

Techniques des croisements contrôlés pratiqués sur les chênes blancs européens sur le site de Pierroton au laboratoire de génétique (Biogeco) de 1987 à 2009

Institut national de la recherche agronomique
Centre de Bordeaux
UMR Biogeco
Laboratoire de génétique et d'amélioration
33610 Cestas France

Guy Roussel guy.roussel@pierroton.inra.fr

Téléphone : 0 557 122 841

Dernière mise à jour : 2009

<http://www.pierroton.inra.fr/biogeco/>



Sommaire

1. Introduction

2. Technique de récolte du pollen

- 2-1 Stades de développement des inflorescences mâles
- 2-2 La décision de récolte du pollen
- 2-3 Description de la poche tamis de maturation et à entonnoir, Récolte pollen
- 2-4 Maturation en poches tamis, tamisage
- 2-5 Résumé des opérations de traitement du pollen

3. La conservation du pollen

- 3-1 Usage du pollen conservé à -18°C
- 3-2 Le processus de conservation
- 3-3 Alicotage, manipulation
- 3-4 Contrôle de la survie du pollen à -18°C
 - 3-4-1 Principe de la fluorescence dans un grain de pollen
 - 3-4-2 Test de viabilité par fluorescence du pollen de chêne
 - 3-4-3 Test de germination du pollen de chêne
 - 3-4-4 Contraintes des méthodes
 - 3-4-4-a La viabilité
 - 3-4-4-b La germination

4. La technique de croisement

- 4-1 Castration
- 4-2 Techniques d'empochage
 - 4-2-1 Empochage sur arbre adulte à l'aide d'une nacelle
 - 4-2-2 Empochage sur greffes en conteneur
 - 4-2-3 Empochage de jeunes arbres en forêt
- 4-3 Injection pollen, l'injecteur cyclone à deux voies

5. Suivi sanitaire de la fructification des chênes de l'inflorescence au semis

- 5.1 Le gel, la pluie, le vent...
- 5.2 Pucerons et autres ravageurs, prédateurs convoitant la glandée
- 5.3 Effet positif du biberonnage
- 5.4 Récolte et conservation des glands
- 5.5 Ciboria
- 5.6 La mouche du collet
- 5.7 Le mulot, le geai
- 5.8 Dates semis, pré germination
- 5.9 Conclusion

6. Tri des croisements à l'aide des marqueurs moléculaires

- 6.1 Prélèvements sur les semis
- 6.2 Exemple de microsat sur séquenceur Licor

7. Utilisation du matériel issu des croisements

- 7. 1 Parc à pied mère en pépinière
- 7. 2 Carte génétique
- 7. 3 Dispositifs conservatoires
- 7. 4 Hybrides inter spécifiques

8. Conclusions

9. Remerciements

10. Bibliographie

11. Annexes

- 11 .1 Historique des développement techniques
- 11 .2 Tableau suivi récolte pollen, codes suivi chronologique
- 11 .3 Tableau résumé des consignes pour la pollinisation
- 11 .4 Tableau résumé suivi sanitaire
- 11 .5 Le cycle de reproduction du chêne pédonculé extraits de *Biologie florale et cycle de reproduction* par Marc Bonnet Masimbert 1984
- 11 .6 Suivi récolte glands sur 3 sujets de parc, Pierroton, du 21 / 09 > 27 / 11 / 1990
- 11 .7 Article traitant de l'injecteur cyclone à deux voies paru dans le cahier technique de l'INRA
- 11 .8 Extrait de C.Delatour et M Morelet 1979 « La pourriture noire des glands » *Biologie forestière Ciboria*
- 11 .9 Extraits de « La conservation des glands, bilan des essais menés entre 1976 et 1982 » *Ciboria Claudine Muller et Marc Bonnet Masimbert 1984*
- 11 .10 Extrait de BALACHOWSKY. - *Traité d'Entomologie* (t. 1, vol. 2). *PHYTOPHAGOIDEA CURCULIONIDAE p1126>28*
- 11 .11 Essai traitements dans les poches
- 11 .12 Relevé période injection pollen sur chêne 1987 > 2005
- 11.13 Validation des techniques de croisements contrôlés mises au point dans le laboratoire BIOGECO génétique

1. Introduction

Pour les besoins du laboratoire de génétique et d'amélioration des arbres forestiers de Pierroton, nous réalisons des croisements contrôlés sur les chênes depuis 1987. Nous avons dû mettre en place des techniques permettant ces croisements et leur réalisation à une échelle importante (ex : campagne annuelle de 800 poches sur arbre adulte, nécessitant une nacelle). Il a fallu appréhender un certain nombre de paramètres biologiques et mettre au point les outils pour réaliser ces croisements. Ce cahier a pour ambition de fixer les techniques mises au point pour le passage du témoin, et la mise à disposition de collègues pratiquant des techniques proches.

Toutes ces étapes nous ont permis de mettre au point et d'affiner nos techniques de travail, et de gagner en efficacité (en économisant efforts, ressources humaines et temps). La castration, l'injection « traditionnelle », le travail en nacelle ...nécessitent beaucoup de temps machine et de main d'œuvre. (annexe 11. 1: Les principales étapes techniques abordées de 1987 à 2008).

2 Techniques de récolte du pollen

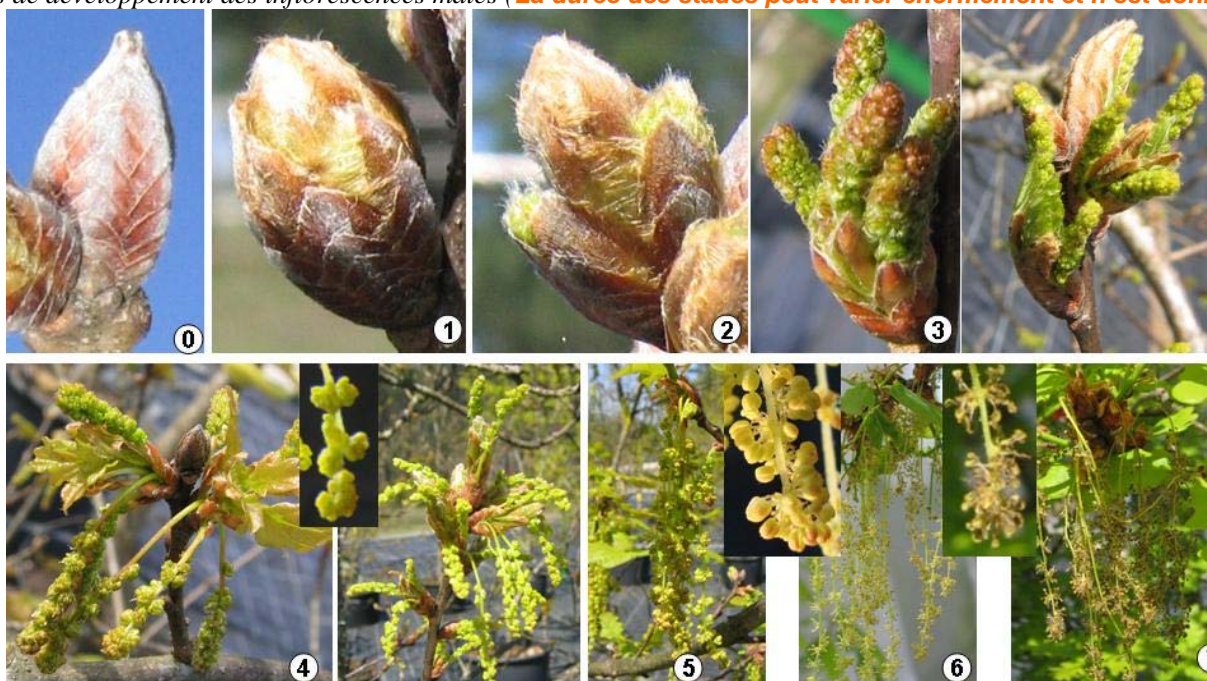
Le programme d'étude concernant les chênes ne suit pas une stratégie type amélioration génétique du pin. Le choix des arbres utilisés pour les croisements s'est fait sur des critères d'accessibilité, de capacité à produire du pollen, des glands. Pour obtenir suffisamment tôt du pollen pour les croisements réalisés sur le domaine de Pierroton (Hermitage), nous le récoltions sur des arbres en bordure du bassin d'Arcachon où la végétation est plus précoce qu'à Pierroton. Nous avons choisi des arbres florifères et très accessibles. L'expérience de nombreuses récoltes nous a permis de bien cerner la marche à suivre pour ce type de récolte. Nous avons commencé par codifier les stades de développement des inflorescences mâles.

2-1 Stades de développement des inflorescences mâles, tableau 1, photos 1

Le tableau donne des temps moyens d'évolution qui varient en fonction de la météo et peuvent évoluer plus ou moins rapidement. De plus d'un individu à l'autre ces stades peuvent s'exprimer différemment, notamment certains individus étirent très peu l'axe de leurs inflorescences qui mûrissent ainsi ramassées (comportement individuel, météo défavorable). La maîtrise de la pollinisation demande une attention permanente. Les stades donnent une échelle de notation lors des passages sur le terrain en vue d'une récolte.

Code stades des inflorescences mâles	Description des différents stades des inflorescences mâles	Evaluation approximative de la durée moyenne des stades	Stade végétatif de l'arbre
1	<i>bourgeons en pinceau, les "écaillés" ne sont plus soudés et laissent voir des "écaillés" plus claires</i>		<i>gonflement des bourgeons (empochage sans castration)</i>
2	<i>éclatement du bourgeon avec apparition des chatons mâles comprimés en grappe</i>	5 jours +	<i>apparition des feuilles et des chatons mâles compactés</i>
3	<i>allongement des inflorescences mâles</i>	5 jours +	<i>déploiement des feuilles, des jeunes rameaux</i>
4	<i>étirement de l'axe, dégagant des "grappillons" d'anthers</i>	5 jours +	
5	<i>passage des anthers du vert au jaune</i>	2 jours +	<i>fin de déploiement des feuilles</i>
6	<i>éclatement des sacs polliniques et déhiscence du pollen</i>		<i>Les feuilles passent d'un vert tendre à un vert bouteille</i>
7	<i>dessèchement et chute des chatons mâles</i>		<i>fin du déploiement de la première pousse</i>

tableau 1 : Stades de développement des inflorescences mâles (*La durée des stades peut varier énormément et n'est donnée qu'à titre indicatif*)



photos 1 : clichés stades inflorescences mâles

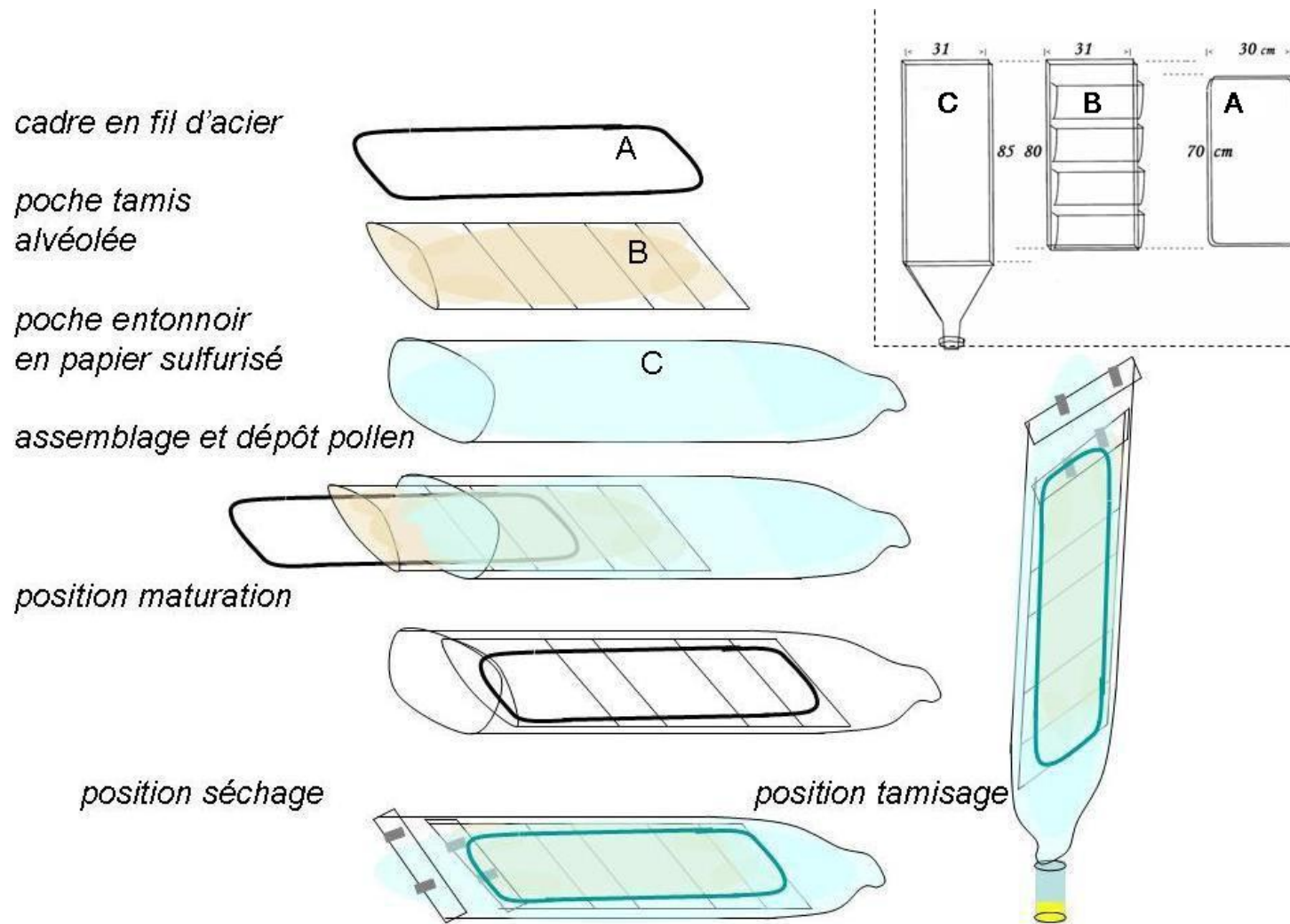


figure 2 : Description et usage de la poche tamis de maturation et de tamisage

2-2 La décision de récolte du pollen

Pour une récolte optimum des inflorescences mâles, il est nécessaire d'attendre le dernier moment avant la déhiscence soit le stade 5-6. La période d'intervention doit être repérée précisément. Ne pas hésiter à remettre la cueillette : ce facteur est déterminant pour la production de pollen et sa viabilité. L'intervention d'un tiers pour l'évaluation des stades sur un site éloigné, demande un minimum d'expérience et de méticulosité. Le type de météo est aussi un facteur déterminant pour la réussite de la récolte. Une récolte et une pollinisation en période chaude et sèche seront toujours plus favorables que lors d'un printemps froid et humide. La récolte des chatons sous la pluie est à proscrire. Ces chatons auraient toutes les chances de s'échauffer et de moisir. Dans un cas extrême, il faudrait évacuer l'eau imprégnant les anthères le plus rapidement possible et ne les rentrer en poche de maturation qu'une fois bien ressuyées.

2-3 Description de la poche tamis¹ de maturation à entonnoir, Récolte du pollen, figure 2, photos 3

La poche tamis mis au point permet d'isoler la récolte, tout en permettant un ressuyage des inflorescences mâles, leur maturation, leur séchage à 30°C en chambre chaude ventilée et enfin la récupération du pollen par tamisage.

Un cadre de fil d'acier rigide A est introduit dans la poche tamis B, alvéoles à l'intérieur du tamis. Les anthères sont déposées dans le tamis. Les alvéoles évitent un empilement excessif des inflorescences. Le tout est introduit dans la poche entonnoir C en papier sulfurisée. Ainsi la maturation peut s'achever sans risque de pollution, puis l'extraction par tamisage peut être réalisée avec un minimum de manipulation.

En pratique, nous arrachons les bouquets de chatons en évitant les feuilles et les rameaux, chatons que nous collectons dans des sceaux. Cette cueillette est pesée et répartie le plus régulièrement possible à l'intérieur de la poche tamis, tamis qui est ensuite déposé soigneusement dans la poche entonnoir, en évitant l'empilement prolongé des chatons qui provoquerait un échauffement préjudiciable (épaisseur d'anthères 2 à 3 cm maximum). L'ensemble est ensuite déposé à plat sur un portoir laissant un espace de ventilation entre les poches. La récolte nécessite une intervention rapide. Dans de bonnes conditions, à titre indicatif, à trois personnes on récolte environ 5 kilogrammes de chatons par jours soit environ 12 poches de maturation.



photos 3 : étamines bien gonflées, récolte, dépôt récolte dans la poche tamis, dépôt poche sur portoir, fixation tube, poches tamis sur le secoueur

¹ tamis : référence trame du 03/07/96 diatex 1000 PES-Marouflage; Diatex 58 ch des sources 69230 Saint Genis Laval France 78 868 500

2-4 Maturation en poches tamis, tamisage, photos 3

Les opérations de maturation et de séchage en poche tamis se réalisent à plat sur des portoirs aérés à 15 à 20°C (ventilation passive du local). L'idéal pour la maturation serait de soumettre le matériel à un flux d'air qui entraînerait l'excès d'humidité de la poche. Nous ne l'avons pas expérimenté à ce jour. Le pliage en forme d'entonnoir de la poche sulfurisée se fait aujourd'hui après maturation, l'ouverture au deux extrémités de la poche durant la maturation permet une meilleure ventilation. On fixe le flacon à vis récepteur de pollen sur l'extrémité de la poche tamis en forme d'entonnoir à l'aide d'un élastique de greffage. Lorsque les anthères libèrent le pollen massivement, la poche est fermée, on effectue un séchage de 12h à 30°C en chambre chaude ventilée (mécanique), et un tamisage soit manuel, soit mécanique à l'aide d'un châssis secoueur. Nous pratiquons 2 tamisages précédés d'un séchage de 12h, le second donnant toujours un complément conséquent de pollen. Toutes ces opérations demandent environ 2 à 4 jours en fonction de la météo et l'état de la récolte. Les poches tamis permettent une manipulation rapide et aisée pour toutes les étapes de la récolte au tamisage. Dès l'obtention du pollen tamisé dans le tube réceptacle, on le dépose au frigo avant son conditionnement pour le stockage à -18 °C. Dans la pratique ce passage au frigo devrait être le plus court possible.

2-5 Résumé des opérations de traitement du pollen (tableau 4, fichier récolte annexe 11. 2)

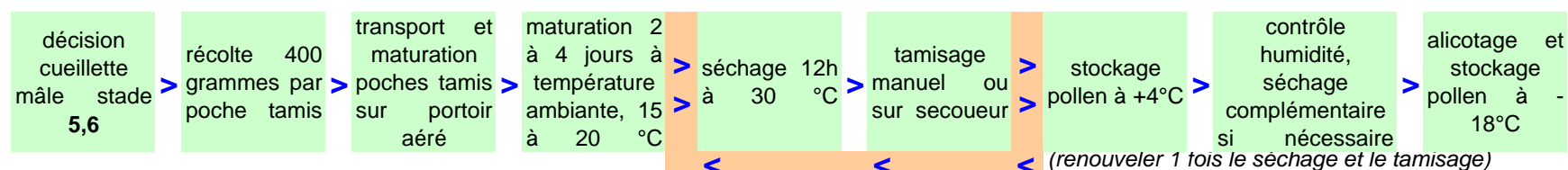


tableau 4 : résumé opérations de traitement du pollen

Le temps de maturation aussi bien à 30°C, lors du séchage avant tamisage, à + 4°C, étape conservatoire avant le stockage, à 30°C, séchage à 20% avant stockage à -18°C, toutes ces étapes doivent être réduites autant que possible, car le pollen est un matériel vivant fragile et ici, précieux. Lors du passage d'un lot de pollen à un autre utiliser de outils propres et se laver les mains à l'alcool 76 %, pour éviter les pollutions, travailler dans un local sans passage, réduire l'exposition du pollen à l'air ambiant durant les manipulations.

C'est la précision du suivi phénologique, la météo, la rapidité d'évaluation et d'intervention qui détermineront la qualité de la campagne de récolte.

3 La conservation du pollen

3-1 Usage du pollen conservé à -18°C

Différents facteurs imposent l'usage de pollen conservé d'une année sur l'autre :

- Les décalages phénologiques importants qui existent entre individus, stations, espèces... pour récolter et croiser la même année avec un pollen donné.
- Les périodes d'interventions sur des sites différents sont difficilement gérables même par une équipe importante. Le travail étalé sur plusieurs années permet de se concentrer sur un secteur particulier et d'affiner la technique.

Enfin la conservation du pollen à -18°C, le test de viabilité, les résultats *in vivo* donnent des résultats satisfaisants. Pour ces raisons nous récoltons le pollen pour les pollinisations des années ultérieures. On le conserve une fois conditionné à -18°C, et aujourd'hui nous utilisons du pollen récolté depuis 1 à 10 ans.

3-2 Le processus de conservation

Le processus de conservation démarre dès sa récolte. Pour cela que les différentes étapes de son traitement doivent être calibrées. Nous ne reviendrons pas ici sur le mode opératoire de récolte, nous prenons les opérations juste après extraction du pollen qui est déposé au frigo + 4°C. Initialement, année 60-70 (Pin maritime), nous conservions le pollen à -18°C à l'aide de gel de silice en contact direct avec le pollen. Il s'est avéré que ce contact était néfaste à la survie du pollen.

Aujourd'hui, avant son stockage à -18°C, nous faisons baisser son humidité dans la chambre chaude ventilée à + 30°C. Le pollen y est déposé en couche mince dans des enveloppes de papier sulfurisé fermées mais perméable au gaz et à la vapeur d'eau. On descend l'humidité à environ 20%. Taux que l'on contrôle à l'aide d'un papier indicateur coloré² qui vire du bleu au violet. Ce séchage du pollen après une récolte normale est rapide, 1 à 2 h en chambre chaude maximum.

3-3 Alicotage , manipulation

Depuis 2001, nous aliquotons les lots de pollen dans le but de décongeler le moins possible les lots de pollen lors de leur utilisation, de réduire la présence d'air durant la conservation. Nous remplissons les flacons entièrement au vue de la récolte de pollen (1, 2, 5, 10, 15 ml). On peut aussi mettre sous vide le pollen (technique utilisée à l'INRA d'Orléans).

La manipulation du pollen s'effectue sur une paillasse propre dans un local fermé et isolé des autres opérations (particulièrement le tamisage), la paillasse est essuyée entre chaque lot à l'alcool 76%, on effectue l'alicotage (**figure3**) à l'aide de 2 feuilles de papier A4 superposées à usage unique par lot de pollen. Le remplissage des flacons s'effectue en prenant la feuille contenant le pollen au creux de la main et faisant entonnoir, au dessus de la deuxième feuille servant de récupérateur. Le pollen stocké à -18°C avant une utilisation ultérieure sera testé par fluorescence pour vérifier sa viabilité et ensuite déposé dans le flacon d'injection lors des croisements.

² Un papier indicateur coloré : papers Hydrion humidicator Micro Essential Laboratory, B'klyn, N.Y. 11210U.S.A. cat n° hjh 650 – introuvable en 2008

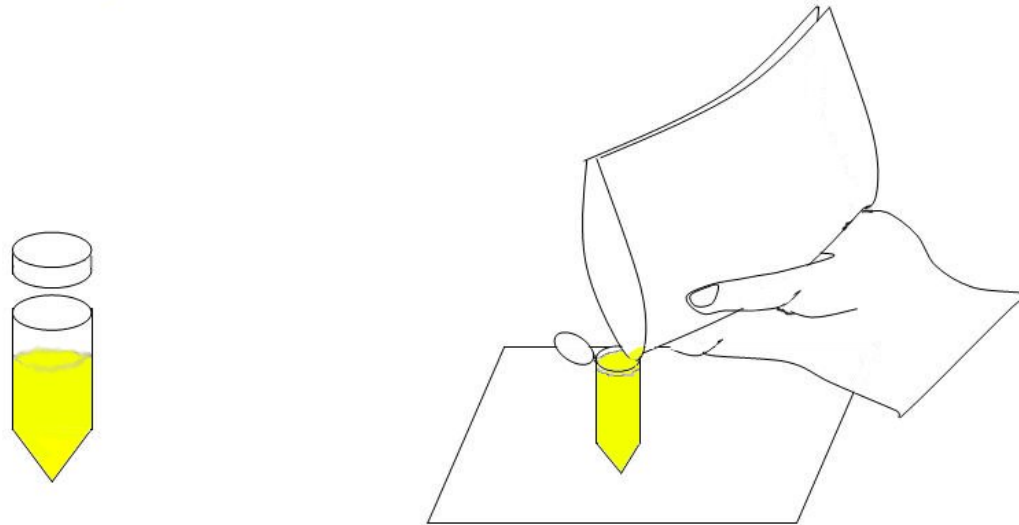


figure 3 : manipulation pollen lors de l'alicotage

3-4 Contrôle de la survie du pollen à -18°C

Pour contrôler l'état de nos lots de pollen que nous conservons à -18°C, nous avons 2 outils, la viabilité par fluorescence et la germination.

3-4-1 Principe de la fluorescence dans un grain de pollen

« Lors ce que le plasmalemme de la cellule végétative du grain de pollen est intact, signe de sa viabilité, l'acétate de fluorescéine non fluorescent est absorbé par le grain de pollen. Une estérase libère la fluorescéine qui est retenue dans le cytoplasme. Celui-ci au fur et à mesure de l'accumulation de la fluorescéine devient fluorescent. Quand le grain de pollen est mort, il n'y a plus d'activité estérasique donc pas de formation de fluorescence libre. De plus le plasmalemme de la cellule végétative n'a plus de perméabilité sélective. L'acétate de fluorescéine pénètre et ressort du grain de pollen. Ce dernier n'est pas fluorescent. »³

3-4-2 Test de viabilité par fluorescence du pollen de chêne.

La réhydratation du pollen avant le test est très importante. Pour cela la veille il faut sortir de -18°C l'échantillon et le mettre en contact de l'air ambiant à + 4 °C (tube entrouvert au frigo).

Le jour du test préparer deux solutions qui seront mélangées au dernier moment. L'expérience montre que les solutions doivent être préparées au plus tôt la veille.

³ D'après: Heslop-Harrison J. and Heslop-Harrison Y. 1970 Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain technology 45: 115-120.

- Sucrose ou saccharose 17 % soit 1.7 gr pour 10 ml
- Fluorescein Diacetate (ref int 33) SIG F 7378 10 mg / 5 ml d'Acétone

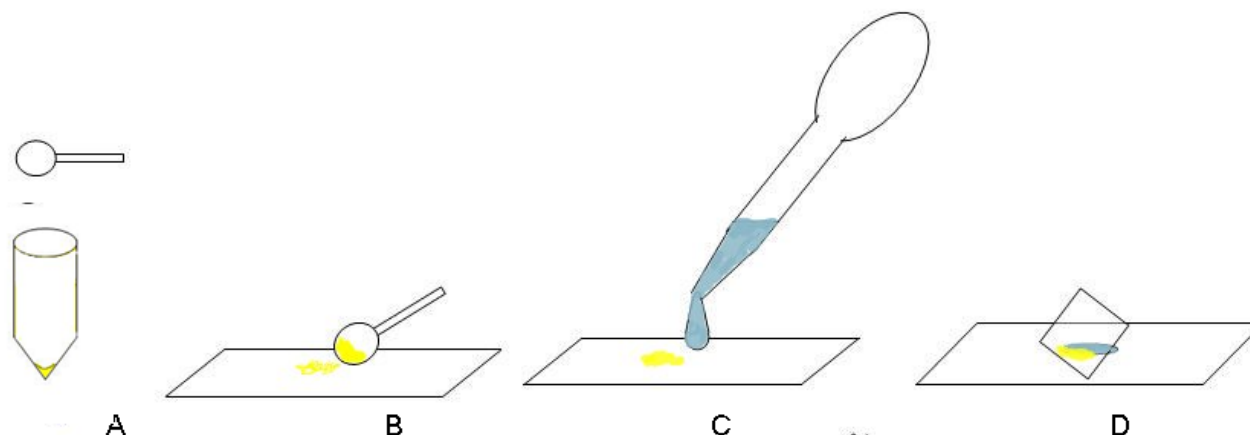
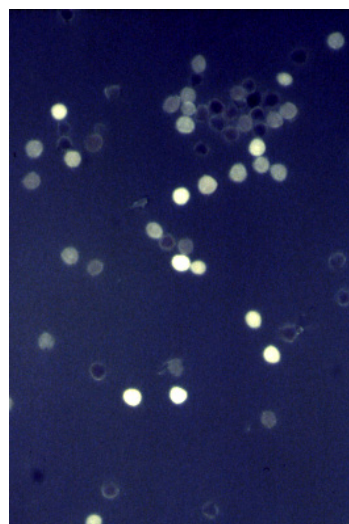


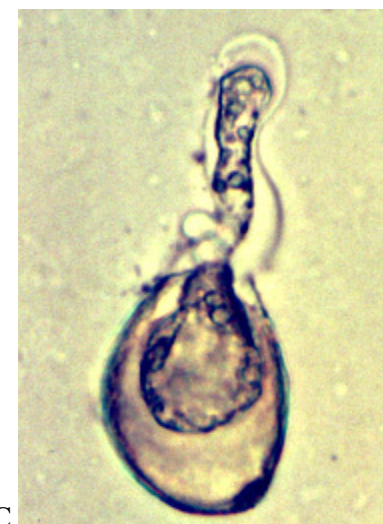
figure 4 : dépôt de pollen réhydraté 12h à + 4°C sur une lame, ajout du mélange fluorescence, brassage avec la lamelle



photos 6 : A : Microscope à éclairage UV ⁴



B : vue au microscope, grains de pollen sombres = non viables, jaunes vifs = viables



C : test de germination, vue au microscope, grain de pollen germé,

⁴ Microscope à éclairage UV, avec un objectif de 10 ou 25, longueur d'onde microscope fluo bleu violet 450-490 nu.

Au moment du test on prépare le mélange nécessaire au test (6 sucrose / 1 fluorescéine). Le pollen de chêne est déposé sur une lame (**figure 4**) B à l'aide du coton tige qui a servi la veille à prélever l'échantillon à tester. Il faut éviter l'excès de pollen car la fluorescence devient diffuse et la lecture est difficile. Une goutte de ce mélange est déposée près du pollen C. On brasse le tout avec la lamelle qui est ensuite déposée sur le mélange D. Dans ces conditions la numération peut être faite au bout de 20 mn à une demi-heure. On considère que les grains de pollen sont viables quand ils prennent une coloration d'un beau jaune fluo. Les autres grains restent plus au moins sombres et sont dits non viables (**photo 6 A**). Le comptage peut-être très rapide par un balayage de la lame et une évaluation dans une fourchette de pourcentage (epsilon, 10-30, 40-60, 70-80 par exemple). Pour les croisements nous utilisons des pollens dont les taux de viabilité sont supérieurs ou égaux à 10 %.

Nota : En 1995, après des problèmes de répétitivité, on a testé différentes proportions de solutions sucrose et de fluorescéine. Il semblerait que les proportions du mélange des 2 solutions étaient à l'origine des problèmes (fluorescence très capricieuse ou nulle). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un mélange des solutions par comptage des gouttes des préparations respectives :

6 sucrose / 1 fluorescéine

3-4-3 Test de germination du pollen de chêne.

Nous avons peu pratiqué la germination (**photo 6 C**). Nous avons utilisé le mode opératoire suivant :

- | | | |
|------------------------------|------|-------------------|
| - Sucrose ou saccharose 20 % | soit | 40 gr pour 200 ml |
| - Agar 1% | soit | 2 gr |
| - Acide borique 0.01% | soit | 0.02 gr |

Le PH est ajusté à 5,5.

Le pollen est déposé sur l'agar en boîte de pétri, incubé 30, 35°C et observé toutes les 12 heures.

Nota : Il existe une technique en milieu liquide, en microtube dite en « goutte pendante » commode pour les manipulations. Le tube renversé permet au pollen de se déposer à la surface inférieure de la goutte.

3-4-4 Contraintes des méthodes

3-4-4-a La viabilité

La qualité du test de viabilité est tributaire de la fraîcheur des produits et des solutions, à leurs dosages. Un témoin de pollen de l'année cueilli mature, lors des tests est le meilleur calage pour la manip. La qualité d'un lot de pollen ne peut préjuger de la réussite d'un croisement qui peut être soumis à des incompatibilités. Le taux de viabilité est un outil de contrôle de la bonne conservation du pollen. Il est très utile lors de croisements polycross⁵ pour pondérer chaque pollen.

3-4-4-b [La germination](#)

Nous avons abandonné en routine la germination car le résultat demande plus de temps que la viabilité. De plus la germination est un peu aléatoire, car trop sensible aux conditions ambiantes (évaporation, température, invasion microorganismes).

4 La technique de croisement

Le principe de base consiste à isoler les inflorescences femelles pour les croiser spécifiquement avec un pollen identifié et récolté à cet effet. Les paramètres à évaluer et à connaître sont nombreux...

Le **tableau 7**, la **figure 5**, les **photos 7** ont été établis pour déterminer la période supposée de réceptivité de l'injection de pollen dans les sacs isolateurs, ainsi que la période de dépochage. Il faut noter qu'il y a un gradient pour la réceptivité sur l'ensemble des inflorescences d'un même arbre. Les conditions météo, la température, l'ensoleillement, la pluie pour ne citer qu'eux ont un rôle majeur sur le bon déroulement de la floraison et la fructification. Nos empochages isolent les inflorescences avant et après la période de réceptivité (déploiement des stigmates de l'ovaire en hélice). Nous injectons alors le pollen du père plusieurs fois pour couvrir cette période de l'arbre.

⁵ Polycross : injection d'un pollen comportant un mélange de plusieurs pères pour un protocole donné.

Description des différents stades, inflorescences femelles	code	Stade végétatif de l'arbre	Durée des stades	Echelle des schémas en + mm +
croissance inflorescences à l'intérieur du bourgeon	1	gonflement des bourgeons (empochage sans castration)	1 à 2 semaines	0.2
éclatement des bourgeons	2	2 apparition des feuilles et des chatons mâles compactés	3 à 7 jours	"
déploiement des inflorescences, coloration en rose, croissance en volume	3	déploiement des jeunes rameaux	3 jours	"
déploiement des stigmates en " hélice" sur un plan horizontal (réceptivité optimum supposée)	4	4 fin de déploiement des feuilles	3 à 7 jours	5
les stigmates deviennent ternes, se ramassent, s'épaississent	5	Les feuilles passent du vert tendre >> vert bouteille		"
l'ovaire grossit, ainsi que les « écailles » de la cupule	6	6 fin du déploiement de la première pousse (chute des chatons mâles)		

La durée des stades peut varier énormément, elle n'est donnée qu'à titre indicatif. Le développement des feuilles, chatons mâles, inflorescences femelles suit des synchronisations différentes suivant les individus.

tableau 7 : Description des stades floraux femelles permettant de suivre la floraison

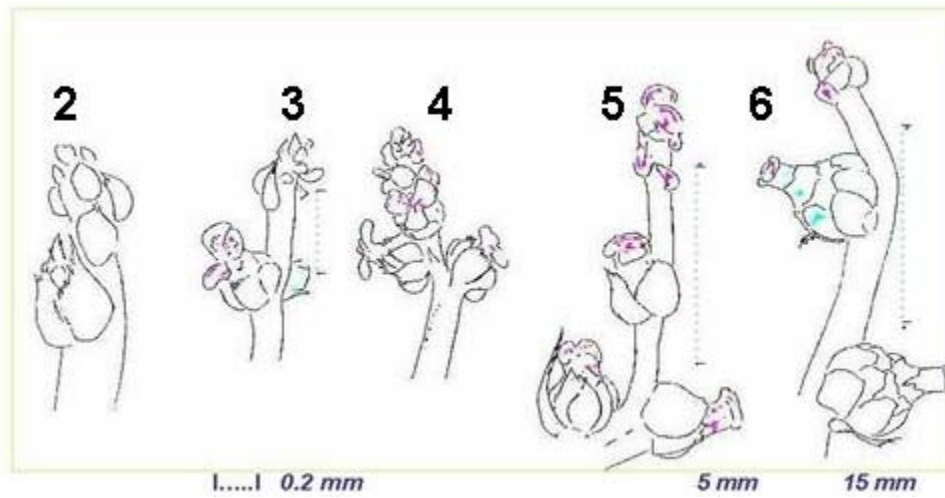
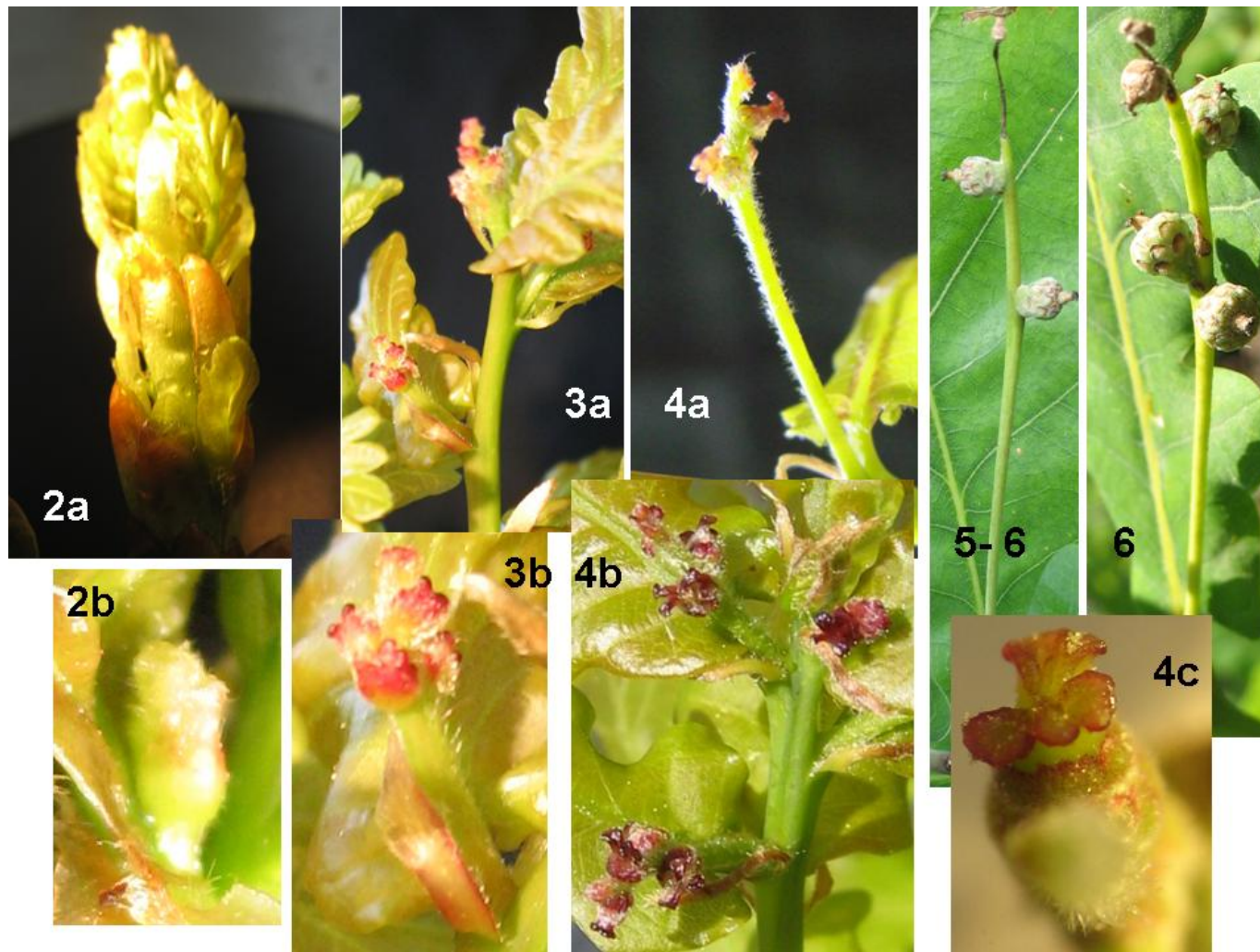


figure 5 : Schéma des stades des inflorescences femelles durant la période de pollinisation



photos 7 : chronologie photographique des stades floraux observés et dessinés en figure 5

2a déploiement rameau, 2b massif d'inflorescences incolores, 3a déploiement feuilles, 3b déploiement inflorescence, 4a déploiement filet inflorescence, 4b, 4c déploiement stigmates (période réceptivité), 5-6 développements post pollinisation (période dépoche, une dizaine de jour après la dernière injection).

4-1 Castration

Jusqu'en 1991 nous pratiquions des croisements en castrant les inflorescences mâles au stade de l'étirement des chatons mâles (3-4). Nous avons du abandonner cette méthode car nous observons de nombreuses pollutions⁶ des croisements lors de analyses isoenzymatiques. Ces pollutions étaient sans doute dues aux dépôts de pollen exogène sur les fleurs, dépôts inévitables à cause d'un empochage tardif. Depuis nous empochons les inflorescences mâles et femelles beaucoup plus tôt, stade gonflement intensif de bourgeons ($0 > 1$, photos 1). Les descendants obtenus sont triés à posteriori à l'aide de marqueurs (isozymes, microsat). On considère que les chênes sont autostériles. Nous observons toutefois des autofécondations, qui sont identifiées lors des tris au laboratoire de biologie moléculaire. Il ne faut pas empocher trop tôt les arbres en extérieur car des conditions météo défavorables peuvent à tout moment compromettrent la campagne de croisements, surtout si les isolateurs forcent l'avancement physiologique (risque de gel, de coulure des inflorescences).

4-2 Techniques d'empochage

Au cours des années de croisements nous avons adapté nos techniques d'empochage aux différents types d'interventions.



photos 9 : *Empochage sur arbres adultes*

4-2-1 Empochage sur arbre adulte à l'aide d'une nacelle, photos 9, 1987...

⁶Zanetto A, Roussel G, and Kremer A, 1994. Geograp variation of interspecific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. For G et 1:111-123.

Bacilieri R, Roussel G, and Ducouso A, 1993. Hybridization and mating system in a mixed stand of sessile and pedunculate oak. Ann Sci For 50:122s-127s.

La technique d'empochage a bien évolué. A l'origine, nous empochions avec des poches de papier sulfurisé (0.7 x 0.25 m) que nous enlevions une fois les croisements réalisés. Nous nous sommes aperçus que les poches laissées sur l'arbre durant le développement des glands les protégeaient de la larve d'un coléoptère parasite, le balanin. Nous avons donc par la suite laissé la poche jusqu'à la récolte, cette poche elle-même recouverte d'un filet pour ne pas perdre les glands à maturité, la poche de papier risquant de se déchirer au cours de la saison de végétation. L'expérience nous fait dire que cet empochage durant l'été loin d'être néfaste aux croisements, les favorise lors de conditions difficiles, tels les printemps humides et froids même s'il entraîne une maturation précoce des glands à l'automne. Par exemple en 1998 nous avons obtenu seulement des glands dans les poches et rien sur le restant de l'arbre. Ceux sont des résultats honorables après les conditions de croisements pluvieuses et froides qui ont condamné la floraison naturelle à l'extérieur... Depuis 1995 nous utilisons aussi des poches en polyester non tissé⁷, plus grandes (2 x 0.5 m), qui sont plus rigides à l'extérieur et résistent mieux aux conditions météo difficiles. On fixe les poches sur les rameaux à l'aide de mousse et d'un lien plastique à crans.

La récolte des poches initialement était faite au sécateur donc destructive pour les rameaux ce qui dégradait les arbres utilisés pour les croisements. Nous avons opté pour un dépochage sur site, donc plus long mais préservant l'arbre pour les campagnes suivantes.



photos 10 : Parc à greffes en conteneur, greffes empochées en serre

4-2-2 Empochage sur greffes en conteneur⁸, photos 10

⁷ polyester non tissé : référence non tissé 6130 : Norlys ZI de la blanche maison av de l'Europe BP 109 59270 Bailleul 0 328 437 474

⁸ Roussel G., 2007. Elevage de chênes greffés en conteneur pour un programme de croisements contrôlés, Cahier des techniques de l'Inra , n° 62, 33- 45

Depuis 2001 nous réalisons les croisements sur les greffes obtenues à partir des arbres adultes sur lesquels nous travaillons depuis 1987. Ces greffes sont élevées en conteneur de 60 litres, conteneur qui permet de contrôler les conditions de pollinisation en entrant les greffes en serre durant la période de pollinisation. Nous cumulons ainsi de nombreux avantages

- l'entrée en serre favorise une très bonne expression de la floraison.
- nous empochons la totalité de la greffe.
- le travail s'effectue à hauteur d'homme.
- on peut par la même multiplier le nombre d'injections de pollen.
- nous fertilisons et arrosons tout au long de la saison de végétation les greffes ressorties à l'extérieur pour favoriser la fructification et les floraisons à venir.

Les greffes fleurissent de manière régulière au bout de 4 à 6 ans après le greffage. Les chênes pédonculés sont plus rapides à fructifier que les chênes sessiles. Cette technique a toutefois quelques désavantages. La greffe en conteneur est fragile au dessèchement par exemple, certaines meurent pour des raisons diverses, stress, incompatibilité, greffage défectueux... Nous ne laissons pas le sac isolateur sur la greffe qui passe l'été à l'extérieur et nous devons traiter pour éviter les dégâts du balanin. A l'extérieur il nous a fallu concevoir un système d'encrage des greffes qui chaviraient lors des coups de vent.

En 2008 nous utilisons cette technique depuis 13 ans et nous voyons qu'après une dizaine d'année la greffe dans ces conditions souffre et est à l'étroit dans le conteneur. Nous estimons que pour la pérennité du parc à greffes il faut songer à rajeunir au fur et à mesure par de nouvelles greffes des clones à conserver.



Photos 11 : *Empochage au Domaine Expérimental de la Tour de Rance 2008-9*

4-2-3 [Empochage de jeunes arbres en forêt](#)⁹, photos 11, 2001- 2009

⁹ Technique d'empochage forestier pour des croisements contrôlés

Depuis 2006 nous appliquons la technique d'empochage en serre (isolation avec du non tissé) en forêt. Pour cela nous empochons de jeunes sujets d'une dizaine d'années qui commencent à fructifier. De la même façon nous empochons la majeure partie de l'arbre que nous pollinisons avec l'injecteur à deux voies. Il nous faut vérifier que le non tissé donne satisfaction quand à son rôle de barrage au pollen « sauvage » dans des conditions extérieures.

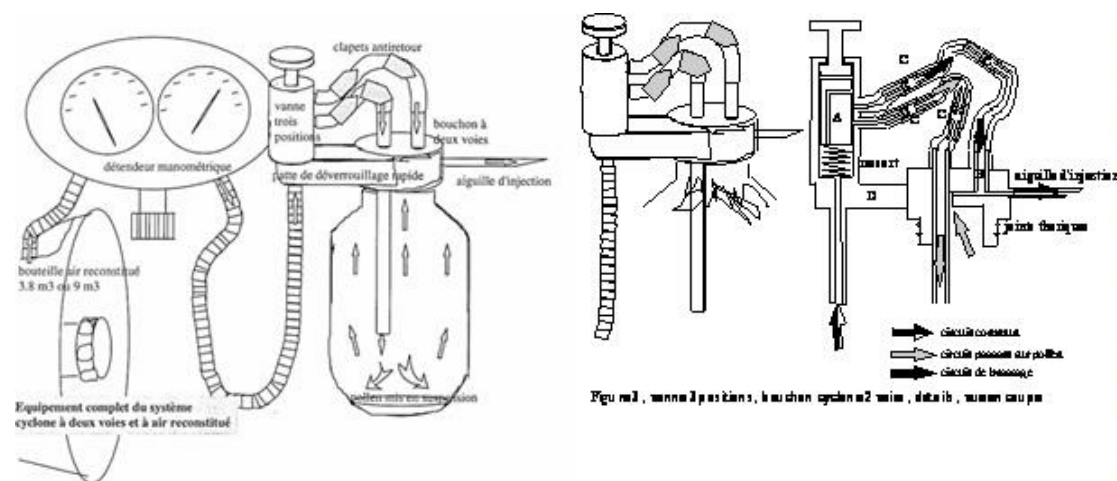


photo 12 : Injecteur cyclone à deux voies et à air reconstitué en 1995



miniaturisé à air comprimé en 2007

4-3 Injection pollen, l'injecteur cyclone à deux voies¹⁰, photo 12

Pour l'injection du pollen nous nous sommes inspirés de ce qui se pratiquait à l'époque (1970) sur d'autres espèces. Nous nous servions d'un flacon dans lequel une poire met en suspension le pollen et l'entraîne à l'intérieur de la poche contenant le rameau florifère. Nous injectons le pollen à l'aveugle, c'est à dire que lors des injections nous ne voyons pas les inflorescences à l'intérieur de la poche, et nous supposons que la série d'injections recouvre la période de réceptivité de l'ensemble des inflorescences. Sur le rameau empoché les inflorescences sont très dispersées. Le volume des protocoles prenant de l'importance au cours des années, la recherche d'une meilleure efficacité a été nécessaire au niveau de l'économie du pollen et de sa dispersion dans les poches. La mise au point du cyclone à deux voies en est le résultat. A ce jour, le système est utilisé en routine et donne toute satisfaction. Nous utilisons un compresseur portable qui nous permet d'obtenir les 1.5 à 2 bars nécessaires à entretenir le flux d'air utile. A l'aide d'un piston à 2 voies nous dosons la quantité de pollen injectée ainsi que son brassage à volonté dans des isolateurs qui aujourd'hui atteignent jusqu'à 3 m³. Ce système permet d'économiser de manière importante le pollen (d'un facteur d'ordre 10). Il restait à vérifier que ces innovations permettaient bien l'obtention des croisements désirés. Les tris des descendants¹¹ à l'aide des microsattellites, 2000-04 valident ce type d'injecteur aux vues des productions obtenues (annexe 11.13).

¹⁰ Injecteur de pollen à deux voies et à air reconstitué, Cahier des technique INRA n° 42 Juillet 1999

¹¹ Validation des techniques de croisements contrôlés mises au point dans le laboratoire BIOGECO génétique des arbres forestiers (document interne annexe 11.13) 2004

5 Suivi sanitaire de la fructification des chênes de l'inflorescence au semis

Un bon nombre des observations et des solutions apportées qui vont suivre ont été relevées lors des croisements contrôlés qui sont plus sujets à des contrôles lors des différentes étapes de la fructification. Nous énumérons ici la liste des infestations qui nous ont posé des problèmes des premiers croisements à ce jour :

- le gel et de longues périodes pluviales sont les premiers destructeurs de la floraison
- les pucerons et autres ravageurs lors de la floraison
- les prédateurs de la glandée le balanin ¹², le ciboria ¹³, le gibier
- la mouche du collet ¹⁴, le mulot lors des semis
- le geai

Nous signalons aussi des améliorations que nous avons apportées :

- l'effet positif du biberonnage en conteneur
- récolte et conservation des glands

Nous ne parlons pas des dégâts occasionnés lors du développement des bourgeons (par exemple des parasites type asticot ou ver). Nos seules interventions à ce stade se résument à une fertilisation des arbres susceptibles de passer en croisements contrôlés pour favoriser la floraison.

5.1 Le gel, la pluie, le vent...

Lors du gonflement et de débourrement des bourgeons une gelée de l'ordre de -5°C peut brûler ces derniers (**photos 13** : A). Pour éviter les dégâts du gel lors d'un empochage total de l'arbre, ce même sac est enterré (ce qui permettrait aux réserves calorifiques du sol de tamponner l'ambiance du sac). Théoriquement cela devrait éviter les dégâts, ainsi que les effets d'inversion. Dans la pratique les dégâts du gel sont difficiles à prévenir autrement qu'avec les lourdes techniques d'arboriculture. Un temps pluvieux qui dure entraîne la coulure ¹⁵ des fleurs mâles et femelles. Certaines tempêtes au moment de la floraison détruisent les isolateurs polliniques avec arrachage et déchirement. En pratiquant les croisements en serre sur des greffes élevées en conteneur nous nous sommes affranchis de l'ensemble des effets néfastes de ces facteurs extérieurs froid, pluie, vent.

5.2 Pucerons et autres ravageurs, prédateurs convoitant la glandée

Il existe divers ravageurs qui interviennent aussi bien sur un rameau en forêt que dans une poche d'isolation. Il est difficile de les déterminer, cela est un vrai travail de spécialiste. Toutefois lors des empochages en serre nous avons observé par exemple des infestations massives de pucerons. Il est possible de faire un traitement préventif lors de l'empochage. De plus lors de récolte en automne des poches de croisement qui sont restées sur

¹² Balanin = coléoptère parasite du gland lors de son développement estival.

¹³ Ciboria = champignon détruisant les cotylédons du gland, ceux-ci passent d'une couleur crème à brun et de fermes, souples à granuleux, se désagrégant (en l'espace d'un mois environ), et cela même à +-1°C.

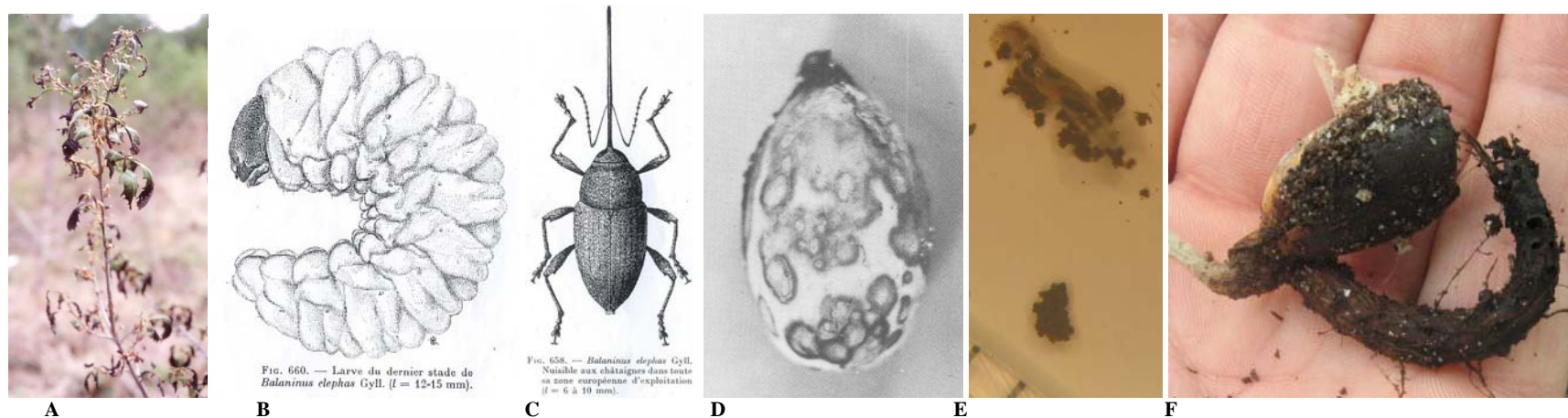
¹⁴ Mouche du collet = moucheron apparaissant, puis pullulant au printemps dans les serres d'élevage. L'asticot se développe dans le milieu d'élevage et s'attaque aux racines tendres jusqu'à la nécrose du collet et de la mort du plant. D'après la littérature du net il s'agirait de Sciarides.

¹⁵ Coulure = Les mauvaises conditions météo entraînent la nécrose des inflorescences

l'arbre croisé, l'état des rameaux est très inégal d'une poche à l'autre et certaines poches sont de vrai vivarium d'une faune qui semble apprécier le confort des poches. Les poches ont l'avantage de protéger les glands du balanin (**photos 13** : B, C).

De nombreux prédateurs convoitent la glandée dès que celle-ci se développe. Et nous avons observé régulièrement le parasitisme du balanin qui peut infester plus de 50% des glands sur le site de Pierroton ¹⁶ (annexe 11.6). Dans le cas des croisements contrôlés il est possible de faire des traitements limitant l'attaque du balanin. Evidemment le type de récolte, leur volume, le lieu de récolte permettront ou non ces interventions éventuelles. Depuis 2003 nous avons fait sur les greffes croisées que nous devons dépochées après la pollinisation, des traitements préventifs avec un insecticide (alphaméthrine ¹⁷) qui nous a permis d'obtenir une récolte sans attaque apparente de balanin, alors qu'autour pour une glandée exceptionnelle nous observions des infestations massives.

Lorsque l'on envisage des récoltes de glands il faut aussi surveiller la présence de gibier qui s'en nourrit (geai, et surtout sanglier). La rapidité d'interventions ou la récolte sur l'arbre assurera l'opération.



photos 13 : A : rameau gelé B, C : larve et adulte de Balanin D : gland infesté de Ciboria E,G : asticot et adulte de mouche du collet l---l = 1 mm F :dégâts sur la radicule (mouche collet)

¹⁶ Suivi récolte glands sur 3 sujets de parc, Pierroton, du 21/09 > 27/11/1990, (zone ramassage 4 x 4 m)

¹⁷ L'alphaméthrine appartient au groupe chimique des pyréthriinoïdes de synthèse Traitement 2004 FASTAC = alphaméthrine à l'empochage le 31/03, et le 15/06, 04/07, 20ml dans 1litre pour limiter la pullulation des pucerons à l'empochage, puis durant la croissance des glands pour lutter contre le balanin.



G : mouche adulte



H : mulot



I : geai



J : sanglier

5.3 Effet positif du biberonnage¹⁸ photos 14, 15

Suite aux croisements nous surveillons les mois suivants l'évolution du matériel végétal. En 1997 nous avons dû arroser durant l'été les arbres de parc utilisés pour les croisements du fait d'une saison très sèche et chaude entraînant la chute prématurée des glands (dénommée : relargage).

Dans le cas des greffes en conteneur nous arrosons les greffes tous les jours et les conteneurs sont posés dans des coupelles qui font réserve d'eau. En effet auparavant le déficit en eau lors des canicules est sans doute une des raisons des descentes de cime sur le parc à greffes en conteneur. De plus nous essayons d'alimenter les sujets croisés en forêt la saison de végétation précédente et durant la croissance des glands par l'apport d'engrais¹⁹.



¹⁸ biberonnage = nous appelons abusivement le biberonnage des greffes en conteneur le fait d'en prendre soin en les fertilisant durant la saison de végétation et en apportant un arrosage estival journalier.

¹⁹ le suivi des greffes en conteneur (traitements, fertilisation) est réalisé par l'unité expérimentale de Pierroton

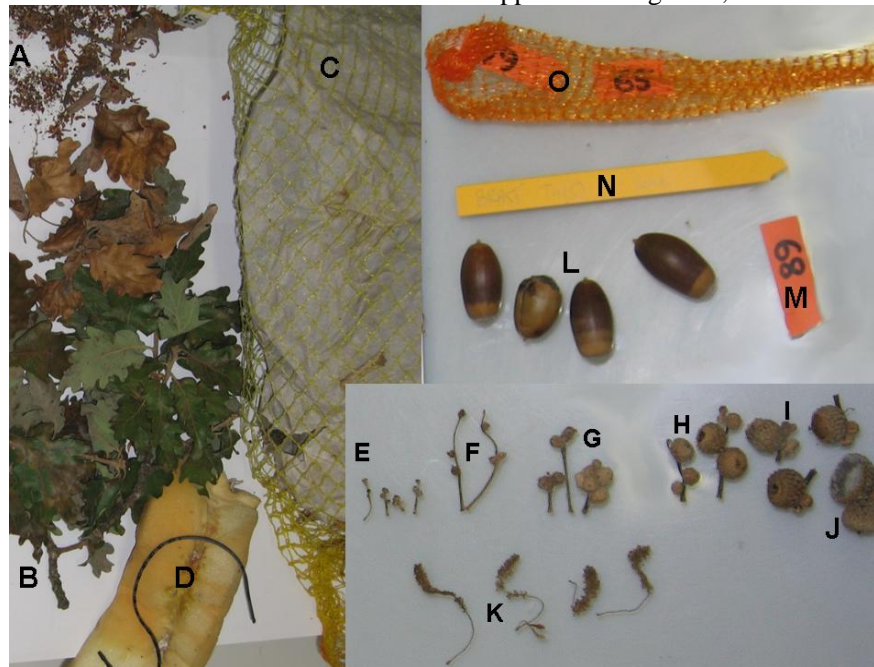
photos 14 : *Suivi photo glandée de chêne pédonculé*



photos 15 : *Suivi photo glandée de chêne sessile*

5.4 Récolte et conservation des glands

Sur arbre adulte, nous pouvons laisser les isolateurs durant le développement des glands,



photos 16 : Dépouillement récolte croisement en poche

A : brindilles accumulées durant 5 mois dans la poche, B : rameau empoché, C : poche d'isolation avec son filet de récupération, D : mousse et lien d'attache, E,F : inflorescences printanières, G, H : inflorescences intermédiaires, I : avortons, J : cupules, K : inflorescences mâles, L : glands, N : étiquette lot, M : étiquette poche, O : filet de stockage glands

arbre femelle	arbre mâle	type croisement	notation glandée mère	nombre de poche	inflorescences printanières	inflorescences développées	glands avortés	cupules	glands viables
3P	* A4	intra	++	1	6	5	3	1	4
Soit				C	E+F	G+H	I	J	L

tableau 8 : Dépouillement de la litière d'un croisement en poche

- les isolateurs auront à subir les conditions climatiques,
- protégerons les glands du balanin,
- ils accélèrent la maturité
- et évitent la perte des glands.

La récolte est faite en fonction de la maturité des glands fin septembre, octobre. Il s'agit de saisir la période avant qu'ils ne se détachent de la cupule et où ils sont suffisamment mûrs. Les comptages effectués dans les poches récoltées avant 2002, nous ont permis d'observer que de nombreuses d'inflorescences avortent aussi bien en période printanière qu'en période estivale, période de développement intensif du gland (**photos 16, tableau 8**)

Les glands sont récoltés, triés, comptés, pesés, traités aux fongicides²⁰ etc... Depuis 2007 à l'entrée des récoltes au labo graines avant toute chose nous passons les lots dans une solution de Javel²¹.

5.5 Ciboria²²

Un des principaux ravageurs post récolte des glands est le ciboria (**photos 13 : D**). Pour éviter son infestation on récolte sur l'arbre à maturité suffisante. Lors de la mise en chambre froide nous les enrobons d'un fongicide le benlate²³.

Nota. Il est très certainement probable que le balanin est un des vecteurs du ciboria.

5.6 La mouche du collet (**photos 13 : E, F, G**)

Nous avons observé dans nos élevages de semis en serre durant le printemps des mortalités massives des semis bien venant (plus particulièrement chez le chêne sessile). De plus nous avons constaté la présence de « moucheron » et de perforations circulaire au niveau du collet et du pivot. Plus récemment ce sont des asticots de ce moucheron qui prolifèrent au contact du milieu d'élevage et de l'insertion de la racine charnue du gland. En 2008 nous avons testé l'introduction d'un parasite de ces moucheron *Steinernema feltiae*.

5.7 Le mulot, le geai (**photos 13 : H, I**)

²⁰ voir : mode opératoire démarche qualité - Traitement des glands issus de récolte massive en forêt

²¹ javel durant environ ¼ d'heure (250 ml de Javel (1 berlingot > dilué dans 1 litre d'eau) dans 10 litres d'eau).

²² Champignon parasite des glands voir annexe 11 8

²³ le benlate : Le bénomyl est une substance active de produit phytosanitaire (ou produit phytopharmaceutique, ou pesticide), qui présente un effet fongicide, et qui appartient à la famille chimique des carbamates..

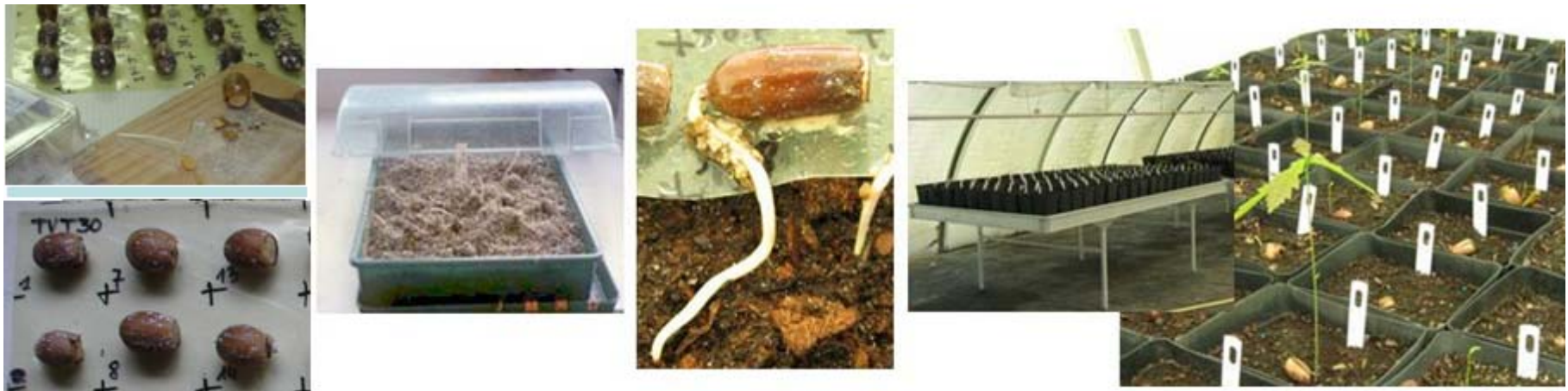
Le mulot est friand des glands qu'il stocke tel l'écureuil en les enterrant et en les mangeant au grand dam du protocole. Les élevages de semis doivent être installés sur des plateaux (**photos 17 : D**) en hauteur sans accès possible pour eux par une rampe quelconque.

Enfin le geai, honoré pour son travail de désimination de la forêt de chêne. Il adore récupérer les cotylédons dressés des semis qu'il arrache avec gourmandise. La meilleur parade est de sortir des serres des plants bien ancrés dans le milieu et d'éviter des semis laissant apparaître des cotylédons appétissants.

5.8 Dates semis, pré germination des glands

La période de semis idéale est difficile à trouver. D'une part un semis précoce (novembre par exemple) expose le matériel à des problèmes de survie durant l'hiver avant la croissance printanière. Il semble que c'est plus favorable en mars, avril même si la conservation en chambre permet à *Ciboria* de faire des dégâts.

- Pour la germination nous les semons dans des germoirs avec de la vermiculite bien humide qui ressuie au travers du germoir.
- Pour des besoins d'identification individuel avant semis (prélèvement de tissus pour la Biologie moléculaire), les glands sont fixés sur un échiquier en polyéthylène (**photos 17 : A**) de façon à faire suivre le codage initial individuel. C'est une méthode pratique pour vérifier l'état de la germination.
- On peut accélérer la germination en incisant l'enveloppe du gland qui activera la pénétration de l'eau (en ménageant la zone de la gemmule : partie pointue du gland).
- Les lots en pré germination sont visités toutes les semaines environ pour repiquer les glands qui émettent leur racicule.
- Ils sont repiqués en enterrant le gland la partie pointu vers le bas, un pré trou étant pratiqué quand le germe est long, puis tassés à l'aide d'un plantoir.
- Suivant l'utilisation ultérieure les glands sont repiqués en motte ou en pot de 4 litres (**photos 17 : C, D**).
- Semis et repiquage sont pratiqués sur plateau pour éviter les rongeurs.
- Les semis peuvent être réalisés directement en plein, mais par expérience le matériel précieux aura des pertes plus importante, et à Pierroton la pépinière n'a pas un sol très favorable. Nous préférons l'élevage en pots de 4 litres.



Photos 17 : A : glands prélevés et collés sur grille individuelle

B : glands mis en pré germination dans de la vermiculite

C : glands pré germés, tranché pour la BM

D : pots 4l sur plateau en serre froide (mars)

5.9 Conclusion (Résumé suivi sanitaire annexe 11.4)

L'espérance de vie d'un ovule de chêne est très faible au vue des embûches qui parsèment sa future histoire. Nous pouvons donc être d'autant plus admiratif devant les beaux chênes centenaires que nous rencontrons en forêt sachant le parcours qu'ils ont réalisé.

6. Tri des croisements à l'aide des marqueurs moléculaires

Nous avons besoin de contrôler les croisements que nous obtenons. Effectivement nous injectons le père choisi dans une poche qui contient du pollen de la mère, donc il y a risque d'autofécondation. Et nous sommes à la merci de pollutions pour diverses raisons (poche percée, pollution pollen...) Nous vérifions donc notre travail à l'aide de marqueurs moléculaires polymorphes qui vont nous permettre d'affirmer l'ascendance des glands obtenus.

Nous avons utilisé les izozymes sur gel d'amidon durant les années 80, les microsat sur séquenceur Licor durant les années 90. Actuellement nous utilisons des kits mis au point dans le laboratoire où plusieurs microsat (5 à 11) sont analysés simultanément.

6.1 Prélèvements sur les semis

Les semis sont installés en fin d'hiver en serre froide sur plateau. Aux mois de mai, juin ils sont bien installés sous ombrière jusqu'à l'automne. Dès qu'il est possible on prélève un échantillon de feuille sur lequel on extrait l'ADN total pour effectuer le tri microsatellite. Ce prélèvement est non destructif, quelques rondelles coupées dans une feuille sur lesquelles nous extrayons l'ADN génomique.

6.2 Exemple de microsat sur séquenceur Licor **photo 18, tableaux : 9, 10, 11**

Nous présentons ici un exemple de lecture avec 1 microsatellite Ag2O. La vérification d'une descendance est considérée comme exacte quand pour 2 microsatellites les gamètes corroborent l'apport parental. Ainsi nous faisons le tri entre autofécondation, allo fécondation voulue et pollution.

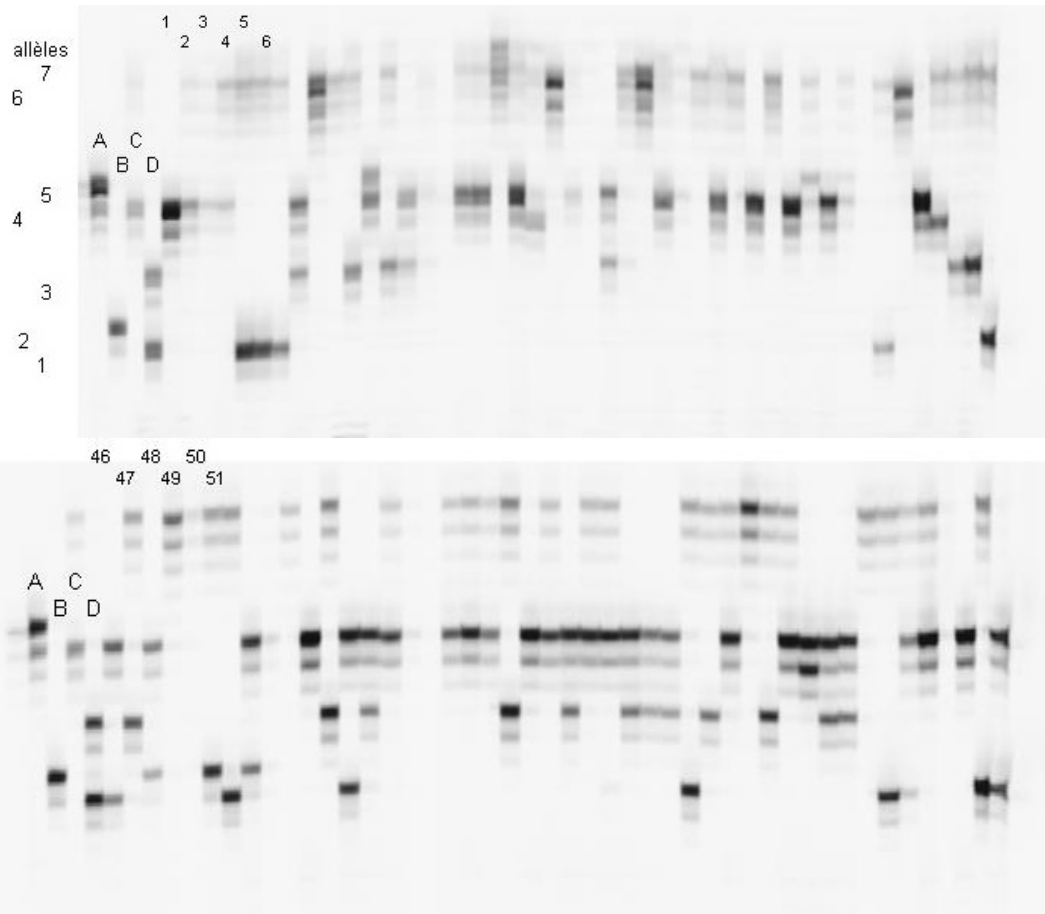


photo 18 : Image obtenue sur séquenceur licor, contrôle d'une descendance avec le microsatellite Ag20

mère pollinisée et récoltée	géniteurs présents	allèles présents						
		1	2	3	4	5	6	7
	A					55		
	B		22					
C					4		6	
	D	1		3				
	?							7

n° descendants	allèle 1	allèle 2	affectation parents	conclusion	effectif profils / 91	% profil
5	1	6	D C	Hybride 3	30	33
9	6	6	C C	autofécondation	43	47
19	6	7	C ?	pollution	3	3
36	5	6	A C	Hybride 1	3	3
48	2	4	B C	Hybride 2	2	2
50	-5	-5		non déterminé	10	11

7. 1 Parc à pied mère en pépinière

Le prolongement des croisements contrôlés est la multiplication végétative. Les croisements obtenus et choisis pour leur effectifs sont installés dans un parc à pieds mère où après leur installations ils subissent un recépage annuel dans le but de les bouturer et ainsi d'une copie on peut multiplier à volonté un clone donné. C'est ainsi les copie clonales issues du croisement 3P*A4, intra pédonculé, réalisé en 1992 sont le matériel de base d'expérimentation de terrain (Bourran I et II) d'essai divers en serre (écophysiologie, pathologie). Ce croisement a servi à la réalisation de la carte génétique du chêne pédonculé.

7. 2 Cartes génétiques ²⁵ , figure 6

Pour réaliser des cartes génétiques, il est nécessaire de disposer :

7-2-1 de familles en ségrégation. Pour le chêne, nous disposons de plusieurs familles F1 issus de croisements intraspécifiques (mère et père de la même espèce, chêne pédonculé ou sessile) ou interspécifiques (mère pédonculé et père sessile).

7-2-2 de marqueurs moléculaires qui ségrégent en suivant les lois de Mendel. Au laboratoire nous avons réalisé le génotypage des familles tout d'abord avec des marqueurs dominants (RAPD, AFLP) puis codominants (SSR ou SNP).

²⁵ Chapitre rédigé par Catherine Bodénès

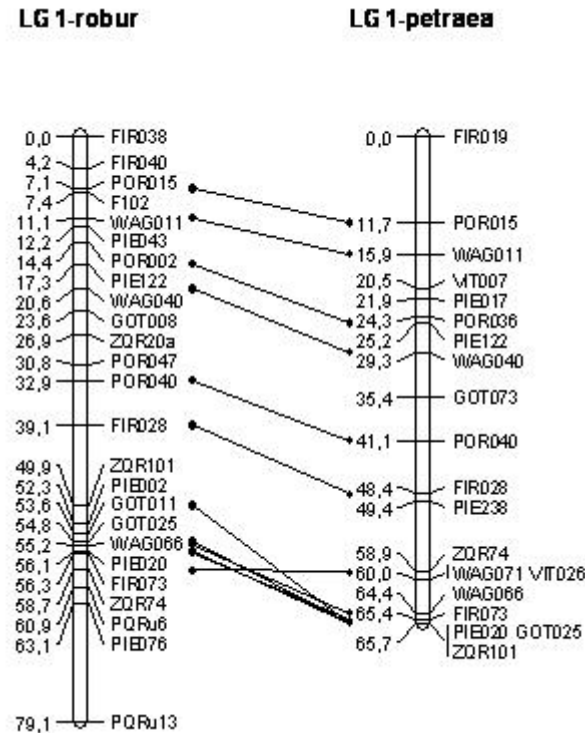


figure 6 : *exemple de la carte génétique du groupe de liaison 1 (LG1) pour le chêne pédonculé (Q. robur) et sessile (Q. petraea), les traits relient les marqueurs communs aux 2 cartes*

7-2-3 d'outils statistiques pour calculer la liaison entre les marqueurs et les ordonner les uns par rapport aux autres. Les cartes génétiques ont été construites en utilisant le logiciel JoinMap.

Nous avons obtenu plusieurs cartes génétiques (une pour chaque parent) et retrouvé 12 groupes de liaison (nombre qui correspond au nombre de chromosomes).

Les cartes génétiques sont des outils précieux pour (1) nous informer sur l'histoire évolutive des différentes espèces en comparant la répartition et l'ordonnancement des marqueurs sur les différents groupes de liaison, (2) connaître la position de gènes (débourrement, sécheresse, ennoyage racinaire) et de caractères quantitatifs d'intérêt (QTL) et d'étudier leur co-localisation, (3) comparer ces cartes avec des cartes physiques pour pouvoir ensuite séquencer des gènes.

7.3 Dispositifs conservatoires

Tous les croisements obtenus ne sont pas installés dans le parc à pieds mère, les autres croisements sont installés en dispositif conservatoire et sont suivis au niveau de la floraison et de la fructification.

7. 4 Génération F2

Depuis 2001 sur des arbres issus des croisements des années 90, suite à l'observation d'un début de fructification (**tableau 12**) nous poursuivons les croisements avec la génération F2. En 2008-9 ont été réalisés des croisements sur Bourran II ²⁶ pour étudier des caractères liés aux systèmes de compatibilité.

Glandée 2004	année de bouturage	date installation dispositif	nbre clones installés	nbre clones fructifères	%	nbre individus installés	nbre individus morts	nbre individus fructifères	%	1 à 5 glands	6 à 10	plus de 10
Bourran I	1997	1999	174	108	62	1080	48	246	24	192	31	23
Bourran II	1998	2000	207	126	72	2196	80	405	19	303	55	47

tableau 12 : Relevé glandé 2004 sur 2 dispositifs issus de boutures 3P x A4, mesures (Mimi Bertocchi)

8. Conclusions

Lorsque nous avons commencé cette démarche nous n'imaginions pas mettre sur pied un système cohérent de production de graines. Ces techniques permettent pourtant aujourd'hui la production précoce de glands à partir de collections de clones. Le processus de fructification a été optimisé et cela dans un délai raisonnable pour peu que l'objectif justifie l'investissement nécessaire. Nous pensons que cette démarche, moyennant des adaptations, est applicable à d'autres espèces dont la multiplication sexuelle est récalcitrante ou très tardive. De la même façon certains outils tel les poches tamis, l'injecteur à 2 voies, l'empochage avec chaussette et servante sont transférables sur d'autres espèces.

²⁶ Génétique et évolution des caractères liés aux systèmes de compatibilité de croisements dans le complexe d'espèces chêne sessile (*Q. petraea*) et chêne pédonculé (*Q. robur*)
Thèse Pierre Abadie

9. Remerciements

Je dois ici remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à l'élaboration des techniques présentées ici. Ils sont nombreux à avoir apporté leur technicité propre. Ils sont encore plus nombreux à avoir donné un coup de main lors des moments de travail intense, j'en oublierai qu'ils me le pardonnent.

Eugène Pohoski, la personne qui m'a initié aux techniques d'amélioration, spécialement les croisements sur pin maritime, décédée en 2003.

Antoine Kremer, le principal responsable de tant de dispersions polliniques et autres...

Rémy Petit, en plus des coups de mains, nous a poussé à faire le pas du « sans castration »

Alexis Ducouso, Anne Zanetto, la mise au point de la fluorescence, les campagnes d'Orléans, tri avec les isozymes

Mr Puy de Bois, la mise au point de la vanne à trois positions pour l'injecteur à 2 voies, décédé en 1997

Pierre Menassieu, les conseils entomologiques

Pierre Laforêt, Christian Daugey, Bernard Montoussé, les conducteurs de nacelle qui surveillent nos lourds vols.

Bernard Montoussé, Laurent Salera, le suivi du matériel en pépinière.

Frédérique Santi, Brigitte Demesure, Thierry Lamant, Laurent Lévêque, Renée Blanluet, Marc Fauché, les sentinelles d'Orléans, qui sont nos yeux de Sologne.

Mimi Bertocchi, Marie-Hélène Pemonge, Laetitia Bertel, Nathalie Sodzi, Delphine Grivet, Laurent Salera, Akim Meddour, Sophie Gerber, David Pot, Frédéric Austerlitz, Teresa Barreneche, Jean Marc Louvet, Caroline Saintagne, Catherine Bodénès, Jean Marc Frigerio, Nasser Barhman, Stéphanie Mariette etc.... les petites mains qui ont tricoté des centaines de poches, cueilli des kilogrammes d'inflorescences mâles, emmaillotté les greffes etc....

Olivier Lepais, Pauline Géré, Pierre Abadie.... Les derniers venus qui nous lance de nouveaux défis



10. Bibliographies

- Bacilieri R, Roussel G, an Ducouso A, 1993. Hybridization and mating system in a mixed stand of sessile and pedunculate oak. *Ann Sci For* 50:122s-127s.
- Balachoswsky, 1963. Traité d'Entomologie t. 1, vol. 2. Phytophagoidea curculionidae
- Beaujard F., Galopin G., 1999. Nouvelles perspectives en multiplication végétative : formation et exploitation de micropieds-mères. PHM /revue horticole/, 400, 64-69.
- Lespinasse, J.M., 1977. INVUFLEC Institut National de Vulgarisation pour les Fruits, Légumes et Champignons, Paris (FRA) La conduite du pommier
- Lespinasse, J.M., 1980. CTIFL Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Paris (FRA) La conduite du pommier. 2ème partie
- Lespinasse, J.M., Leterme, E., 2005. Inra Bordeaux De la taille à la conduite des arbres fruitiers, *Editions du Rouergue, Rodez (FRA)*
- Muller C. et Bonnet Masimbert M., 1984. « La conservation des glands, bilan des essais menés entre 1976 et 1982 »
- Roussel G., 1999. Injecteur de pollen à deux voies et à air reconstitué, Cahier des technique de l'Inra n° 42 Septembre 1999
- Roussel G., 2004. Validation des techniques de croisements contrôlés mises au point, à l'aide des microsattellites, (document interne)
- Roussel G., 2005. *Récolte pollen chêne blanc européens * Conservation du pollen de chêne, test de viabilité * Technique de croisements contrôlés chez les chênes * Traitement des glands issus de récolte massive en forêt * Suivi sanitaire de la fructification des chênes * Techniques de greffage chez les chênes * Bouturage chênes * Elevage de chênes greffés en conteneur * Bilan sur les techniques de croisements pratiquées depuis 1987 * Injecteur de pollen à deux voies et à air reconstitué * (documents techniques, Assurance Qualité Recherche)
- Roussel G., 2007. Elevage de chênes greffés en conteneur pour un programme de croisements contrôlés, Cahier des techniques de l'Inra , n° 62, 33- 45
- Roussel G., 2009. Technique d'empochage de jeunes chênes (10 ans) pour la réalisation de croisements contrôlés, Cahier des technique de l'Inra (en relecture)
- Roussel G., 200. Résultats des campagnes de bouturage sur chênes pédonculés et sessiles de 1997 à 2008. (en rédaction)
- Vergeron P, 1975 Dispersion du pollen de pin maritime dans le massif forestier landais thèse université de Bordeaux
- Zanetto A, Roussel G, and Kremer A, 1994. Geograp variation of interspecific differentiation between *Qercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *For G et 1:111-123*.
- Zanetto A, 1998. Structuration de la diversité allozymique dans le complexe des chênes blancs européens : *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. et *Quercus robur* L. Université de Paris XI, Orsay, 122 pages

11. Annexes

- 1990 - castration
 - suivi [glandé sur 3 arbres adultes](#) de parc
 - essai injection pollen en fonction du temps
- 1992 - mise au point [extracteur pollen](#) chêne (poche tamis)
 - conception [cyclone 2 voies](#)
 - tri descendants par marqueurs (profil iso enzymatique) = croisements sans castration
- 1993 - mesure [viabilité](#) pollen par fluorescence
 - viabilité (fluorescence) pollen dans les poches
 - essai création d'hybrides interspécifiques pédonculés, sessiles
- 1994 - codification stades floraux
 - essais traitement rameaux empochés
 - essai [injecteur pollen](#) cyclone à 2 entrées à air reconstitué
 - mise au point [châssis](#) extracteur pour poches tamis
- 1996 - utilisation massive du cyclone à 2 voies
 - essai pollinisation en serre = sur greffes en conteneur
- 1997 - [pollinisation en serre](#) avec isolateur léger
- 2002 - utilisation [compresseur portatif](#) pour injection
- 2007 - [miniaturisation](#) injecteur
- 2008 - empochage F1 sur dispositif avec [système chaussette](#)

11. 1 *Historique des développements techniques*

code	coordonnées		espèce	année	flaconnage stocké	volume total	Reliquat	Calendrier interventions récolte poller												Test viabilité en % de grains viables		Calcul	
	position	deposiitif						stockage, viabilité, calcul >>>>	Mars Avril Mai											mois	année	test	Observed
clone	famill	ligne	n°ligne	récolte				nombre poche												e = epsilon, très faible		%	
								anthères récoltées												%		%	
								poids												%		%	
								temps de réhydratation en heures												%		%	
fichiers récoltes pollen, réceptions																							
Qs2 Pu5	3	18	wb	VIII	inter	2007	0																
Qs31			conteneur	S		2005	21																
Qs31			conteneur	S		2006	20																
Qsuber			gare Tocto	suber		2006	4																
T 12	adulte		Cestas	Ta		2005	50	3-4 visite															
T 16	adulte		Cestas	Ta		2005	70	R															
T 25	adulte		Cestas	Ta		2005	20	R															
T 5	adulte		Cestas	Ta		2005	4	R															
T3 30P	2	2	wa	XXII	inter	2006	4	R															
T3 Pu3	13	9	wb	IV	inter	2007	0	R															
T3 Pu3			wa	XXI	inter	2005	2	R															
T3 Pu3			wa	XXI	inter	2006	2	R															
tennis	adulte		hermitage	Qi		2005	86	R															
27P			conteneur			2008	13	R															
3P						2008	20	R															
A4			greffe			2008	20	R															

Codes suivi chronologique période polinisation Croisements

- [] empochage
- G gelée susceptible de faire des dégats
- +++ R récolte pollen, présence inflorescence pollen
- 1 1 > 6 injection pollen dans l'isolateur
-) (dépochage de l'individu et sortie à l'extérieur
- > fasta > traitement phytosanitaire (puceron, balanin), FASTAC (alphaméthrine)
- 0 entrée serre, [] empochage, G gelée, P récolte pollen, p présence pollen,
- 1 > 6 injection polen,) (dépochage, sortie extérieur, > traitement

11.2 Tableau suivi récolte pollen, codes suivi chronologique

	la récolte du pollen	la conservation du pollen	les croisements	le suivi sanitaire de la fructification
Matériel nécessaire	poches tamis, portoir poches tamis, tubes récepteur table, seaux, balance sécateur emmanché matériel de grimpage nacelle sur tracteur locaux chauffés, chambre chaude 30°C	papiers Hydrion humidicator tubes 10, 5, 2 ml papier sulfurisé chambre chaude réglée à +30°C et ventilée Microscope UV boites de Pétri, tubes, microtubes, lames, lamelles, dispensettes trompe à vide gaine polypropylène (mise sous vide) thermosoudeuse	enveloppes de papier sulfurisé ou de polyester injecteurs pollen (cyclone 2 voies) compresseur nacelle sur tracteur serre de forçage arrosage programmé	ambiance de germination (pièce hors gel), germoirs pulvérisateur dosatron alimenté par circuit d'eau serre d'hivernage balance au 1/10 gramme nacelle sur tracteur
Réactifs chimiques, biologiques	alcool 76°C	alcool 76°C Sacrose ou saccharose Fluoresceïn Diacetate SIG F 7378 Acétone	alcool 76°C	Fastac (insecticide) Benlate (fongicide) Hakaphos (engrais)
Hygiène et sécurité	L'utilisation d'une nacelle élévatrice nécessite le respect de la réglementation (habilitation des utilisateurs), ainsi que le grimpage dans des arbres de petites tailles.	Lors du passage d'un lot de pollen à un nouveau utiliser des outils propres et se laver les mains à l'alcool 76 %, pour éviter les pollutions.		Lors des différents traitements (fongicides, insecticides) appliqués sur le matériel végétal se conformer aux différentes précautions recommandées par les fabricants et signaler leur utilisation sur les lots traités.
Contraintes de la technique	C'est la précision du suivi phénologique, la météo, la rapidité d'évaluation et d'intervention qui détermineront la qualité de la campagne de récolte.	Toutes ces étapes de traitement du pollen doivent être réduites au mieux, le pollen est du matériel vivant, fragile et précieux. La qualité du test de viabilité est tributaire de la fraîcheur des produits et des solutions, à leurs dosages.	Nous travaillons ici sur un phénomène biologique, donc sur quelque chose de difficile à maîtriser. Il en résulte qu'il s'agit de surveiller l'évolution de la météo, de la végétation de façon à se tenir prêt car une fois démarré le processus peut aller très vite et notre intervention doit s'y adapter.	Ce suivi nécessite un passage régulier sur le dispositif pour contrôler l'évolution du processus et le calage des interventions avenir. Lors ce que la maturité est suffisante on procède à la récolte, aux opérations en vue du stockage car les glands sont des semences fragiles et un excès de dessèchement entraîne une forte perte du taux de germination. De la même façon il faut savoir que le semis des glands est tributaire du temps de conservation. Ceux sont des graines qui perdent régulièrement de la faculté germinative qui risquent d'être nulle au-delà d'un an de conservation à + - 1°C.

11. 3 Tableau résumé des consignes pour la pollinisation

Problèmes sanitaires rencontrés										milieu forestier					milieu protégé (serre, pépinière)																													
gel	pluie	vent	sécheresse	ciboria	oidium	botrytis	balanin	pucerons	mouche du collet	gibier	mulot	geai	pré floraison	floraison	développement gland	récolte glands	conservation	élevage semis	plantation	pré floraison	floraison	développement gland	récolte glands	conservation	élevage semis	plantation																		
X	X	X																																										
										Solutions apportées																																		
										empochage enterré					empochage en serre					insecticide																								
															fongicide, insecticide																													
															arrosage																													
															récolte dès la maturité et mieux sur l'arbre																													
															fongicide, insecticide																													
															traitement milieu d'élevage																													
															semis sur plateau, appât																													
															plants avec ancrage, filet protection																													

11.4 Tableau résumé suivi sanitaire

11.5 Le cycle de reproduction du chêne pédonculé extraits de Biologie florale et cycle de reproduction par Marc Bonnet Masimbert 1984

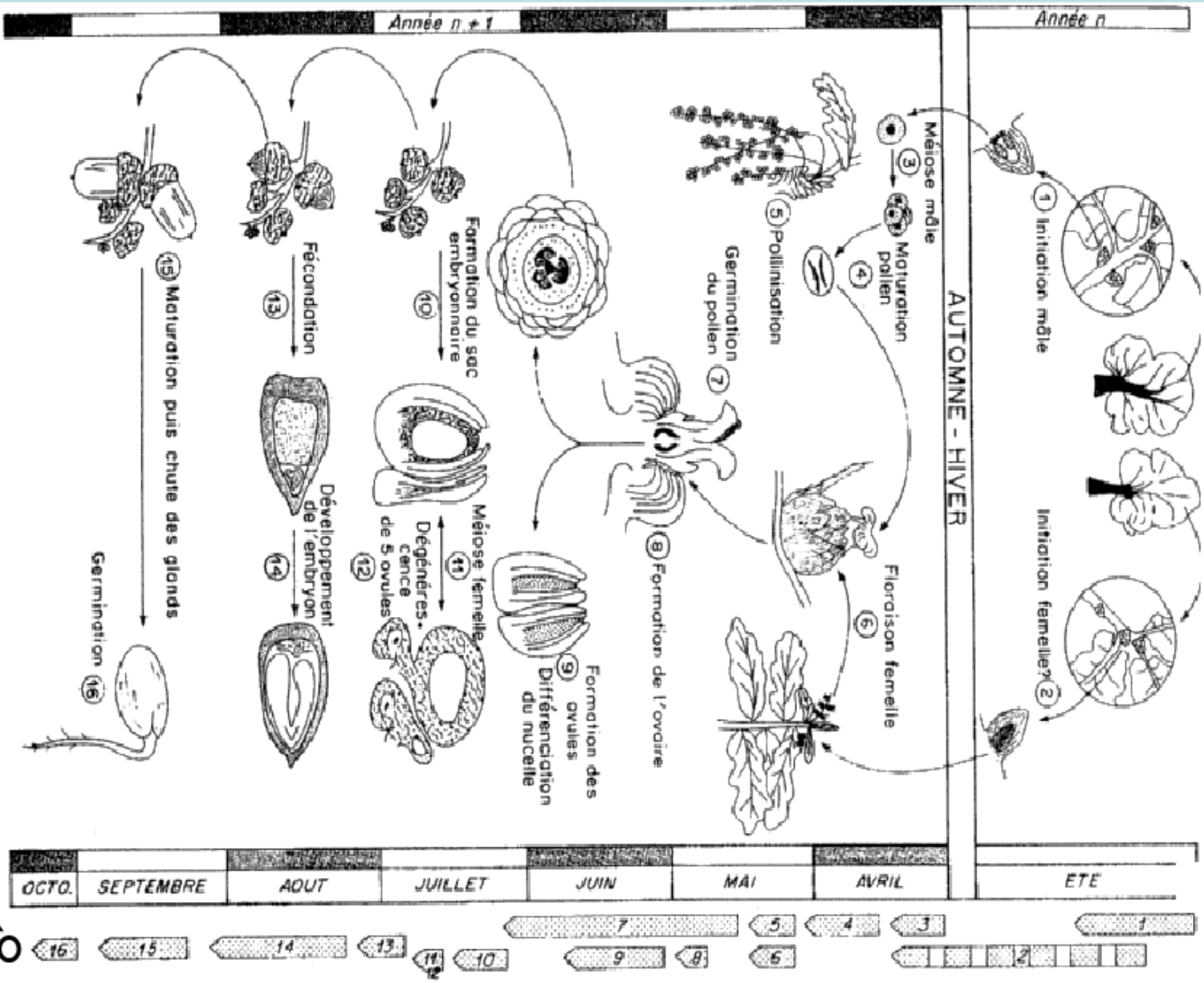
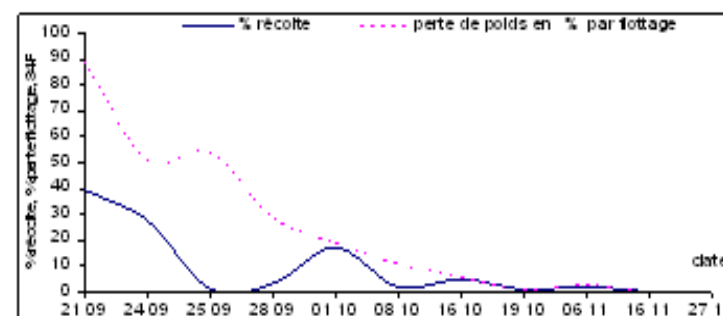
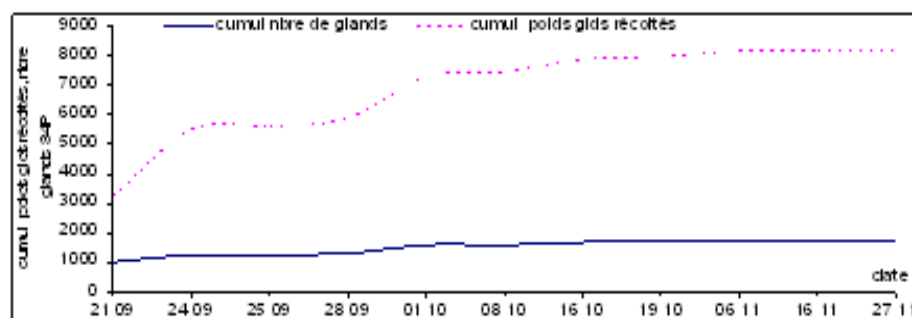


Fig. 101. — Le cycle de reproduction du chêne pédonculé. Les inflorescences sont initiées dans le courant de l'été. La pollinisation intervient début mai et la fécondation à la fin de juillet. Les glands tombent au début d'octobre et germent immédiatement. Les chiffres 1 à 16 renvoient aux différentes étapes du développement des inflorescences puis de l'ovule à la semence. La longueur des flèches dans la partie droite représente la durée approximative de chaque étape.

11.6 Suivi récolte glands sur 3 sujets de parc, Pierroton, du 21/09 > 27/11/1990, (zone ramassage 4 x 4 m)

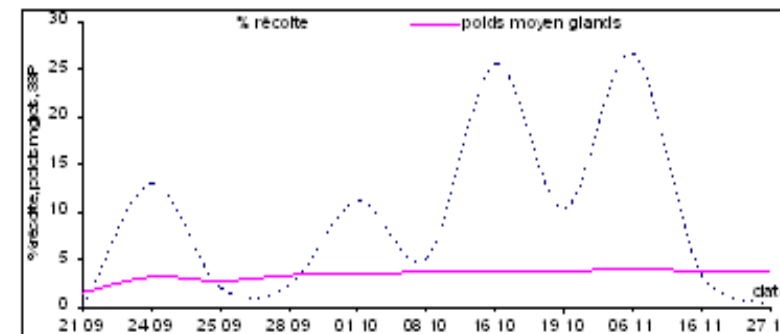
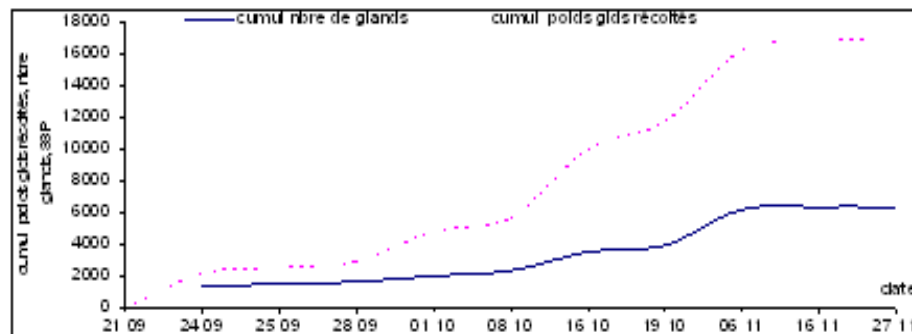
données arbre : 34P	date récolte	21 09	24 09	25 09	28 09	01 10	08 10	16 10	19 10	06 11	16 11	27 11
cumul nbre de glands		1018	1259	1259	1319	1601	1601	1694	1694	1694	1694	1694
cumul poids glds récoltés		3238	5509	5619	5892	7310	7473	7892	7982	8168	8189	8199
% récolte		39	28	1	3	17	2	5	1	2	0	0
perte de poids en % par flottage		89	51	54	29	19	11	6	1	3	2,7	0,7
faculté germinative sur 50 glds le 02/07/91						62,7	23,0	51,5	29,7	10,2	2,7	0,7

type arbre : arbre à houppier volumineux
 estimation zone couverte par la chute des glands en m2, la production totale en kilogrammes, et le nombre total de glands : 69,0 m2 soit 132 kg soit 34000 glands
 perte lors de la conservation à + ou - 1° C : 389,0 gr soit 5 %
 perte par flottage : 2760 gr soit 35 %



données arbre : 33P	date récolte	21 09	24 09	25 09	28 09	01 10	08 10	16 10	19 10	06 11	16 11	27 11
cumul nbre de glands			1377	1520	1672	2039	2370	3540	3995	6231	6393	6393
cumul poids glds récoltés			2203	2557	2949	4843	5718	10045	11794	16318	16906	16937
% récolte			13	2	2	11	5	26	10	27	3	0
poids moyen glands			2	3	3	3	4	4	4	4	4	4
faculté germinative sur 50 glds le 02/07/91			2,0	10,0		20,0	2,0	28,0	26,0	56,0	38,0	

type arbre : arbre volumineux, fastigie
 estimation zone couverte par la chute des glands en m2, la production totale en kilogrammes, et le nombre total de glands : 24,0 m2 soit 121 kg soit 39000 glands
 perte lors de la conservation à + ou - 1° C : 670,0 gr soit 3,3 %
 perte par flottage : 5060 gr soit 25 %



11.6 suite Suivi récolte glands sur 3 sujets de parc, Pierroton, du 21 /09 > 27 /11 /1990, (zone ramassage 4 x 4 m)

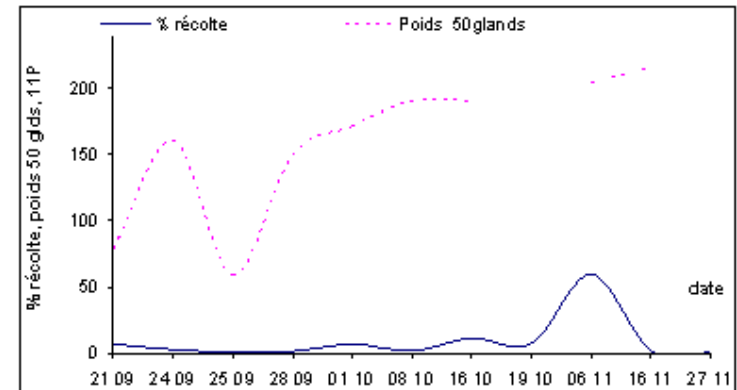
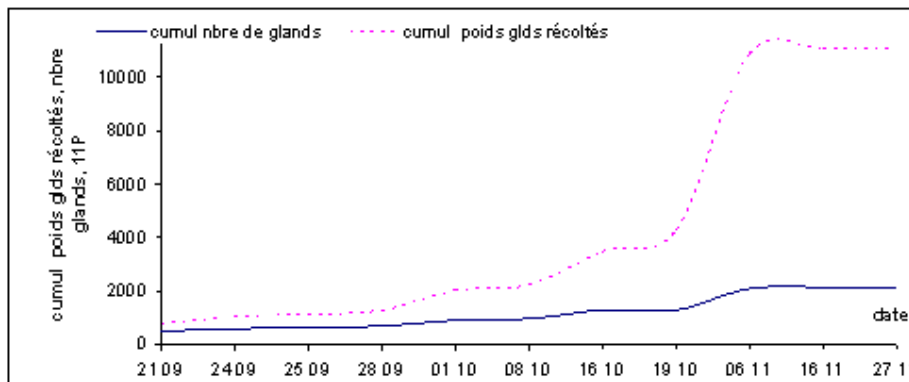
données arbre : 11P	date récolte >>	21 09	24 09	25 09	28 09	01 10	08 10	16 10	19 10	06 11	16 11	27 11
% récolte		7	3	1	1	7	2	11	7	59	2	0
Poids 50glands		79	161	59	150	172	191	191		205	216	
cumul nbre de glands		482	569	625	679	896	948	1276	1276	2081	2132	2132
cumul poids glds récoltés		761	1043	1109	1270	2018	2217	3470	4279	10889	11082	11109
faculté germinative sur 50 glds le 02/07/91						54,0		12,0		52,0	40,0	

type arbre

estimation zone couverte par la chute des glands en m2, la production totale en kilogrammes, et le nombre total de glands 50,0 m2 soit 136 kg soit 37000 glands

perte lors de la conservation à + ou - 1° C 182,0 gr soit 1,6 %

perte par flottage 1298 gr soit 12 %



11.7 Article traitant de l'injecteur cyclone à deux voies paru dans le cahier technique de l'INRA

Injecteur de pollen à deux voies et à air reconstitué.

Guy Roussel

Institut national de la recherche agronomique - Centre de Bordeaux

Laboratoire de génétique et d'amélioration des arbres forestiers

Domaine de l'Hermitage Pierroton BP 45 Gazinet 33611 Cestas FRANCE

guy.roussel@pierroton.inra.fr

1 Historique

Nous réalisons des croisements contrôlés sur les arbres forestiers depuis de nombreuses années ; les premiers croisements dans notre station ont été faits dans les années 60 sur pin maritime. Depuis les années 80 nous travaillons sur les chênes. Les techniques de croisement sur ces espèces sont plus complexes que sur les conifères.

D'une part la disposition spatiale des fleurs dans la couronne de l'arbre est beaucoup plus "éclatée" que chez les conifères. D'autre part les fleurs sont très petites ; le rapport volume de fleur / volume du sac de pollinisation extrêmement réduit peut conduire un à "gaspillage" de pollen. Enfin la méconnaissance de la biologie florale chez les chênes ne permet pas de cerner de manière précise la période de réceptivité des fleurs femelles.

Dès lors il a fallu concevoir une méthode de pollinisation contrôlée très économe en pollen, de manière à garantir un maximum de rendement. Une économie en pollen se traduit par la possibilité de multiplier le nombre de sacs de pollinisation, de réaliser plusieurs injections de pollen de manière à piéger la période optimale de réceptivité des fleurs femelles. L'injecteur à pollen que j'ai mis au point, contribue à une économie très substantielle de pollen et à une optimisation du brassage pollinique dans le sac isolateur.

2 Présentation des différents types d'injecteurs à pollen

Nous appelons injecteur à pollen, le système qui permet de polliniser artificiellement les fleurs. Pour cela les fleurs femelles sont isolées du pollen de l'air ambiant par un sac de pollinisation qui enveloppe le rameau, sans empêcher son développement.

Ce sac est fixé sur le rameau à l'aide d'un bloc de mousse et un lien. En routine, dans notre cas, ce sac est un tube en papier sulfurisé, fermé par agrafage, d'une contenance de 15 litres environ. Plus récemment nous avons testé un sac en polyester non tissé, plus solide, plus rigide et qui résiste bien lors des pluies printanières, de volume 80 litres environ.

Lors du dépouillement de croisements contrôlés nous avons dénombré jusqu'à une quarantaine d'inflorescences femelles dans des poches de 15 litres. Il faut observer que l'avortement naturel est très important.

injecteur classique figure 1

A l'aide d'une poire **A**, l'air est envoyé dans un pilulier **B** qui contient le pollen **C**. Le pollen ainsi mis en suspension est injecté par l'aiguille **D** et brassé dans le sac de pollinisation **E**. Deux clapets anti-retour **F** imposent cette circulation forcée du pollen.

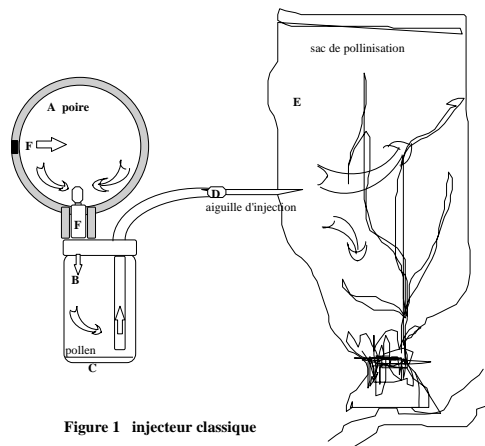


Figure 1 injecteur classique

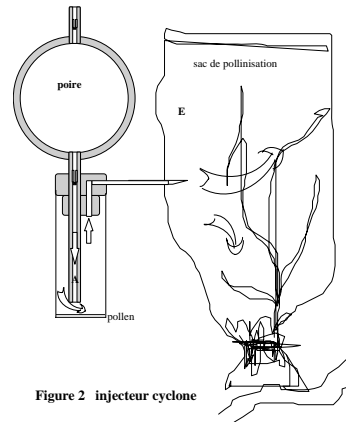


Figure 2 injecteur cyclone

injecteur cyclone figure 2

Le système "cyclone», proposé par nos confrères INRA-Forêts-Orléans, utilise une descente du conduit d'air **A** pour une mise en suspension du pollen. L'inconvénient du "cyclone" est qu'il consomme un volume important de pollen.

injecteur à deux voies figure 3

Ce système utilise les principes des deux injecteurs précédents et présente deux innovations principales.

- L'air extérieur est remplacé par des bouteilles d'air reconstitué qui apporte d'une part sa force mécanique comme vecteur pollinique , d'autre part sa propreté , l'air y est exempt de pollen naturel susceptible de polluer les croisements notamment lors de croisements interspécifiques . Nous ne l'avons pas testé mais l'air comprimé peut être une variante.
- L'injection est commandée par une vanne à trois positions **A** :
 - arrêt
 - mise en suspension cyclonique et injection
 - brassage du pollen dans l'isolateur

En effet un circuit d'air est ajouté : ce dernier ne passe pas dans le récipient de pollen, permet donc l'économie de ce pollen, et un meilleur brassage à la demande dans le sac de pollinisation qui de ce fait peut avoir un volume plus important (actuellement nous utilisons des isolateurs allant jusqu'à 80 litres). Pour cela une deuxième voie **B** est aménagée dans le bouchon de l'injecteur qui permet un passage direct de l'air dans l'aiguille de piqûre, évitant ainsi le récipient de pollen. L'équipement de 2 clapets antiretour sur chaque voie **C** et le déverrouillage rapide **D** de l'injecteur permettent le changement fréquent d'un lot de pollen à un autre.

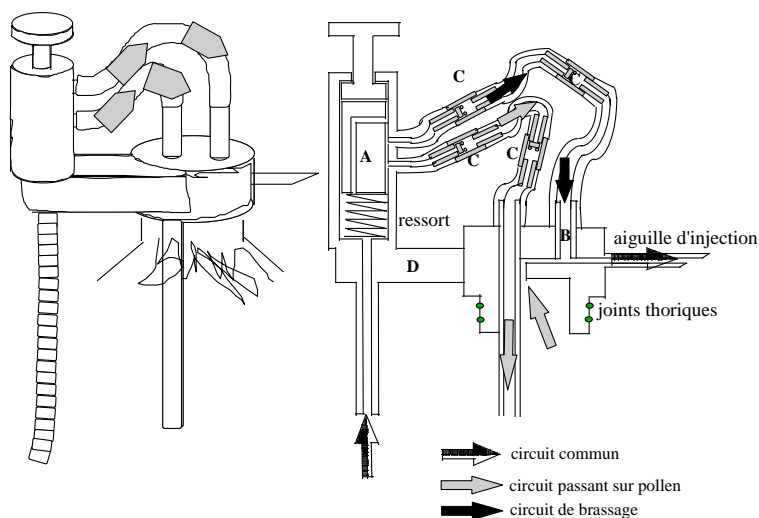


Figure 3 , vanne 3 positions , bouchon cyclone 2 voies , détails , vue en coupe

3 Conclusions

Ce système a été testé en grandeur nature en 1997 et 1998 à la Station de Recherches Forestières de Pierroton. Nous avons réalisé 4 injections dans 1400 sacs de pollinisation pour des croisements interspécifiques à l'aide d'une nacelle forestière. Après une familiarisation avec l'appareil, le confort de travail lors d'importants protocoles est évident, le brassage dans les sacs est fait à volonté, l'économie de pollen, la rapidité de l'injection, la fatigue des mains est diminuée notablement.

Nous avons essayé de comparer à posteriori le volume moyen utilisé par piqûre dans un sac de 15 litres, ces calculs sont approximatifs et nous donnent seulement une idée de la consommation.

année matériel d'injection	volume calculé pour 1 injection	volume calculé pour 4 injections dans 350 poches
injecteur classique 1994	0.4 ml	560ml
injecteur deux voies 1997	0.033ml	46.2 ml

Nous pouvons donc conclure que ce système permet d'économiser de manière importante le pollen (d'un facteur d'ordre 10). Ce système est adaptable à toute sorte de pollinisation en sac d'isolation, en réduisant le poids et le volume des bouteilles d'air le système deviendrait portable par un manipulateur pédestre par exemple lors de pollinisations contrôlées en verger à graines. On peut imaginer par ailleurs des injections polliniques automatisées en serre par un système pneumatique.

Je remercie Monsieur PUY DE BOIS pour la mise au point de la vanne à trois positions.

Depuis cette publication, le système est utilisé en routine et donne toute satisfaction. Nous avons utilisé un compresseur thermique portatif pour les campagnes de pollinisation 2002 2003. A l'aide d'une vanne volumétrique et d'une seconde vanne marche arrêt, nous obtenons les 1.5 à 2 bars nécessaires pour entretenir le flux d'air utile. Ce même flux d'air met le système sous pression en permanence, ce qui a pour conséquence importante que l'air chargé de pollen ne peut pas faire un retour à contre courant. Les clapets antiretour sont là en double sécurité et sont très utile lors des manipulations sans pression (connection système, remplissage, rangement), manipulations où l'on doit toutefois tenir les récipients munis de leur bouchon cyclone à la verticale. Il reste à vérifier que nous ne polluons pas de trop avec l'air ambiant le pollen injecté.

11. 8 extrait de C.Delatour et M Morelet 1979 « La pourriture noire des glands » *Biologie forestière*

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS PRATIQUES

Si le *Ciboria batschiana* n'est pas le seul ennemi des glands, dans la plupart des cas examinés il prédomine nettement ; il est cependant important de ne pas passer sous silence l'existence des autres champignons pathogènes dont les attaques pourraient se révéler graves dans certains cas.

Nous avons vu l'ampleur et la rapidité des dégâts que peut provoquer le *Ciboria* lors de la conservation des glands de telle sorte que des mesures prophylactiques particulièrement dirigées contre ce pathogène sont parfaitement justifiées et susceptibles d'apporter une amélioration décisive des méthodes de conservation. Nous avons vu également qu'une bonne compréhension du cycle biologique du parasite permet de concevoir une lutte raisonnée ; cette lutte peut être résumée par les recommandations suivantes :

- le ramassage des glands doit se faire le plus tôt possible après leur chute afin de les soustraire rapidement à l'inoculum naturel ; cet inoculum lui-même pourrait être réduit par un travail du sol qui aurait enfoui les glands infectés des glandées antérieures ;
- après ramassage, les glands devront être mis en conservation le plus rapidement possible afin d'éviter notamment leur stockage provisoire dans des conditions de température et d'humidité trop favorables à l'évolution de la pourriture noire ; si un ressuyage est nécessaire (glands devant avoir environ 45 % d'humidité relative), celui-ci devra être conçu de façon à être rapide.
- avant la mise en conservation, il faudra choisir la meilleure prophylaxie à appliquer ; pour cela, le seul critère utilisable est l'examen des surfaces cotylédonaire après décortication d'une centaine de glands prélevés dans chaque lot bien homogénéisé. Deux cas types pourront se présenter :

- 1 - si une faible proportion de glands présente des taches, on pourra se satisfaire d'un traitement chimique afin d'assurer la protection des glands non encore touchés ;

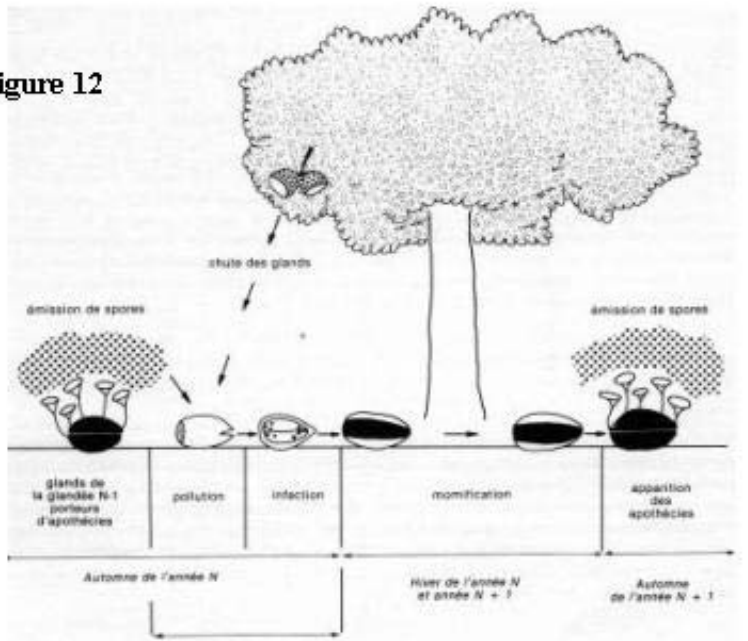
- 2 - si une forte proportion de glands présente des cotylédons tachés, seule la thermothérapie pourra permettre d'arrêter le développement du parasite s'il s'agit bien du *Ciboria* ;

- traitements chimiques (Bonnet-Masimbert et al. 1977) : on pourra choisir l'un des deux traitements suivants :

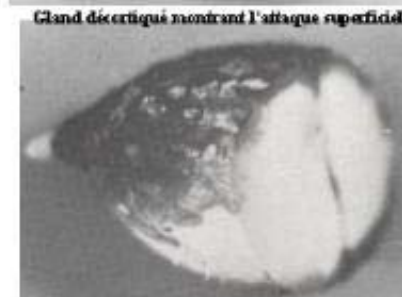
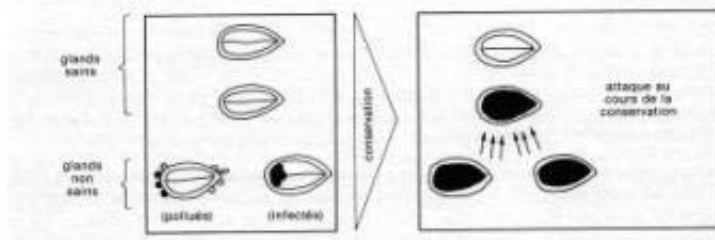
- 1 - trempage des glands pendant une nuit dans l'eau additionnée de Bénomyl (Benlate 50 % de matière active) à raison de 0,4 g de matière active par litre. A la sortie du trempage, lorsque les glands sont encore humides, ils seront poudrés avec du Thirane de façon

à ce que l'enrobage soit satisfaisant (ordre de grandeur : 2g de matière active pour 1 kg de glands). Ressuyer les glands si nécessaire, avant la mise en conservation.

Figure 12



Développement de Ciberia en nature et en conservation



Glands à enveloppe éclatée, cotylédons noirs = Ciberia



11.9 extraits de **Claudine Muller et Marc Bonnet Masimbert 1984 « La conservation des glands, bilan des essais menés entre 1976 et 1982 »**

CONCLUSION GENERALE

Les essais sur la conservation des glands entrepris entre 1976 et 1982, la plupart en collaboration avec le laboratoire de Pathologie Forestière, ont abouti à la maîtrise de Ciboria batschiana, agent de la pourriture noire souvent responsable de la mauvaise conservation des glands.

Nous avons pu déterminer un certain nombre de conditions favorables à la conservation des glands. La méthode proposée par la Station d'Amélioration et le Laboratoire de Pathologie Forestière est la suivante:

- Thermothérapie à 41°C pendant 3 heures
- Ressuyage jusqu'à une teneur en eau de 42-45%.
- Mise en récipients non fermés en alternant couches de glands et couches de tourbe séchée à 45%.
- Léger film polyéthylène à la surface du container pour réduire les dessèchements.
- Température de conservation -1°C.

THERMOTHERAPIE

Ainsi avec un trempage dans l'eau chaude à 41°C pendant 3 heures, on a maintenant la certitude que Ciboria batschiana est bien détruit à l'intérieur des glands mais encore faut il vérifier si à long terme le traitement par thermothérapie n'a pas un effet dépressif sur la vigueur des plants issus de ces glands. Jusqu'à présent aucun effet dépressif du traitement ne s'est manifesté ni sur la vitesse de levée ni sur la croissance des plants en pépinière.

TENEUR EN EAU

Un problème difficile à résoudre est celui du maintien de la teneur en eau à un niveau relativement élevé (42-45%) tout au long de la conservation. Nous avons pu constater que lorsque la teneur en eau diminue et se rapproche d'un seuil critique se situant aux environs de 37-39%, la faculté germinative diminue rapidement.

CONDITIONNEMENT

C'est à la demande de l' O.N.F. que des essais de conservation sans milieu ont été entrepris afin d'essayer de réduire le coût et le volume de stockage. Il est difficile encore de conclure étant donné que notre seul essai comparatif a été entrepris en 1982.

Cependant après 18 mois de conservation, il semble que l'utilisation d'un milieu de stockage tel que la tourbe aboutit à des résultats légèrement supérieurs. La tourbe jouerait le rôle de tampon et limiterait considérablement la dessiccation (SUSZKA 1980).

TEMPERATURE

C'est après l'essai de 1976 que la température de +4°C a été définitivement abandonnée au profit de -1°C qui permet une meilleure conservation en diminuant le métabolisme et en freinant le développement des champignons. Le problème de la conservation des glands étant quasiment résolu au niveau du laboratoire, il faut maintenant adapter les méthodes aux essais en vraie grandeur. Ceux-ci ont déjà été entrepris par l'O.N.F. en 1982 qui a stocké dans sa nouvelle sècherie 142 tonnes de glands. Lors du passage à des volumes aussi importants, des difficultés sont apparues notamment l'accumulation de CO₂ dans le fond des containers mais aussi

des difficultés d'équilibrages thermique. Quoiqu'il en soit et bien que la technique soit perfectible, on peut espérer parvenir à une conservation sur 2 ou 3 années.

11 .10 Extrait de BALACHOWSKY. - Traité d'Entomologie (t. 1, vol. 2). PHYTOPHAGOIDEA CURCULIONIDAE p1126>28

BALANINUS ELEPHAS, Gyll. (Syn. : mastodon Jekel). - Syst. : BEDEL (L.) 1901, p. 187 et 350; HUSTACHE 1931, p. 965; HOFFMANN (A.) 1954, p. 1087. BIOI. BIGOT (J.) 1874, p. 123; PEYERIMHOFF (P. de) 1919, p. 243; COLIZZA 1929, p. 244; BALACHOWSKY (A.) et MESNIL (L.) 1935, p. 617-618; VAYSSIÈRE (P.) 1938, p. 277; LAFERLA 1945; BONNEMAISON (L.) 1953, p. 316; HOFFMANN (A.) 1954, p. 1088; id., 1958, p. 1752; CAILLOL (H.) 1954, p. 290; COUTIN (R.) et DUSAUSOY (G.) 1956, p. 62. [Châtaignes].

Description. - Cet insecte mesure 6 à 10,5 mm. (fig. 658). Son arrière-corps subcordiforme est de couleur gris fauve ou cendré. Son rostre est aussi long ou plus long que le corps chez la femelle, moitié plus court chez le mâle; les élytres sont dépourvus de crête de pubescence vers l'apex.

Biologie - Les larves de *B. elephas* vivent dans les glands des Chênes à feuilles caduques ou persistantes et dans les fruits du Châtaignier, auxquels ils provoquent des dégâts souvent très importants. L'adulte apparaît à partir du 15 juin et persiste dans le Sud de l'Europe jusqu'à la fin de juillet (COLIZZA) et même plus tard (25 août au 15 septembre dans le Gard). Il se nourrit en piquant de son rostre les châtaignes, surtout vers la base, ainsi que les bourgeons provoquant de profondes altérations. L'accouplement s'effectue en général vers 9 à 10 heures du matin; la ponte commence peu après la copulation, de la fin d'août à la fin de septembre (COLIZZA), et se prolonge jusqu'en octobre (FABRE). Elle comprend au total, pour chaque femelle, une vingtaine d'oeufs. La femelle perce un trou dans l'involucre du fruit, le plus souvent dans sa moitié inférieure. Chaque fruit ne reçoit, d'une même femelle, qu'un seul oeuf (rarement 2 ou 3) mais plusieurs femelles peuvent pondre dans le même fruit et si l'on trouve rarement plus de 2 larves dans le gland du chêne, il est possible d'en observer jusqu'à 8 et 10 dans une seule châtaigne (COLIZZA). Ce dernier auteur indique que le trou de ponte est assez large pour que l'ovipositeur puisse s'y engager convenablement. Il mentionne que deux oeufs peuvent être pondus dans le même temps; dans ce cas la pression exercée par la poussée du second favorise l'enfoncement du premier. Le nombre plus élevé des larves, se trouvant dans le même fruit, explique les cas de nanisme fréquents observés chez les adultes, consécutifs à une carence alimentaire.



FIG. 658. — *Balaninus elephas* Gyll.
Nuisible aux châtaignes dans toute
sa zone européenne d'exploitation
(l = 6 à 10 mm).

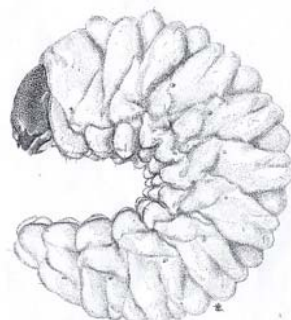


FIG. 660. — Larve du dernier stade de
Balaninus elephas Gyll. (l = 12-15 mm).

L'oeuf elliptique, blanc, lisse, mesure 0,4-0,5 mm. x 0,3-0,4 mm.; son incubation dure 5 à 8 jours.

D'après COUTIN et DUSAUSOY, l'insecte s'attaquerait plus rarement aux châtaignes dont l'involucre du fruit porte des épines plus serrées et plus longues qui opposeraient une gêne mécanique à l'introduction du rostre et l'insertion de l'oeuf.

La jeune larve, dès sa naissance, s'achemine dans la pulpe, y produisant une cryptocécidie analogue à celle que *B. nucum* provoque dans les noisettes. Le développement larvaire dure 30 à 45 jours; les fruits tombent à terre et la larve, pratiquant un trou de sortie dans la châtaigne, gagne le sol, s'y enfonçant à 10-15 cm. de profondeur (GUSSENO) et même 30-40 cm. (BARGAGLI). Elle confectionne une coque de terre agglutinée dans laquelle elle reste en diapause jusqu'au printemps suivant. D'après les observations faites en France, en Corrèze (COUTIN 1955), les pontes tardives (septembre octobre) déposées dans les châtaignes débarrassées de leur cupule, sont moins préjudiciables que les pontes précoces qui donnent des larves déjà développées et des dégâts très avancés au moment de la récolte. La nymphose qui dure 10 à 15 jours (COLIZZA), se produit tardivement de mai à juin et de juillet à août pour les individus déposant des pontes tardives. Les adultes issus de ces dernières n'apparaissent qu'à partir de la mi-septembre. Il n'existe qu'une seule génération dont l'échelonnement des pontes donne des cycles qui se confondent et se chevauchent. Il n'y a pas d'hivernation imaginaire car les adultes périssent avant les grands froids.

Les dégâts sur les châtaignes, s'observent dans les mêmes régions et en même temps que ceux de la chenille de *Laspeyresia splendana* Hubn. (Tortricidae). Le taux d'infestation pour une variété donnée est encore mal défini. COUTIN a observé sur la variété " Bourgeois " des attaques passant régulièrement de 5 à 30 p. 100 à 65 p. 100, puis à 90 p. 100 des fruits. Cet auteur en supprimant les aiguillons sur toute ou une partie de l'involucre a constaté que les pontes s'effectuent au profit des zones dénudées. D'ailleurs les observations faites dans la nature, sur trois variétés de châtaigne, sont assez suggestives. Dans la variété " Bourgeois " l'auteur a constaté une infestation de 90 p. 100; dans la variété « Coutinelle », 65 p. 100 et dans la variété « Marron du Gard » seulement 2 p. 100. Les aiguillons de la première variété sont divergents, clairsemés et la cupule porte quatre bandes inermes très nettes; les aiguillons de la deuxième sont ramifiés à la base et plus serrés, les bandes inermes étant recouvertes. Chez la troisième variété, les aiguillons très serrés comportent un feutrage sous-jacent de piquants plus courts à la base des grands aiguillons. On peut donc conclure que l'intensité des attaques de l'insecte sur châtaigne est en rapport avec la morphologie du revêtement épineux de la cupule. Par l'obtention de variétés de fruits à aiguillons denses et divergents, on pourrait obtenir a priori une limitation des dégâts de l'insecte. Au cours de l'opération de forage, ce n'est pas le rostre qui pénètre difficilement dans les fruits très épineux mais l'ovipositeur qui ne peut s'en approcher suffisamment pour l'introduction des oeufs.

La larve âgée de *B. elephas* a été décrite par COLIZZA; elle est blanche mesurant de 7 à 12 mm de longueur à son complet développement (fig. 660).

Cette espèce est distribuée dans toute l'Europe méridionale : Italie, Espagne, le Sud et le centre de la France, l'Allemagne occidentale et l'Afrique du Nord (Algérie) (zone montagnarde).

Lutte. - Les traitements directs dans les châtaigneraies par pulvérisation ou poudrage d'insecticides organiques de synthèse sont pratiquement inapplicables ou non rentables. La sélection des variétés résistantes n'a pas fait l'objet d'études particulières mais certaines variétés sont moins attaquées que d'autres (cf. supra).

VAYSSIÈRE (1938) a étudié la désinsectisation des châtaignes par le bromure de méthyle (40 g. à 60 g. par m³ de local pendant 3 heures dans un vide descendant à 20 mm). Cette mesure perd beaucoup de son intérêt du fait que les châtaignes désinsectisées après récolte ou dans les entrepôts sont déjà contaminées au maximum et les dégâts consommés. La plupart d'entre elles ne contiennent plus de larves à l'intérieur, celles-ci ayant abandonné les arbres encore en période de végétation pour s'enfouir dans le sol .

11.13 Validation des techniques de croisement contrôlés mises au point dans le laboratoire BIOGECO génétique

I Introduction

Depuis les années 1980 nous avons démarré au laboratoire d'amélioration génétique un programme de recherche sur les chênes rouges d'Amérique, puis sur les chênes blancs européens. Pour ce qui concerne les croisements contrôlés, nous démarrions sans trop d'expérience sinon avec celle développée sur le pin maritime. Nous nous sommes inspirés des techniques pratiquées sur d'autres espèces dans les équipes de recherche françaises (Orléans, Nancy), aussi bien qu'étrangères (Allemagne, Danemark). Aujourd'hui nous pouvons dire que nous avons développé des techniques originales. Le sujet de cet article est un bilan sur les techniques de croisements pratiquées et la validation de ces techniques aux vues des productions obtenues, contrôlées à posteriori par des analyses de microsattellites qui nous permettent d'observer les résultats in vivo.

En résumé nous sommes passés de campagnes de croisements très lourdes logistiquement en main d'oeuvre, en matériel (nacelle), en temps (castration ...) à des campagnes beaucoup plus souples, par le fait que nous travaillons aujourd'hui avec des greffes élevées en conteneur et que les récoltes de pollen sont anticipées d'au moins 1 an. La qualité et l'économie des pollens sont des facteurs essentiels. Cet article met en regard les deux approches sur adultes et sur greffes, ainsi qu'une validation des options techniques accumulées au cours des campagnes.

Si nous voulons classer les innovations, les plus déterminantes ont été :

- la mise au point de l'injecteur de pollen double voie
- la mise au point de l'élevage et des croisements sur greffes en conteneur

Nous allons donc essayer de répondre aux questions soulevées par la nouveauté de ces approches.

II Que peut-on attendre comme floraison et glandée d'une greffe élevée en conteneur, et au bout de quel laps de temps. Ceci comparé à la technique plus classique d'un travail sur arbre adulte ?

Quels résultats peut-on espérer de ces techniques de pollinisation dans la production de glands intra et inter-spécifique pour des chênes sessiles et pédonculés ?

Lors du démarrage des élevages en conteneur des greffes nous ne pouvions pas préjuger des résultats, cette démarche était en effet assez nouvelle. Nous avons contacté un expert de l'élevage en conteneur, François Beaugeard INRA Angers, ainsi qu'en arboriculture, Jean Marie Lespinasse INRA Bordeaux, et je les remercie ici de leur disponibilité et de leurs conseils.

La fructification sur les greffes en conteneur nécessite une période non négligeable de mise en place. Les greffes produisant aujourd'hui ont été greffées à partir de 1994 et mises en conteneur à partir de 1997. Nous avons tâtonné du fait de la nouveauté du protocole. Moyennant un suivi régulier d'alimentation en eau et de fertilisation, nous avons été agréablement récompensés au bout de quelques années par des productions régulières et abondantes. De plus cette stratégie a apporté des avantages techniques très appréciables :

- travail à hauteur d'homme, économie des heures de nacelle = autonomie du manipulateur, sans déplacement dans les différentes stations
- travail en serre en période de floraison = optimisation des conditions de floraison. Nous savions déjà que l'isolation des rameaux lors de l'ensachage permettait la préservation de la floraison, lors de printemps aux conditions météo défavorables. Avec le passage en serre, les conditions sont proches de l'idéal.
- multiplication des injections de pollen, de par l'autonomie du manipulateur et le système à trois voies économe en pollen, puissant en capacité de dispersion (ensachage de greffe qui occupe environ de 1 à 3 mètres cube).

- surveillance sanitaire qui donne des productions de meilleure qualité du celle d'arbre adulte en forêt (traitement printanier et estival, puceron, balanin).

Tout cela a permis une expression de la floraison et de la glandée dans des conditions favorables

Nous voyons bien que la production des greffes qui ne rivalisent pas évidemment avec celle d'un arbre adulte, quoique le rapport volume houppier/production est parfois étonnamment favorable, est très correct surtout par la souplesse et l'autonomie que permettent cette façon de procéder. Le point le plus délicat à notre sens est la longueur de la période de mise à fruit. On doit pouvoir écourter la mise à fruit en élevant la greffe dans de bonnes conditions de croissance et de fertilisation le plus tôt possible.

Seules les greffes utilisées pour les croisements sont entrées en serre puis remises à l'extérieur, pour le reste l'ensemble des greffes reçoit les mêmes traitements d'arrosage, de fertilisation et phytosanitaires. De 1999 à 2004, nous voyons bien la montée en production du parc après 4 à 6 ans du greffage. Il faut noter que :

- lors de croisements interspécifiques la glandée baisse naturellement.
- la production chez les chênes sessiles reste plus longue et plus faible à s'exprimer.
- la chute de production sur le graphique peut-être due en partie à l'arrivée dans le comptage de greffes plus jeunes.

III Que donne l'isolement des rameaux florifères non castrés en autofécondation ?

Quel est l'efficacité du système cyclone à deux voies, pour ce qui concerne son utilisation avec plusieurs lots de pollen, et/ou avec l'utilisation de l'air comprimé issu de l'air ambiant chargé ou non de pollen sauvage, et/ou avec les faibles volumes de pollen insufflés dans l'isolateur ?

Quelle est la réalité, l'efficacité de l'isolation d'une greffe avec une enveloppe de polyester non tissé en serre, ainsi qu'au champ, enveloppe qui est au départ perméable mécaniquement au pollen ?

Ces 3 questions concernent des domaines proches comme l'autofécondation, la pollution pollinique que l'on vérifie à l'aide de marqueurs génétiques. Les isozymes y ont répondu pour les croisements de 1992 (Structuration géographique de la diversité allozymique dans le complexe des chênes blancs : *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. et *Quercus robur* L. , 22/12/1998 , Anne Zanetto). Le tableau E rassemble les résultats des analyses microsatellites 2001>2004.

Tableau E : Tri croisements contrôlés avec les microsatellites QP119 et AG7

technique injection pollen	type croisement					répartition en fonction du type de résultat						% en fonction du type de croisement								
	sur greffe avec injecteur double voie air reconstitué	sur greffe avec injecteur double voie compresseur	interspécifique	intraspécifique	année croisement	femelle	mâle	croisement désiré	croisement utile	autofécondation	anormal	pollution	total individus déterminés	% croisement désiré	% croisement utile	% autofécondation	% anormal	% pollution		
X	X			97 98 99 02	QP	QS	11PxQS29													
X	X			97 98 99 02	QP	QS	11PxQS28													
X	X			97 98 99 02	QP	QS	24	35	83	1	24	167	14	21	50	1	14			
X		X		97 98 99	QP	QS	11PxQS29													
X		X		97 98 99	QP	QS	11PxQS28													
X		X		97 98 99	QP	QS	41	4	13			58	71	7	22		0			
X		X		97 98 99	QP	QS	11PxQS29													
X		X		97 98 99	QP	QS	11PxQS28													
X		X		97 98 99	QP	QS	62	38	33			133	47	29	25		0			
X		X	2000		QS	QS	QS28xQS21													
X		X	2000		QS	QS	72		1		4	77	94		1		5			
X		X	1997		QP	QS	27P x QS28													
X		X	1997		QP	QS	22		4			26	85		15		0			
	X	X	2002		QP	QP	A 4 x 3 P													
	X	X	2002		QP	QP	76		2			78	97		3		0			
	X	X	2002		QP	QP	3Px A4													
	X	X	2002		QP	QP	56		4		2	62	90		6		3			

L'autofécondation et la pollution se produisent à des fréquences qui sont tolérables dans nos croisements. Les microsatellites confirment ces réponses, et de ce fait nous sommes rassurés.

Le système cyclone à deux voies, de par son flux d'air à sens unique et des clapets antiretour fonctionne bien, aussi bien pour ce qui est de l'utilisation de l'air comprimé issu de l'extérieur qu'avec le changement de lot pour une même vanne à trois positions. L'isolateur de polyester des greffes permet la canalisation du flux de pollen sur la greffe et semble une barrière suffisante au flux éventuel de pollen exogène (croisement 2002). On peut dire que nos installations satisfont aux buts que nous sommes fixés.

IV A quel âge un jeune chêne au champ fleurit et produit des glands ?

Depuis l'année 1998 nous relevons la glandée dans les plantations issues des croisements contrôlés, nous constatons que la fructification quoique sporadique sur l'ensemble des collections apparaît au bout de 5 à 7ans. Nous pouvons dire qu'effectivement l'apparition de la fructification est possible dans les 10 premières années. En 2001 et 2002 nous avons croisé des sujets plantés en 1994, et nous nous sommes aperçus que de la même façon que pour les greffes en conteneur nous pouvons favoriser la mise à fruit sur ces sujets par une conduite culturale favorable (fertilisation, arrosage estival, suivi phytosanitaire) et optimiser son expression par l'ensachage printanier. Par ailleurs nous avons observé l'apparition de glands sur des boutures issues de croisements dans les même délais qu'en plantation classique.

Relevé glandée 2004 sur 2 dispositifs issus de boutures 3P x A4

Glandée	année bouturage	date installation dispositif	nbre clone installé	nbre clone fructiphère	%	nbre individus installés	nbre individus morts	nbre individu fructifère	%	1 à 5 glands	6 à 10	plus de 10
Bourran 1	1997	1999	174	108	62	1080	48	246	24	192	31	23
Bourran 2	1998	2000	207	126	72	2196	80	405	19	303	55	47

mesures Mimi Bertocchi

V Conclusion

Lorsque nous avons entrevu cette démarche nous n'imaginions pas mettre sur pieds un système cohérent de techniques. Celles-ci permettent pourtant aujourd'hui la production précoce de glands à partir de collections. Le processus de fructification a été optimisé, cela dans un délai raisonnable pour peu que l'objectif justifie l'investissement nécessaire. Nous pensons que cette démarche moyennant les adaptations nécessaires, est applicable à d'autres espèces dont la multiplication sexuelle est récalcitrante ou très tardive.

