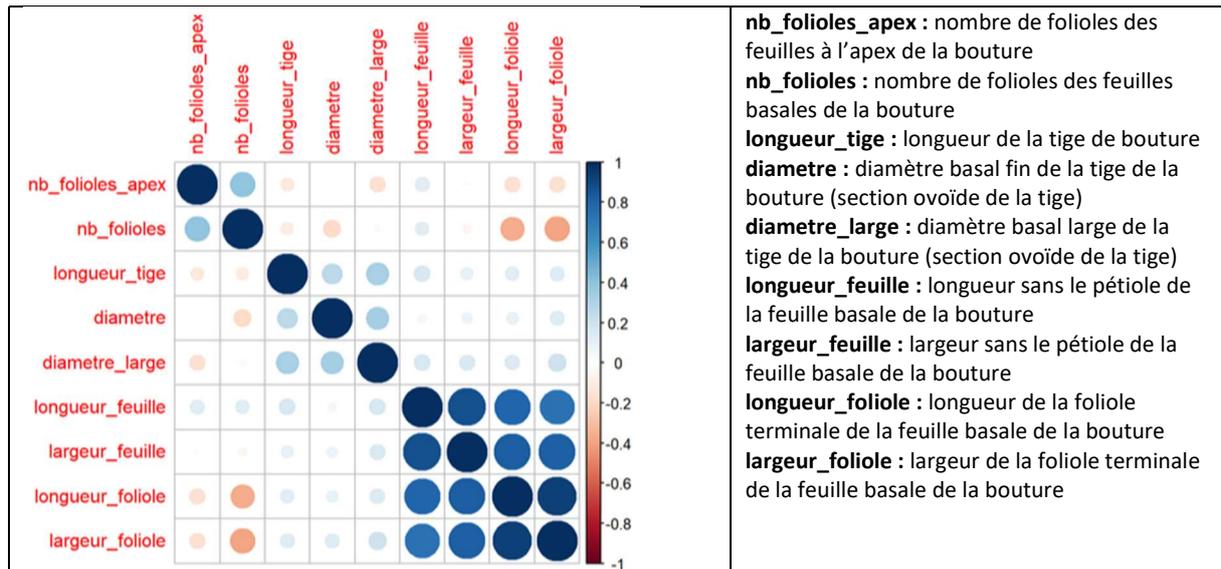


Figure 15 : Expérimentation plein champ. Corrélations entre les mesures morphologiques.

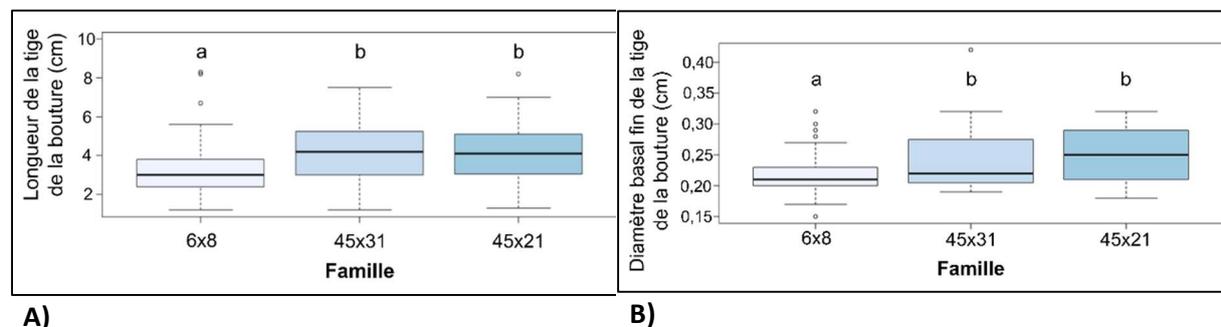


Figure 16 : Expérimentation plein champ. Boxplots des mesures morphologiques présentant des différences significatives entre familles (6x8, 45x31, 45x21). Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres. A) Longueur de la tige de la bouture en cm (longueur\_tige). B) Diamètre basal fin de la tige de la bouture en cm (diametre).

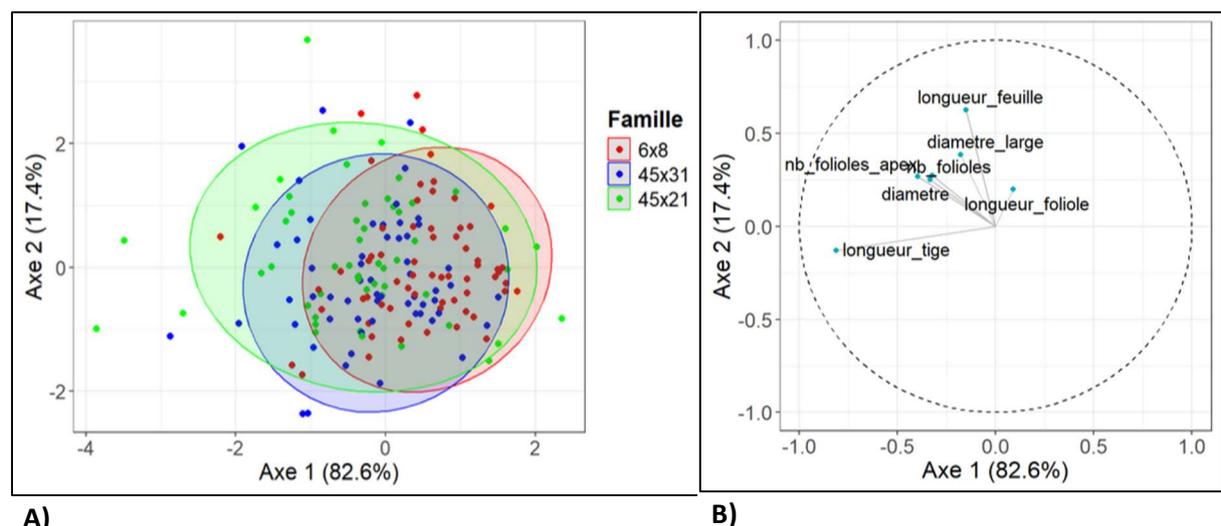


Figure 17 : Expérimentation plein champ. AFD des données morphologiques discriminées selon la famille. A) Représentation des individus sur les axes 1 et 2 de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des familles (6x8, 45x31, 45x21). B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.1.1.2 Approche morphologique :

De nombreuses corrélations significatives ont été observées entre caractères morphologiques, et particulièrement la longueur de la feuille avec sa largeur, et la longueur de la foliole avec sa largeur. Ces quatre mesures étant très proches, seules les longueurs de la feuille et de la foliole ont été gardées pour la suite des analyses (fig. 15).

Au seuil d'erreur de 5%, les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn ont montré que les tiges des boutures de la famille 6x8 étaient significativement moins longues et avec un diamètre basal fin plus petite que les deux autres familles (fig. 16). Les autres données morphologiques n'ont pas montré de différence significative.

Cependant, l'effet « famille » du plant n'affecte pas suffisamment les caractéristiques morphologiques relevées au cours de cette expérimentation pour que cela apparaisse dans une AFD (fig. 17, A). L'ellipse de la famille 45x31 est contenue presque entièrement dans celle de la famille 45x21, indiquant des caractéristiques morphologiques similaires. Les variables ayant un poids important dans le placement des points de l'AFD sont la longueur de la tige de la bouture et la longueur de la feuille basale de la bouture (fig. 17, B)

D'après l'AFD, il n'y a pas d'effet « famille » fort et significatif sur les variables morphologiques qui nécessiterait d'être pris en compte dans la suite des analyses. L'étude des classes d'enracinement a donc été réalisée sur le jeu de données complet, familles confondues.

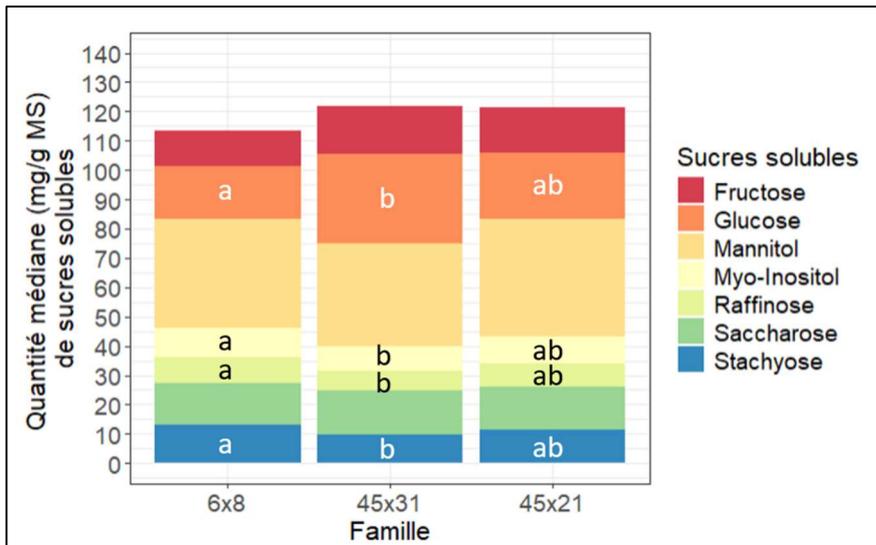


Figure 18 : Expérimentation plein champ. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) dosées par HPLC dans les tiges prélevées sous les boutures en fonction des familles des pied-mères : 6x8, 45x31 et 45x21. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres (*p*-values corrigées par la méthode de Holm). L'absence de lettre indique la non-significativité des différences au seuil d'erreur de 5%.

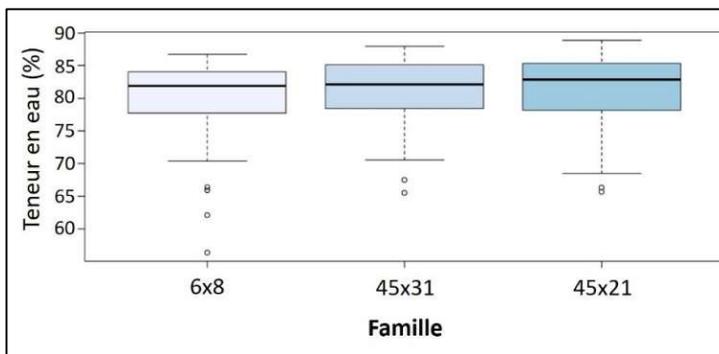


Figure 19 : Expérimentation plein champ. Boxplot de la teneur en eau dans les tiges des boutures en fonction des familles des pied-mères : 6x8, 45x31 et 45x21. Aucune différence significative observée au seuil d'erreur de 5% (test de Kruskal-Wallis).

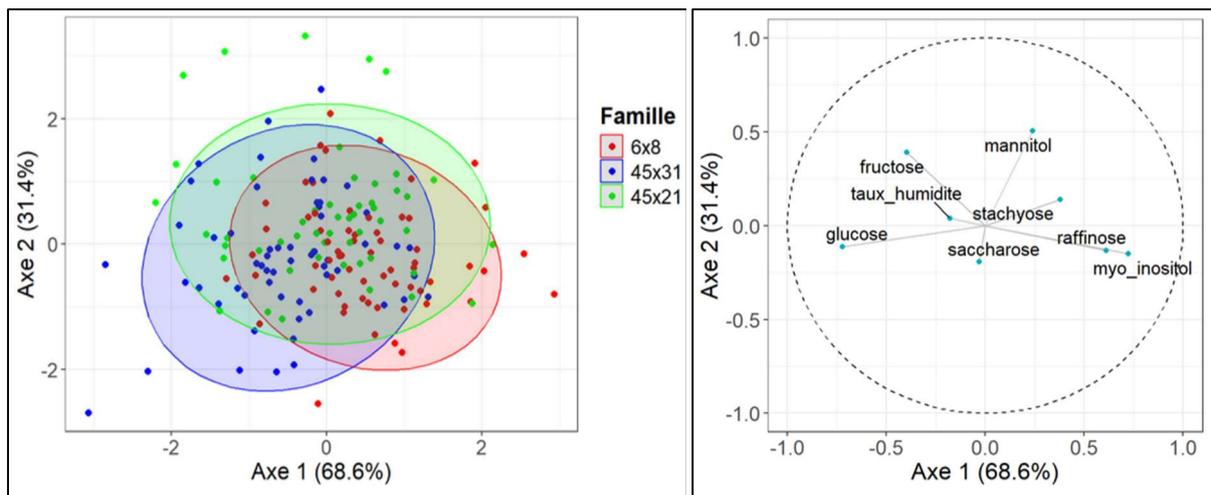


Figure 20 : Expérimentation plein champ. AFD des données biochimiques discriminées selon la famille. A) Représentation des individus sur les axes 1 et 2 de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des familles (6x8, 45x31, 45x21). B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.1.1.3 Approche biochimique :

Le sucre soluble majoritaire dans les boutures de l'expérimentation plein champ était le mannitol. Le myo-inositol et le raffinose étaient présents en plus petite quantité dans les échantillons (fig. 18).

Les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn ont montré que les quantités de sucres solubles totaux étaient équivalents entre familles. Des différences significatives de quantités au seuil d'erreur de 5% ont néanmoins été observées pour certains sucres (fig. 18). Les tiges des boutures issues de la famille 45x31 présentaient moins de stachyose, de raffinose et de myo-inositol, et une plus grande quantité de glucose que celles issues de la famille 6x8. Aucune différence dans les teneurs en eau des boutures des trois familles n'a été observée (fig. 19).

Des zones de la représentation de l'AFD sont occupées par des points d'une seule famille (fig. 20, A). Les variables ayant le plus influencé le placement des points sont le mannitol, le myo-inositol, le raffinose et le glucose (fig. 20, B). Néanmoins, la majorité des points sont compris dans les ellipses de confiance à 95% des trois familles. Comme pour les données morphologiques, l'AFD sur les mesures biochimiques n'a pas montré de fortes différences entre familles. Le jeu de données biochimique a donc été utilisé entièrement, toutes familles confondues dans l'étude des classes d'enracinement.

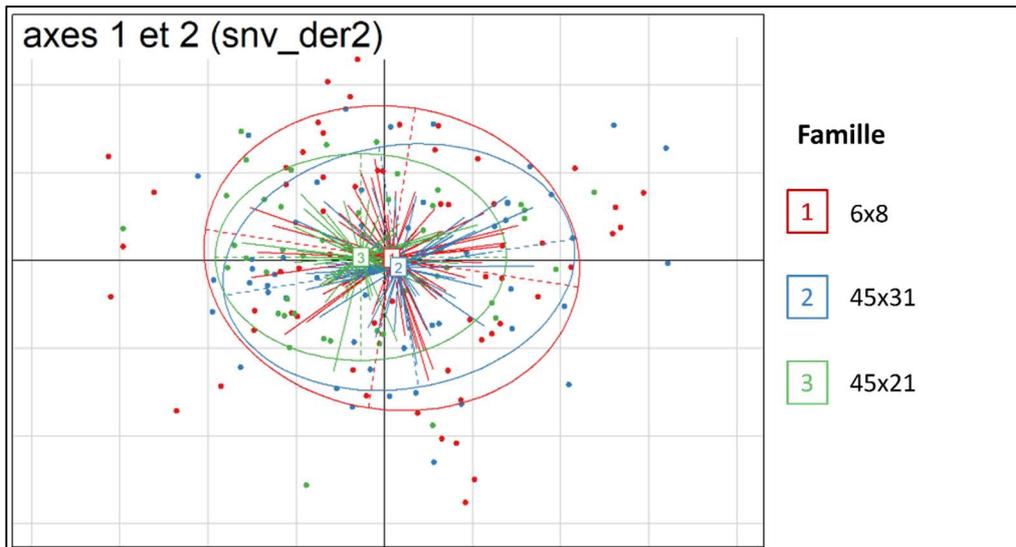


Figure 21 : Expérimentation plein champ. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres PIR de laboratoire (proche infrarouge). Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement snv\_der2. Ellipses de confiance à 95%.

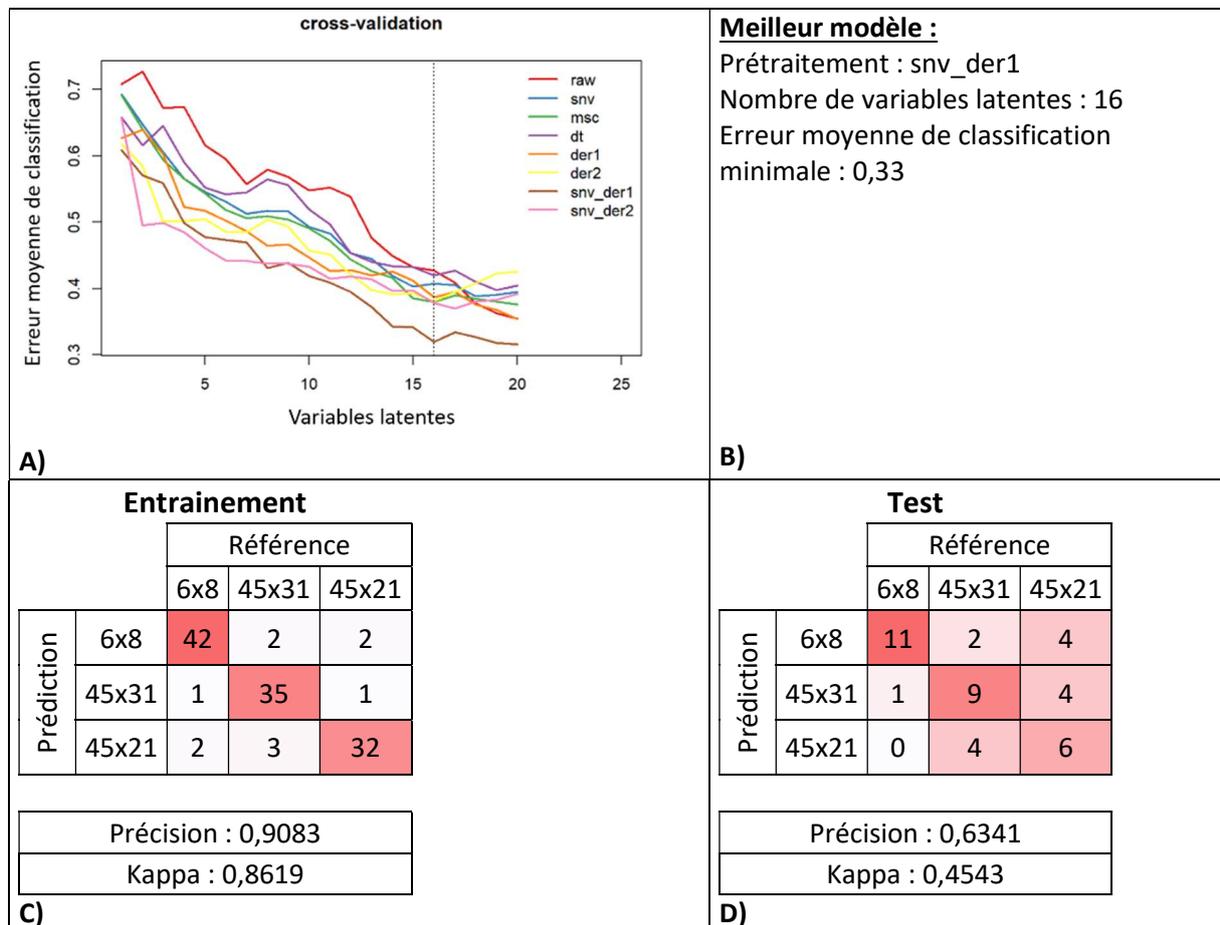


Figure 22 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres PIR de laboratoire, pour la prédiction des familles des pied-mères : 6x8, 45x31, 45x21. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. A) Validation croisée. B) Paramètres du meilleur modèle de prédiction obtenus par la validation croisée. C) Matrice de confusion sur le jeu de données d'entraînement, calculée grâce au meilleur modèle. D) Matrice de confusion sur le jeu de données de test, calculée grâce au meilleur modèle.

#### 2.1.1.4 Approche spectrométrique :

Aucune ACP sur les données brutes ou prétraitées de spectrométrie proche et moyen infrarouge n'a séparé fortement les trois familles. La figure 21 présente en exemple l'une de ces ACP, sur les spectres PIR. En conséquence, le jeu de données complet, familles confondues, et tous les prétraitements de spectres ont été utilisés pour l'analyse de l'enracinement des boutures.

En revanche, les analyses PLS-DA sur ces mêmes spectres MIR et PIR ont tout de même permis de discriminer les familles. Les trois types de spectres PIR, acquis par l'équipement portable sur feuilles et tige et laboratoire sur feuilles, conduisent à des résultats similaires. L'analyse en PLS-DA des spectres PIR de laboratoire est donnée en figure 22. L'erreur moyenne de classification de la validation croisée diminue avec l'augmentation des variables latentes, jusqu'à atteindre la valeur minimale de 0,33 avec 16 variables latentes et le prétraitement « snv ». La précision de la matrice de confusion sur le jeu d'entraînement est très élevée (0,9), alors que celle sur le jeu de test est moins convaincante (0,6) (fig. 22).

L'étude des spectres MIR a produit une meilleure matrice de confusion que les spectres PIR, avec une précision élevée (>0,9) et un coefficient Kappa supérieur à 0,8 pour le jeu de données d'entraînement comme pour le jeu de test (fig. 23). Cette prédiction très précise a été obtenue en choisissant le prétraitement des spectres « msc » qui maximisait les différences dues aux familles.

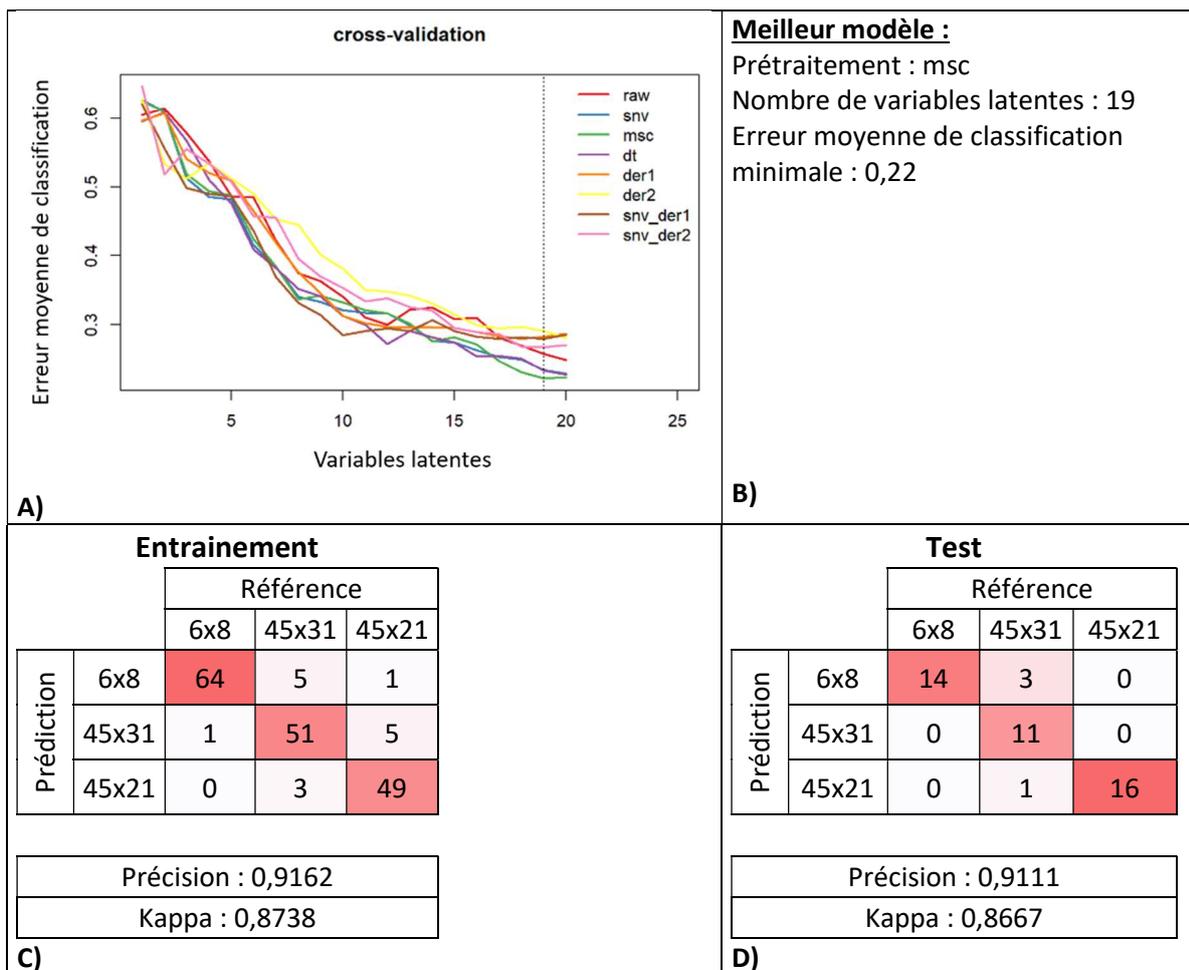


Figure 23 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres MIR de laboratoire, pour la prédiction des familles des pied-mères : 6x8, 45x31, 45x21. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. A) Validation croisée. B) Paramètres du meilleur modèle de prédiction obtenus par la validation croisée. C) Matrice de confusion sur le jeu de données d'entraînement, calculée grâce au meilleur modèle. D) Matrice de confusion sur le jeu de données de test, calculée grâce au meilleur modèle.

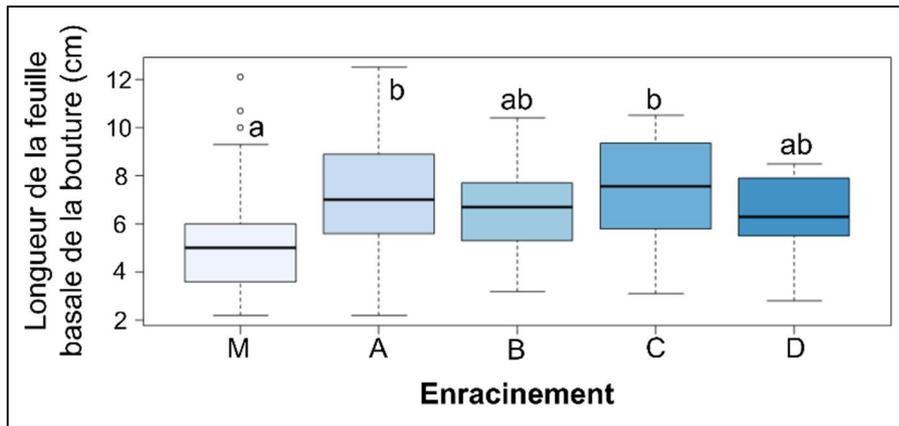
## 2.1.2 Prédiction de l'enracinement des boutures

### 2.1.2.1 Effectifs et influence de la famille sur l'enracinement :

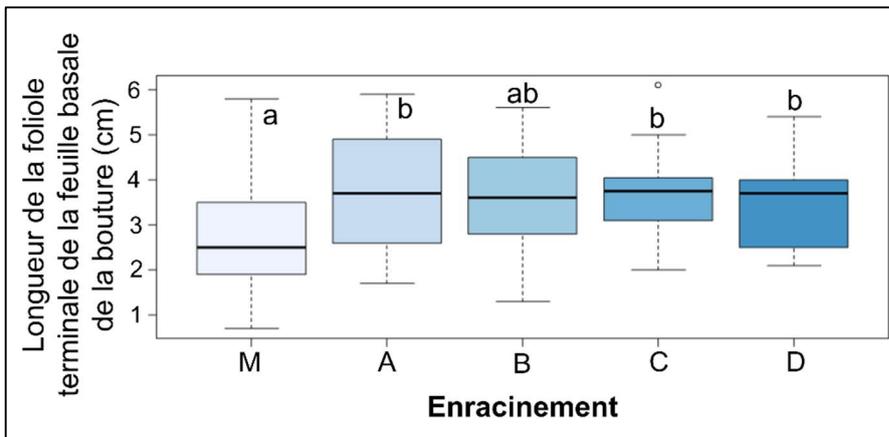
Le pourcentage de boutures racinées est calculé sur les boutures arrivées à terme car il est impossible de savoir ce que seraient devenues les boutures mortes prématurément en l'absence du ravageur (Tableau 7). Le meilleur taux d'enracinement est atteint par la famille 45x31, avec 27,8% d'enracinement des boutures arrivées à terme, mais aucune influence significative de la famille n'a été mise en avant par le test du  $\chi^2$  (p-value = 0,9).

Tableau 7 : Expérimentation plein champ. Enracinement des boutures. M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine.

Famille	Boutures mortes prématurément (M)	Boutures arrivées à terme (T)				Nombre total de bouture	Pourcentage de boutures arrivées à terme racinées
	M	A	B	C	D		
6x8	42	5	4	8	6	65	26
45x31	41	3	4	6	5	59	27,8
45x21	31	6	6	6	6	55	25
Total	114	14	14	20	17	179	

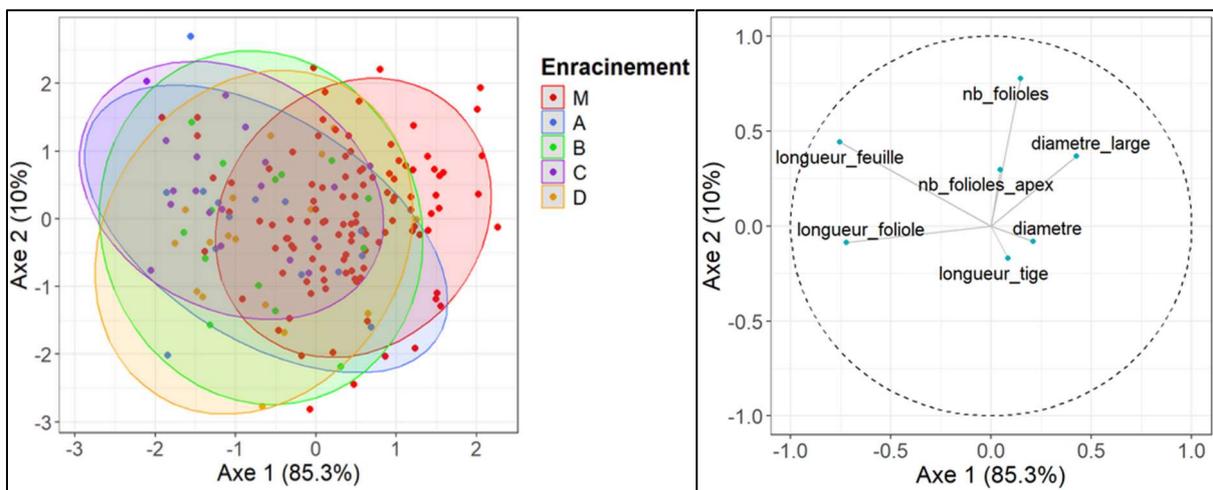


A)



B)

Figure 24 : Expérimentation plein champ. Boxplots des mesures morphologiques présentant des différences significatives entre les classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres. A) Longueur de la feuille basale de la bouture en cm (longueur\_feuille). B) Longueur de la foliole terminale de la feuille basale de la bouture en cm (longueur\_foliole)



A)

B)

Figure 25 : Expérimentation plein champ. AFD des données morphologiques discriminées selon l'enracinement. A) Représentation des individus sur les axes 1 et 2 de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.1.2.2 *Approche morphologique :*

L'analyse variable par variable par les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn ont permis de mettre en avant des différences entre classes d'enracinement. Au seuil d'erreur de 5%, les boutures mortes prématurément (M) avaient des feuilles moins longues que les boutures n'ayant formé ni cal ni racine (A), et que celles ayant formé un cal de prolifération (C) (fig. 24, A). Elles avaient également une foliole terminale moins longue que ces mêmes boutures et que celles ayant formé des racines (D) (fig. 24, B).

L'AFD des données morphologiques n'a pas discriminé toutes les classes d'enracinement les unes des autres. L'ellipse des boutures ayant formé un cal de prolifération (C) est incluse dans celles n'ayant formé ni cal ni racine (A) (fig. 25, A). La même observation peut être faite sur les boutures ayant produit des racines (D) et celles ayant formé un cal de cicatrisation (B). Les boutures mortes prématurément se distinguent des autres classes. La variable la plus responsable de cet éloignement semble être le diamètre large de la tige (fig. 25, B). Les autres variables ayant un poids fort dans l'AFD sont la longueur et le nombre de folioles de la feuille basale de la bouture, la longueur de la foliole terminale de cette même feuille.

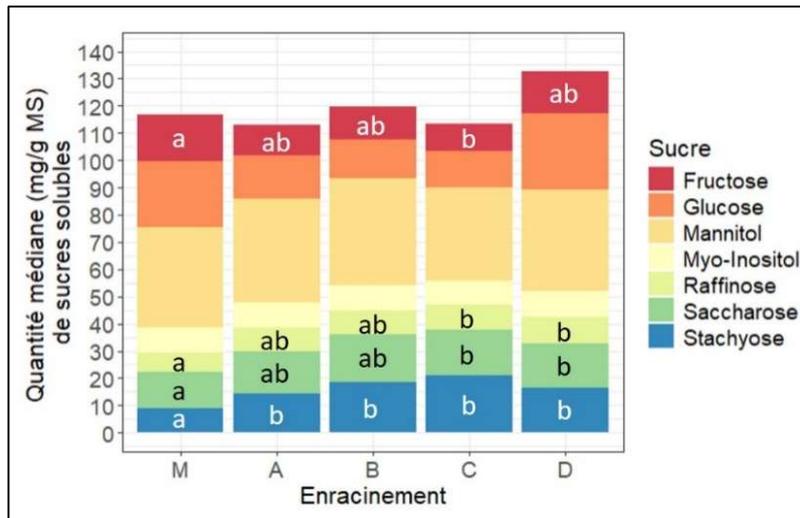


Figure 26 : Expérimentation plein champ. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) dosées par HPLC dans les tiges prélevées sous les boutures en fonction des classes d'enracinement de celles-ci : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres (*p*-values corrigées par la méthode de Holm). L'absence de lettre indique la non-significativité des différences au seuil d'erreur de 5%.

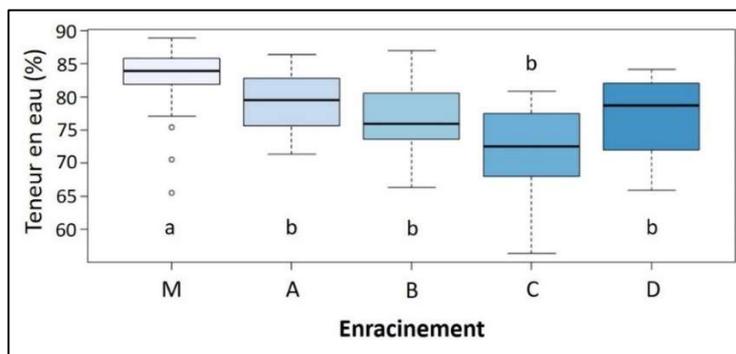


Figure 27 : Expérimentation plein champ. Boxplot de la teneur en eau dans les tiges des boutures en fonction des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres.

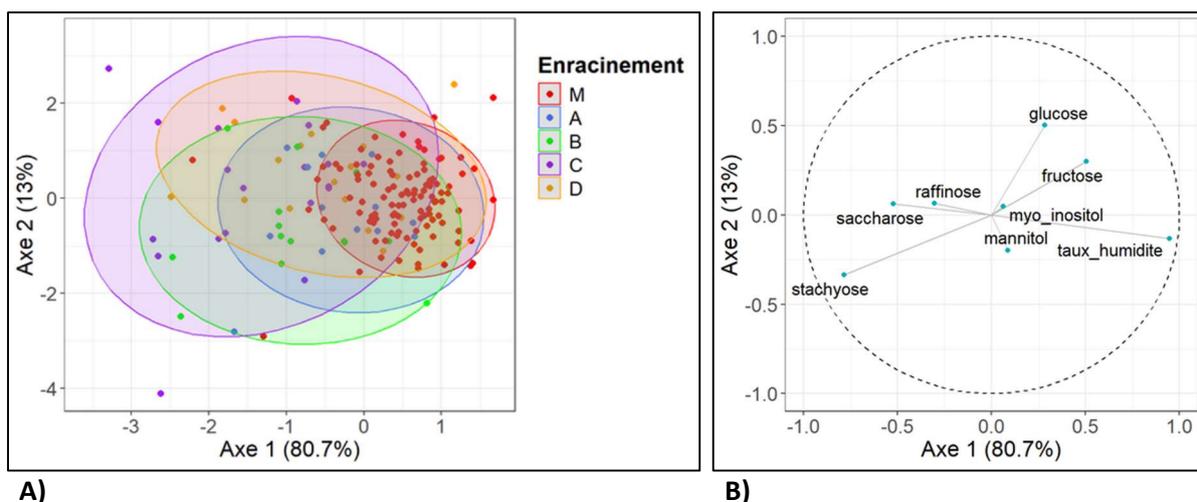


Figure 28 : Expérimentation plein champ. AFD des données biochimiques discriminées selon l'enracinement. A) Représentation des individus sur les axes 1 et 2 de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.1.2.3 Approche biochimique :

L'analyse individuelle de chaque sucre révèle des différences significatives au seuil de 5% entre les classes d'enracinement. Les boutures mortes prématurément (M) avaient une quantité plus faible de stachyose que les boutures arrivées à terme (A, B, C et D) (fig. 26). Elles possédaient également moins de saccharose et de raffinose que les boutures ayant formé un cal de prolifération (C) ou des racines (D), et présentaient à l'inverse une quantité plus élevée de fructose que les boutures ayant formé un cal de prolifération (C). La teneur en eau de ces boutures mortes prématurément était significativement plus élevée que celles des boutures arrivées à terme (fig. 27).

L'AFD des données biochimiques ne montre pas de différence entre les classes d'enracinement des boutures arrivées à terme (A, B, C, et D) (fig. 28). Néanmoins, les boutures mortes prématurément (M) se distinguent à nouveau des boutures arrivées à terme.

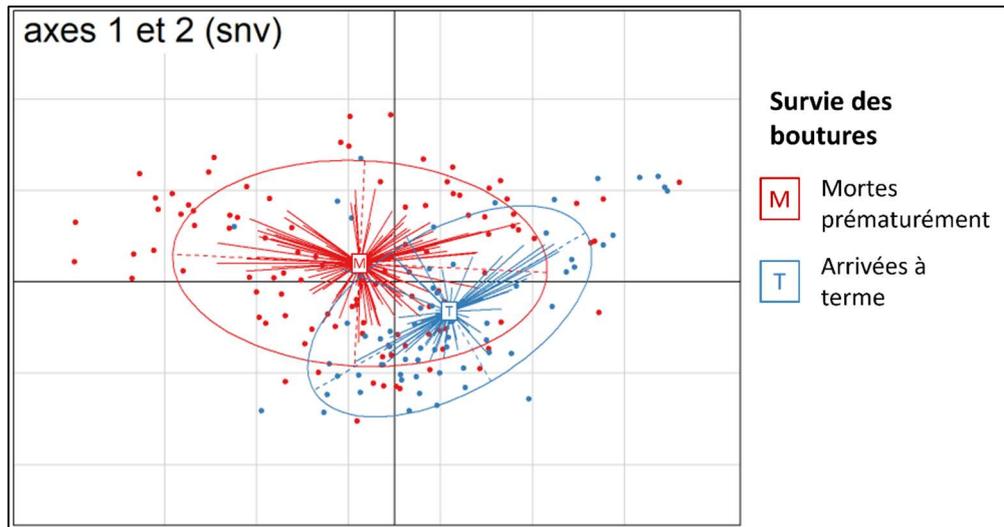


Figure 29 : Expérimentation plein champ. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres de PIR (proche infrarouge) portable. Spectres mesurés sur les feuilles fraîches du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement snv. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes de survie des boutures : M = mortés prématurément, T = arrivées à terme.

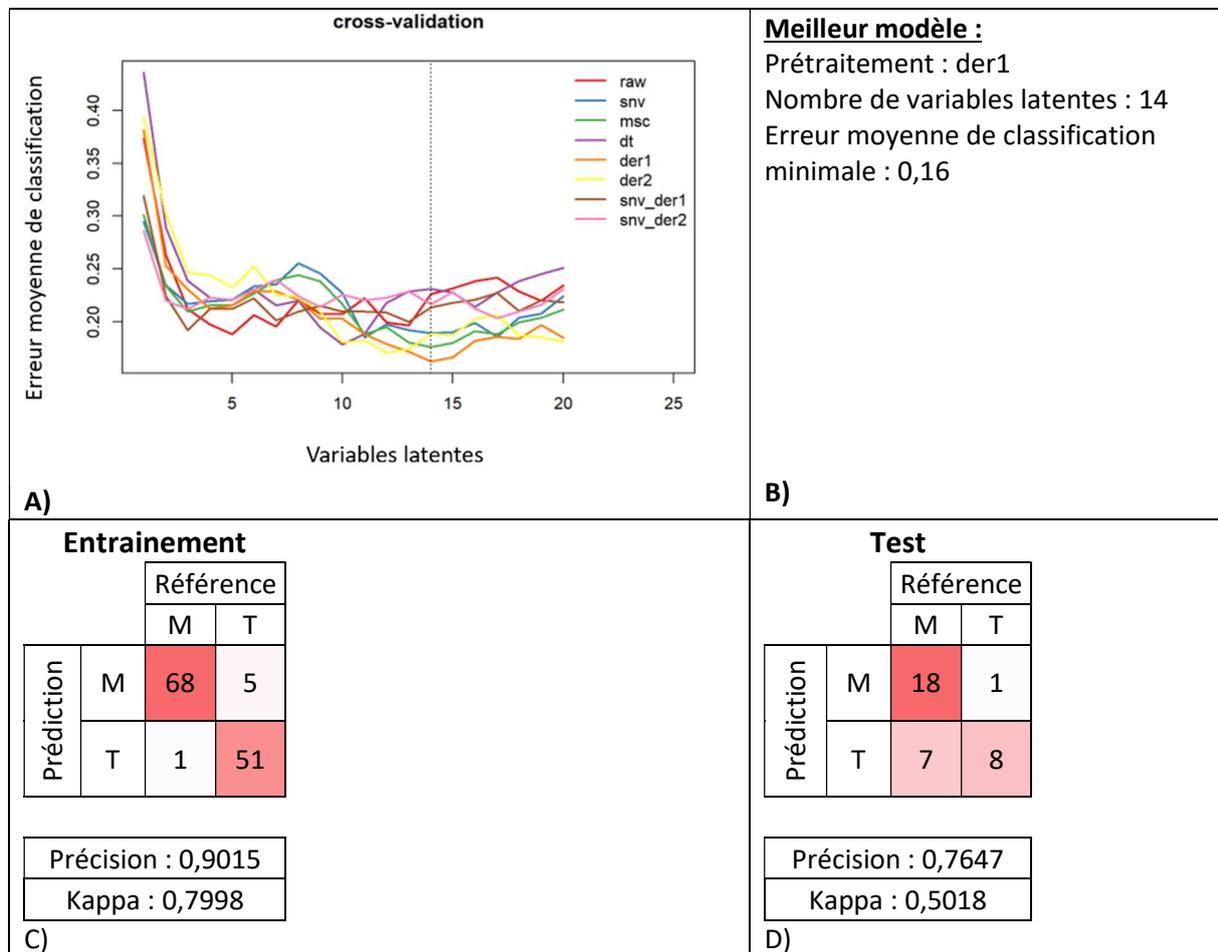


Figure 30 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres de PIR (proche infrarouge) portable, pour la prédiction des classes de survie des boutures : M = mortés prématurément, T = arrivées à terme. Spectres mesurés sur les feuilles fraîches du bas des boutures. A) Validation croisée. B) Paramètres du meilleur modèle de prédiction obtenus par la validation croisée. C) Matrice de confusion sur le jeu de données d'entraînement, calculée grâce au meilleur modèle. D) Matrice de confusion sur le jeu de données de test, calculée grâce au meilleur modèle.

#### 2.1.2.4 Approche spectrométrique :

Aucune ACP ou PLS-DA en spectrométrie PIR n'a été capable de différencier les classes d'enracinement des boutures arrivées à terme. En revanche, en regroupant les 4 classes de boutures arrivées à terme, une séparation en ACP et PLS-DA a été observée entre les boutures mortes prématurément et toutes les boutures arrivées à terme. Les spectres PIR de tige acquis avec l'appareil portable ont présenté des différences moins visibles entre ces classes de survie que les autres méthodes spectrométrie PIR.

La figure 29 présente une des ACP séparant les deux groupes d'enracinement, obtenue avec le PIR portable sur feuille et le prétraitement « snv ». Les ellipses de confiance des deux groupes se recouvrent en partie, indiquant une confusion des caractéristiques spectrométriques. Néanmoins, les centres des groupes sont distincts, et de nombreux points ne sont compris que dans une ellipse. Cette distinction des groupes est confirmée par la PLS-DA (fig. 30) effectuée sur ces mêmes données, prétraitées cette fois avec « der1 ». La validation croisée d'entraînement atteint la valeur minimale d'erreur moyenne de classification (0,16) lorsque 14 variables latentes sont prises en compte. Les matrices de confusion parviennent à classer les boutures avec une précision de 0,9 (kappa = 0,79) sur le jeu d'entraînement, et une précision de 0,76 (kappa = 0,5) sur le jeu de test.

Les acquisitions en MIR ont également permis de distinguer les boutures mortes prématurément des boutures arrivées à terme en ACP (fig. 31) et PLS-DA (fig. 32). Les quatre classes d'enracinement des boutures arrivées à terme sont restées inséparables. Les valeurs de kappa et de précision sont plus faibles, mais valident tout de même la capacité de la MIR à discriminer les boutures mortes prématurément (précision de 0,78 et Kappa de 0,34 sur le jeu de test).

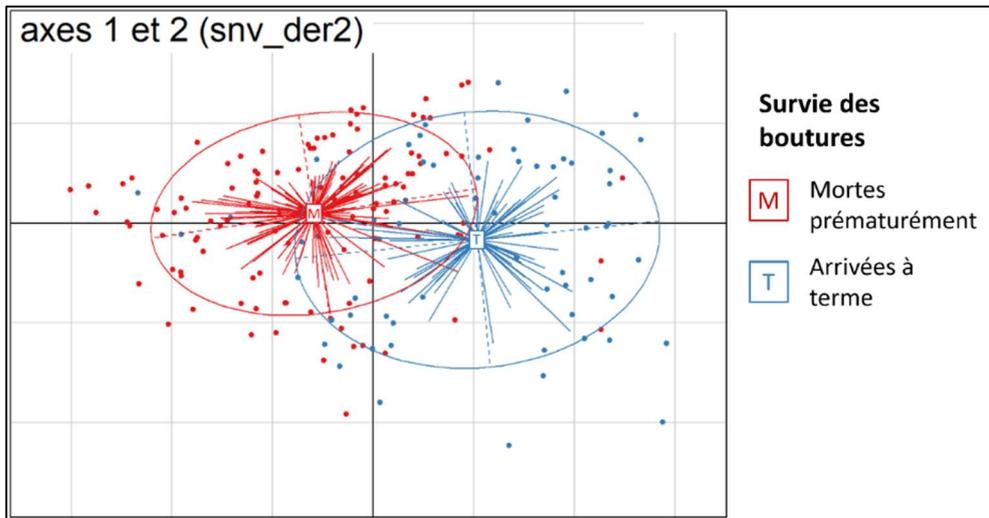


Figure 31 : Expérimentation plein champ. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres de MIR (moyen infrarouge). Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement snv\_der2. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, T = arrivées à terme.

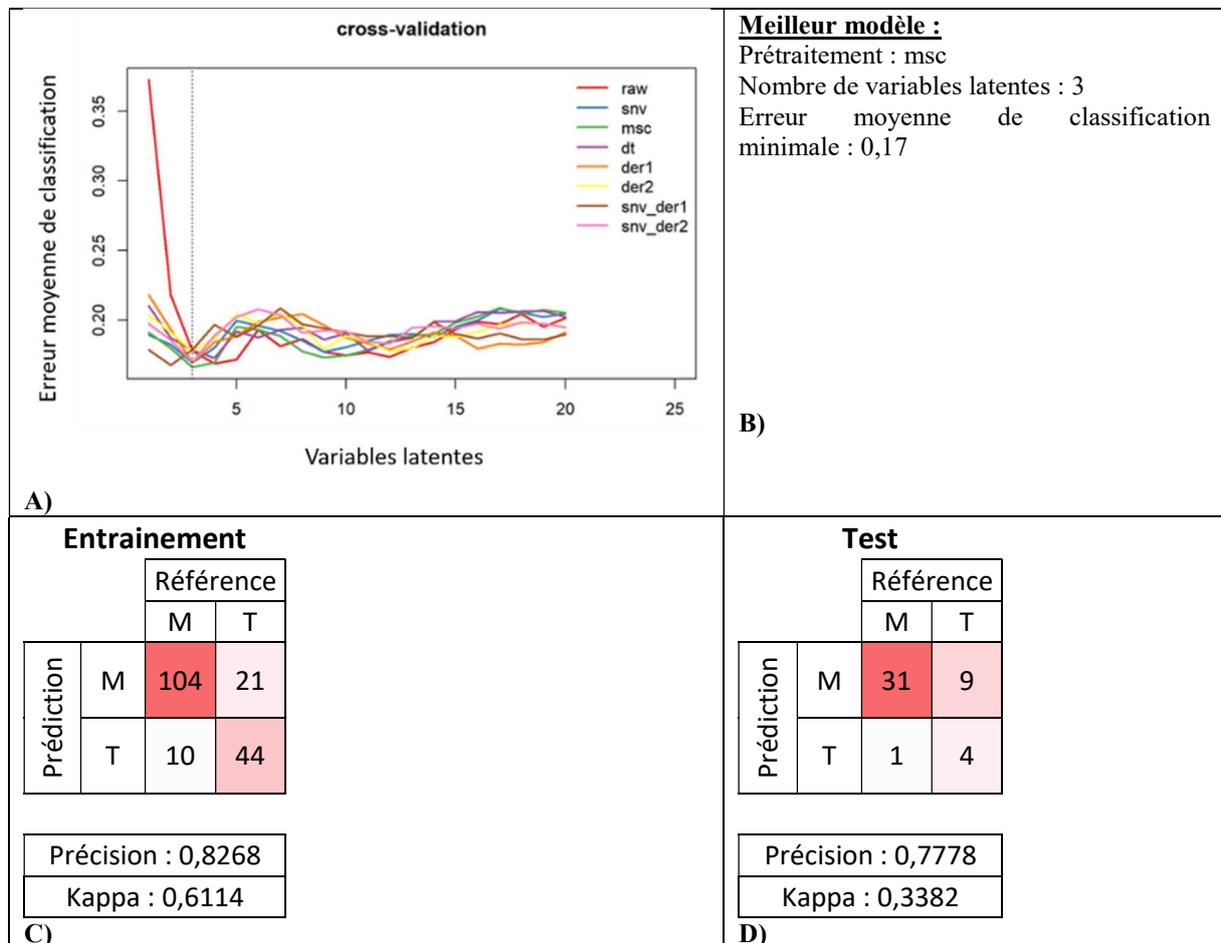


Figure 32 : Expérimentation plein champ. PLS-DA sur les spectres de MIR (moyen infrarouge), pour la prédiction des classes de survie des boutures : M = mortes prématurément, T = arrivées à terme. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. A) Validation croisée. B) Paramètres du meilleur modèle de prédiction obtenus par la validation croisée. C) Matrice de confusion sur le jeu de données d'entraînement, calculée grâce au meilleur modèle. D) Matrice de confusion sur le jeu de données de test, calculée grâce au meilleur modèle.

## 2.2 Expérimentation en serre :

### 2.2.1 Influence des pincements sur les mesures morphologiques, biochimiques et spectrométriques

Les premières boutures ont été récoltées le 27 mai 2024 et les dernières le 27 juin 2024, soit une expérimentation d'une durée de 31 jours. Quelques jours après le début de l'expérimentation, deux plants appartenant à la modalité pincement à 1 métamère ont flétri sans raison apparente, entraînant ainsi l'arrêt de leur croissance. Deux plants de cette même modalité ont été touchés par des acariens.

#### 2.2.1.1 Production de boutures

Au total, 84 boutures ont été récoltées au cours de ces 31 jours, et 73 ont été échantillonnées et notées. Le nombre moyen de boutures produites par pied-mère est difficile à estimer pour les plants pincés à un métamère, car seulement trois d'entre eux ont pu croître de façon optimale. En médiane, ces trois plants ont produit chacun 9 boutures au cours des 31 jours. La médiane sur les sept plants de la modalité est de 4 boutures (Tableau 8). Les tests de Kruskal-Wallis ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative de nombre de boutures produites entre les plants des deux modalités de pincement, que tous les plants soient considérés ou seulement ceux dont la croissance au cours de l'essai a été optimale (respectivement p-value = 0,17 et p-value = 0,4).

Tableau 8 : Boutures produites au cours de l'expérimentation en serre (durée : 31 jours).

Pincement	Nombre médian de boutures par pied-mère	Nombre total de boutures produites	Nombre total de boutures notées
1 métamère	4	33	26
2 métamères	7	51	47
Total	5,5	84	73

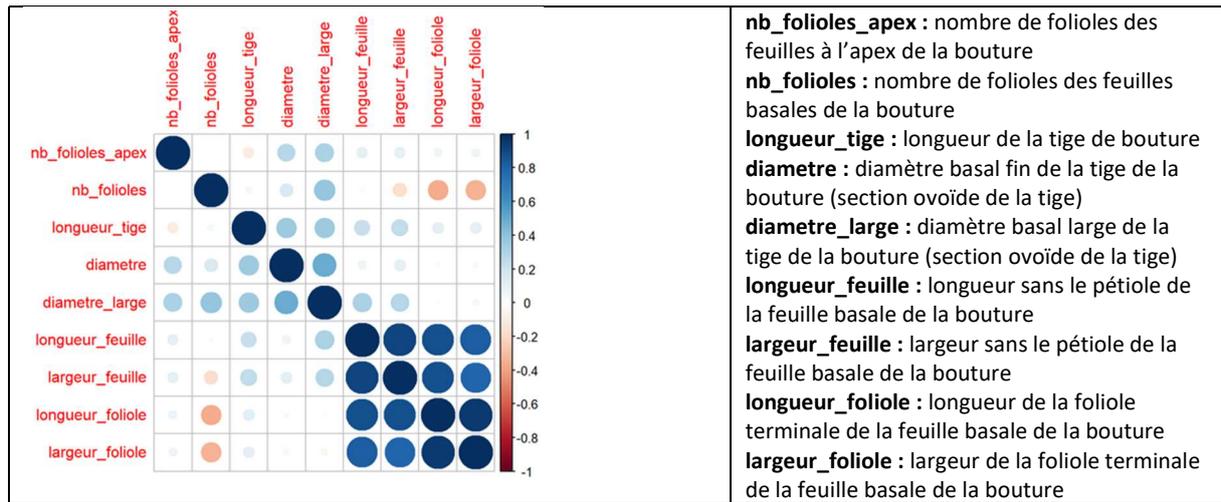


Figure 33 : Expérimentation en serre. Corrélations entre les mesures morphologiques.

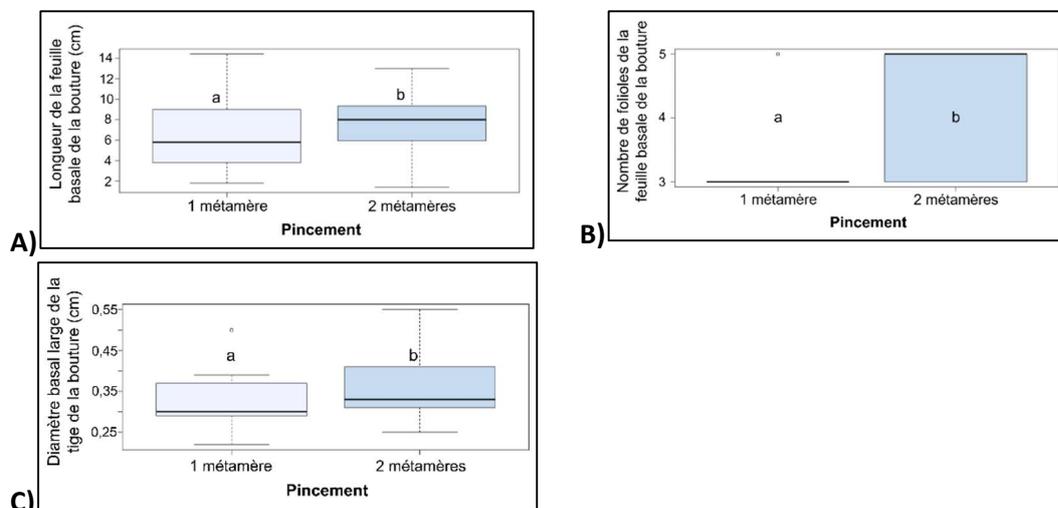


Figure 34 : Expérimentation en serre. Boxplots des mesures morphologiques présentant des différences significatives entre les modalités de pincement des pied-mères : 1 ou 2 métamères. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres. A) Longueur de la feuille basale de la bouture en cm (longueur\_feuille). B) Nombre de folioles de la feuille basale de la bouture (nb\_foliole). C) Diamètre basal maximal de la tige de la bouture (diametre\_large).

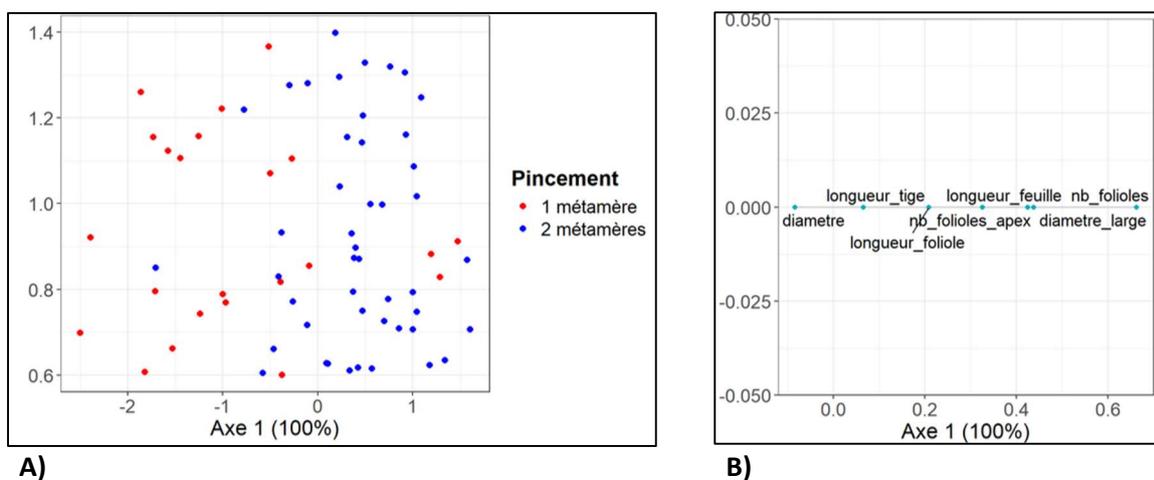


Figure 35 : Expérimentation en serre. AFD des données morphologiques discriminées selon le pincement appliqué. A) Représentation des individus sur l'axe discriminant de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des modalités de pincement (pincement à 1 métamère et pincement à 2 métamères). B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.2.1.2 *Approche morphologique :*

Des corrélations entre mesures morphologiques ont également été observées dans l'expérimentation en serre (fig. 33). A nouveau, la largeur et la longueur des feuilles ainsi que la largeur et la longueur de la foliole terminale sont fortement corrélées. Dans la suite des analyses, la largeur des feuilles et celle de la foliole terminale ne seront donc pas utilisés.

Des différences significatives au seuil d'erreur de 5% ont été observées entre les deux modalités de pincement. Les boutures issues des plants pincés à un métamère avaient des feuilles basales moins longues et un nombre de folioles plus faible que celles issues des plants pincés à deux métamères (fig. 34, A et B). Le diamètre large de la tige de ces boutures était également plus faible (fig. 34, C). Le diamètre fin, qui est pourtant l'une des variables les plus discriminante en AFD ne présente pas de différence significative entre modalités d'après le test de Wilcoxon.

Les individus des deux modalités de pincement sont séparés sur l'AFD (fig. 35, A). Les variables les plus discriminantes sont le diamètre fin de la tige et le nombre de folioles de la feuille basale de la bouture (fig. 35, B). Malgré l'influence apparente des modalités de pincement sur les mesures morphologiques, les données ont tout de même été utilisées dans leur ensemble pour l'étude de l'enracinement afin de ne pas réduire les effectifs déjà faibles.

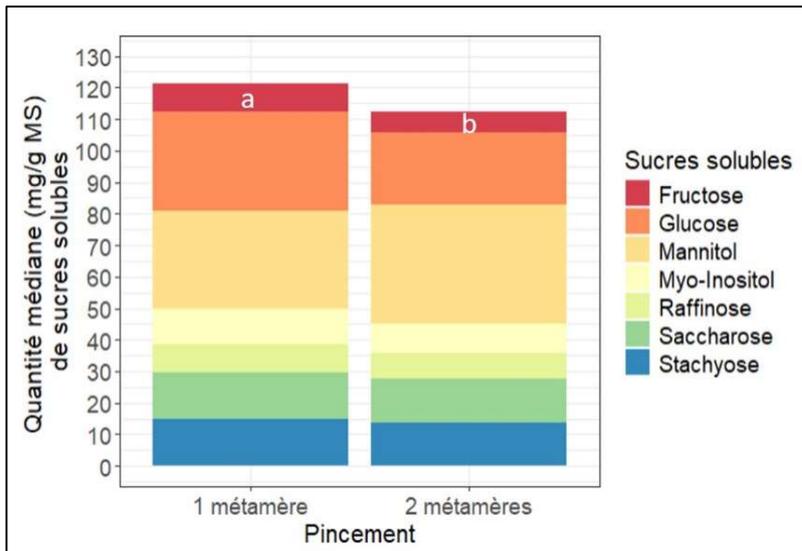


Figure 36 : Expérimentation en serre. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) dosées par HPLC dans les tiges prélevées sous les boutures en fonction des modalités de pincement des pied-mères : 1 ou 2 métamères. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec le test de Kruskal-Wallis sont indiqués par des lettres (p-values corrigées par la méthode de Holm). L'absence de lettre indique la non-significativité des différences au seuil d'erreur de 5%.

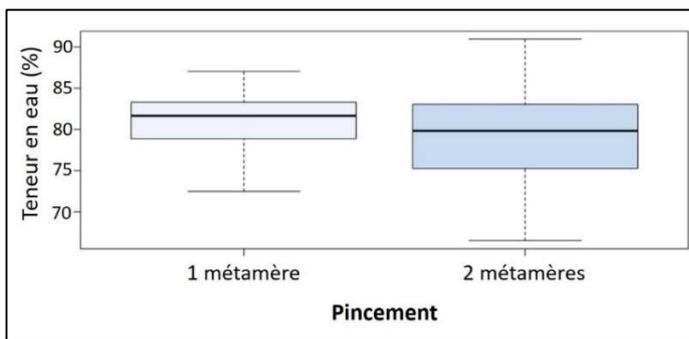


Figure 37 : Expérimentation en serre. Boxplot de la teneur en eau dans les tiges des boutures en fonction des modalités de pincement des pied-mères : 1 ou 2 métamères. Aucune différence significative observée au seuil d'erreur de 5% (test de Kruskal-Wallis).

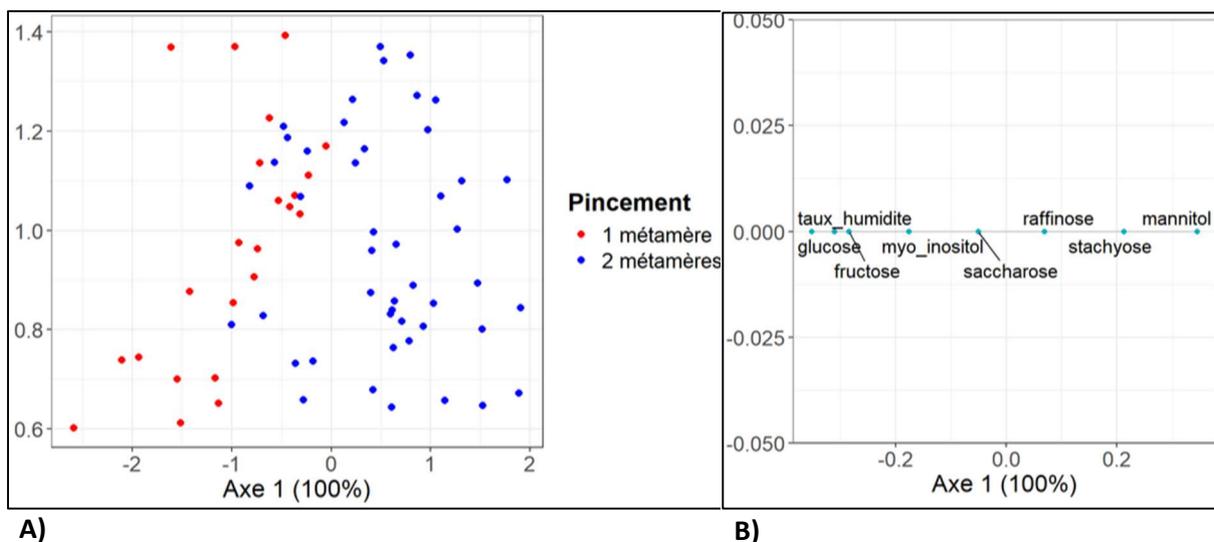


Figure 38 : Expérimentation en serre. AFD des données biochimiques mesurées discriminées selon le pincement appliqué. A) Représentation des individus sur l'axe discriminant de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des modalités de pincement (pincement à 1 métamère et pincement à 2 métamères). B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.2.1.3 *Approche biochimique :*

Au seuil d'erreur de 5%, les boutures prélevées sur les plants pincés à un métamère présentaient des taux de fructose significativement plus élevés que celles prélevées sur les plants taillés à deux métamères (fig. 36). Aucune différence dans les quantités des autres sucres solubles, dans les quantités totales de sucres solubles, et dans la teneur en eau entre les deux modalités de pincement n'a été observée (fig. 37).

Les données biochimiques ont permis à l'AFD de séparer les modalités de pincement (fig. 38, A). Le mannitol et le glucose sont les sucres ayant le plus participé à la discrimination de l'AFD (fig. 38, B). Comme pour les données morphologiques, malgré l'influence des pincements sur les mesures biochimiques, le jeu de données a été analysé dans sa totalité par la suite à cause des faibles effectifs.

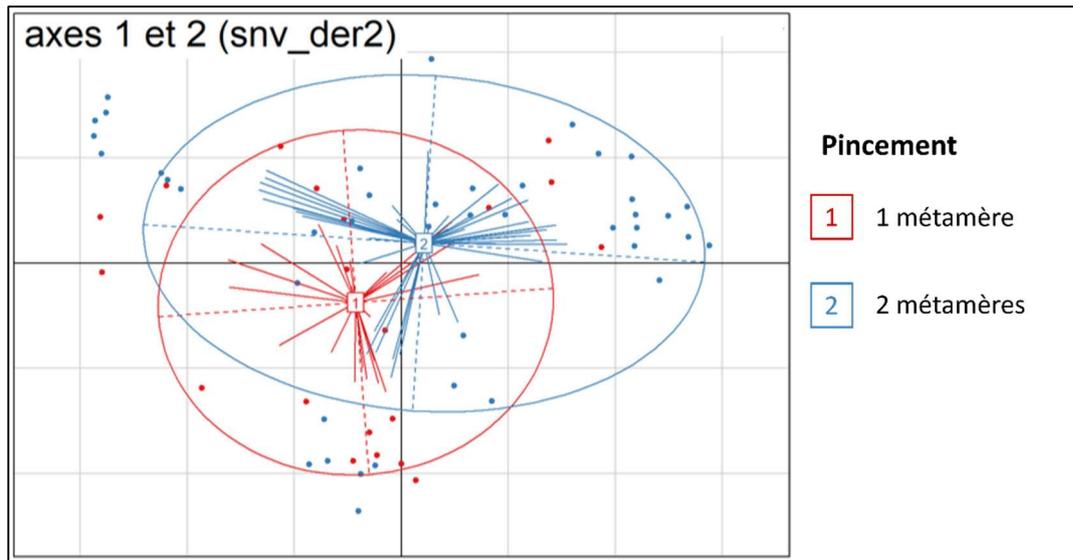


Figure 39 : Expérimentation en serre. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres de PIR (proche infrarouge) laboratoire. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement snv\_der2. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des modalités de pincement.

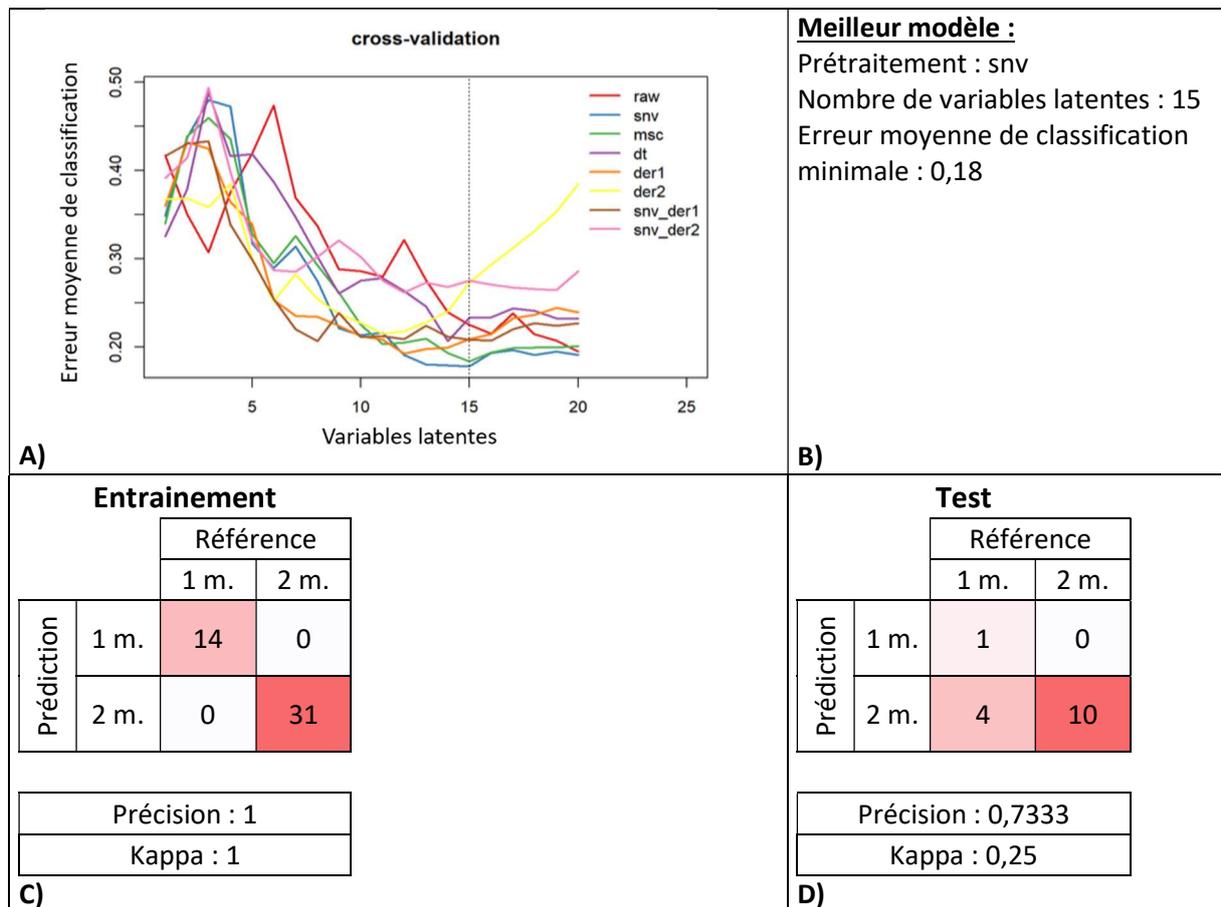


Figure 40 : Expérimentation en serre. PLS-DA sur les spectres de PIR (proche infrarouge) laboratoire, pour la prédiction des modalités de pincement des pied-mères : 1 m. = pincement à 1 métamère, 2 m. = pincement à 2 métamères. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. A) Validation croisée. B) Paramètres du meilleur modèle de prédiction obtenus par la validation croisée. C) Matrice de confusion sur le jeu de données d'entraînement, calculée grâce au meilleur modèle. D) Matrice de confusion sur le jeu de données de test, calculée grâce au meilleur modèle.

#### 2.2.1.4 Approche spectrométrique :

Comme pour l'expérimentation plein champ, les trois méthodes de PIR ont produit des ACP et PLS-DA similaires, avec les spectres PIR portable sur tiges présentant les PLS-DA et les ACP séparant le moins les groupes. L'ACP des spectres PIR de laboratoire montre que les deux modalités de pincement ne sont pas totalement confondues mais restent proches, quel que soit le prétraitement (fig. 39).

La PLS-DA effectuée à la suite de cette ACP a montré une très bonne séparation des deux modalités de pincement sur le jeu d'entraînement : la valeur minimale d'erreur moyenne de classification de la validation croisée est de 0,18 et est atteinte avec 15 variables latentes et le prétraitement « snv » (fig. 40). La matrice de confusion d'entraînement ne montre aucune erreur de classification (précision et kappa de 1). La matrice de confusion de test classe en revanche quasiment toutes les boutures dans la modalité deux métamères (précision de 0,73 et Kappa de 0,25) mais cela est certainement dû aux faibles effectifs déséquilibrés entre classes.

Les analyses des spectres en MIR sont cohérentes avec les spectres PIR. Les modalités de pincement ne sont pas séparées en ACP mais le sont en PLS-DA (fig. 41 et fig. 42). Contrairement au PIR, la matrice de confusion du jeu de données test est aussi précise que celle du jeu de données d'entraînement (Précision du jeu de données d'entraînement = 0,96 ; du jeu de données test = 1).

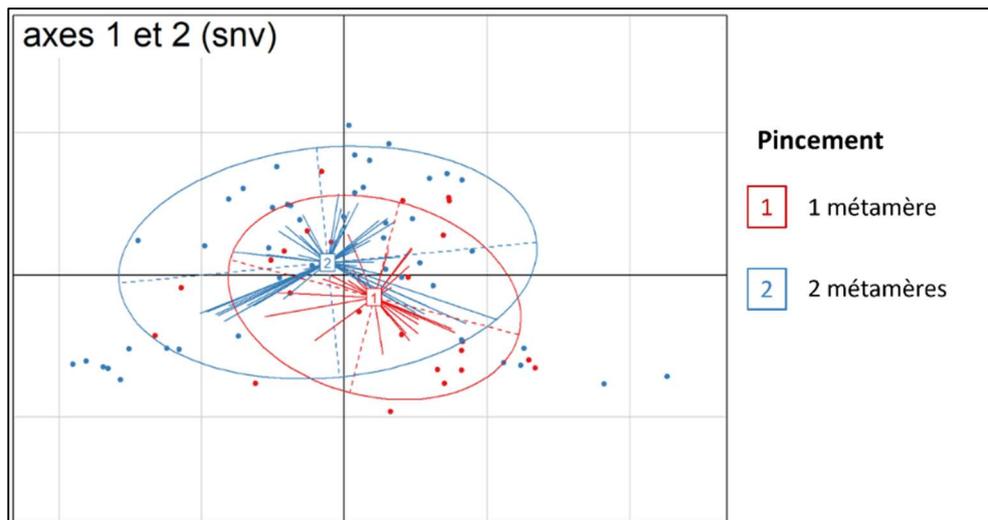


Figure 41 : Expérimentation en serre. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres de MIR (moyen infrarouge). Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement snv. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des modalités de pincement : 1 = pincement à un métamère, 2 = pincement à deux métamères.

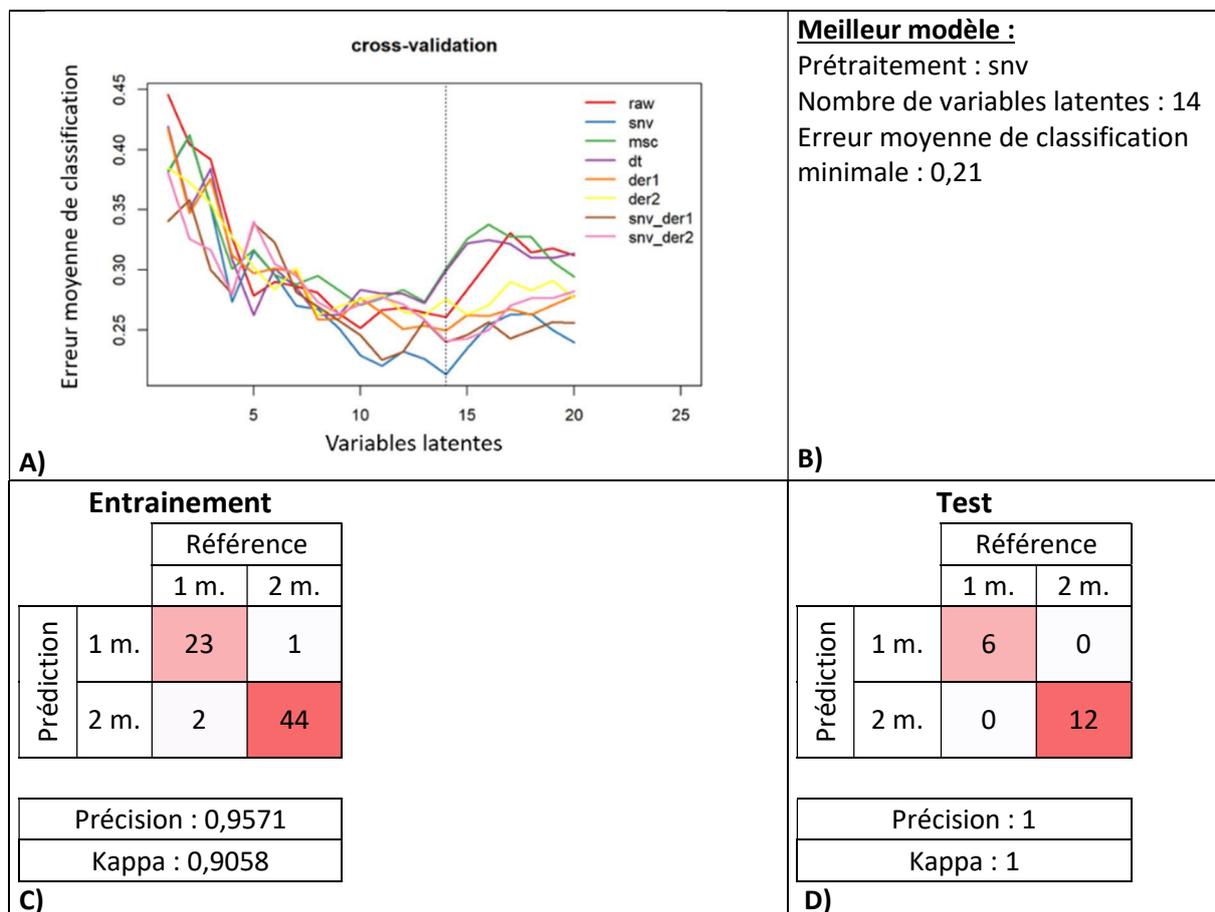


Figure 42 : Expérimentation en serre. PLS-DA sur les spectres de MIR (moyen infrarouge) laboratoire, pour la prédiction des modalités de pincement des pied- mères : 1 m. = pincement à 1 métamère, 2 m. = pincement à 2 métamères. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. A) Validation croisée. B) Paramètres du meilleur modèle de prédiction obtenus par la validation croisée. C) Matrice de confusion sur le jeu de données d'entraînement, calculée grâce au meilleur modèle. D) Matrice de confusion sur le jeu de données de test, calculée grâce au meilleur modèle.

## 2.2.2 Prédiction de l'enracinement des boutures

### 2.2.2.1 Effectifs et influence du pincement sur l'enracinement :

82,2% des boutures ont été dégradées avant les 50 jours d'enracinement. Les effectifs de cet essai étaient donc très faibles et les analyses de données n'ont pas pu toutes être effectuées. Les boutures arrivées à terme prélevées sur les plants pincés à deux métamères se sont enracinées à 25%, tandis qu'aucune bouture issue des plants pincés à un métamère ne s'est enracinée (Tableau 9). Le test du Khi2 a montré que le pincement n'avait pas eu d'effet sur l'enracinement des boutures (p-value = 0,181)

Tableau 9 : Expérimentation en serre. Enracinement des boutures. M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine.

Pincement	Boutures mortes prématurément	Boutures arrivées à terme				Nombre total de bouture	Pourcentage de boutures arrivées à terme racinées
	M	A	B	C	D		
1 métamère	21	4	0	1	0	26	0
2 métamères	39	1	3	2	2	47	25
Total	60	5	3	3	2	73	

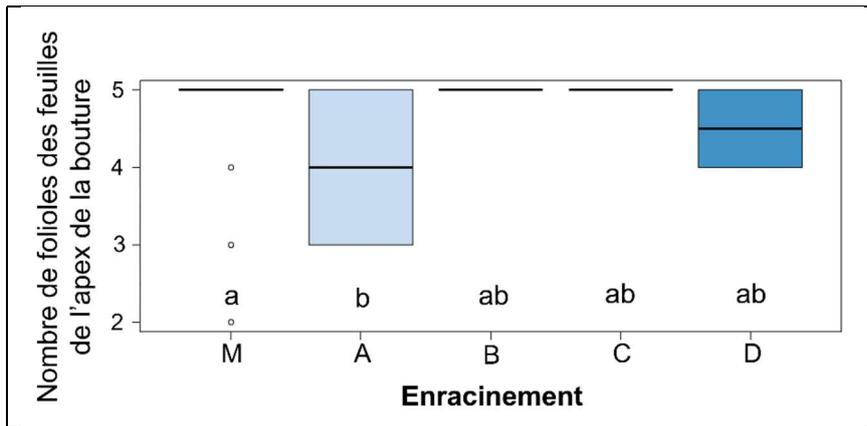


Figure 43 : Expérimentation en serre. Boxplot du nombre de folioles des feuilles de l'apex de la bouture en fonction des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. Les groupes formés au seuil d'erreur de 5% avec les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sont indiqués par des lettres.

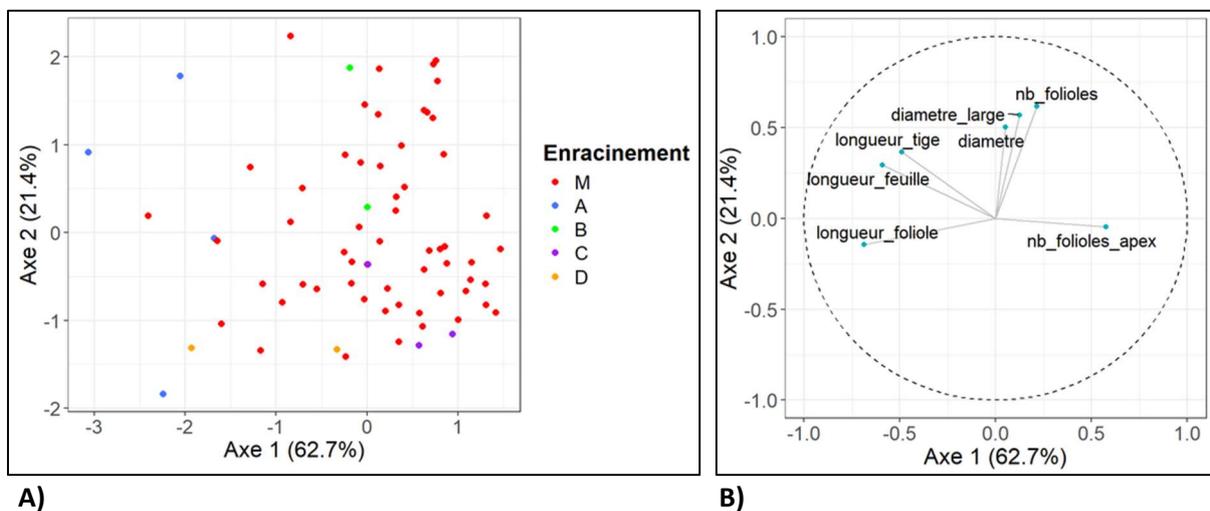


Figure 44 : Expérimentation en serre. AFD des données morphologiques discriminées selon l'enracinement. A) Représentation des individus sur les axes 1 et 2 de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.2.2.2 *Approche morphologique :*

Au seuil d'erreur de 5%, les boutures mortes prématurément (M) avaient plus de folioles sur les feuilles de l'apex que les boutures n'ayant formé ni cal ni racine (A) (fig. 43). Aucune autre différence significative n'a été observée entre les autres classes d'enracinement et sur les autres mesures morphologiques.

Les effectifs des classes d'enracinement des boutures arrivées à terme étant très faibles, les ellipses de confiance à 95% des graphiques des individus de l'AFD n'ont pas pu être tracées, seuls les points ont été représentés.

Sur l'AFD, les boutures mortes prématurément (M) sont confondues avec celles ayant formé un cal de prolifération (C) mais semblent se distinguer des autres classes d'enracinement (fig. 44, A). Il est difficile d'affirmer cette séparation à cause des faibles effectifs. Toutes les mesures morphologiques ont un poids équivalent dans la discrimination de l'AFD (fig. 44, B).

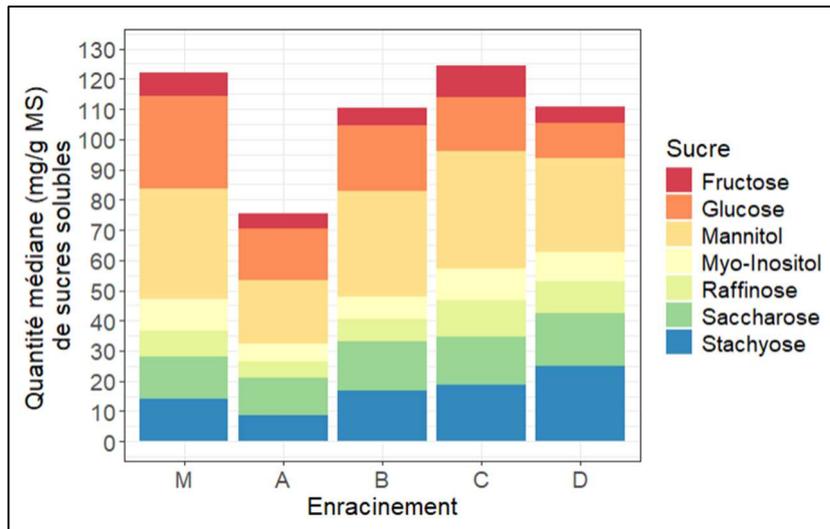


Figure 45 : Expérimentation en serre. Quantités médianes de sucres solubles (mg/g de matière sèche) dosées par HPLC dans les tiges prélevées sous les boutures en fonction des classes d'enracinement de celles-ci : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. Aucune différence significative observée au seuil d'erreur de 5% (test de Kruskal-Wallis, p-values corrigées par la méthode de Holm).

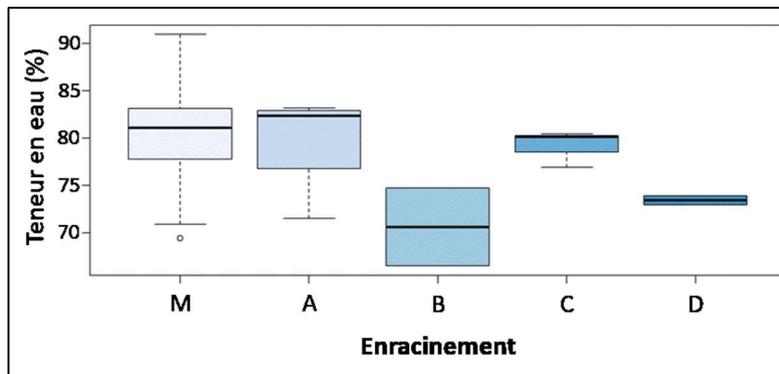


Figure 46 : Expérimentation en serre. Boxplot de la teneur en eau dans les tiges des boutures en fonction des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. Aucune différence significative observée au seuil d'erreur de 5% (test de Kruskal-Wallis).

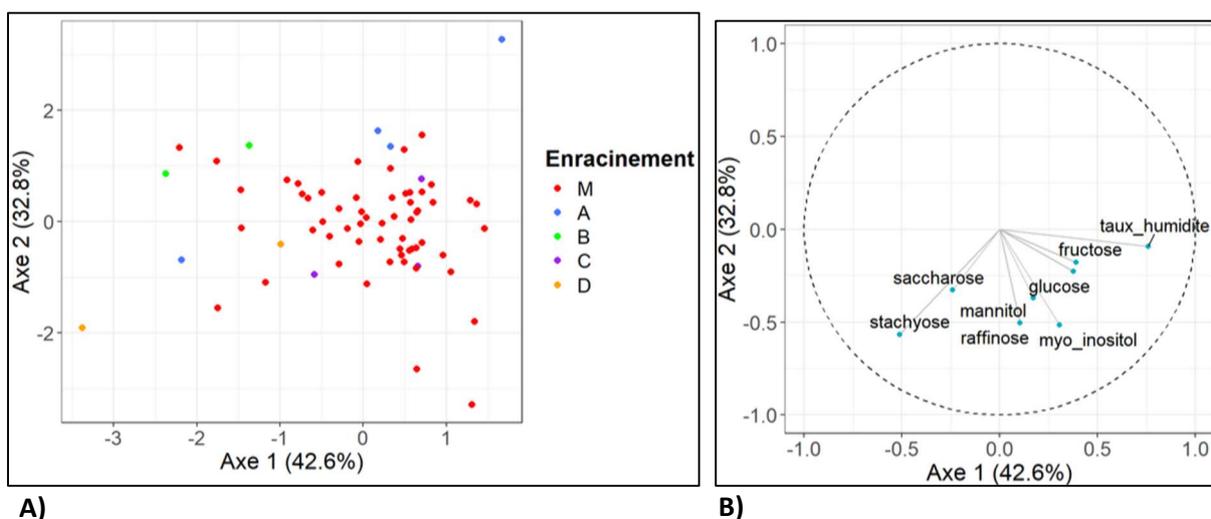


Figure 47 : Expérimentation en serre. AFD des données biochimiques discriminées selon l'enracinement. A) Représentation des individus sur les axes 1 et 2 de l'AFD. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine. B) Cercle de corrélation montrant le poids des variables dans la discrimination de l'AFD.

### 2.2.2.3 *Approche biochimique*

Bien que les boutures arrivées à terme sans produire de cal ni de racine (A) semblaient présenter des taux de sucres beaucoup plus bas que les autres classes d'enracinement, les tests de Kruskal-Wallis n'ont montré aucune différence significative au seuil d'erreur de 5% dans les quantités de sucres solubles totaux et individuels entre toutes les classes d'enracinement (fig. 45). Il n'y avait pas non plus de différence significative dans les teneurs en eau des boutures entre les classes d'enracinement (fig. 46).

L'AFD sur les données biochimiques semble à nouveau séparer les boutures mortes prématurément (M) des autres classes d'enracinement (A, B, C, D) (fig. 47, A). Les données participant le plus à la discrimination sont la teneur en eau, les quantités de myo-inositol, de raffinose et de stachyose (fig. 47, B).

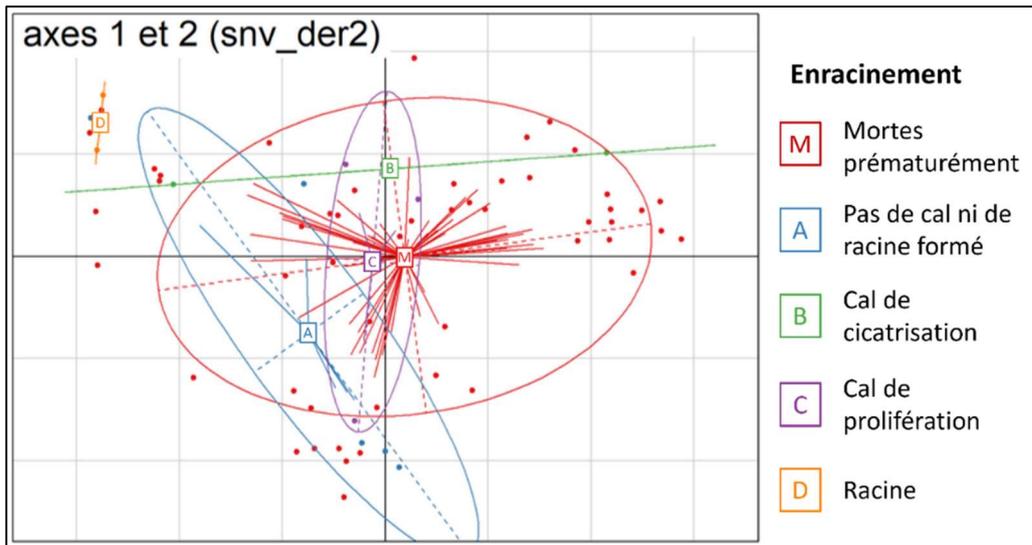


Figure 48 : Expérimentation en serre. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres de PIR (proche infrarouge) laboratoire. Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement snv\_der2. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine.

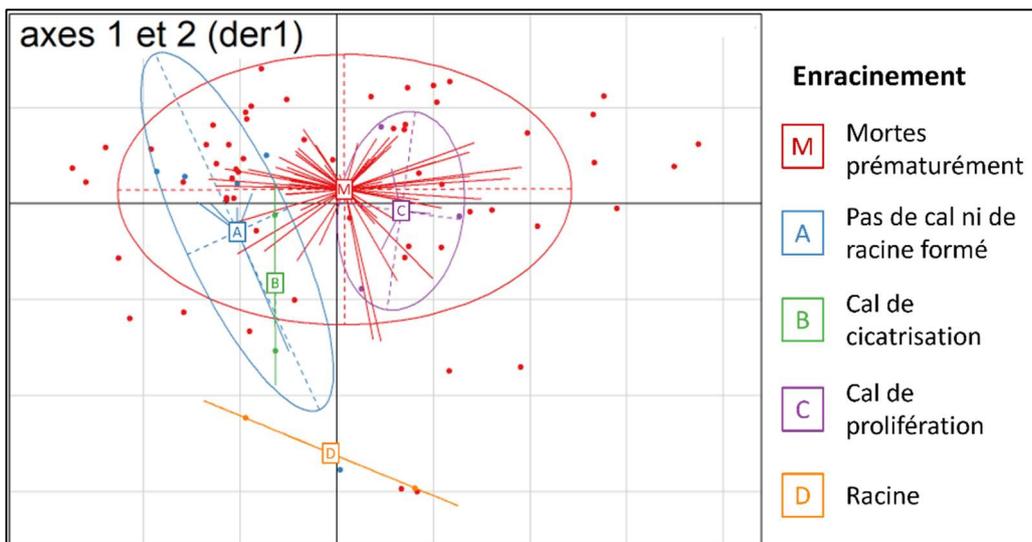


Figure 49 : Expérimentation en serre. Dimensions 1 et 2 de l'ACP sur les spectres de MIR (moyen infrarouge). Spectres mesurés sur les feuilles lyophilisées et broyées du bas des boutures. Modalité spectrale : prétraitement der1. Ellipses de confiance à 95% tracées autour des classes d'enracinement : M = mortes prématurément, A = pas de cal ni de racine formé, B = cal de cicatrisation, C = cal de prolifération, D = racine.

#### 2.2.2.4 Approche spectrométrique :

A cause des très faibles effectifs des boutures arrivées à terme, les PLS-DA n'ont pas été réalisées puisqu'elles étaient peu fiables. Seules les ACP sont présentées.

Aucune séparation des groupes par les ACP n'a été observée sur les spectres PIR portable tige. En revanche, sur les ACP des spectres PIR portable feuille et PIR de laboratoire feuille, les deux boutures racinées (D) sont éloignées de toutes les autres modalités, notamment avec le prétraitement « snv\_der2 » (fig. 48).

La séparation des boutures racinées (D) en ACP est également visible en spectrométrie MIR (fig. 49). La meilleure séparation est obtenue avec le prétraitement « der1 ». Les autres classes d'enracinement sont indissociables, comme en PIR.



### 2.3 Prédiction des sucres par la spectrométrie :

Les  $R^2$  des PLS-R sur les données de test ne sont pas montrés car ils sont tous en dessous de 0,7 pour l'expérimentation plein champ, ou peu fiables pour l'expérimentation en serre à cause du faible effectif. Les  $R^2$  sur le jeu d'entraînement sont présentés dans le tableau 10.

Les prédictions des sucres pour l'expérimentation plein champ ne sont pas satisfaisantes. Seul le glucose est correctement prédit par la MIR avec un  $R^2$  d'entraînement de 0,79.

Les prédictions des sucres pour l'expérimentation en serre sont bien meilleures. Le mannitol et le glucose sont correctement prédits par les spectres de toute gamme et équipement sur les feuilles. Le stachyose est prédit par toutes les méthodes de spectrométrie PIR, le saccharose par la spectrométrie PIR laboratoire, la quantité totale de sucres par les spectrométries PIR et MIR laboratoires, et la quantité de sucres à 6 carbones par toutes les méthodes.

Tableau 10 :  $R^2$  sur les données d'entraînement des PLS-R de prédictions des sucres solubles contenus dans les tiges sous les boutures par différentes méthodes de spectrométrie infrarouge et sur différents types d'échantillons. En rouge, les  $R^2$  considérés comme satisfaisants car supérieurs à 0,7. PIR : Proche Infrarouge, MIR : Moyen infrarouge, Sucres à 6C : Sucres à 6 carbones (mannitol, glucose, fructose et myo-inositol).

Gamme		PIR			MIR
Equipement		Portable		Laboratoire	Laboratoire
Echantillon		Feuilles fraîches	Section de tige	Feuilles broyées	Feuilles broyées
Entrainement		$R^2$	$R^2$	$R^2$	$R^2$
Plein champ	Mannitol	0,183	0,012	0,465	0,310
	Glucose	0,650	0,316	0,626	<b>0,790</b>
	Fructose	0,204	0,245	0,499	0,550
	Myo-inositol	0,174	0,195	0,573	0,400
	Sucres à 6C	0,622	0,011	0,539	0,440
	Saccharose	0,244	0,153	0,267	0,250
	Raffinose	0,119	0,333	0,261	0,140
	Stachyose	0,400	0,496	0,501	0,550
	Sucres	0,541	0,015	0,022	0,025
Serre	Mannitol	<b>0,956</b>	0,072	<b>0,824</b>	<b>0,780</b>
	Glucose	<b>0,996</b>	0,601	<b>0,771</b>	<b>0,840</b>
	Fructose	0,070	0,581	0,635	0,580
	Myo-inositol	0,229	0,531	0,606	0,600
	Sucres à 6C	<b>0,972</b>	<b>0,869</b>	<b>0,941</b>	<b>0,870</b>
	Saccharose	0,131	0,495	<b>0,746</b>	0,540
	Raffinose	0,268	0,132	0,661	0,090
	Stachyose	<b>0,725</b>	<b>0,759</b>	<b>0,813</b>	0,470
	Sucres	0,639	0,327	<b>0,779</b>	<b>0,830</b>



### 3 Discussion

Le bouturage du frêne commun est un enjeu essentiel dans la lutte contre la chalarose. Il permettrait d'améliorer la fiabilité des essais d'évaluation de sensibilité à la chalarose (répétitions biologiques à génotype constant) et de faciliter la diffusion des génotypes à faible sensibilité en les multipliant à l'identique. Malheureusement, le frêne commun est récalcitrant au bouturage. Une seule équipe, menée par G. Douglas est parvenue à de bons résultats avec des taux d'enracinement atteignant jusqu'à 94% d'enracinement (Douglas, 2001 ; Douglas et al., 2017). La méthode employée consistait à créer le pied-mère par bouturage *in vitro* puis à le tailler à 5 cm une fois par an et à prélever les boutures deux fois dans l'année. Malheureusement, à ce jour, aucune autre équipe n'a réussi à reproduire cette méthode avec succès, pas même le successeur de G. Douglas. L'un des freins majeurs est l'étape d'enracinement *in vitro* des explants. Elle est très complexe et sensible à de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. L'INRAE d'Orléans (Ardon, France) n'a pas réussi cette étape, et sur les 10 génotypes envoyés à un partenaire spécialisé, l'Institut Für Pflanzenkultur (Schnega, Allemagne), un seul a été enraciné après 3 années.

Les objectifs de cette étude étaient (1) de prédire la probabilité d'enracinement d'une bouture grâce à une caractérisation morphologique et/ou biochimique et/ou la prise de spectre proche et moyen infrarouge ; (2) d'évaluer l'influence de la génétique d'un plant au niveau famille sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites ; (3) d'évaluer l'influence de deux modalités de pincement sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques (caractéristiques de juvénilité), sur la durabilité du plant, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites ; (4) d'estimer les quantités de sucres solubles contenues dans les tissus des boutures par une étude des spectres infrarouges.

#### 3.1 Estimation des quantités de sucres solubles contenues dans les tissus des boutures par une étude des spectres infrarouges

Nos expérimentations ont montré que, dans certains cas, la spectrométrie infrarouge pourrait se substituer à des dosages par HPLC. La prédiction de la quantité de sucre n'a été satisfaisante que sur les plants clonaux de l'expérimentation en serre, ce qui indique que la prédiction ne serait peut-être pas possible sur tous les génotypes, ou dans tous les modes de culture, l'environnement en serre étant standardisé contrairement, au plein champ. La prédiction nécessiterait peut-être un modèle spécifique pour chaque génotype ou famille, et par mode de culture. Il serait intéressant d'effectuer de nouvelles PLS-R de prédiction des sucres en séparant les données de l'expérimentation plein champ par famille, et de voir si cela améliore les prédictions, bien qu'il ne semble pas y avoir d'effet fort de la famille sur les jeux de données. Le fructose, le myo-inositol et le raffinose n'ont été prédits par aucune méthode. Le dosage des sucres par spectrométrie a déjà été mis en place sur des biomasses végétales (Sills et Gossett, 2012), et dans les industries agroalimentaires (Bertrand et Dufour, 2006). L'identification de sucres sur les végétaux se fait surtout par la prise de spectres MIR avec une assignation des bandes d'absorbance due à des liaisons chimiques caractéristiques, plutôt que par la mise en place de modèles de prédiction (Dima et al., 2023).

Il est encourageant de souligner que d'autres sucres ont été très bien prédits, avec certains  $R^2$  d'entraînement supérieurs à 0,9, et ce par plusieurs techniques de spectrométrie. Les spectres PIR de laboratoire sont les seuls à prédire la quantité de saccharose. Dans un objectif de réduire au minimum l'équipement nécessaire et le temps de manipulation, la spectrométrie PIR portable sur feuilles fraîches serait une alternative intéressante puisqu'elle prédit les taux de mannitol, glucose, sucres à 6 carbones, et stachyose avec un  $R^2$  très élevé.

Ces résultats sont à nuancer, puisque les  $R^2$  des modèles de prédiction ont été obtenus sur des données d'entraînement et non de test. Les  $R^2$  sur les jeux de données de test étaient très faibles (tous



inférieurs à 0,7), certainement à cause des faibles effectifs. Ces  $R^2$  d'entraînement constituent une preuve de concept : il est possible de prédire la quantité de certains sucres solubles dans les tissus d'une bouture par de la spectrométrie infrarouge.

De plus, les mesures de spectrométrie et les dosages HPLC n'ont pas tous été réalisés sur les mêmes tissus pour des contraintes de quantités d'échantillons : il est difficile de récupérer la poudre de l'échantillon après un passage en spectrométrie MIR et un minimum de 10mg d'échantillon est nécessaire pour une extraction de sucres pour l'HPLC. Les spectres PIR portables sur les tiges fraîches sont ceux qui prédisent le moins bien les sucres, bien qu'il s'agisse de la même matrice que les dosages HPLC. Ceci est dû à la trop grande variabilité dans la dimension des sections de tiges. En effectuant le dosage de référence HPLC sur les feuilles, comme les méthodes de spectrométrie, les résultats de prédiction pourraient encore être améliorés.

Au final, afin de préciser la fiabilité, il serait intéressant de refaire une expérimentation centrée sur la prédiction des quantités de sucres, avec des effectifs suffisant à la réalisation d'une PLS-R, pour des plants de différents génotypes, et, dans la mesure du possible, en dosant en HPLC les sucres à prédire dans les mêmes tissus que ceux utilisés pour la spectrométrie.

### 3.2 Enracinement des boutures :

La forte mortalité des boutures des deux expérimentations semble avoir été causée par un état physiologique défaillant de la bouture, puisque la mortalité de la bouture a pu être prédite notamment par la spectrométrie infrarouge ; et par la présence de *Bradysia impatiens* dont les larves ont consommé les boutures. *Bradysia impatiens* est une sciaride connues pour les ravages causés par ses larves notamment sur les semis en serre. Ces sciarides avaient élu domicile dans le substrat d'autres plantes présentes dans la chambre de culture, et leur nombre devenu trop important (malgré la présence de plaques collantes dans la chambre de culture) a dû les pousser à pondre dans la vermiculite, un substrat normalement inhospitalier. Dès l'identification de ce ravageur, des plaques collantes ont été installées également à l'intérieur des mini-serres, ce qui a considérablement réduit le nombre d'adultes et limité les nouvelles pontes. Dans la perspective de nouveaux essais de bouturage, il serait essentiel d'effectuer un vide sanitaire de la chambre de culture, de n'y installer si possible que les boutures, de placer des plaques collantes en prévention et de surveiller la présence éventuelle de larve ou d'adulte. En cas de présence du ravageur, des nématodes entomopathogènes et des acariens prédateurs pourraient être utilisés (Acharya et al., 2019). Quelques boutures ont été dégradées par des contaminations fongiques non identifiées dont les dégâts n'ont pas pris beaucoup d'ampleur grâce à une élimination systématique des boutures touchées. Ces contaminations pourraient être réduites par l'application de fongicides, mais ces produits ont parfois des influences sur l'enracinement des boutures, c'est pourquoi il avait été choisi de n'appliquer aucun traitement (Yeboah et al., 2010).

### 3.3 Prédiction de l'enracinement et de la mortalité des boutures

L'objectif majeur de cette étude était de prédire l'enracinement des boutures par des approches morphologique, biochimique et spectrométrique. Malheureusement, aucune caractéristique mesurée n'a permis de discriminer avec précision les boutures ayant racinées des autres. Cependant, pour l'expérimentation en serre, les ACP effectuées sur les données spectrométriques de PIR portables sur feuilles, PIR laboratoire et MIR ont montré une séparation marquée des deux boutures racinées par rapport à toutes les autres classes d'enracinement. Il serait intéressant de réitérer l'expérimentation, avec des effectifs plus grands, et des conditions sanitaires mieux contrôlées afin de confirmer ou infirmer cette observation encourageante.

Le résultat étonnant de cette étude est la prédiction de la survie des boutures. De nombreuses caractéristiques ont montré des différences entre les boutures mortes prématurément (M) et celles arrivées à terme. Dans l'expérimentation plein champ, les boutures mortes prématurément avaient des folioles et feuilles basales moins longues ; et dans l'expérimentation en serre elles avaient à l'apex



des feuilles avec plus de folioles. Il semblerait que les boutures avec ces caractéristiques auraient des chances plus faibles de survie, ou en tout cas une plus grande sensibilité au ravageur principal rencontré, *Bradysia impatiens*. Un faible nombre de folioles est une caractéristique de juvénilité chez le frêne (Wardle, 1961 ; essais 2023), et les boutures juvéniles ayant un meilleur taux d'enracinement et donc de survie (Morgan et McWilliams, 1976 ; Libby et Hood, 1976 ; Galopin et al., 1996 ; Pizarro et Diaz-Sala, 2019), nos observations sont cohérentes. Cette importance du nombre de folioles à l'apex est à nuancer puisqu'observée uniquement sur l'expérimentation en serre, qui présentait de faibles effectifs. Les longueurs de la feuille et de la foliole terminale rendent compte de la surface foliaire, qui est un facteur déterminant dans l'enracinement des boutures. Il a notamment été montré sur *Prunus africana* (Tchoundjeu et al., 2002) et *Terminalia spinosa* (Newton et al., 1992) que les boutures avec des feuilles peu ou pas réduites s'enracinaient mieux que celles dont les feuilles avaient été fortement réduites. Sur *Rosa hybrida*, la surface foliaire initiale de la bouture était un indicateur de la croissance des racines puisqu'elle était linéairement reliée à la masse sèche des racines après 10 semaines de plantation (Costa et Challa, 2002). La surface foliaire de la bouture prélevée dépend du stade de récolte de la bouture : ces observations montrent qu'il faudrait essayer, en plus du comptage de métamère, de rajouter un seuil de longueur de feuille minimale pour effectuer le prélèvement, afin de laisser le temps aux feuilles de se développer. Le seuil choisi pourrait être autour de 6,3 cm, la médiane des boutures enracinées de l'expérimentation plein champ.

Dans l'expérimentation plein champ, une teneur en eau des tiges élevée était corrélée à une mort prématurée. Il s'agit d'un paramètre essentiel à la formation de racines, comme chez *Acer saccharum* dont la teneur en eau optimale des boutures est comprise entre 55 et 75% (Tousignant et al., 2003). Les dosages des sucres ont montré que ces boutures mortes prématurément avaient une plus grande concentration en fructose et des concentrations plus faibles en stachyose, raffinose et saccharose. Les sucres sont des régulateurs de l'induction et de la formation de racines adventives (Druege, 2009), et sont impliqués dans des réseaux de signalisation, en lien avec les hormones végétales telles que les auxines (Da Costa et al., 2013). Le fructose a des rôles contradictoires selon la littérature. Il est connu pour réprimer à faible concentration la formation des racines primaires d'*Arabidopsis* (Zhong et al., 2020). Mais il est également utilisé comme source d'énergie pour la formation de racines adventives (Ahkami et al., 2009 ; Druege et al., 2019). Dans notre cas, le fructose semble plutôt être un frein à la survie, et donc à l'enracinement des boutures. La présence de saccharose participe à la formation de racines adventives en fournissant de l'énergie, après clivage en fructose et glucose, pour la cicatrisation et la division cellulaire (Ahkami et al., 2009 ; Druege et al., 2019), ce qui s'accorde avec nos observations. Chez le cultivar d'*Olea europaea* 'Abequina', une corrélation négative entre concentration initiales de raffinose et taux d'enracinement a été observée, tandis qu'aucune corrélation n'avait pu être mise en évidence pour le stachyose (Denaxa et al., 2012), ce qui contredit nos observations. D'autres sucres, que nos résultats n'ont pas mis en avant, peuvent également avoir un effet sur la formation des racines chez les Oleacées, comme le glucose et le mannitol qui favorisent l'enracinement des boutures d'*Olea europaea* (Denaxa et al., 2012). Chez le frêne commun il avait été observé que les boutures avec un taux initial de mannitol faible, ou décroissant rapidement après le prélèvement s'enracinaient mieux (Douglas, 2002).

L'approche en spectrométrie proche infrarouge, portable ou non, sur feuilles fraîches ou broyées, et en moyen infrarouge ont également permis de prédire la mortalité des boutures de l'expérimentation plein champ avec précision (PIR portable sur feuilles : précision de 0,9 pour le jeu de données d'entraînement et de 0,76 pour le jeu de données de test). La spectrométrie PIR portable sur tige a fourni les résultats les moins intéressants.

Les trois approches ont montré leur capacité à prédire la mortalité des boutures. La spectrométrie a également montré des tendances encourageantes pour la prédiction des boutures racinées (expérimentation en serre). Concernant la prédiction de la mortalité, la question clé est de savoir s'il s'agit de la détection d'un état physiologique conduisant inévitablement à la mort de la bouture ; ou d'une détection de sa sensibilité à *Bradysia impatiens*, avec la possibilité que la bouture aurait pu s'enraciner dans un environnement plus sain.



### 3.4 Evaluation de l'influence de la génétique d'un plant au niveau famille sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites

L'absence de différence de nombre de boutures produites, des classes d'enracinement de celles-ci et de croissance entre les trois familles des plants de l'expérimentation plein champ est une bonne nouvelle pour le bouturage. En effet, les frênes multipliés à terme seront sélectionnés pour leur faible sensibilité à la chalarose et non selon leur aptitude au bouturage. Il est donc essentiel que l'itinéraire technique de production de boutures soit applicable à un maximum de génotypes. Néanmoins, cet essai ne permet pas de conclure que la génétique du plant n'a pas d'effet sur le bouturage, puisque seulement trois familles, dont deux sont issues du même arbre mère, et toutes les graines issues du même verger à graines, ont été testés. De plus, l'influence de certains gènes sur la capacité rhizogène a été démontrée chez de nombreux ligneux tels que les peupliers (Sun et al., 2019) ou les catalpas (Wang et al., 2019), et l'aptitude au bouturage variable selon les cultivars de certains ligneux est bien connue et souvent problématique pour la production, comme pour l'olivier (Denaxa et al., 2012) et le rosier (Monder, 2019).

Concernant les mesures morphologiques, biochimiques et spectrométriques, celles-ci n'ont pas été influencées fortement par la famille des plants d'un point de vue global, bien qu'il existe des différences entre familles sur certaines variables et que les PLS-DA de spectrométrie soient capables de les discriminer. Il est essentiel de faire d'autres essais pour évaluer l'influence de variabilités génétiques plus fortes sur ces prédicteurs et donc de tester si cela pourrait influencer la prédiction de l'enracinement.

### 3.5 Evaluation de l'influence de deux modalités de pincement sur des caractères morphologiques, biochimiques et spectrométriques (caractéristiques de juvénilité), sur la durabilité du plant, sur le nombre et la capacité rhizogène des boutures produites

Au cours de l'expérimentation en serre, deux plants ont flétri, deux ont été attaqués par des acariens, et tous les quatre appartenaient à la modalité de pincement à un métamère. L'un des plants flétris l'était avant le début des pincements. Cette tendance doit être confirmée par d'autres essais, mais il semblerait que le pincement à un métamère, très récurrent, ait pu fragiliser ces trois plants, tandis que le pincement à deux métamères semble plus durable.

Les deux modalités de pincement n'ont influencé ni le nombre de boutures produites, ni leur classe d'enracinement sur les 31 jours de l'essai. Cependant, il est probable que des différences puissent être observées en conduisant l'expérimentation plus longtemps et avec de plus grands effectifs de boutures arrivées à terme. Le pincement à deux métamères laisse plus de bourgeons axillaires sur le plant, donc plus d'axes potentiels, et laisse plus de temps entre chaque coupe, ce qui peut entraîner une rematuration du plant plus rapide et donc un risque de perte de capacité rhizogène plus élevé que pour le pincement à un métamère.

Les données morphologiques, biochimiques et spectrométriques ont été influencées par les modalités de pincement. De ceci découle deux choses : (i) L'étude des caractéristiques des boutures propres à l'enracinement a pu être influencée par ces différences entre modalités, d'autant plus que toutes les boutures racinées étaient issues de plants pincés à deux métamères. Il aurait donc fallu faire les analyses avec toutes les données, et les refaire ensuite en scindant par pincement. Cela n'a pas été fait par manque de temps et d'effectifs. (ii) si des caractéristiques morphologiques, biochimiques et spectrométriques définies comme prédicteurs de l'enracinement sont influencées par les pincements, alors, bien que cela n'a pas été mis en avant ici (certainement à cause de la mortalité des boutures), la modalité de pincement pourrait influencer l'enracinement des boutures. Ceci confirme notre hypothèse de départ, appuyée par de la littérature chez plusieurs espèces (Galopin et al., 1996 ; Boutebtoub, 2009 ; Galopin et al., 2010)



La longueur de la feuille basale de la bouture est une des caractéristiques des boutures mortes prématurément influencées par le pincement. Le pincement à un métamère a pour effet de réduire la longueur de la feuille. Les boutures arrivées à terme avaient des feuilles plus grandes que celles mortes prématurément, mais il est probable qu'il existe un optimum et non une relation linéaire entre taille des feuilles et capacité d'enracinement. La quantité de fructose est également influencée par le pincement : un pincement à un métamère provoque la production de fructose dans les tiges. Cette variation du fructose dans les tiges provoquées par le pincement est en contradiction avec les résultats sur *Mandevilla sanderi*, pour lequel aucune différence de concentration de fructose n'était observée entre les plantes pincées ou non (Boutebtoub, 2009). A l'inverse, cette même étude avait montré des différences de concentration en saccharose, que nous n'observons pas ici.

La modalité de pincement à un métamère a produit des boutures avec un nombre de folioles des feuilles basales plus faible que le pincement à deux métamères et il avait déjà été prouvé en 2023 qu'un pincement plus drastique produisait des feuilles avec moins de folioles. Or, les boutures mortes prématurément avaient des feuilles à l'apex avec plus de folioles que les boutures arrivées à terme. Les nombres de folioles des feuilles basales et apicales sont fortement corrélés, il serait donc possible de voir un effet du pincement sur ce nombre.

Les modifications morphologiques, biochimiques et spectrométriques provoquées par les pincements confirment la pertinence de l'adaptation de la méthode du micro-pied-mère à *Fraxinus excelsior*.

## 4 Perspectives

Les approches morphologique, biochimique et spectrométrique qui ont été utilisées dans ces expérimentations pourraient être améliorées de différentes façons.

L'objectif des mesures des feuilles basales des boutures était de calculer la surface foliaire à l'aide d'un modèle préalablement créé. Cependant, le modèle créé n'a pas fourni des résultats satisfaisants (surface foliaire négative pour certaines boutures). Pourtant, des relations allométriques entre la longueur des feuilles et la surface foliaire ont bien été montrées chez les Oléacées (Shi et al., 2019). Il faudrait échantillonner de nombreuses feuilles (une centaine n'ont pas suffi), mesurer la longueur de la feuille et de la foliole terminale ainsi que la surface foliaire afin de créer un modèle plus fiable.

L'approche biochimique pourrait être élargie avec des dosages d'auxine et/ou d'autres hormones végétales. Ceux-ci n'ont pas été effectués cette année en raison de contraintes techniques. Les résultats fournis pourraient être d'une avancée majeure. En effet, les hormones ont un rôle déterminant dans l'établissement des racines, et en particulier les auxines (Garrido et al., 2002 ; Da Costa et al., 2013 ; Lakehal et al., 2019). Une bonne rhizogenèse est le résultat d'un équilibre complexe notamment entre les sucres et les hormones. Le suivi de la quantité d'auxine endogène permettra de savoir si le non enracinement des boutures est dû à un déficit d'auxine ou non, et donc si l'ajout d'auxine exogène pourrait être une solution. Si c'est le cas, des essais pourront être menés en s'assurant au préalable que la quantité d'hormone endogène est bien fixée par l'itinéraire appliqué sur les pied-mères.

L'approche spectrométrique pourra quant à elle être allégée en supprimant la prise de spectre PIR portable sur les tiges. Cette méthode a été la moins informative et la moins standardisée : section de tiges de différentes surfaces, recouvrant donc plus ou moins la fenêtre d'acquisition de spectres, épaisseur de la coupe peu précise... Les spectres PIR portable ou de laboratoire ayant fourni des résultats similaires, la PIR portable sur feuilles fraîches pourrait suffire. L'intérêt de cette méthode est majeur puisqu'elle pourrait être appliquée chez les producteurs de jeunes plants : à terme, un Outil d'Aide à la Décision pourrait être créé. Cet OAD fournirait, sur la base des spectres PIR, une probabilité d'enracinement des boutures et des conseils pour l'entretien des pied-mères. Par exemple, si l'itinéraire technique retenu à la fin de ces recherches comprend le micro bouturage et donc une taille répétée, quelques feuilles peuvent être scannées à chaque coupe pour voir s'il est économiquement intéressant d'utiliser du substrat pour planter ces boutures, ou s'il vaut mieux attendre la taille



suivante. Si un autre itinéraire sans taille récurrente est mis en place, alors cet OAD pourrait permettre de choisir le moment de prélèvement optimal des boutures.

La prédiction de l'enracinement pourrait être enrichie d'une approche épigénétique. L'horloge épigénétique permet d'évaluer un âge rendant compte du vieillissement réel d'un organisme, au-delà de son âge chronologique (Fisher, 2018). La maturation des cellules entraîne en effet des modifications épigénétiques (Pizarro et Diaz-Sala, 2019). Cette méthode pourrait permettre d'évaluer précisément la juvénilité des plants, et donc leur faculté d'enracinement. Les facteurs épigénétiques jouent également un rôle direct dans la mise en place de racines adventives en contrôlant la dédifférenciation des cellules en cellules pluripotentes et leur re-différenciation en cellules racinaires (Jing et al., 2020).

Au-delà des trois approches de prédiction et caractérisation, de nombreuses perspectives sont à explorer pour améliorer les taux d'enracinement des boutures.

Tout d'abord, les conditions environnementales lors de l'enracinement des boutures pourraient être améliorées. Au lieu de mini-serres, les boutures pourraient être placées dans des tunnels équipés de fog system. Ce système a montré son efficacité sur l'enracinement des boutures de nombreuses espèces (Harrison-Murray et al., 1988 ; Harrison-Murray et Thompson, 1988 ; Cornu et Verger, 1992 ; Mateja et al., 2017, Tetsumura et al., 2017).

Ensuite, l'effet de la génétique pourrait être exploré à une autre échelle, en comparant deux génotypes issus de populations différentes. Ainsi, la variabilité génétique intra-groupe sera nulle, tandis qu'elle sera maximale en inter-groupes. Cela permettra d'évaluer l'effet provoqué par une forte variabilité génétique.

Enfin, les modalités de pincements à un et deux métamères pourraient être testées à nouveau, avec des effectifs plus grands et sur une durée d'expérimentation plus longue. Le recépage à 3 cm avait montré un effet bénéfique très marqué sur l'enracinement des plants en 2023. La taille d'entretien, le pincement, reste donc à optimiser pour la mise en place d'un itinéraire technique complet de production de pied-mères. Il est également essentiel de tester des méthodes de rejuvenilisation sur des arbres âgés puisque l'objectif final est de multiplier des arbres sélectionnés pour leur tolérance à la chalarose. L'effet de rejuvenilisation et le taux de reprise suite à un recépage devraient donc être évalués sur des arbres de différents âges. D'autres méthodes pourraient également être expérimentées, telles que le marcottage ou le bouturage de racine.



## Bibliographie

- Acharya, Rajendra, Hwal-Su Hwang, Jae-Kyoung Shim, Yeon-Su Yu, et Kyeong-Yeoll Lee. 2019. « Control efficacy of fungus gnat, *Bradysia impatiens*, enhanced by a combination of entomopathogenic nematodes and predatory mites ». *Biological Control* 138 (1 novembre 2019): 104071. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104071>.
- Ahkami, Amir H., Sandra Lischewski, Klaus-T. Haensch, Svetlana Porfirova, Joerg Hofmann, Hardy Rolletschek, Michael Melzer, et al. 2009. « Molecular Physiology of Adventitious Root Formation in *Petunia Hybrid* Cuttings: Involvement of Wound Response and Primary Metabolism ». *The New Phytologist* 181, n° 3 (2009): 613-25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02704.x>.
- Anagnostakis, Sandra L. 2001. « The Effect of Multiple Importations of Pests and Pathogens on a Native Tree ». *Biological Invasions* 3, n° 3 (1 septembre 2001): 245-54. <https://doi.org/10.1023/A:1015205005751>.
- Askenasy, E. 1880. « Über eine neue Methode, um die Vertheilung der Wachstumsintensität in wachsenden Theilen zu bestimmen ». *Naturhistorisch-Medizinischer Verein, Heidelberg Verhandlungen, neue serie* 2: 70–153.
- Baral, Hans-Otto, Valentin Queloz, et Tsuyoshi Hosoya. 2014. « *Hymenoscyphus Fraxineus*, the Correct Scientific Name for the Fungus Causing Ash Dieback in Europe ». *IMA Fungus* 5, n° 1 (juin 2014): 79-80. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.01.09>.
- Barlow, P. W. 1989. « Meristems, metamers and modules and the development of shoot and root systems. » *Botanical Journal of the Linnean Society*, 100(3), 255–279. doi:10.1111/j.1095-8339.1989.tb01721.x
- Basheer-Salimia, Rezaq. 2007. « Juvenility, Maturity, and Rejuvenation in Woody Plants ». *Hebron University Research Journal* 3, n° 1 (2007): 17-43.
- Belmokhtar, Nassim, Nathalie Boizot, Arnaud Dowkiw. 2023. « Utilisation du SPIR portable pour la discrimination de génotypes de frêne résistant à la chalarose ». 24èmes rencontres HélioSPIR, Jun 2023, Montpellier, France. (hal-04153669)
- Bertrand, D., et E. Dufour. 2006. « La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques ». *Sciences et Techniques Agroalimentaires*. Lavoisier, 2006. <https://hal.inrae.fr/hal-02824683>.
- Bonhomme, Marc, Médéric Peuch, Thierry Ameglio, Rémy Rageau, Agnès Guillot, et al. 2010. « Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia* L.) ». *Tree Physiology*, Oxford University Press (OUP) : Policy B - Oxford Open Option B, 2010, 30 (1), pp.89-102. (10.1093/treephys/tpp103). (hal-00729456)
- Boshier, David, Jesus Cordero, Stephen Harris, John Pannell, Sarah Rendell, Peter Savill, Janet Stewart, et al. 2005. « *Ash Species in Europe: Biological Characteristics and Practical Guidelines for Sustainable Use* », 2005. ISBN : 978-0-85074-163-6
- Boutebtoub, Wahiba. 2009. « Gestion du métabolisme carboné de *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson en réponse à une taille répétée ». Thèse de doctorat, Angers. <https://theses.fr/2009ANGE0053>.
- Caraglio, Y., et D. Barthélémy. 1997. « Revue critique des termes relatifs à la croissance et à la ramification des tiges des végétaux vasculaires », 1997. <https://amap.cirad.fr/amapsim/referman/glossaire/prolepsie.html>.



- Collin, P., Pierre-Marie Badot, B. Millet, et P. Barnola. 1994. « Étude de la croissance et du développement chez le frêne commun, *Fraxinus excelsior*, cultivé en conditions contrôlées ». *Canadian Journal of Botany* 73 (15 novembre 1994): 1464-70. <https://doi.org/10.1139/b95-159>.
- Cornu, Daniel, et Michel Verger. 1992. « La multiplication végétative de feuillus précieux et de clones fournissant des bois figurés. » *Revue forestière française* 44 (1992): 55-60. <https://doi.org/ff10.4267/2042/26382f>.
- Costa, J. M, et H Challa. 2002. « The effect of the original leaf area on growth of softwood cuttings and planting material of rose ». *Scientia Horticulturae* 95, n° 1 (2 août 2002): 111-21. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00023-7).
- CRABBÉ, J. 1998. « Pertinence et ambiguïtés du concept de changement de phase ». Séminaire du groupe d'étude de l'arbre, Faculté des sciences de Nancy, France, 1998, p. 1-4.
- Da Costa, Cibele T., Marcia R. De Almeida, Carolina M. Ruedell, Joseli Schwambach, Felipe D. Maraschin, et Arthur G. Fett-Neto. 2013. « When Stress and Development Go Hand in Hand: Main Hormonal Controls of Adventitious Rooting in Cuttings ». *Frontiers in Plant Science* 4 (14 mai 2013). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>.
- Denaxa, Nikoleta-Kleio, Stavros N. Vemmos, et Peter A. Roussos. 2012. « The role of endogenous carbohydrates and seasonal variation in rooting ability of cuttings of an easy and a hard to root olive cultivars (*Olea europaea* L.) ». *Scientia Horticulturae* 143 (16 août 2012): 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.026>.
- Dima, Ștefan-Ovidiu, Diana Constantinescu-Aruxandei, Naomi Tritcan, Marius Ghiurea, Luiza Capră, Cristian-Andi Nicolae, Victor Faraon, Constantin Neamțu, et Florin Oancea. 2023. « Spectroscopic Analyses Highlight Plant Biostimulant Effects of Baker's Yeast Vinasse and Selenium on Cabbage through Foliar Fertilization ». *Plants* 12, n° 16 (janvier 2023): 3016. <https://doi.org/10.3390/plants12163016>.
- Douglas, Gerry. 2001. « VEGETATIVE PROPAGATION OF SELECTED REPRODUCTIVE STOCKS OF ASH AND SYCAMORE ». In *Vegetative Propagation Techniques for Oak, Ash, Sycamore and Spruce*, COFORD, National Council for Forest Research and Development, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland., 2001.
- Douglas, G. 2002. « Report on EC Fifth Framework Project "Improving *Fraxinus* (Ash) Productivity for European Needs by Testing, Propagation and Promotion of Improved Genetic Resources" (RAP: Realising Ash's Potential) ». *Research on Noble Hardwoods*, 2002, 31-32.
- Douglas, Gerry C., Alfas Pliura, Jean Dufour, Patrick Mertens, Dominique Jacques, Jean Fernandez-Manjares, Joukje Buiteveld, et al. 2013. « Common Ash (*Fraxinus excelsior* L.) ». In *Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives*, édité par Luc E Pâques, 403-62. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6146-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6146-9_9).
- Douglas, G C, J M Namara, K O'Connell, L Dunne, et J Grant. 2017. « Vegetative Propagation of Dieback-Tolerant *Fraxinus excelsior* on Commercial Scale », 2017.
- Druege, Uwe. 2009. « Involvement of carbohydrates in survival and adventitious root formation of cuttings within the scope of global horticulture », 187-201, 2009.



- Druege, Uwe, Alexander Hilo, José Manuel Pérez-Pérez, Yvonne Klopotek, Manuel Acosta, Fahimeh Shahinnia, Siegfried Zerche, Philipp Franken, et Mohammad R Hajirezaei. 2019. « Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation ». *Annals of Botany* 123, n° 6 (juin 2019): 929-49. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy234>.
- Esau, K. 1965. *Plant anatomy*, 2nd ed. John Wiley, New York, New York, USA
- Francllet A., 1983. « Rejuvenation: theory and practical experiences in clonal silviculture ». *Clonal Forestry: its impact on tree improvement and our future forests*. XIXth Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, 22-26/8/1983, Toronto, 96-134
- Francllet, A., M. Boulay, F. Bekkaoui, Y. Fouret, B. Verschoore-Martouzet, et N. Walker. 1987. « Rejuvenation ». In *Cell and Tissue Culture in Forestry: General Principles and Biotechnology*, édité par J. M. Bonga et Don J. Durzan, 232-48. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1_14).
- Galopin, Gilles, François Beaujard, et Michel Gendraud. 1996. « Intensive production of juvenile cuttings by mother microplant culture in *Hydrangea macrophylla* "Leuchtfeuer" ». *Canadian Journal of Botany* 74, n° 4 (avril 1996): 561-67. <https://doi.org/10.1139/b96-071>.
- Galopin, Gilles, Philippe Morel-Chevillet, Remi Gardet, et Chloé Patrier. 2010. « Mass vegetative propagation of *Ostrya carpinifolia* by continual removal of axillary branches from juvenile donor plants ». *Propagation of Ornamental Plants* 10, n° 2 (2010): 88-92.
- Garrido, Germán, Juan Ramón Guerrero, Emilio Angel Cano, Manuel Acosta, et José Sánchez-Bravo. 2002. « Origin and Basipetal Transport of the IAA Responsible for Rooting of Carnation Cuttings ». *Physiologia Plantarum* 114, n° 2 (2002): 303-12. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140217.x>.
- Gross, A., P.L. Zaffarano, A. Duo, et C.R. Grünig. 2012. « Reproductive Mode and Life Cycle of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus Pseudoalbidus* ». *Fungal Genetics and Biology* 49, n° 12 (décembre 2012): 977-86. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.08.008>.
- Haissig, B. E. 1989. « Carbohydrate relations during propagation of cuttings from sexually mature *Pinus banksiana* trees ». *Tree Physiology* 5, n° 3 (1 septembre 1989): 319-28. <https://doi.org/10.1093/treephys/5.3.319>.
- Harrison-Murray, R.S., B.H. Howard, et R. Thompson. 1988. « POTENTIAL FOR IMPROVED PROPAGATION BY LEAFY CUTTINGS THROUGH THE USE OF FOG ». *Acta Horticulturae*, n° 227 (septembre 1988): 205-10. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.227.33>.
- Harrison-Murray, R.S., et R. Thompson. 1988. « IN PURSUIT OF A MINIMUM STRESS ENVIRONMENT FOR ROOTING LEAFY CUTTINGS: COMPARISON OF MIST AND FOG ». *Acta Horticulturae*, n° 227 (septembre 1988): 211-16. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.227.34>.
- Husson, C., O. Caël, J. P. Grandjean, L. M. Nageleisen, et B. Marçais. 2012. « Occurrence of *Hymenoscyphus Pseudoalbidus* on Infected Ash Logs ». *Plant Pathology* 61, n° 5 (2012): 889-95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02578.x>.
- IGN. 2023. *INVENTAIRE FORESTIER NATIONAL MÉMENTO Edition 2023*. [https://inventaire-forestier.ign.fr/IMG/pdf/memento\\_2023.pdf](https://inventaire-forestier.ign.fr/IMG/pdf/memento_2023.pdf).



- Jing, Tingting, Rhomi Ardiansyah, Qijiang Xu, Qian Xing, et Ralf Müller-Xing. 2020. « Reprogramming of Cell Fate During Root Regeneration by Transcriptional and Epigenetic Networks ». *Frontiers in Plant Science* 11 (2020): 317. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00317>.
- Jinks, R. L. 1995. « The Effects of Propagation Environment on the Rooting of Leafy Cuttings of Ash (*Fraxinus Excelsior* L.), Sycamore (*Acer Pseudoplatanus* L.), and Sweet Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) ». *New Forests* 10, n° 2 (1 septembre 1995): 183-95. <https://doi.org/10.1007/BF00033406>.
- Kuhn, M. 2008. « Building Predictive Models in R Using the caret Package ». *Journal of Statistical Software*, 28(5), 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>
- Kowalski, T.; Łukomska, A. 2005. «Studies on *Fraxinus excelsior* L. dieback in Włoszczowa Forest Unit stands. » *Acta Agrobotanica* 58, n° 2 : 429-39.
- Kowalski, T. 2006. « Chalara Fraxinea Sp. Nov. Associated with Dieback of Ash (*Fraxinus Excelsior*) in Poland ». *Forest Pathology* 36, n° 4 (2006): 264-70. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x>.
- Kowalski, T., et O. Holdenrieder. « The Teleomorph of Chalara Fraxinea, the Causal Agent of Ash Dieback ». *Forest Pathology* 39, n° 5 (2009): 304-8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x>.
- Krenke N.P., 1940. « The theory of the cycle of senescence and rejuvenation of plants and its practical applications ». *Plant Breed. Abstract.*, 15 (181), 1-135.
- Lakehal, Abdellah, Salma Chaabouni, Emilie Cavel, Rozenn Le Hir, Alok Ranjan, Zahra Raneshan, Ondřej Novák, et al. 2019. « A Molecular Framework for the Control of Adventitious Rooting by TIR1/AFB2-Aux/IAA-Dependent Auxin Signaling in Arabidopsis ». *Molecular Plant* 12, n° 11 (4 novembre 2019): 1499-1514. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.001>.
- Leclercq, A. 1975. « La Qualité du bois de Frêne. » *Bulletin des recherches agronomiques de Gembloux*, n° Vol. 10 n° 4 (1 novembre 1975): vol.10 (4), 497-526
- Libby, W.J., et J.V. Hood. 1976. « JUVENILITY IN HEDGED RADIATA PINE ». *Acta Horticulturae*, n° 56 (mai 1976): 91-98. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1976.56.7>.
- LING, Wang, et Zhao Zhong. 2012. « Seasonal variation in rooting of the cuttings from Tetraploid Locust in relation to nutrients and endogenous plant hormones of the shoot ». *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 36, n° 2 (1 janvier 2012): 257-66. <https://doi.org/10.3906/tar-1011-1511>.
- Marçais, Benoit, Claude Husson, Olivier Cael, Arnaud Dowkiw, François-Xavier Saintonge, Laurence Delahaye, Catherine Collet, et Anne Chandelier. 2017. « Estimation of Ash Mortality Induced by *Hymenoscyphus fraxineus* in France and Belgium ». *Baltic forestry* 23, n° 1 (2017): 159-67.
- Mateja, Štefančič, Vodnik Dominik, Štampar Franci, et Osterc Gregor. 2007. « The Effects of a Fogging System on the Physiological Status and Rooting Capacity of Leafy Cuttings of Woody Species ». *Trees* 21, n° 4 (1 juillet 2007): 491-96. <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0121-z>.
- Mazalewski, Robert Lynn. 1978. « The Influences of Plant Growth Regulators, Hedging and Other Rejuvenation Methods Upon the Rooting of *Eucalyptus Ficulifolia* Stem Cuttings. » U. of Calif., Davis, 1978.
- Meichenheimer, Roger D. 2014. « The Plastochron Index: Still Useful after Nearly Six Decades ». *American Journal of Botany* 101, n° 11 (2014): 1821-35. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400305>.



- Meilan, Richard. 1997. « Floral Induction in Woody Angiosperms ». *New Forests* 14, n° 3 (1 novembre 1997): 179-202. <https://doi.org/10.1023/A:1006560603966>.
- Monder, Marta Joanna. 2019. « Rooting and Growth of Root Cuttings of Two Old Rose Cultivars 'Harison's Yellow' and 'Poppius' Treated with IBA and Biostimulants ». *Acta Agrobotanica* 72, n° 2 (1 juillet 2019). <https://doi.org/10.5586/aa.1774>.
- Monteuuis, O. et M.C. Bon. 1998. « Changement de phase et clonage chez les espèces arborescentes : importance des méristèmes primaires et caulinaires ». Séminaire du groupe d'étude de l'arbre, Faculté des sciences de Nancy, France, 1998, p. 11-20.
- Morgan, D.L. and McWilliams, E.L. 1976. « JUVENILITY AS A FACTOR IN PROPAGATING *QUERCUS VIRGINIANA* MILL ». *Acta Hort.* 56, 263-268. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1976.56.30>
- Muñoz, Facundo, Benoît Marçais, Jean Dufour, et Arnaud Dowkiw. 2016. « Rising Out of the Ashes: Additive Genetic Variation for Crown and Collar Resistance to *Hymenoscyphus fraxineus* in *Fraxinus excelsior* ». *Phytopathology*® 106, n° 12 (décembre 2016): 1535-43. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-15-0284-R>.
- Namkoong, G. 1984. « Genetic structure of forest tree populations ». In *Genetics: New Frontiers. Proceedings of the 15th International Congress of Genetics*. Edited by V.L. Chopra, B.C. Joshi, R.P. Sharma, and H.C. Bansal. Vol. 4. Applied Genetics. Mohan Primilani, Oxford and IDH Publishers, New Delhi, India. pp. 352–360.
- Nepveu, Gérard. 1992. « L'utilisation des bois de Frêne et de Merisier : aptitudes technologiques, facteurs de variabilité ». *Revue forestière française* 44, n° 5 (1992): 142-49. <https://doi.org/10.4267/2042/26371>.
- Newton, A. C., P. N. Muthoka, et J. McP. Dick. 1992. « The Influence of Leaf Area on the Rooting Physiology of Leafy Stem Cuttings of *Terminalia Spinosa* Engl. ». *Trees* 6, n° 4 (1 septembre 1992): 210-15. <https://doi.org/10.1007/BF00224338>.
- Nozeran, René. 1978. « Réflexions sur les enchaînements de fonctionnements au cours du cycle des végétaux supérieurs ». *Bulletin de la Société Botanique de France* 125, n° 5-6 (1 janvier 1978): 263-79. <https://doi.org/10.1080/00378941.1978.10839452>.
- Nozeran, R., G. Ducreux, et L. Rossignol-Bancilhon. 1982. « Réflexions sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux ». *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques* 129, n° 2 (janvier 1982): 107-30. <https://doi.org/10.1080/01811797.1982.10824535>.
- Nozeran R. 1985. « Le mouvement morphogénétique spécialement chez les végétaux supérieurs pérennes. » *L'arbre, Naturalia Monspeliensia*, hs, 415-430
- Pizarro, Alberto, et Carmen Díaz-Sala. 2019. « Cellular Dynamics during Maturation-Related Decline of Adventitious Root Formation in Forest Tree Species ». *Physiologia Plantarum* 165, n° 1 (2019): 73-80. <https://doi.org/10.1111/ppl.12768>.
- Przybył, K. 2002. « Fungi Associated with Necrotic Apical Parts of *Fraxinus Excelsior* Shoots ». *Forest Pathology* 32, n° 6 (2002): 387-94. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x>.
- Queloz, V., C. R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber, et O. Holdenrieder. 2011. « Cryptic Speciation in *Hymenoscyphus Albidus* ». *Forest Pathology* 41, n° 2 (2011): 133-42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x>.



- Roberds, J H, et J W Bishir. 1997. « Risk Analyses in Clonal Forestry ». *Canadian Journal of Forest Research* 27, n° 3 (1 mars 1997): 425-32. <https://doi.org/10.1139/x96-202>.
- Sallé-Tourné, Françoise. 1988. « Amélioration de la multiplication du frêne par la micropropagation », 2 décembre 1988.
- Schmidt, A. 1924. Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkte. *Botanical Archives* 8: 345–404.
- Shi, Peijian, Mengdi Liu, David A. Ratkowsky, Johan Gielis, Jialu Su, Xiaojing Yu, Ping Wang, Lifang Zhang, Zhiyi Lin, et Julian Schrader. 2019. « Leaf Area–Length Allometry and Its Implications in Leaf Shape Evolution ». *Trees* 33, n° 4 (1 août 2019): 1073-85. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01843-4>.
- Sills, Deborah L., et James M. Gossett. 2012. « Using FTIR Spectroscopy to Model Alkaline Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Six Lignocellulosic Biomasses ». *Biotechnology and Bioengineering* 109, n° 4 (2012): 894-903. <https://doi.org/10.1002/bit.24376>.
- Silveira, Conceição Eneida, et Alain Cottignies. 1994. « Period of Harvest, Sprouting Ability of Cuttings, and in Vitro Plant Regeneration in *Fraxinus Excelsior* ». *Canadian Journal of Botany* 72, n° 2 (1 février 1994): 261-67. <https://doi.org/10.1139/b94-035>.
- Stutz, H. P., M. Hocevar, et A. Burkart. 1983. « Vegetative Vermehrung der Esche mit Grünstecklingen ». *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 102, n° 1 (1 décembre 1983): 336-43. <https://doi.org/10.1007/BF02741865>.
- Skovsgaard, J. P., I. M. Thomsen, I. M. Skovgaard, et T. Martinussen. 2010. « Associations among Symptoms of Dieback in Even-Aged Stands of Ash (*Fraxinus Excelsior* L.) ». *Forest Pathology* 40, n° 1 (2010): 7-18. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2009.00599.x>.
- Sun, Pei, Huixia Jia, Yahong Zhang, Jianbo Li, Mengzhu Lu, et Jianjun Hu. 2019. « Deciphering Genetic Architecture of Adventitious Root and Related Shoot Traits in *Populus* Using QTL Mapping and RNA-Seq Data ». *International Journal of Molecular Sciences* 20, n° 24 (4 décembre 2019): 6114. <https://doi.org/10.3390/ijms20246114>.
- Tapper, Per-Goran. 1992. « Demography of Persistent Juveniles in *Fraxinus Excelsior* ». *Ecography* 15, n° 4 (1992): 385-92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1992.tb00048.x>.
- Tchoundjeu, Z., M. L. Avana, R. R. B. Leakey, A. J. Simons, E. Assah, B. Duguma, et J. M. Bell. 2002. « Vegetative Propagation of *Prunus Africana*: Effects of Rooting Medium, Auxin Concentrations and Leaf Area ». *Agroforestry Systems* 54, n° 3 (1 juillet 2002): 183-92. <https://doi.org/10.1023/A:1016049004139>.
- Tetsumura, Takuya, Shuji Ishimura, Chitose Honsho, et Hiroyuki Chijiwa. 2017. « Improved rooting of softwood cuttings of dwarfing rootstock for persimmon under fog irrigation ». *Scientia Horticulturae* 224 (20 octobre 2017): 150-55. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.007>.
- Thioulouse J, Dray S, Dufour A, Siberchicot A, Jombart T, Pavoine S. 2018. « Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4 ». Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8850-1>.
- Tousignant, D., C. Richer, J. -A. Rioux, N. Brassard, et J. -P. Mottard. 2003. « Vegetative propagation of sugar maple: Relating stem water content and terminal bud developmental stage to adventitious rooting of stem cuttings ». *Canadian Journal of Plant Science* 83, n° 4 (octobre 2003): 859-67. <https://doi.org/10.4141/P02-178>.



- Villari, Caterina, Arnaud Dowkiw, Rasmus Enderle, Marjan Ghasemkhani, Thomas Kirisits, Erik D. Kjær, Diana Marčiulyrienė, et al. 2018. « Advanced Spectroscopy-Based Phenotyping Offers a Potential Solution to the Ash Dieback Epidemic ». *Scientific Reports* 8, n° 1 (28 novembre 2018): 17448. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35770-0>.
- Wallander, Eva. 2008. « Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and Evolution of Dioecy ». *Plant Systematics and Evolution* 273, n° 1 (1 juin 2008): 25-49. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0005-3>.
- Wang, Peng, Lingling Ma, Shu'an Wang, Linfang Li, Qing Wang, Rutong Yang, et Ya Li. 2019. « Identification and Analysis of a Candidate WRKY Transcription Factor Gene Affecting Adventitious Root Formation Using Association Mapping in Catalpa Scop. ». *DNA and Cell Biology* 38, n° 4 (avril 2019): 297-306. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4528>.
- Wardle, P. 1961. « Fraxinus Excelsior L. ». *Journal of Ecology* 49, n° 3 (1961): 739-51. <https://doi.org/10.2307/2257236>.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. 2019. « Welcome to the tidyverse. » *Journal of Open Source Software*, \*4\*(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.
- Wickham, H. 2016. « ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis ». Springer-Verlag New York, 2016.
- White, James. 1976. « The Plant as a Metapopulation ». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 10, n° Volume 10, (1 novembre 1979): 109-45. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.10.110179.000545>.
- Yeboah, J., A. Akrofi, et F. Owusu-Ansah. 2010. « Influence of Selected Fungicides and Hormone on the Rooting Success of Shea (Vitellaria Paradoxa Gaernt) Stem Cuttings ». *Agriculture and Biology Journal of North America* 1, n° 3 (mai 2010): 313-20. <https://doi.org/10.5251/abjna.2010.1.3.313.320>.
- Zhao, Yan-Jie, Tsuyoshi Hosoya, Hans-Otto Baral, Kentaro Hosaka, et Makoto Kakishima. 2012. « Hymenoscyphus pseudoalbidus, the correct name for Lambertella albida reported from Japan ». *Mycotaxon -Ithaca Ny-* 122 (1 octobre 2012): 25-41. <https://doi.org/10.5248/122.25>.
- Zhong, Yingli, Jiyong Xie, Suzhen Wen, Wenwu Wu, Li Tan, Mingguang Lei, Huazhong Shi, et Jian-kang Zhu. 2020. « TPST Is Involved in Fructose Regulation of Primary Root Growth in Arabidopsis Thaliana ». *Plant Molecular Biology* 103, n° 4 (1 juillet 2020): 511-25. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01006-x>.



**Sitographie :**

CNPF. « Fiches itinéraires techniques par essence ». Consulté le 28 juillet 2024.

<https://www.cnpf.fr/gestion-durable-des-forets/mise-en-oeuvre/fiches-itineraires-techniques-par-essence>.

Fischer, Anne. 2018. « Partie 3 : l'horloge épigénétique, un outil puissant de mesure du vieillissement ». *Work for human longevity* (blog). Consulté le 28 août 2024.

<https://www.longlonglife.org/fr/transhumanisme-longevite/vieillissement/epigenetique-vieillissement-longevite/horloge-epigenetique-un-outil-puissant-de-mesure-du-vieillissement/>.

Ogle DH, Doll JC, Wheeler AP, Dinno A. 2023. « FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods ». R package version 0.9.5, <https://CRAN.R-project.org/package=FSA>.

R Core Team. 2024. « R: A Language and Environment for Statistical Computing ». R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Slowikowski, K. 2024. « ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2' ». R package version 0.9.5, <https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>.

Taiyun Wei and Viliam Simko. 2021. « R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix ». R package version 0.92. <https://github.com/taiyun/corrplot>



# Annexes







## Annexe 2 : Paramètres de l'HPLC pour le dosage des sucres solubles.

Les échantillons ont été analysés avec la chaîne HPLC VWR-HITACHI Chromaster couplée au détecteur DEDL. Les données ont été acquises et traitées avec le logiciel dOpenLAB CDS version EZChrom.

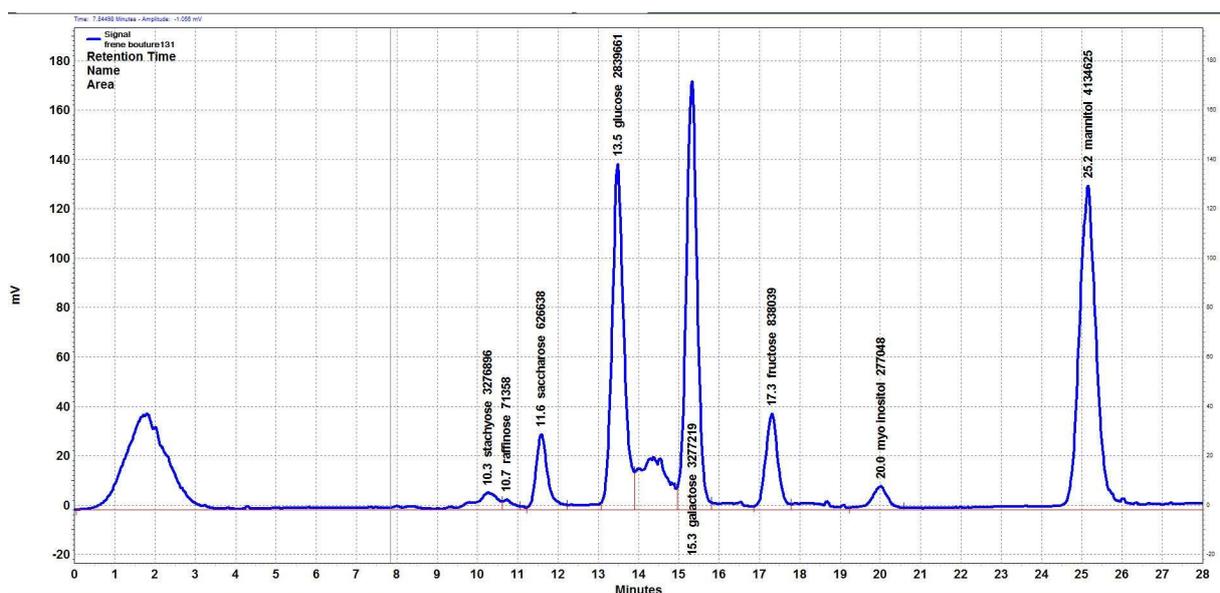
Les conditions chromatographiques ont été les suivantes :

- Méthode : sucres07\_colonneREZEX\_Pb
- Durée d'analyses : 28 minutes
- Colonne : RezexTM RPM-Monosaccharide Pb+2 (8%) 300x7.8 mm (n° série H19-362730 – Phénoménex).
- Température de la colonne : 85°C
- Eluant : eau ultra-pure
- Débit : 0,6 ml/min
- Volume d'injection : 10 µl (soit 25 µg de mannitol)
- Paramétrages du détecteur DEDL :
  - Temperature : 60°C
  - Gain : 5
  - Offset: 0
  - Filter: 6s,
  - Sampling time: 100ms-10Hz
  - Pressure: 3,5 bars

L'identification des sucres a été réalisée par comparaison avec les temps de rétention de sucres de référence (Sigma). La quantification des sucres a été réalisée par étalonnage externe : l'injection des sucres de référence à 10, 20, 40, 60 et 80 µg a permis de réaliser des courbes de calibration afin de convertir les surfaces de pic en quantité de sucres présents dans les échantillons végétaux.

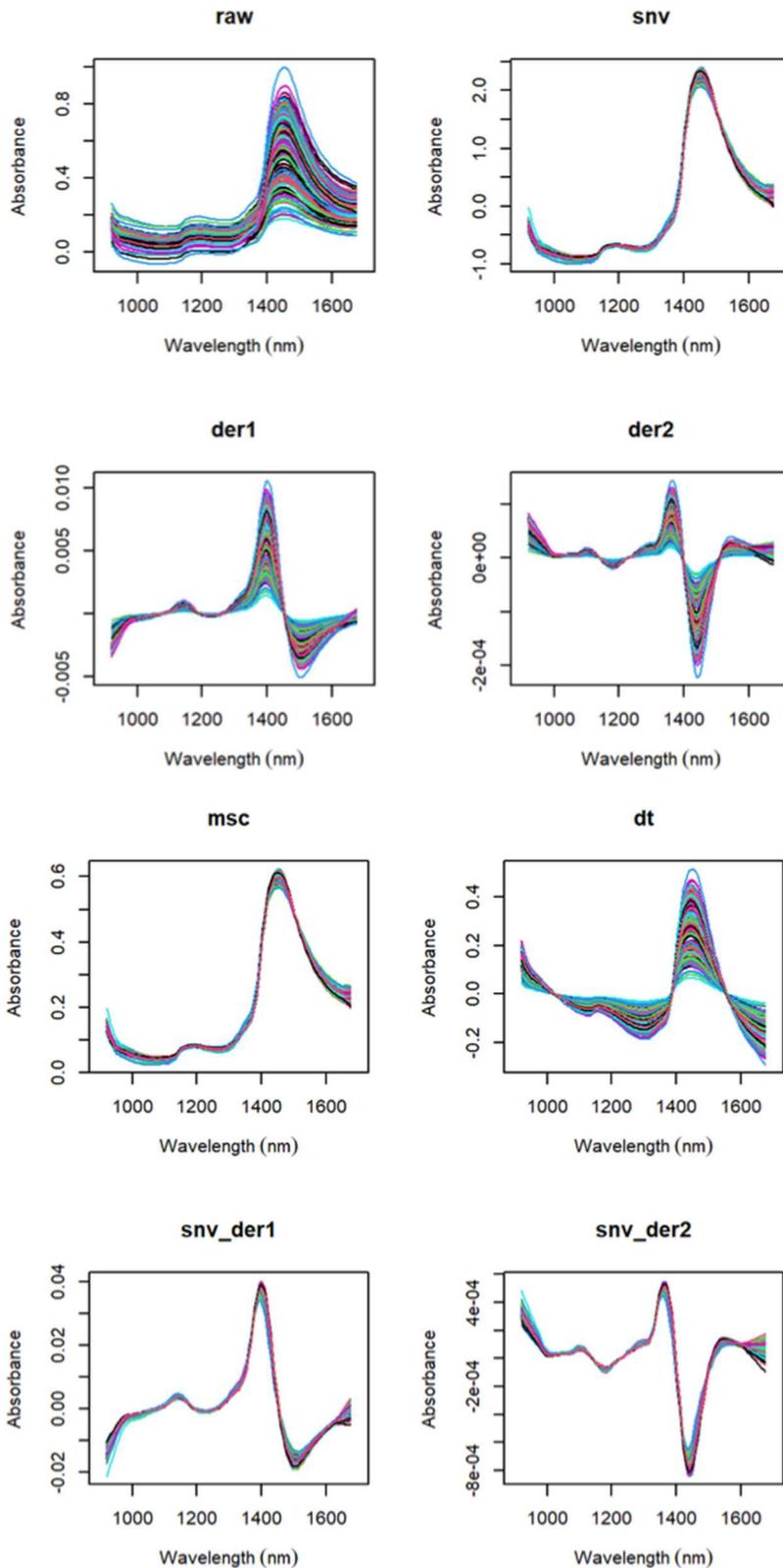
## Annexe 3 : Chromatogramme obtenu par le dosage en HPLC sur un échantillon de tige.

En ordonnée, l'intensité de la détection en mV et en abscisse le temps de rétention en minutes. Le sucre assigné et le temps de rétention sont indiqué sur chaque pic. Le premier pic observé entre 1 et 3 minutes de temps de rétention correspond au front d'injection.





Annexe 4 : Effets des huit modalités spectrales sur les spectres PIR mesurés avec l'appareil portable sur les feuilles fraîches des boutures de l'expérimentation plein champ. En ordonnée, l'absorbance de l'échantillon pour la modalité « raw », et une unité arbitraire calculée à partir de l'absorbance. En abscisse, la longueur d'onde en nm.



**Fiche résumé = quatrième de couverture du mémoire\***

	Diplôme : Ingénieur de l'Institut Agro Angers Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Seeds and Plants Propagation Enseignant référent : Gilles GALOPIN
Auteur(s) : Chloé RICHARD  Date de naissance* : 06/12/2001	Organisme d'accueil : INRAE – Val de Loire Adresse : 2163 Avenue de la Pomme de Pin
Nb pages : 36      Annexe(s) : 4	45160 ARDON
Année de soutenance : 2024	Maître de stage : Arnaud DOWKIW
Titre français : Prédiction de la capacité rhizogène de boutures de frêne commun ( <i>Fraxinus excelsior</i> ) par des approches morphologique, biochimique et spectrométrique.	
Titre anglais : Prediction of the rhizogenic capacity of common ash ( <i>Fraxinus excelsior</i> ) cuttings using morphological, biochemical and spectrometric approaches.	
<p>Résumé (1600 caractères maximum) : Le bouturage de <i>Fraxinus excelsior</i> est un enjeu essentiel pour l'évaluation et la diffusion de génotypes de faible sensibilité à la chalarose. Le frêne commun étant récalcitrant au bouturage, de nombreux essais sont menés pour optimiser ce processus. Au cours de la présente étude, des boutures ont été prélevées sur des plants clonaux ou issus de semis, cultivés en serre ou en plein champ, rejeuvenilisés par un recépage et entretenus par des pincements. Des mesures morphologiques, biochimiques et spectrométriques (proche et moyen infrarouge) ont été réalisées sur ces boutures. Les résultats de cette étude ont montré (i) que la mortalité des boutures était corrélée avec certaines caractéristiques morphologiques et biochimiques, et que la spectrométrie proche et moyen infrarouge permettait de prédire cette mortalité ; (ii) que la génétique au niveau famille n'influe pas significativement l'enracinement ou les caractéristiques mesurées des boutures ; (iii) que les modalités de pincement à un et deux métamères produisaient des boutures avec des caractéristiques morphologiques, biochimiques et spectrométriques différentes ; (iv) que le taux de certains sucres dans les tissus végétaux pouvaient être estimés par spectrométrie infrarouge.</p>	
<p>Abstract (1600 caractères maximum): Propagating <i>Fraxinus excelsior</i> by cuttings is a key factor in the evaluation and dissemination of ash dieback low-susceptibility genotypes. As common ash is recalcitrant to cuttings, numerous trials are being carried out to optimize this process. In the present study, cuttings were taken from clonal or seedling plants, grown in the greenhouse or in the field, rejuvenated by cut-back pruning and maintained by regular pruning. Morphological, biochemical and spectrometric (near- and mid-infrared) measurements were carried out on these cuttings. The results of this study showed (i) that cuttings mortality was correlated with certain morphological and biochemical characteristics, and that near- and mid-infrared spectrometry was able to predict this mortality; (ii) that genetics at family level did not significantly influence rooting or the measured characteristics of the cuttings; (iii) that one- and two-metamers regular pruning modalities produced cuttings with different morphological, biochemical and spectrometric characteristics; (iv) that the levels of certain sugars in plant tissues could be estimated by infrared spectrometry.</p>	
Mots-clés : multiplication végétative, spectrométrie infrarouge, sucres solubles, morphologie végétale, juvénilité, <i>Fraxinus excelsior</i> , chalarose	
Key Words: vegetative propagation, infrared spectrometry, soluble sugars, morphology, juvenility, <i>Fraxinus excelsior</i> , ash dieback	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires