JOSÉE GRONDIN

EFFET DE PHYTOHORMONES SUR LES RÉACTIONS DE DÉFENSE DE L'ÉRABLE À SUCRE (*Acer saccharum* Marsh.) SUITE À L'ENTAILLAGE ET À D'AUTRES TYPES DE BLESSURE MÉCANIQUE

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences forestières
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département des sciences du bois et de la forêt
FACULTÉ DE FORESTERIE ET DE GÉOMATIQUE
UNIVERSITÉ LAVAL

MARS 2004

© Josée Grondin, 2004

RÉSUMÉ

L'exploitation de l'érable à sucre (*Acer saccharum*) pour la production de sirop est d'une grande importance économique et sociale au Québec. Cependant, l'entaillage cause une blessure à l'arbre et celui-ci réagit, entre autres, en formant des murs de compartimentage qui vont limiter le développement du bois coloré improductif. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes du compartimentage, des érables matures ont été entaillés et traités avec divers régulateurs de croissance (les acides jasmonique, abscissique et salicylique, l'éthylène, le thidiazuron (une cytokinine) et la bétaïne) pouvant jouer des rôles importants lors de l'induction de ces mécanismes. Des analyses de volume de bois coloré ont révélé que son développement semble influencé par l'application de lanoline. De plus, une blessure fraîche traitée avec la lanoline réagira fortement en limitant la progression de la colonne de bois coloré. Nos données montrent aussi que les volumes de bois coloré suite à l'utilisation de petites entailles sont moins importants que ceux apparaissant suite à l'entaillage conventionnel. Les murs du compartimentage ne semblent pas être influencés par l'application de lanoline mélangée ou non aux régulateurs de croissance. Les 3000 échantillons prélevés à divers endroits autour et dans la zone affectée par l'entaille ont permis de découvrir des caractéristiques nouvelles sur le compartimentage. Une zone d'autofluorescence jaune révélée sous illumination bleue se trouve accolée aux murs 3 et 4. Cette fluorescence contribue particulièrement à rendre les murs 3 plus complets. Cependant, la nature chimique de cette fluorescence n'a pas pu être précisée par les tests utilisés. Une expérience avec des boutures d'érable ayant subi des blessures mécaniques révèle que la bétaïne et le thidiazuron ont des effets sur le compartimentage. De plus, contrairement aux attentes, la lanoline semble nuire à la fermeture des blessures. En définitive, cette étude aura permis de recueillir des observations inédites sur le compartimentage ainsi que d'entrevoir des possibilités intéressantes quant à la stimulation de cet important mécanisme de défense chez l'arbre à l'aide des phytohormones.

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Leurs apports sont considérables, sauf qu'il serait inopportun ici de les remercier tous individuellement Cependant, certaines personnes ont été présentes du début à la fin, et il m'est tout simplement impossible de les laisser dans l'ombre. D'abord, le Dr Danny Rioux, chercheur scientifique en pathologie forestière au Centre de foresterie des Laurentides, Ressources naturelles Canada, pour avoir assuré les fonctions de directeur de maîtrise associé. Il a su m'initier à sa passion pour la microscopie et la pathologie forestière. Ses nombreux conseils m'ont permis de mener cette étude à terme. Il a mis un temps inestimable à ma disposition ainsi qu'une grande patience. Ensuite, Madame Marie Simard, microbiologiste spécialisée en microscopie électronique, une précieuse collaboratrice, toujours disposée à aider et à répondre à mes mille questions pratiques. Merci aussi à tout le personnel du Centre Acer, dont Stéphane Guay (biologiste spécialisé en écophysiologie et écologie forestières) pour ses calculs statistiques impressionnants. Mes remerciements vont aussi au Dr Louis Bernier de l'Université Laval, directeur de recherche officiel de ce mémoire, et aussi au Dr Normand Chevrier de l'Université du Québec à Montréal pour, entre autres, leurs efforts ayant permis de financer ce travail de maîtrise. À toutes mes connaissances du Centre de foresterie des Laurentides qui ont su égayer mes journées de recherche. Je tiens à remercier aussi mon ''mec'', Martin, qui a su tout supporter au cours de cette maîtrise. Il a su aussi me motiver dans les moments plus difficiles. Merci aussi à ma famille. À mon ti-pou de filleul qui voulait toujours savoir quand je finissais mon école! C'est enfin fait Jean-Françis!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ii
AVANT-PROPOS iii
TABLE DES MATIÈRES iv
LISTE DES FIGURES vi
INTRODUCTION 1
1 Revue de la littérature 2
1.1 Généralités concernant l'érable 2
1.2 Distribution d'*Acer saccharum* 3
1.3 Coulée de la sève 4
1.4 L'historique de la production du sirop 7
1.5 La production de sirop 9
1.6 L'entaillage 10
1.7 Mécanismes de défense des arbres : le compartimentage 13
1.8 Les régulateurs de croissance 16
1.8.1 Acide salicylique (AS) 17
1.8.2 Jasmonates 20
1.8.3 Éthylène (ETH) 22
1.8.4 Acide abscissique (ABA) 24
1.8.5 Thidiazuron (cytokinine) 27
1.8.6 Bétaïne (Bx) 30
1.9 Références 32
2 Effet de phytohormones sur les réactions de défense de l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh) suite à l'entaillage. 42
2.1 Résumé 42
2.2 Introduction 43
2.3 Matériel et Méthodes 45
2.3.1 L'échantillonnage : arbres, entailles et traitements 45
2.3.2 Fixations et enrobage 47
2.3.3 Les coupes 47
2.3.4 Microscopie 47
2.3.5 Histochimie 49
2.3.6 Échantillonnage pour la mesure des volumes de bois coloré 52
2.4 Résultats et discussion 52
2.4.1 Volume de bois coloré 52
2.4.2 Observations en microscopie photonique 55
2.4.2.1 Bois sain (BS) et bois atteint (BA) 55
2.4.2.2 Murs 3 (M3) 56
2.4.2.3 Description anatomique des murs 4 60
2.4.2.4 Variabilité des murs 4 chez l'érable 67
2.4.2.5 La subérine dans les murs 70
2.4.2.6 L'autofluorescence jaune dans les murs 3 et 4 76
2.5 Conclusion 77
2.6 Références 78

3 Effet de phytohormones sur les réactions de défense de boutures d'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) suite à des blessures mécaniques. 82
3.1 Résumé 82
3.2 Introduction 82
3.3 Matériel et Méthodes 83
3.3.1 L'échantillonnage : arbres, blessures et traitements 83
3.3.2 Fixations et enrobage 85
3.3.3 Les coupes 85
3.3.4 Microscopie 87
3.3.5 Histochimie 87
3.4 Résultats et discussion 88
3.4.1 Fermeture des blessures 88
3.4.2 Observations microscopiques 90
3.5 Conclusion 93
3.6 Références 98
CONCLUSION DU MÉMOIRE 99
ANNEXE 1 100
Le compartimentage des zones entaillées chez des érables à sucre affectés par la tempête de verglas de 1998 100

LISTE DES FIGURES

Figures du chapitre 2 :

Figure 1 : CODIT 44
Figure 2 : Prélèvement des échantillons 48
Figure 3 : Découpe de tige 50
Figure 4 : Graphique des moyennes de bois coloré 51
Figure 5 : Bois sain 58
Figure 6 : Occlusions dans les vaisseaux d'un mur 3 58
Figure 7 : Colmatage efficace et fort d'un mur 3 58
Figure 8 : Fin de cerne très réactive d'un mur 3 58
Figure 9 : Rayons activés d'un mur 3 58
Figure 10 : Pectine dans mur 3 59
Figure 11 : M3 sous lumière polarisée 59
Figure 12 : M4 normal 61
Figure 13 : M4 normal à fort grossissement 61
Figure 14 : M4 moins uniforme 61
Figure 15 : Rayons activés 61
Figure 16 : M4 incomplet 61
Figure 17 : Cellule entre deux vaisseaux 61
Figure 18 : M4 absent 62
Figure 19 : M4 complet avec zones rosées 62
Figure 20 : M4 incomplet 62
Figure 21 : M4 avec zones rosées 62
Figure 22 : Échantillons pris trop près d'une blessure 62
Figure 23 : Mince bande rosée au début d'un M4 62
Figure 24 : M4 en deux parties 64
Figure 25 : Grossissement de la figure 24 64
Figure 26 : Rayon fortement activé 64
Figure 27 : Écorce après un M4 64

Figure 28 : Activation de la croissance 64
Figure 29 : Zone rosée avec amidon 69
Figure 30 : Grains d’amidon et phénols 69
Figure 31 : Grains d’amidon en MET 71
Figure 32 : Grains d’amidon dans cellule emplie de phénols en MET 71
Figure 33 : Cellule avec ponctuation en MET 71
Figure 34 : Cellule avec beaucoup de parois secondaires en MET 71
Figure 35 : Phénols dans une cellule de parenchyme en MET 71
Figure 36 : Ponctuations en MET 72
Figure 37 : Ponctuations et plasmodèsmes en MET 72
Figure 38 : Cellule ayant une forme anormale en MET 73
Figure 39 : Lamelles de subérine en MET 73
Figure 40 : Zone d’autofluorescence dans un M3 75
Figure 41 : Zone d’autofluorescence dans un M4 75
Figure 42 : Autofluorescence de la subérine dans un M4 75

Figures du chapitre 3

Figure 1 : Schématisation de la prise d’échantillons 86
Figure 2 : Suivi de fermeture d’une blessure ayant subi aucun traitement 89
Figure 3 : Suivi de fermeture d’une blessure ayant reçu de la lanoline 89
Figure 4 : Absence de réaction anatomique chez un témoin 95
Figure 5 : Échantillon pris loin d’une blessure traitée au THIDIA 95
Figure 6 : Échantillon pris près d’une blessure traitée au THIDIA 95
Figure 7 : Partie du M4 de la figure 6 95
Figure 8 : Forte croissance du côté de la blessure 95
Figure 9 : Échantillon pris loin d’une blessure traitée à la bétaïne 96
Figure 10 : Échantillon pris près d’une blessure traitée à la bétaïne 96
Figure 11 : Partie du M4 de la figure 10 96
Figure 12 : Forte croissance et réactions du côté de la blessure 96

INTRODUCTION

L'acériculture est d'une grande importance économique au Canada, particulièrement au Québec. Soixante-dix pour cent de la production mondiale de sirop d'érable provient du Québec et la majeure partie de cette production est exportée vers les marchés internationaux. On évalue à plus de 100 millions de dollars par an la valeur des productions agricoles attribuables à l'acériculture, ce qui en fait la troisième production agricole en importance au Québec .

La récolte de la sève se fait via une entaille au tronc de l'arbre qui pénètre dans le xylème. La blessure induit des réactions de défense qui impliquent la formation de murs de protection associés au compartimentage. Les volumes de bois coloré entourés par ces murs peuvent toutefois être considérables dans l'arbre. Le phénomène du compartimentage lié à l'entaillage de l'érable à sucre a été peu étudié à ce jour. Les moyens de stimuler les mécanismes de défense lors du désentaillage dans le but de réduire au minimum la zone de bois coloré sont pratiquement inexistants. Pourtant, la production acéricole pourrait être améliorée par une réduction de la zone de bois coloré improductive.

L'objectif principal de ce projet est d'accroître la production de sirop des érablières à moyen terme. Pour ce faire, l'utilisation de régulateurs de croissance pouvant stimuler le compartimentage autour de la zone de bois coloré présente une avenue de recherche intéressante, d'autant plus que de nouveaux régulateurs ont été décrits récemment et ont été peu étudiés chez les arbres. Les observations microscopiques des barrières sont aussi une bonne façon de mieux saisir l'efficacité des divers traitements envisagés.

1 Revue de la littérature

1.1 Généralités concernant l'érable

On classe les érables (*Acer* spp.) chez les Angiospermes Dicotyles dans la famille des Acéracées (*Aceraceae*) qui comprend aussi le genre *Dipteronia*. Selon Marie-Victorin (1995), on compte environ 100 espèces d'érables dans le monde mais seulement dix indigènes au Canada. Au Québec particulièrement, les érables se distinguent par leur bois dur (Ansseau et Bernier, 1995) ainsi que par leur sève sucrée à partir de laquelle s'est développée l'importante industrie acéricole (Babin, 1995; Marie-Victorin, 1995). L'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) est l'espèce de prédilection pour la production de sève bien que trois autres espèces puissent aussi être utilisées à l'occasion. En effet, l'érable rouge (*Acer rubrum* L.), l'érable argenté (*Acer saccharinum* L.) et l'érable noir (*Acer nigrum* Michx. L.) sont des essences que l'on retrouve aussi dans les érablières exploitées au Québec. L'érable à sucre, qui a une longévité d'environ 250 ans (Marie-Victorin, 1995), est privilégié dans les érablières car sa sève possède un goût recherché tout en étant généralement plus sucrée que celle des autres érables. L'érable noir a toutefois une sève comparable à celle d'*A. saccharum,* avec lequel il s'hybride parfois (Skepner et Krane, 1998 ; Harlow et al., 1978), mais la distribution de cette espèce se limite au sud du Québec. L'érable rouge est quelquefois entaillé même si sa productivité est moindre que celle des érables à sucre et noir (Coons, 1976).

Comme *A. saccharum* tolère l'ombre, les semis peuvent facilement se développer sous le couvert dense des arbres matures et ainsi permettre une régénération permanente de l'érablière. Les pousses obtiennent un maximum de croissance avec seulement 50% de pleine lumière (Vézina et Roberge 1981). Les jeunes érables ont un radiculaire peu développé, ce qui les empêche de puiser l'eau profondément dans le sol. L'ombre amène une hausse du taux d'humidité du sol de surface, ce qui facilite la croissance des petits érables. De plus, le taux de photosynthèse de l'érable est à peu près constant et atteint son maximum à une

intensité de lumière beaucoup moins élevée que chez les autres arbres (Bertrand, 1995a).

Les érables atteignent leur maturité sexuelle autour de leur vingtième année et la floraison s'initie tôt au printemps peu après le débourrement des bourgeons (Ansseau et Bernier, 1995). Les samares, graines ailées réunies deux à deux par la base qui sont souvent comparées aux pales d'un hélicoptère, atteignent leur plénitude au début du mois de septembre. Leur développement s'effectue tout au long de l'été. Lorsque les samares se détachent de l'arbre au début de l'automne, elles peuvent franchir des distances considérables car leur forme et leur poids permettent aux vents de les porter facilement. L'avancement de la saison chaude conduit à la lignification des rameaux en plus de la sénescence et l'abscission des feuilles. Le refroidissement automnal va contraindre l'arbre à s'endurcir afin de résister aux rigueurs de l'hiver. La coulée de la sève a lieu au printemps (généralement au mois de mars et avril), avant le débourrement des feuilles.

La germination des graines de l'année précédente n'a lieu qu'à ce moment même si elles étaient complètes au moment où elles sont tombées. Cette dormance est due à un blocage métabolique et est nécessaire à l'embryon pour obtenir une maturation suffisante de ses différents tissus (Ansseau et Bernier, 1995). La température optimale de levée des graines (~1°C) est une des plus basses chez les arbres, ce qui permet d'expliquer en partie la dominance des érables au Québec malgré une croissance relativement lente (Bertrand, 1995a).

1.2 Distribution d'*Acer saccharum*

Une érablière exploitée pour sa sève est habituellement un peuplement uniforme d'érables à sucre qui peut aussi comprendre d'autres essences comme l'érable rouge, l'érable noir, l'érable argenté, le tilleul d'Amérique (*Tilia americana* L.) et le bouleau jaune (*Betula alleghaeliensis* Britton). Les arbres du genre *Acer* peuvent croître partout dans le monde, mais ces arbres se retrouvent ordinairement dans l'hémisphère nord. L'érable à sucre est, quand à lui, typiquement nord-américain.

Le Québec est une région de choix pour la croissance de ces arbres. De plus, le printemps du Québec est incomparable pour obtenir une coulée abondante étant donné les variations de température allant de sous zéro la nuit à au dessus de zéro le jour, qui sont les conditions idéales pour favoriser la coulée (Bertrand, 1995b). D'après Marie-Victorin (1995), l'érable à sucre n'est pas présent partout au Canada comme le laisse à tort supposer le choix de la feuille d'érable comme emblème national. Les cartes de distribution montrent bien que l'on ne retrouve pas l'érable à sucre plus au nord que le Lac Saint-Jean. Sa distribution s'étend de la Nouvelle-Écosse jusqu'au Manitoba. Du côté des États-Unis, les peuplements se retrouvent surtout dans le nord, du centre vers l'est de ce pays (Ansseau et Bernier, 1995 ; Marie-Victorin, 1995)

Au Québec, les peuplements les plus propices à la croissance et à la production optimales de l'érable à sucre sont des érablières à bouleau jaune, à tilleul d'Amérique et à caryer cordiforme. L'érable se développera de façon optimale sur des sols frais autant riches que humides. La région des Bois-Francs est l'endroit où l'on retrouve les rendements en sève les plus intéressants (Marie-Victorin, 1995).

1.3 Coulée de la sève

La coulée de la sève au printemps est un phénomène difficile à expliquer. On peut cependant affirmer que cet événement est lié à la température ou plutôt aux variations de température. L'alternance entre des nuits froides et des jours chauds est essentielle car la coulée se divise physiquement en deux étapes. Il y a une phase dite « d'absorption » qui se déroule au début de la nuit lors du refroidissement. Chez l'érable à sucre, la poussée racinaire n'est pas assez importante pour provoquer une telle ascension de la sève dans le xylème. Ceci est possible grâce à la structure même du xylème de l'érable. En effet, celui-ci est composé de gros vaisseaux et la sève peut ainsi être transportée rapidement à la cime des arbres par une libération de pression. La perte d'énergie provoquée par le passage de l'eau de sa phase liquide à sa phase solide cause cette baisse de

potentiel hydrique. L'appel d'eau est donc créé par le gel de la sève des branches de la cime soumise au froid. L'eau des couches externes du xylème gèle avant celle qui se trouve plus en profondeur dans la branche. L'eau encore en phase liquide doit se déplacer pour se retrouver dans des zones de plus faible potentiel hydrique plus à l'intérieur de l'arbre. Ce mouvement d'eau produit un appel de liquide. On constate, au niveau cellulaire, que les vaisseaux de l'érable, généralement emplis de liquide, sont entourés de fibres qui, elles, contiennent des gaz. Les gaz peuvent être compressés et ainsi laisser de la place pour permettre l'expansion de l'eau lors du gel. Chez la majorité des plantes ligneuses, les fibres sont emplies de liquide. La sève ne peut monter vers la cime de ces arbres et elle est plutôt repoussée vers les racines la nuit car aucun vide n'est engendré dans le haut de la plante. Ainsi, la nature des vaisseaux et des fibres de l'érable amène le vide qui crée une succion et l'eau peut monter assez facilement dans l'arbre en grand volume (Bertrand, 1995a et 1995b; Tyree, 1983 et 1984; Marvin, 1968).

Le matin venu, lorsque la température de l'air passe au dessus de zéro, la sève emprisonnée dans le xylème dégèle et l'expansion des gaz sous l'effet de l'augmentation de la température chasse la sève des fibres qui redescend dans l'arbre par gravité. Cette seconde phase est nommée « exsudation » (Marvin et Green, 1951).

Cependant, la coulée est complexe et cette description du phénomène est exclusivement physique. On sait par ailleurs que la coulée implique aussi des phénomènes chimiques et biologiques. En effet, si la sève ne contient pas de saccharose, l'absorption est nettement réduite et la coulée de la sève n'est pas possible (Johnson et al. 1987). Les forces physiques ne sont donc pas seules en jeu. Le sucre joue un rôle majeur toujours non clarifié et même quelque peu mystique pour ceux ayant tenté d'élucider les principes de la coulée chez l'érable. Précisons ici que l'on nomme fréquemment l'eau d'érable récoltée « sève », même si celle-ci ne correspond pas exactement à la sève brute normale de l'arbre. En

effet, le réveil de l'arbre n'a pas encore eu lieu au moment de la récolte et c'est un liquide différent de la sève brute qui est alors récolté.

Il importe de faire une distinction entre la sève brute et la sève élaborée. La sève du xylème porte le nom de sève brute et est essentiellement constituée d'eau et de sels minéraux puisés dans le sol par les racines. Le phloème sert au transport descendant de la sève élaborée qui contient 10 à 25% de sucres fabriqués par les feuilles lors de la photosynthèse (Kozlowski et Pallardy, 1997). En moyenne, la concentration en sucres de la sève exploitée est de 2 à 3% et on en prélève environ 50 litres par entaille lors des bonnes années. Ce prélèvement nuirait peu à la santé de l'arbre car ceci représenterait au plus 4,5% de ses réserves en sucres (Renaud et Allard, communication personnelle dans Bertrand, 1995b)

L'entaille faite dans le tronc libère la pression et permet ainsi de récolter la sève qui descend dans le xylème de l'arbre. Comme la sève ne coule que le jour, l'entaille tend à s'assécher pendant la nuit. L'assèchement permet l'entrée d'air dans le xylème. La présence d'air dans les tissus de l'arbre apparaît être le principal facteur déclenchant les mécanismes de défense (Boddy 1992). Donc, l'arbre percevra l'entaille comme une blessure et tendra à la refermer ce qui nuira grandement à la coulée au fil des jours (Walters et Shigo, 1978a et b). Le compartimentage de la zone affectée par l'entaille n'est pas seulement dû à la présence d'air. D'autres facteurs comme la présence de champignons ou de bactéries affecte le compartimentage. L'entaille faite dans l'arbre est avant tout une blessure par laquelle divers microorganismes peuvent pénétrer l'aubier et le coloniser. Le compartimentage qui en résulte, et qui sera expliqué plus longuement dans une section ultérieure, implique la formation de tissus qui protègeront l'arbre contre l'envahissement par des microorganismes. Ces tissus de protection ainsi que le bois affecté qu'ils entourent constitueront toutefois des zones improductives lors des entaillages subséquents.

1.4 L’historique de la production du sirop

On attribue la découverte du sirop d’érable aux Amérindiens qui auraient, avant même l’arrivée des premiers Européens en Amérique, découvert comment extraire la sève. Le sirop servait à des fins médicinales et alimentaires. Les premiers colons arrivés au Québec apprirent le secret des érables à sucre rapidement, mais jusqu’au 19e siècle, les productions étaient artisanales et visaient seulement à satisfaire les besoins familiaux. Pour récolter la sève, ils utilisaient une méthode peu efficace tirée de celle des Amérindiens. Ce n’est pas avant la fin du 19e siècle que la production devint commerciale. Des chalumeaux artisanaux étaient insérés dans les entailles faites au vilebrequin et l’eau d’érable s’écoulait dans des seaux accrochés sur l’arbre ou déposés par terre près du tronc. Les chalumeaux (synonyme : goutterelle, goudrelle, goudille, goudrille) sont des petits tubes glissés dans l’entaille pratiquée dans le tronc et qui permettent à la sève de s’égoutter. La production est demeurée négligeable pendant de nombreuses années jusqu’à l’apparition d’accessoires en métal et de bâtiments permanents. À partir de ce moment, la production a vraiment pris son envol vers l’industrialisation, mais pendant plusieurs décennies aucune amélioration remarquable n’a été faite aux systèmes de récolte. Les techniques d’entaillage ont graduellement évolué et, aujourd’hui, l’entaille est plus petite mais permet tout de même de récolter un volume supérieur de sève. La plus remarquable avancée en acériculture fut la mise au point de systèmes de collecte sous vide. La production a alors augmenté tout en diminuant la main d’œuvre vu la mécanisation de la cueillette. Cette méthode permet de créer en plus un vide à l’entaille, ce qui augmente la différence de pression entre l’intérieur de l’arbre et l’extérieur. En renforçant cette différence, on prolonge la durée de la coulée quotidienne, l’arbre tendant à ajuster sa pression sur celle à l’extérieur. Aujourd’hui, les seaux ne sont utilisés que dans un cadre d’activités de type traditionnel qui plaisent aux amateurs de cabanes à sucre friands de redécouvrir ces pratiques ancestrales.

L'arrivée des tubulures a permis diverses expérimentations sur l'élimination de l'entrée d'air la nuit lors du tarissement de la coulée. Il a été mentionné précédemment que l'embolie créée par une blessure serait un motif important stimulant l'arbre à réagir et à mettre en œuvre ses mécanismes de défense (Boddy, 1992). Une des répercussions néfastes de la mise en œuvre de ces mécanismes de défense est d'amener l'arbre à boucher ses vaisseaux, ce qui contribue à diminuer grandement le volume de la coulée. Il est connu et admis qu'un arbre sain est saturé en eau et qu'il ne contient pratiquement pas d'oxygène (Pearce, 1996 ; Boddy, 1992). Des billots de bois complètement immergés dans de l'eau stagnante peu oxygénée pendant plusieurs mois, voire même des années, sont nullement colonisés par les microorganismes. La plupart des champignons sont incapables de croître dans un bois saturé en eau (Zabel et Morrell, 1992). L'entrée d'air engendrée par une blessure diminue l'humidité et les microorganismes peuvent alors prospérer plus aisément et la qualité de la sève s'en voit nettement affectée. D'un autre côté, il semble que ce soit l'oxygène de l'air qui amène l'oxydation du bois. Une étude a révélé que l'injection d'azote la nuit dans l'entaille par le système tubulaire comparativement à celle d'air permettait d'obtenir une meilleure coulée de façon significative (Renaud, 1998a et b). Quoi qu'intéressants, ces résultats n'ont pas encore favorisé de changements marquants dans la production acéricole.

Pour estimer le nombre d'entailles pouvant être faites à un arbre, le seul facteur pris en cause encore aujourd'hui est le DHP, soit le diamètre à hauteur de poitrine. Les normes actuelles utilisées au Québec sont celles du Conseil des Productions Végétales du Québec (CPVQ). Elles sont moins rigoureuses que celles de Houston (Houston et al. 1990). À moins de 20 cm de DHP, il n'est pas approprié d'entailler. Entre 21 et 39 cm, on conseille seulement une entaille, de 40 à 59 cm on peut percer deux entailles, de 60 à 79 cm, trois entailles sont possibles et pour les arbres de plus de 80 cm, on peut pratiquer quatre entailles. Cependant, ces normes ne tiennent aucunement compte d'autres facteurs telles la croissance de l'arbre et sa santé. Le modèle d'Allard et al. (1997) mis au point pour simuler le

rendement en fonction de divers paramètres physiques et physiologiques montre que si l'on continue la production à ce rythme pendant encore 30 ans, la productivité des érablières diminuera jusqu'à 40%.

1.5 La production de sirop

L'eau d'érable est peu sucrée et elle est pratiquement sans goût. La saveur caractéristique du sirop d'érable est due en premier lieu à des réactions de caramélisation dites de Maillard qui surviennent lors du chauffage à haute température et aussi à la concentration en sucre vu l'évaporation d'eau (Akochi-K et al., 1997). Comme l'ébullition de l'eau d'érable est un processus coûteux, les exploitants d'entreprises acéricoles se sont vus dans l'obligation de chercher des méthodes alternatives pour concentrer l'eau d'érable. L'osmose inversée est connue depuis le début du siècle dernier, mais ce processus n'a été appliqué à la concentration de l'eau d'érable qu'au cours des années 1960 par Willits et al. (cité dans Allard, 1984). On obtient une eau d'érable plus concentrée en la faisant passer par une membrane semi-perméable et en exerçant une force mécanique plus élevée que la pression osmotique. On passe ainsi d'une concentration de 2 à 3% de saccharose et éléments minéraux à 8%. L'économie d'énergie a incité une majorité de producteurs à acquérir ce genre de système car, en plus, il permet une filtration préalable de l'eau d'érable, ce qui a aussi pour effet d'améliorer la qualité du sirop. La sève concentrée passe ensuite dans un évaporateur conventionnel permettant de concentrer les sucres et de rehausser la saveur caractéristique du sirop. À haute température, des réactions chimiques entre des sucres et des acides aminés se produisent amenant la formation de pyrazines, qui font partie des composés donnant un goût particulier au sirop d'érable. On retrouve, en plus des pyrazines des phénols volatils et des composés carbonyles (Akochi-K et al., 1997). Les pyrazines sont des composés typiques des réactions de Maillard.

Pour obtenir un litre de sirop d'érable, on doit utiliser entre 30 et 40 litres de sève par un chauffage traditionnel. Les producteurs de sirop utilisent souvent la règle du 86 qui donne une approximation grossière du nombre de litres de sève

nécessaires à la production d'un litre de sirop. Il suffit de diviser 86 par la concentration de sucre en pourcentage de la sève. La même règle s'applique aussi avec le concentré obtenu par osmose inverse. Si on concentre d'abord la sève par osmose inverse à 8% comme c'est généralement le cas, la production d'un litre de sirop demandera près de 11 litres de sève à cette concentration.

Le sirop contient par définition 66% de sucre. On détermine encore maintenant la qualité du sirop en fonction de sa couleur. Plus il est clair, plus il est de qualité. Sa teinte progresse au cours de la saison et habituellement plus on approche de la fin, plus le sirop est foncé. Cependant, on sait que la couleur peut être un caractère trompeur, même si c'est celui accepté par le milieu. La sève récoltée trop tard en saison, pendant ou après le débourrement, donne un sirop au goût âcre typique non recherché (nommé ''goût de bourgeons''). L'appellation des produits de l'érable change avec la concentration en sucre. La tire sur la neige titre autour de 85%, le beurre à 87%, les bonbons à 90% et finalement le sucre granulé à 96% et plus. Encore ici, la couleur obtenue est garante de la qualité du produit (Willits et Hills, 1976).

1.6 L'entaillage

L'entaillage est une opération qui demande beaucoup de précautions. Les arbres peuvent être entaillés chaque année mais leur santé doit être prise en compte. Un arbre affaibli, stressé ou surentaillé aura des rendements moindres et pourra même en souffrir. L'asepsie est cruciale lors de l'entaillage. L'introduction de microorganismes présents sur le foret ou sur l'écorce de l'arbre dans le xylème, un milieu où ils pourront facilement se propager, doit être minimale. La mèche est nettoyée et désinfectée à l'alcool suite à un certain nombre de perçages de l'aubier et tous les chalumeaux sont assainis avant d'être introduits dans l'arbre. L'entaille n'est généralement pas plus profonde que 6,35 cm (2''½) et certaines expérimentations ont été faites visant à diminuer la profondeur de l'entaille (Allard et al. 1997 ; Allard, 1999 ; Renaud, 1998b). Il ne semble pas que la diminution de bois coloré compense pour le volume de sève perdu, même si les normes

actuelles sont à revoir (Renaud, 1998b). Cependant, dans une érablière à croissance lente, les acériculteurs gagneraient à entailler moins profondément, soit 5 cm (Allard, 1999). La profondeur de l'entaille ne doit pas non plus dépasser la zone d'aubier sain. Le bois de cœur est considéré comme mort et par conséquent ne favorise pas le passage de la sève. L'entaillage du bois de cœur pourrait aussi favoriser la dispersion des microorganismes souvent présents dans cette zone.

Le diamètre de l'entaille utilisé depuis longtemps est de 11,1 mm (7/16''). Depuis quelques années, diverses études du Centre Acer (Allard et al. 1997 ; Allard, 1999; Renaud, 1998b) tendent à démontrer que l'utilisation d'un chalumeau à diamètre réduit, soit 7,4 mm (19/64'') serait favorable au compartimentage de l'arbre et tendrait à diminuer la colonne de bois coloré de part et d'autre de l'entaille. Même si moins de vaisseaux porteurs de la sève sont segmentés lors de cet entaillage réduit, la diminution de diamètre ne réduirait pas substantiellement la production. Le maintien de la production serait dû au vide amélioré pouvant être créé par la pompe du système tubulaire sur un chalumeau plus petit.

Peu d'études ont été menées pour mettre en évidence l'importance de garder les arbres sains et les bonnes mesures à prendre pour y parvenir. Les principales recherches ont porté sur l'effet controversé du paraformaldéhyde (PFD). Dès 1970, Shigo et Laing (cité dans Walters et Shigo 1978a et b) ont suggéré que le paraformaldéhyde causait des blessures internes importantes et l'effet à long terme de cette substance était dès lors questionné. Deux études de Walters et Shigo parues en 1978 ont montré qu'il y avait un plus grand volume de bois coloré résultant d'entailles traitées au PFD que dans les témoins. Le PFD a été utilisé surtout pour obtenir de meilleurs rendements de sève chez les érables entaillés avant la saison de coulée. La coulée diminue au fil des jours et peut même parfois s'arrêter précocement. Des études de Sheneman et al. en 1959 et Ching et Mericle en 1960 (cités dans Houston et Fagan, 1997) ont suggéré que les microorganismes présents dans l'entaille pouvaient se développer sous certaines conditions (des températures plus clémentes par exemple). Comme on

soupçonnait les microorganismes de causer des pertes de rendement, on a donc tenté de trouver un agent antimicrobien qui serait peu résiduel, mais qui aurait tout de même un large spectre d'action. Suite à des tests de laboratoire sur les microorganismes peuplant souvent les entailles, des capsules de PFD de 250 mg ont été mises en marché et les essais sur le terrain montraient une augmentation de 30 à 40% de la production des entailles. L'augmentation de la coulée pourrait être due à l'asepsie créée par la pilule mais aussi au fait que le PFD, qui est un puissant fixateur, semble interagir avec les cellules vivantes de l'arbre et empêcherait un bon compartimentage de la blessure. En retardant la fermeture des vaisseaux dans lesquels circule la sève, on permet une coulée plus longue mais la zone de bois coloré sera plus imposante (Walters et Shigo, 1978a et b). L'utilisation de paraformaldéhyde lors de la récolte d'eau d'érable est bannie depuis 1992 au Canada et 1999 aux États-Unis. La raison principale de l'interdiction du produit est avant tout son effet dommageable sur l'arbre de même que sa récurrence dans le produit final. Cependant, il est encore utilisé frauduleusement dans plusieurs grandes érablières. Ce produit permet d'entailler beaucoup plus tôt, souvent même en janvier avant la saison de coulée et ainsi de profiter des petites périodes de dégel pouvant survenir en hiver. Le fait d'entailler plus tôt a aussi l'avantage de laisser plus de temps au personnel de faire l'entaillage, ce qui est particulièrement utile pour les producteurs possédant de grandes érablières.

À l'heure actuelle, la principale cause de diminution de rendement de l'industrie acéricole est la présence de zones de bois coloré de plus en plus importantes suite à l'entaillage. Plusieurs producteurs de sirop d'érable maintiennent que, malgré les innovations encourues depuis les vingt dernières années et un système de collecte en bon état de marche, leurs érablières sont en perte de production globale pouvant atteindre jusqu'à 30% dans certains cas. Cette perte de potentiel est probablement due à l'âge des peuplements et à l'entaillage qu'ils ont subi au fil des années. L'utilisation du modèle mathématique de Allard et al. (1997) montre que les normes actuelles (CPVQ) amènent une surexploitation constante des

érablières composées d'arbres ayant une trop faible croissance radiale (Stéphane Guay, communication personnelle).

1.7 Mécanismes de défense des arbres : le compartimentage

La paternité de la pathologie forestière est attribuée à l'Européen Robert Hartig qui, avant même la fin du 19^{e} siècle, avait remarqué des tissus spécifiques et distincts entre le bois sain et le bois attaqué par des champignons de carie des arbres qu'il débitait (Hartig, 1894). Ces tissus spécifiques sont en fait les murs d'un compartiment fermé qui permet de limiter la propagation des microorganismes, d'où le nom de compartimentage. Depuis, Shigo a fait du compartimentage sa marque de commerce. Le modèle CODIT (Compartmentalization Of Decay In Trees) proposé par Shigo et Marx (1977) est maintenant fort connu. Il permet d'expliquer et de visualiser la chronologie des actions mises en place par un arbre pour se défendre contre une blessure ou un envahisseur. Il a été établi que le compartimentage pouvait permettre à l'arbre de résister à des maladies vasculaires (Tippett et Shigo, 1981) et à des blessures mécaniques (Shigo, 1984). Par la suite, il a aussi été démontré que des plantes non ligneuses comme l'œillet (Baayen et al. 1996) produisent des barrières pour contrer l'envahissement par des agents pathogènes.

Le compartimentage est donc la façon utilisée par l'arbre pour condamner une zone atteinte, soit le bois coloré. Pour ce faire, l'arbre bâtit quatre murs (Shigo, 1985 ; Shigo et Marx, 1977). On croit que l'un des facteurs principaux stimulant les réactions de défense de l'arbre est l'entrée d'air et la dessiccation des tissus en résultant (Boddy 1992; Boddy et Rayner 1983). En conséquence, le compartimentage serait un moyen de défense non spécifique mais actif. Les prochaines informations se réfèreront au schéma CODIT présenté à la figure 1 du chapitre deux de ce mémoire. Le modèle CODIT est en fait constitué de quatre zones de réaction; ces zones étant aussi appelées des « murs ». Les trois premiers murs sont formés à partir des cellules déjà présentes au moment du

dommage et apparaissent de façon simultanée. Le mur 1 limite la colonisation longitudinale des tissus. Chez les feuillus, il est constitué d'occlusions qui se forment dans les vaisseaux du xylème. Ces bouchons sont en majorité dus à la formation de gels provenant des cellules de parenchyme adjacentes et de thylles qui sont en fait des excroissances de cellules de parenchyme. Ce mur serait le moins efficace du modèle CODIT et ceci permettrait d'expliquer la longueur considérable que certaines colonnes de bois coloré peuvent atteindre. La composition des gels obstruant les vaisseaux n'est pas encore complètement élucidée bien qu'il semble que la majorité d'entre eux contiennent de la pectine (Rioux et al., 1998). Le mur 2 est constitué du bois final des cernes annuels. Les cellules de ce bois possèdent d'épaisses parois souvent fortement lignifiées. Ces cellules contrecarreront l'avance de l'agent pathogène vers l'intérieur de l'arbre. La colonisation tangentielle des microorganismes sera freinée par le mur 3 formé des cellules de rayons. Il est important de noter que les rayons ont des hauteurs et des largeurs limitées variant selon l'espèce d'arbre. Donc le mur 3, par sa composition, est un mur discontinu. Dans un cours laps de temps suivant l'attaque, le cambium réagira pour former le mur 4 ou barrière de protection. Il est constitué habituellement de cellules de parenchyme contenant une quantité importante de composés phénoliques antimicrobiens. Ce mur est le plus durable et efficace du modèle.

L'efficacité des murs serait due aux composés chimiques qui s'accumulent dans les cellules, la majorité étant des composés phénoliques (Shain, 1967 et 1979 ; Pearce et Woodward, 1986 ; Rioux et Ouellette, 1989 et 1991a et b). Les parois cellulaires des murs sont aussi fréquemment imprégnées de lignine et de subérine (Rioux et Ouellette, 1991a et b ; Rioux et Baayen, 1997). Ces deux substances assureraient l'imperméabilité à plusieurs substances, dont l'air. Vu l'énorme sacrifice que l'arbre fait en intoxiquant ses propres cellules de diverses substances antimicrobiennes et toxiques, les murs aideraient à concentrer ces substances dans les endroits stratégiques compris entre les murs. Il a aussi été mentionné précédemment que l'air est le principal facteur influençant la croissance des

champignons de carie. Il est donc important pour l'arbre d'empêcher la dessiccation de gagner les tissus sains. L'étanchéité des murs nuirait aussi à la propagation des agents pathogènes en limitant la disponibilité des éléments nutritifs. À l'origine, les murs peuvent aussi contenir des grains d'amidon qui seront ultérieurement transformés en substances inhibitrices. L'imperméabilité des murs est assurée par divers composés, dont la subérine et les lignines. La subérine est un polymère lipidique de type ''cire''. Cette cire est caractérisée par une teneur élevée en acides dicarboxyliques et en alcools à longues chaînes. (Kolattukudy, 1984) La subérisation se fait habituellement en strates entre la paroi et la membrane cytoplasmique. La structure de la subérine est assurée par des composés phénoliques. La stabilité de la substance est aussi assurée par une libération de composés antifongiques lors de la détérioration microbienne (Biggs et al. 1984). Suite à une blessure, Biggs (1987) a rapporté que chez l'érable à sucre la subérine en structure lamellaire est localisée dans le parenchyme axial ainsi que dans les cellules de rayons du xylème. Des vaisseaux sont aussi emplis de subérine. À titre d'exemple supplémentaire, Rioux et Ouellette (1991a) ont montré que les barrières de protection formées par le cambium chez des ormes d'Amérique (*Ulmus* americanan L.) infectés par un champignon de la maladie hollandaise de l'orme (*Ophiostoma ulmi Buism.* Nannf) (puisqu'on reconnaît désormais que *O. novo-ulmi* cause aussi la maladie) ou simplement blessés, contiennent de la subérine. Cette même étude a permis de détecter de la subérine présente dans des thylles. La défense des arbres n'est pas gratuite et demande une grande quantité d'énergie. La transformation des sucres en composés antimicrobiens et la perte d'une zone productive de l'arbre sont des exemples de coûts impliqués.

La vitesse à laquelle les défenses apparaissent est, elle aussi, critique. La maladie hollandaise de l'orme amène ici un exemple intéressant. L'inoculation d'un champignon causant la maladie, soit *Ophiostoma ulmi,* à des branches d'orme d'Amérique et à d'autres branches d'arbres non hôtes a révélé que les arbres non hôtes forment des barrières de protection plus efficacement, mais surtout

beaucoup plus rapidement. En dedans de 15 jours suivant l'infection, la barrière est complète et efficace. Il faut attendre au moins 30 jours pour obtenir une telle barrière chez l'orme. Ce laps de temps permet au champignon de progresser librement et d'attaquer le cambium. Le cambium ainsi atteint, l'arbre n'est plus en mesure de se défendre (Rioux et Ouellette, 1989, 1991a et 1991b).

La dégradation du bois par les champignons est de loin la principale perte de rendement dans les érablières. De plus, une accumulation de bois coloré causée par des entailles superposées réduit la qualité et la valeur du bois. Le bois coloré induit par des blessures est présent chez toutes les espèces. Vu les pertes de rendement souvent importantes causées par la dégradation du bois par les champignons lors des blessures, plusieurs études ont porté sur l'utilisation de substances pouvant freiner cette dégradation. De nombreuses substances ont été testées et leur utilisation est encore aujourd'hui controversée (Shigo et Wilson, 1971). Les substances utilisées peuvent avoir diverses fonctions : favoriser la fermeture de la blessure, accélérer la guérison, prévenir l'entrée des microorganismes. Il est cependant connu que l'application d'une substance ne prévient habituellement pas la dégradation (Collins, 1934 cité dans Shigo et Shortle, 1983) et que les bénéfices ne sont pas toujours évidents. Une meilleure connaissance des mécanismes de défense de l'arbre apparaît primordiale pour permettre de trouver une substance pouvant permettre de limiter les dommages suite à une blessure ou à une agression par un agent pathogène (Shigo et Wilson, 1971).

1.8 Les régulateurs de croissance

Les éléments nutritifs tels les sucres et les composés azotés jouent un rôle limitant sur la croissance d'une plante, mais les quantités en jeu sont imposantes. Les phytohormones régissent aussi la croissance, la différenciation et le développement de la plante, mais à des dosages infinitésimaux. Le mot « hormone » a d'abord été employé en physiologie animale. Il provient du grec *horman* qui signifie « mettre en marche ». Ce mot englobe donc différents types

de molécules qui servent de signaux chimiques à l'organisme, que leur effet soit positif ou négatif sur le métabolisme. Ce sont des régulateurs qui peuvent être transportés ou utilisés pour contrôler des réponses physiologiques. Une auxine, soit l'IAA (acide indole-3-acétique), a été la première hormone identifiée chez les plantes. Actuellement, les phytohormones englobent cinq substances ou groupes de substances : les auxines, les cytokinines, l'éthylène, les gibbérellines et l'acide abscissique (ABA). Plus récemment, de nouvelles molécules ayant des propriétés sur la croissance ont été rapportées, mais étant donné qu'elles ont aussi diverses autres propriétés, on les classe dans «les autres régulateurs endogènes de croissance». On retrouve parmi celles-ci l'acide salicylique (composé phénolique), l'acide jasmonique (un cyclopentane dérivé de l'acide linolénique), les brassinostéroïdes (stéroïde), la bétaïne et la systémine (petit peptide). Comme seulement six de ces substances ont été utilisées au cours de ce projet, l'accent sera donc mis sur celles-ci. Il est aussi approprié de rappeler que les hormones des plantes agissent souvent en synergie avec d'autres hormones . De plus, les catégories sont sujettes à changements et encore aujourd'hui, les recherches amènent la découverte de nouvelles substances (Gaspar et al. 1996).

1.8.1 Acide salicylique (AS)

Les propriétés antipyrétiques et analgésiques des feuilles et de l'écorce de bouleau étaient connues bien avant que les scientifiques se penchent sur la substance à la base de ces effets. Lorsqu'une équipe de chercheurs allemands a réussi à synthétiser à grande échelle l'acide salicylique acétyle (un analogue qui, une fois en solution aqueuse, est spontanément hydrolysé en acide salicylique), plusieurs n'ont pas cru aux possibilités du produit. Quelques années plus tard, après des essais concluants, Bayer lance l'Aspirine. On est en 1898 et très rapidement l'Aspirine devient un des médicaments les plus vendus dans le monde (Raskin, 1992).

L’acide salicylique, ou l’acide ortho-hydroxybenzoïque, est un phénol. Même si certains phénols exercent des fonctions primordiales chez les plantes, ils sont considérés comme des composés secondaires. En s’accordant sur certains modèles mathématiques, des chercheurs ont pu déterminer que les propriétés physico-chimiques de l’AS en font un composé quasi idéal pour le transport sur de longues distances dans le phloème (Raskin, 1992). En un court laps de temps, le composé libre nouvellement synthétisé ou appliqué à la plante est transporté rapidement dans les tissus végétaux (Raskin, 1992; Popova et al., 1997). La majorité des familles des végétaux supérieurs produisent de l’AS et on retrouve cette substance dans toutes les parties d’une plante (Popova et al., 1997).

L’AS produit par les plantes déclencherait, entre autres, la thermogenèse. Une certaine quantité de chaleur est produite chez les plantes lors de la formation des structures reproductives de quelques espèces d’angiospermes des familles Annonaceae, Araceae, Aristolochiaceae, Cyclanthaceae, Nymphaeaceae et Palmeae (Lamarck, 1778 cité dans Raskin, 1992). La thermogenèse résulterait d’une augmentation importante du transport d’électrons dans un sentier métabolique unique aux mitochondries des plantes (Raskin, 1992) et l'accroissement de cette respiration alternative amènerait une consommation d’oxygène telle qu’il se dégage des inflorescences une quantité importante de chaleur, comme par exemple chez *Arum lilies* (Raskin, 1992). Cette chaleur aiderait à disperser les amines odorantes et les indoles attractives pour les insectes pollinisateurs (Smith et al., 1966 cité dans Raskin, 1992). La thermogenèse a pu être associée à l’AS par l’utilisation d’inhibiteurs de cette substance qui arrêtaient le phénomène. De plus, des analyses biochimiques montrent une augmentation importante de l’AS en lien avec l'accroissement de la température (Popova et al., 1997). Même si la thermogenèse est connue depuis longtemps, les mécanismes et l’élément calorigène n’ont été démontrés qu’après des dosages très sensibles de Raskin (1992).

On a par la suite découvert que l'AS était nécessaire lors de la floraison et de la formation des bourgeons chez des cultures de cellules de tabac (Eberhard et al., 1989, cité dans Popova et al., 1997). L'effet de l'AS sur l'effloraison a été ensuite démontré chez plusieurs autres espèces de plantes, mais l'AS n'est pas spécifique et il engage la fleuraison en combinaison avec d'autres facteurs, les gibbérellines par exemple.

Macri et al. (1986) ont aussi découvert que l'AS causerait l'interruption du potentiel électrochimique trans-membranaire des mitochondries et le gradient de protons ATP-dépendant de certaines vésicules associées au réticulum endoplasmique. L'AS aurait aussi une fonction allélopathique lors de son relâchement dans la rhizosphère en inhibant la croissance des plantes environnantes (Raskin, 1992).

La biosynthèse de l'éthylène peut être inhibée par l'AS. En effet, des études in vitro sur des disques de pomme et des cultures de cellules de poire ont montré que la conversion de l'acide 1-aminocylcopropane-1-carboxylique en éthylène serait fortement compromise à certains pH et concentrations d'AS (Leslie et Romani, 1986). Les concentrations en AS utilisées dans cette étude étaient comparables à celles produites dans certains tissus des plantes. L'effet de l'AS sur l'éthylène est réversible (Leslie et Romani, 1986)

L'effet le plus important de l'AS rapporté à de nombreuses occasions dans la littérature est l'induction de la résistance systémique acquise (RSA). La première mention de l'acide salicylique comme inducteur de cette résistance est celle de White en 1979 (cité dans Sticher et al., 1997). White travaillait avec le tabac et il a démontré qu'une application exogène d'acide salicylique menait à l'accumulation des protéines reliées à la résistance et réduisait ainsi considérablement l'ampleur des dégâts causés par le virus de la mosaïque. Les observations de White ont été par la suite confirmées dans plusieurs autres systèmes et de nombreux agents pathogènes différents (Sticher et al., 1997). Néanmoins, ce n'est qu'en 1983 (van Loon, 1983) que le lien entre l'AS et la résistance systémique acquise a été envisagé. De nombreuses publications viennent renforcer l'évidence du rôle

central de l'AS dans la RSA. Des dosages de l'AS endogène près et loin d'une application du virus de la mosaïque à des plants de tabac sains montraient une nette augmentation des PR (protéines reliées à la pathogenèse). Il a aussi été rapporté que l'acide salicylique augmentait dans le phloème de plants de concombre infectés avant même le début de la RSA (Métraux, 2002 ; Métraux et al., 1990). Dans des plants de tabac transformés exprimant des niveaux très bas d'AS, la RSA est bloquée (Delaney et al., 1994 ; Gaffney et al., 1993). L'utilisation de ces mutants a permis de déterminer que malgré le rôle central de l'AS dans la RSA, un autre signal serait transloqué vers les feuilles supérieures et induirait une résistance (Vernooij et al., 1994). Une augmentation soudaine du pouvoir oxydant serait aussi liée à la présence de l'AS. En effet, il a été démontré que l'AS bloquerait en s'y liant une catalase supposée décomposer H_2O_2 en eau et en oxygène. Ce surplus de peroxyde est perçu comme étant le signal mobile permettant de transmettre la résistance aux différentes parties de la plante (Chen et al., 1995; Neuenschwander et al., 1995 ; Chen et al., 1993). Cependant, un son de cloche différent fut rapporté dans une étude démontrant que l'AS et le peroxyde d'hydrogène ne semblent pas toujours nécessaires pour déclencher les processus menant à la RSA (Hunt et al., 1996).

1.8.2 Jasmonates

Plusieurs fonctions sont attribuées à l'acide jasmonique et aux jasmonates. L'efficacité des jasmonates dépend de la forme biochimique sous laquelle ils sont retrouvés. Ceci découlerait de la sensibilité de chaque plante (Sembdner et Parthier, 1993). Quatre formes de jasmonates sont détectées chez les plantes, la plus active étant de loin le (+)-7-iso-acide jasmonique qui est rapidement méthylée pour assurer sa stabilité dans les cellules (Wasternack et Parthier, 1997). L'acide jasmonique est détecté partout dans la plante, à des concentrations beaucoup plus importantes dans les parties en croissance comme à l'apex des tiges, au bout des racines, dans les fruits immatures, et dans les jeunes feuilles (Wasternack et Parthier, 1997; Creelman et Mullet, 1995; Sembdner et Parthier, 1993). Les

jasmonates seraient transportés dans la plante possiblement via le phloème (Ryan, 1992, cité dans Sembdner et Parthier, 1993). Le jasmonate de méthyle est volatile et pourrait être impliqué dans les messages entre les plantes (Farmer & Ryan 1990). L'application exogène d'acide jasmonique provoque divers effets conduisant à des changements dans la physiologie et la morphologie du plant exposé (Sembdner et Parthier, 1993). Certaines des activités de l'acide jasmonique sont semblables à celles de l'acide abscissique.

Les jasmonates induiraient la sénescence et l'abscission des feuilles en favorisant principalement la dégradation de la chlorophylle, en plus de participer à la détérioration des compartiments servant à la synthèse des enzymes rubisco (RuBPCase), à l'augmentation de la respiration cellulaire et à des activités des peroxydases et des protéases. En clair, les jasmonates provoquent un arrêt de la photosynthèse (cycle de Calvin) (Koda, 1992; Maslenkova et al., 1990; Parthier, 1990, Popova et al., 1988; Weidhase et al., 1987 ; tous cités dans Sembdner et Parthier, 1993).

Les jasmonates sont des intermédiaires clés et indispensables dans la cascade de réactions suite à une blessure. L'acide jasmonique s'accumule rapidement suite à une blessure (Bell et al., 1995) et aussi suite à un traitement de cultures de tissus avec des révélateurs des mécanismes de défense (Gundlach et al., 1992). Il a été démontré par Xu et al. (1994) que certains gènes de défense (PR) de jeunes plants de tabac, par exemple l'osmotine, sont induits par l'éthylène et le méthyl-jasmonate qui agissent ici en synergie. Creelman et al. (1992) suggèrent aussi que l'acide jasmonique et son homologue méthylé auraient un rôle dans la médiation de l'expression des gènes associés à la réponse des plantes aux blessures. De plus, des plants mutants d'*Arabidopsis* ne pouvant accumuler de jasmonates, puisqu'ils sont déficients en acide linolénique qui est un précurseur de l'acide jasmonique, sont extrêmement susceptibles à une pourriture des racines causée par un agent pathogène (*Pythium mastophorum* Drechs.) alors que les plants sauvages sont peu touchés par cette affection. La mise en contact de

mutants avec de l'acide jasmonique suffisait à les protéger de cette maladie. Il a aussi été montré que l'application exogène de l'acide jasmonique à des mutants non sensibles à ce régulateur de croissance ne les protégeait pas contre l'attaque de l'agent pathogène des racines. Ceci montre que l'action protectrice de l'application de l'acide jasmonique n'est pas due à une action anti-fongique directe mais plutôt à une médiation des mécanismes de défense de la plante (Creelman et Mullet, 1997).

Les mêmes mutants déficients en acide linolénique ont permis de découvrir que les jasmonates étaient aussi essentiels à la défense contre les insectes chez *Arabidopsis*. Ces plants qui contiennent des quantités négligeables d'acide jasmonique ont montré un taux de mortalité très important, soit près de 80%, suite à l'attaque de la larve saprophage commune *Bradysia impatiens* (McConn et al. 1997) tandis que les plants sauvages étaient peu affectés par cet insecte. Néanmoins, l'application exogène de jasmonate de méthyle protégeait efficacement les mutants et le taux de mortalité chutait à 12% (McConn et al. 1997).

Chez les gymnospermes tels les Pinaceae, l'application exogène de jasmonate méthylé sur l'écorce intacte d'un arbre les amène à réagir. En effet, cette application permet d'obtenir des changements très semblables à ceux causés par une blessure, par exemple l'accumulation de phénols. Il y a aussi expansion des cellules de parenchyme polyphénoliques du phloème et la formation de canaux résinifères traumatiques. Ces résultats semblent indiquer que la voie des octadécanoïdes est impliquée dans les mécanismes de défense des Pinaceae (Hudgins et al., 2003).

1.8.3 **Éthylène** (ETH)

L'éthylène ($H_2C=CH_2$) est synthétisé à partir de la méthionine. C'est le seul hydrocarbure ayant un effet aussi prononcé sur les plantes. L'éthylène est un gaz volatil qui se propage par diffusion. L'auxine et les cytokinines sont des

protagonistes importants pour la production de l'éthylène et ils agiraient avec une certaine synergie (Gaspar et al, 1989, cité dans Gaspar et al. 1996). Les niveaux d'éthylène et d'auxine sont habituellement auto-ajustés pour obtenir un équilibre. L'éthylène se trouve largement distribué dans les plantes et sa quantité varie grandement dans le temps et l'espace. Dans la majorité des plantes, l'éthylène a un effet répresseur sur la croissance des cellules. Cette inhibition de la croissance découlerait d'une altération de l'orientation des microtubules et des microfibrilles des cellules résultant ainsi en une réduction de l'élongation. Ceci n'a été observé qu'avec une forte concentration d'éthylène (Apelbaum et Burg, 1971; Steen et Chadwick, 1981; tous les deux cités dans Gaspar et al. 1996). Le principal rôle connu de l'éthylène est le mûrissement des fruits. L'importance de l'éthylène est mise à profit dans les manipulations après récolte des fruits et légumes. Prenons le cas des tomates qui sont cueillies vertes et qui sont conservées en atmosphère contrôlé sans éthylène jusqu'à la mise en marché. À ce moment, il suffit de mettre les tomates en contact avec de l'éthylène pour qu'elles rougissent. Cette méthode est utilisée avec plusieurs autres fruits (Raven et al., 1999). On croit que l'augmentation de la production d'éthylène dans les fruits dit climatériques serait à l'origine du changement de couleur, de la texture, de l'arôme et de la saveur (Brady, 1987; Oetiker et Yang, 1995; Yang et Hoffiman, 1984; tous cités dans Jiang et Fu, 2000).

Lors d'un stress environnemental, une plante qui synthétise habituellement peu ou pas d'éthylène en produira jusqu'à dix fois plus que les concentrations dites normales (Kozlowski et Pallardy, 1997). Les pointes de production d'éthylène ont été mesurées suite à des blessures, du gel, de la sécheresse, de la pollution atmosphérique et des attaques par des microorganismes. La concentration en éthylène est même considérée comme un bon facteur pour indiquer le début et le degré de stress d'une plante (Chen et Patterson, 1985, cité dans Kozlowski et Pallardy, 1997). Cet outil de diagnostic a tout de même des limites car même des plants non stressés vont produire de l'éthylène (Kozlowski et Pallardy, 1997). Il est aussi connu que l'éthylène aurait un rôle dans la résistance systémique acquise.

Cette substance est produite suite à une blessure ou à l'attaque par un agent pathogène et aussi lorsqu'on traite une plante avec des révélateurs connus des réactions de défense (Boller, 1990). Certaines protéines liées à la pathogénèse (PR) sont induites par l'éthylène comme la β-1,3-glucanase et une chitinase (Abeles et al. 1971 cité dans Sticher et al. 1997). L'éthylène aurait aussi un effet dans le renforcement de la structure des parois cellulaires en favorisant la lignification et l'accumulation de protéines de membrane riches en hydroxyproline (Boller, 1990). Malgré tout, on croit que l'éthylène serait indirectement lié au déclenchement de la RSA et que la production d'éthylène serait plutôt un symptôme de réaction à la blessure ou l'infection (Mauch et al., 1984 cité dans Sticher et al., 1997).

1.8.4 **Acide abscissique** (ABA)

La premier nom donné à l'acide abscissique fut «dormin» par Eagles et Wareing (1963) à la fin des années 1940. Isolé des feuilles d'un platane (*Platanus occidentalis* L.), l'agent actif empêchait l'élongation et causait le développement hâtif des bourgeons lorsqu'il était appliqué sur le bout d'une branche. Quelques années plus tard, encore au cours des années 60, Addicott et Carns (1983) mentionnent qu'on redécouvrait cette substance qui fut nommée cette fois «abscissin II» du fait qu'elle était capable d'accélérer l'abscission des feuilles et des fruits. La comparaison des deux structures en infrarouge montra toutefois que les deux molécules étaient identiques. L'acide abscissique s'accumule surtout chez les plantes suite à un stress hydrique et pourrait causer la fermeture des stomates des feuilles (Hartung et Davies, 1991). Diverses conditions défavorables aux plantes peuvent provoquer une variation du niveau d'acide abscissique dans ses diverses parties. L'acide abscissique est considéré comme la principale hormone inhibitrice des plantes. L'acide abscissique est un sesquiterpénoïde (une des sous-classes des isoprénoïdes), donc de la famille des métabolites secondaires. Les rôles biologiques attribués à l'ABA sont nombreux. D'abord, l'ABA a plusieurs utilités chez la graine. En effet, cette substance semble favoriser

l'accumulation de substances nutritives au cours de la maturation, comme de l'amidon, des peptides et des lipides. Des mutants chez le maïs qui ont perdu la capacité de produire l'ABA ou qui n'y sont plus sensibles ont des graines qui n'entrent plus en dormance et germent directement sur l'épi. Il est bon de souligner que la sortie de la dormance est due à l'action combinée d'une augmentation de la concentration en gibbérellines et d'une chute de celle de l'acide abscissique (Kozlowski et Pallardy, 1997 ; Raven et al., 1999).

La dormance est aussi détectée chez les bourgeons pendant l'hiver ou pendant toutes autres conditions défavorables à la croissance de la plante. La longueur du jour et la température, de même que la disponibilité en eau et en éléments nutritifs sont des facteurs susceptibles de provoquer la mise en dormance. Comme son nom l'indique, l'acide abscissique exerce tout de même un certain contrôle sur l'abscission des bourgeons, des feuilles, des fleurs et des fruits, mais ce rôle est plutôt secondaire. Lors d'un stress hydrique, la plante et plus souvent l'arbre prévient une dessiccation plus importante en se départant d'une quantité importante de feuilles. La majeure partie de la perte d'eau provient de la transpiration des feuilles. Dans la plante, le principal rôle de l'ABA et le plus important est le contrôle d'un stress. Habituellement, les racines sont les premières affectées par le manque d'eau et elles réagissent en produisant de l'ABA qui sera transporté par le système vasculaire vers les branches et les feuilles où il provoquera une baisse de la transpiration par la fermeture des stomates (Hartung et al., 2002).

Plusieurs espèces de plantes possèdent la capacité de s'endurcir au froid en réponse à des baisses de température. Encore ici, l'acide abscissique occupe un rôle prépondérant même si on comprend peu ce qui favorise vraiment l'acclimatation. La résistance au gel dépend essentiellement de la capacité de la plante d'éviter la formation de cristaux de glace chez ses cellules vivantes (Levitt, 1980). Chaque plante a une tolérance au gel qui lui est propre, exprimée par les gènes qui la composent. D'un autre côté, on peut induire la tolérance au gel en

acclimatant la plante au froid. Chez l'orge, dont la tolérance au gel est constitutive, la quantité d'ABA présente naturellement est plus élevée et semble donc être bien corrélée à la tolérance (León et al. 2001). L'ABA pourrait favoriser la tolérance au froid en maintenant un niveau d'eau adéquat et en induisant des gènes impliqués dans la réponse active de la plante (Bravo et al., 1998). L'application exogène d'ABA lors de l'acclimatation d'un plante n'a pas montré de résultats probants car le niveau de production d'ABA chez la plante était peut-être déjà suffisant à son acclimatation (León et al. 2001).

Une blessure change drastiquement le patron de gènes exprimés chez les plantes. Jusqu'à ce que Birkenmeier et Ryan (1998) corrigent la situation, on croyait que l'ABA était un révélateur important lors de blessures. Ces auteurs ont démontré que chez des plants de tomate, l'augmentation d'ABA après une blessure sur la feuille était somme toute assez faible bien qu'elle était plus importante dans le voisinage immédiat de la blessure. On observe cependant une augmentation considérable de la concentration de l'acide jasmonique et de la systémine et ce serait plutôt ces deux molécules qui joueraient un rôle déterminant dans l'induction des réactions de défense. Les faibles augmentations d'ABA observées lors de blessures seraient encore ici une réponse au stress hydrique ''imposé'' par l'entrée d'air dans la plante. Selon Dammann et al (1997), l'acide abscissique serait essentiel à la réponse à une blessure en activant la synthèse de l'acide jasmonique de même que d'autres gènes dont les fonctions ne sont pas pour le moment bien établies. Ce régulateur est intéressant dans le cas des traitements des blessures chez les plantes car il a été montré par Soliday et al. (1978) que la subérisation peut être activée en culture par l'application d'acide abscissique. Il est aussi connu que la subérine imprègne souvent les parois des cellules associées au compartimentage (Rioux et Ouellette, 1991b). Comme déjà mentionné plus tôt, le compartimentage serait une réaction due, entre autres, à un stress hydrique, soit une entrée d'air. De plus, il a été mis en lumière dans les paragraphes précédents que l'ABA est le régulateur clé du stress chez les plantes.

1.8.5 **Thidiazuron** (cytokinine)

Le thidiazuron (N-phényle-N'1,2,3-thidiazol-5-ylurée) est un dérivé de l'urée. Cette molécule a été développée pour faciliter la récolte mécanique du coton en défoliant le plant. Les propriétés régulatrices de la morphogenèse du thidiazuron (THIDIA) ont été par la suite grandement exploitées. Le THIDIA a une activité de type cytokinine. Les cytokinines naturelles sont habituellement des adénines connectées à une chaîne latérale en N_6 avec soit un isopentenyl de cinq carbones, soit un noyau aromatique. De petites variations dans les voies métaboliques conduisant à la synthèse des cytokinines vont affecter les activités, la stabilité et le transport de ces substances dans la plante (Auer, 2002). Ces molécules jouent un rôle central dans le cycle cellulaire. Au départ, le nom ''kinetin'' leur a été donné parce qu'elles induisaient la division cellulaire. Un peu plus tard, le terme cytokinine est apparu et il s'applique aux composés qui favorisent la prolifération des cellules. Les cytokinines agissent fréquemment de concert avec les auxines lors la division cellulaire. Le passage de la phase G2 de l'interphase à la mitose se trouverait stimulé par cette substance. La différenciation cellulaire est directement influencée par le rapport auxine/cytokinine dans l'entourage des cellules impliquées.

Toutefois, il apparaît que les cytokinines ont d'autres propriétés qui se manifestent dans divers processus physiologiques. Ces substances seraient impliquées dans les étapes marquant la fin de la période de dormance de certaines semences, dans le contrôle du développement des bourgeons et elles décaleraient aussi la chute des feuilles. Les cytokinines contrôleraient l'expression de divers gènes et l'activité de plusieurs enzymes mais ceci reste des hypothèses vu que la majorité des fonctions de ces molécules ne sont pas encore élucidées (Mok et Mok, 2001). De plus, il apparaît que même les récepteurs des cytokinines n'ont pu être identifiés facilement. Encore aujourd'hui, plusieurs molécules sont suggérées comme étant des récepteurs potentiels mais les preuves manquent toujours (Mok et Mok, 2001). Il est difficile de comprendre tous les mécanismes découlant de l'action des cytokinines car les sentiers de signalisation engagés sont nombreux et

comportent une multitude de récepteurs différents et de plus, les interactions avec d'autres régulateurs de croissance sont fréquentes. En effet, l'action des cytokinines est souvent masquée par l'interaction avec d'autres régulateurs, comme c'est souvent le cas avec l'auxine, par exemple (Mok et Mok, 2001). Les cytokinines sont largement utilisées dans la préparation des milieux de culture de cellules végétales conjointement avec l'auxine pour favoriser le développement des tissus. C'est même de cette façon que la première molécule de cette classe a été découverte. L'application exogène de cytokinines semble induire la traduction de certains gènes de stress. Paradoxalement, le niveau de cytokinines tend à décroître sous des conditions environnementales défavorables. Ceci altère le niveau dans les parties hautes de la plante amenant une forte réponse au stress (Hare et al. 1997). Le changement dans l'expression des gènes associés à la réponse au stress est probablement la résultante de toutes les transitions découlant de l'effet des régulateurs de type hormonaux au cours du développement de la plante. Il y a plusieurs rôles envisagés pour les cytokinines dans cette cascade complexe et ceci implique probablement de nombreux autres régulateurs de croissance (Hare et al., 1997).

Plusieurs événements physiologiques et biochimiques sont très probablement influencés par le THIDIA bien que peu d'entre eux aient pu être directement reliés à cette substance. Le mode d'action du THIDIA est toujours inconnu (Murthy et al., 1998). Le THIDIA présente une propriété unique très intéressante. Il peut mimer l'effet conjoint d'une cytokinine avec l'auxine sur la croissance et la différenciation d'explants bien que cet effet soit quelque peu différent de celui obtenu par l'application d'auxine ou d'une autre cytokinine. Entre autres, le THIDIA amène une augmentation de la croissance des cals jusqu'à 30 fois plus importante lorsqu'il est ajouté à une culture *in vitro* (Capelle et al., 1983). Habituellement, c'est l'auxine qui est ajoutée à ces cultures (Murthy et al., 1998). Un autre exemple : la formation de tissus embryogéniques en culture à partir de cellules somatiques peut être stimulée en modifiant le ratio auxine/ cytokinine. Le THIDIA seul peut se substituer à la nécessité d'avoir ce genre de ratio dans ce

type de culture pour de nombreuses espèces comme l'arachide, le géranium et le tabac (Murthy et al., 1998). Ce double effet est probablement dû à la structure même du THIDIA. La molécule possède deux groupes fonctionnels, soit un phényle et un thidiazol. L'activité cytokinine du THIDIA serait due à la structure cyclique de carbone de type phényle. Si celui-ci est remplacé par un autre, il y a une perte considérable de l'effet cytokinine de la molécule (Mok et al., 1982). Le THIDIA est une molécule assez stable et même entreposée en solution pendant un grand laps de temps, elle garderait la propriété d'induire des réponses physiologiques (Murthy et al., 1998). De plus, les quantités nécessaires pour provoquer un effet en culture ne sont pas aussi importantes que l'auxine. C'est le cas notamment dans les cultures de cals mentionnées plus tôt. Les cals absorbent moins de THIDIA comparativement aux autres régulateurs de croissance, ce qui porte à croire que l'activité intrinsèque du THIDIA est élevée (Capelle et al., 1983). Le THIDIA cause une grande variété d'effets physiologiques sur les plantes. Il améliorerait entre autres la germination des graines chez des plantes aussi variées que la laitue et une mauvaise herbe tropicale (*Striga asiatica*) (Murthy et al. 1998). Il peut se substituer à un gel lors de la germination de certains graines comme celles du pommier (Lin et al., 1994) et aussi accélérer leur débourrement (Wang et al., 1986). Le THIDIA favorise aussi la germination des pommes de terre (Ji et Wang, 1988), la croissance des cotylédons chez la citrouille (Burkhanova et al., 1984 cité dans Murthy et al., 1998) et accentuerait la taille des grappes et des fruits chez les raisins (Reynolds et al., 1992 cité dans Murthy et al., 1998). Il est intéressant de noter qu'un plant stressé va s'adapter en modifiant son métabolisme et en accumulant diverses substances, des régénérateurs. Ces derniers sont produits en grande quantité lorsqu'un plant stressé est traité avec du THIDIA. Ceci suggère fortement que le THIDIA pourrait être employé avantageusement pour stimuler les mécanismes de défense à différents stress (Murch et al., 1997).

1.8.6 **Bétaïne** (Bx)

Les bétaïnes sont un ensemble de petites molécules ultra solubles qui sont surtout impliquées dans l'osmoprotection. La glycine bétaïne, la β-alanine bétaïne et la hydroxyproline bétaïne sont assez semblables et possèdent les mêmes fonctions, c'est pourquoi le terme bétaïne sera utilisé invariablement pour ces composés. La synthèse de la bétaïne augmente considérablement lorsque l'organisme est exposé à des facteurs environnementaux qui modifient les conditions internes des cellules. Ces conditions défavorables peuvent être créées par des stress tels le froid, la chaleur, les sels et le gel (Krall et al., 1989 ; Jolivet et al., 1982 ; Jolivet et al., 1983 ; Zhao et al., 1992 tous cités dans Huang et al., 2000). La bétaïne n'a pas de charge nette au pH physiologique des cellules (Mc Neil et al., 1999), même si cette molécule est dipolaire (Sakamoto et Murata, 2000). La bétaïne peut s'accumuler jusqu'à de hautes concentrations dans les organites des cellules sans danger de toxicité et elle est présente dans une grande variété d'organismes allant des bactéries, aux animaux et à plusieurs familles de plantes (Weretilnyk et Hanson, 1990, Huang et al. 2000). Les osmoprotecteurs permettent un fonctionnement normal du métabolisme dans les cellules où le potentiel osmotique est désajusté. Les méthodes d'action des osmoprotecteurs ne sont pas encore toutes élucidées mais il est évident que, jusqu'à un certain point, la bétaïne agirait comme un ''capteur d'eau'' qui permettrait de stabiliser la conformation quaternaire des protéine, leur permettant ainsi d'être fonctionnelles lorsque les conditions sont préjudiciables (McNeil et al., 1999). La perturbation de la structure des protéines est causée par la mise en contact avec des solutés non compatibles aux forces thermodynamiques de contact minimales recherchées par les protéines lors du repliement tertiaire et l'assemblage quaternaire (Xing et Rajashekar, 2001). Il est aussi mentionné dans la littérature que la bétaïne pourrait agir aussi comme co-régulateur lors du repliement d'enzymes et de certaines autres protéines (Chen et Murata, 2002). Un autre des modes d'action suggérés pour les osmoprotecteurs consisterait à ordonner davantage la structure des membranes souvent mises à

rude épreuve lors des différents dommages pouvant affecter un organisme (Gorham, 1955 cité dans Sakamoto et Murata, 2000).

La bétaïne est synthétisée à partir de la choline dans le chloroplaste chez les plantes (Schroppel-Meier et Kaiser, 1988; Wyn Jones, 1984; tous deux cités dans Weretilnyk et Hanson, 1990). La bétaïne ne se retrouve pas chez toutes les plantes. Par exemple, l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), le riz (*Oriza sativa*) et le tabac (*Nicotiana tabacum*) ne produisent pas de bétaïne (Chen et Murata, 2002). Néanmoins, l'application exogène de bétaïne sur les feuilles ou les racines permet d'améliorer substantiellement la résistance des plantes à différents stress (Allard et al., 1998; Hayashi et al., 1998; Harinasut et al., 1996; Mäkelä et al., 1996; Itai et Paleg, 1982 tous cités dans Sakamoto et Murata, 1999). Plusieurs plantes d'importance en agriculture comme les pommes de terre ne produisent pas de bétaïne et il est envisagé d'accroître leur tolérance au froid et à l'action des sels par des manipulations génétiques en incluant certains gènes permettant la synthèse de la bétaïne (Sakamoto et Murata, 1999).

Il a aussi été observé récemment que la bétaïne déstabiliserait la double hélice d'ADN *in vitro*, diminuant ainsi la température de fusion des brins, ce qui fait croire que la bétaïne jouerait un rôle dans la promotion de la transcription et la réplication (Rajendrakumar et al., 1997 cité dans Sakamoto et Murata, 1999). Parallèlement, la bétaïne protégerait les mécanismes de transcription et de traduction de l'ADN (Chen et Murata, 2002). De surcroît, on suggère, suite à la caractérisation physiologique de plants transgéniques, que le rétablissement de la plante suite au stress serait facilité par la bétaïne qui favoriserait la synthèse de nouvelles protéines (Alia et al., 1999 cité dans Sakamoto et Murata, 1999). La bétaïne protègerait aussi efficacement des composantes essentielles à la photosynthèse comme la rubisco et le complexe du photosystème II (PSII) en empêchant les sous-unités de se dissocier lors de stress salin (Papageorgious et Murata, 1995, cité dans Sakamoto et Murata, 1999). L'accumulation de la bétaïne en réponse au sel, à la sécheresse ou au froid serait corrélée avec l'acclimatation des plantes à

ces facteurs, notamment chez le maïs et l'orge (Kishitani et al., 1994; Rhodes et al., 1989 ; tous les deux cité dans Sakamoto et Murata, 1999). Même si certains travaux laissent sous-entendre que la bétaïne pourrait induire des gènes de réponse au froid et déclencher l'accumulation de protéines de la pathogenèse, il n'a pas été possible d'associer ces réponses à la présence de la bétaïne (Xing et Rajashekar, 2001).

1.9 Références

- **Addicott FT. et Carns HR**. 1983. History and introduction. In ''*Abscisic Acid*'' (F.T. Addicott, ed.), Praeger, New York. pp. 1-21.

- **Akochi K E., Alli I. et Kermasha S**. 1997. Characterization of the pyrazines formed during the processing of maple syrup. *J. Agric. Food Chem*. **45** : 3368-3373.

- **Allard GB.** 1984. L'osmose inversée : description et principes de fonctionnement. Publication du Centre Acer. Article de vulgarisation no. 102-HPG-0284. 15 pages.

- **Allard GB**. 1999. L'entaillage des érables. Publication du Centre Acer. Info-fiche acéricole no.140a0599. Publications no. 140-FCH-0599. 10 pages.

- **Allard GB., Boudreault G. et Renaud J-P**. 1997. Modèle de simulation du rendement d'une entaille en fonction de différents paramètres physiques et physiologiques associés à l'entaillage. Actes du colloque ''Les stress et la productivité de l'érable à sucre de l'arbre au peuplement du Centre ACER tenu le 11 et 12 novembre 1997. pp. 111-130.

- **Ansseau C. et Bernier H**. 1995. L'érable à sucre. Caractéristiques, écologie et aménagement. Chapitre 1.1 : Position taxonomique et biogéographique de l'érable à sucre. Chapitre 1.2 : Description morphologique de l'arbre. Publication conjointe du ministère des Ressources naturelles (# RN95-3050) et du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (#95-0064). Pp. 50-51.

- **Auer CA**. 2002. Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism. *J. Plant Growth Regulation*. March, **21** : 24-31.

- **Baayen RP., Ouellette GB et Rioux D**. 1996. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* **86** : 1018-1031.

- **Babin A**. 1995. L'acériculture, une activité économique en mutation. *Géographes* **6** : 43-54.

- **Bell E., Creelman RA. et Mullet JE**. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **92** : 8675-8679.

- **Bertrand A**. 1995a. La physiologie de l'érable à sucre et le phénomène de la coulée. *Géographes* **6** : 21-26.

- **Bertrand A**. 1995b. L'érable à sucre. Caractéristiques, écologie et aménagement. Chapitre 2.2.2 : Coulée de la sève. Publication conjointe du ministère des Ressources naturelles (# RN95-3050) et du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (#95-0064). pp. 50-51.

- **Biggs AR**. 1987. Occurrence and location of suberin in wound reaction zones in xylem of 17 species. *Phytopathology.* **77** : 718-725.

- **Biggs AR., Merrill W. et Davis DD**. 1984. Discussion : response of bark tissues to injury and infection. *Can. J. For. Res*. **14** : 351-356.

- **Birkenmeier GF. et Ryan CA**. 1998. Wound signalling in tomato plants : evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiol.* **117**(2) : 687-693.

- **Boddy L**. 1992. Chapter 6 : Microenvironmental aspects of xylem defenses to wood decay fungi. Tiré du livre de RA Blanchette et AR Biggs (Éds) : Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi , Springer-Verlag. Allemagne. Éditeur de la série : T.E. Timell. pp. 96-132.

- **Boddy L. et Rayner ADM**. 1983. Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytol*. **94** : 623-642.

- **Boller T**. 1990. Ethylene and plant pathogen interactions. *Curr. Top. Plant Physiol.* **5** : 138-145.

- **Bravo LA., Zuniga GE., Alberdi M. et Corcuera LJ**. 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiol. Plant.* **103**: 17-23.

- **Capelle SC., Mok DWS., Kirchener SC. et Mok MC**. 1983. Effects of Thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N [nitrogen]6-(delta 2-isopentenyl) (8-14C [carbon isotope]) adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol*. **73** : 796-802.

- **Chen THH. et Murata N**. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant biol.* **5** : 250-257.

- **Chen X., Silva H. et Klessig DF**. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262** : 1883-1886.

- **Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sanchez-Casas P., Silva H., Ricigliano J. et Klessig DF**. 1995. Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92** : 4134-4137.

- **Coons CF**. 1976. Sugar bush management for maple syrup producers. Publication of Ontario Ministry of Natural Resources, Toronto, Ontario, Canada. 41 pages.

- **Creelman RA. et Mullet JE**. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **92** : 4114-4119.

- **Creelman RA. et Mullet JE**. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol*. **48** : 355-381.

- **Creelman RA., Tierney ML. et Mullet J E**. 1992. Jasmonic acid-methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **89** : 4938-4941.

- **Dammann C., Rojo E. et Sanchez Serrano JJ**. 1997. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways*. Plant J.* **11** : 773-782.

- **Delaney TP., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negretto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E. et Ryals JA**. 1994. Central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266** : 1247-1250.

- **Eagles CF. et Wareing PF**. 1963. Dormancy regulators in woody plants. Experimental induction of dormancy in *Betula pubescens*. *Nature* (London). **199** : 874-875.

- **Farmer E.E. et Ryan C.A**. 1990. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87** : 7713-7716.

- **Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H. et Ryals J**. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261** : 754-756.

- **Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M. et Thorpe TA**. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant.* **32** : 272-289.

- **Gundlach H., Müller MJ., Kutchan TM. et Zenk MH**. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 2389-2393.

- **Hare P D., Cress W A. et Van Staden** J. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regul*. **23** : 79-103.

- **Harlow WM., Harrar ES. et White FM**. 1978. Textbook of dendrology. Sixth Edition. McGraw-Hill Book, inc. USA. 510 pages.

- **Hartig R**. 1894. Text-book of the diseases of trees. MacMillan and Co., London.

- **Hartung W. et Davies WJ**. 1991. Drought-induced changes in physiology and ABA. Dans: W.J. Davies et H.G. Jones (éditeurs). Abscisic acid: physiology and biochemistry. BIOS Scientific Publishers, Birmingham, UK. Pp. 63-79.

- **Hartung W., Sauter A. et Hose E**. 2002. Abscisic acid in the xylem : where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* **53** : 27-32.

- **Houston DR., Allen DC. et Lachance D**. 1990. Sugarbush management : a guide to maintaining tree health. USDA *For. Serv. Gen. Tech. Rep.* NE-129, Radnor PA. 55 pages.

- **Houston DR. et Fagan JC**. 1997. Reexamination of effects of paraformaldehyde on tissues around tapholes in sugar maple trees. USDA For. Serv., Northeastern forest Exp. St. Res. Paper NE-706. 12 pages.

- **Huang J., Hirji R., Adam L., Rozwadowski KL., Hammerlindl JK., Keller WA. et Selvaraj G**. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine

production toward enhancing stress tolerance in plants: Metabolic limitations. *Plant Physiol.* **122** : 747-756.

- **Hudgins JWl., Christiansen E**. **et Franceschi VR**. 2003. Methyl jasmonate induces anatomical and chemical defenses in diverse members of the *Pinaceae*. *Tree Physiol*. **23** : 361-371.

- **Hunt MD., Neuenschwander UH., Delaney TP., Weymann KB., Friedrich LB., Lawton KA., Steiner HY. et Ryals JA**. 1996. Recent advances in systemic acquired resistance research: A review. *Gene-Amsterdam*. **179** : 89-95.

- **Ji ZL et Wang SY**. 1988. Reduction of abscisic acid content and induction of sprouting in potato, *Solanum tuberosum* L. by TDZ. *J. Plant Growth Regul.* **7** : 37-14.

- **Jiang Y. et Fu J**. 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regul.* **30** : 193-200.

- **Johnson RW., Tyree MT. et Dixon MA**. 1987. A requirement for sucrose in xylem sap flow from dormant maple trees. *Plant Physiol.* **84** : 495-500.

- **Kolattukudy PE**. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot*. **62** : 2918-2933.

- **Kozlowski TT. et Pallardy SG**. 1997. Plant hormones and other endogenous growth regulators (chap. 13). Tiré du livre : Physiology of woody plants (second edition) Academic Press, Inc. California. pp. 309-319.

- **León J., Rojo E. et Sánchez-Serrano JJ**. 2001. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **52** : 1-9.

- **Leslie CA. et Romani RJ**. 1986. Salicylic acid : a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* **5** : 144-146.

- **Levitt J.** 1980. Responses of plants to environmental stresses Vol.1. Chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd Ed.. Academic Press Inc. New York. NY. pp. 67-344.

- **Lin CH., Lee LY et Tseng MJ**. 1994. The effect of stratification and TDZ treatment on germination and protein synthesis of *Pyrus serotina* Rehd ev. *Niauli. Ann. Bot*. **73** : 515-523.

- **Macri F., Vianello A. et Pennazio S**. 1986. Salicylate-collapsed membrane potential in pea stem mitochondria. *Physiol. Plant*. **67** : 136-140.

- **Marie-Victorin, Frère**. 1995. La flore laurentienne. 3e édition. Les Presses de l'Université de Montréal. 1093 pages.

- **Marvin JW**. 1968. Physiology of sap production. *Proceedings of the sugar maple conference*. August 20-22. pp. 12-15.

- **Marvin JW. et Green MT**. 1951. Temperature-induced sap flow in excised stems of *Acer. Plant Physiol*. **26** : 565-580.

- **McConn M., Creelman RA., Bell E., Mullet JE. et Browse J**. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94** : 5473-5477.

- **McNeil SD., Nuccio ML. et Hanson AD**. 1999. Betaines and related osmoprotectrants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120** : 945-949.

- **Métraux J-P**. 2002. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci*. **7** : 332-334.

- **Métraux JP., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W. et Inverardi B**. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250** : 1004-1006.

- **Mok DWS. et Mok MC**. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. **52** : 89-118.

- **Mok MC., Mok DWS., Armstrong DJ., Shudo K., Sogai Y. et Okamoto T**. 1982. Cytokinin activity of N Phenyl-N'-1,2,3-Thidiazol-5-yl-urea (THIDIAZURON). *Phytochemistry*. **21** : 1509-1512.

- **Murch SJ., Krishnaraj S. et Saxena PK**. 1997. TDZ-induced morphogenesis of regal geranium (*Pelargonium domesticum*) : a potential stress response. *Physiol. Plant*. **101** : 183-191.

- **Murthy BNS., Murch SJ. et Saxena Praveen K**. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. **34** : 267-275.

- **Neuenschwander U., Vernooij B., Friedrich L., Uknes S., Kessmann H. et Ryals J**. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J*. **8** : 227-233.

- **Pearce RB**. 1996. Tansley Review No.87. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol*. **132** : 203-233.

- **Pearce RB. et Woodward S**. 1986. Compartmentalization and reaction zone barriers at the margin of decayed sapwood in *Acer saccharinum* L. *Physiol. and Mol. Plant Pathol*. **29** : 197-216.

- **Popova, L., Pancheva T. et Uzunova A**. 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulg. J. Plant Physiol*. **23** : 85-93.

- **Raskin I**. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. **43** : 439-463.

- **Raven PH., Evert RF. et Eichhorn SE**. 1999. Chapter 28 : Regulating growth and development : the plant hormones. Dans le livre : Biology of Plants, sixth edition. W.H. Freeman and Company, New York. pp. 672-701.

- **Renaud JP**. 1998a. Étude de l'effet de l'oxydation des tissus du xylème sur le rendement en haut d'érable. Comparaison entre une exposition à N_2 et à l'air. Publication du Centre Acer. Projet de recherche : Rapport Final. Publication no. 211-FIN-1098. 10 pages.

- **Renaud JP**. 1998b. Étude de l'effet du diamètre et de la profondeur de l'entaille sur le volume et la longueur de la zone de bois coloré. Essais sur des gaulis. Publication du Centre Acer. Projet de recherche : Rapport Final. Publication no. 282-FIN-0998. 10 pages.

- **Rioux D. et Baayen RP**. 1997. A suberized perimedullary reaction zone in *Populus balsamifera* novel for comparmentalization in trees. *Trees* **11** : 389-403.

- **Rioux D., Nicole M., Simard M. et Ouellette GB**. 1998. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis Formation in Trees. *Phytopathology* **88** : 494-505.

- **Rioux, D. et Ouellette G B**. 1989. Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various nonhost trees and shrubs. *Can. J. Bot*. **67** : 2335-2351.

- **Rioux D. et Ouellette GB**. 1991a. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry. *Can. J. Bot*. **69** : 2055-2073.

- **Rioux, D. et Ouellette G B**. 1991b. Barrier zone formation in host and nonhost trees Inoculated with *Ophiostoma ulmi* II. Ultrastructure. *Can. J. Bot.* **69** : 2074-2083.

- **Sakamoto A. et Murata N**. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants : current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **51**(342): 81-88.

- **Sembdner G. et Parthier B**. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol*. **44** : 569-589.

- **Shain L**. 1967. Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathology* **57** : 1034-1045.

- **Shain L**. 1979. Dynamic responses of differentiated sapwood to injury and infection. *Phytopathology* **69** : 1143-1147.

- **Shigo AL**. 1984. Compartmentalization : a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Ann. Rev. Phytopathol.* **22** : 189-214.

- **Shigo AL**. 1985. Les défenses des arbres. *Pour la Science* (juin). pp. 69-78.

- **Shigo AL. et Marx HG**. 1977. Compartmentalization of decay in trees. Agric. Inf. Bull. US Dep. Agric. Dept. of Agriculture, Forest Service. No. 405, 73 pages.

- **Shigo AL. et Shortle WC**. 1983. Wound dressings : results of studies over 13 years. *J. Arboriculture* **9** : 317-329.

- **Shigo AL et Wilson CL**. 1971. Are tree wound dressings beneficial? *Arborist's News* **36** : 85-88.

- **Skepner AP et Krane DE**. 1998. RAPD reveals genetic similarity of *Acer saccharum* and *Acer nigrum*. *Heredity*. **80** : 422-428.

- **Soliday CL., Dean BB. et Kollattukudy PE.** 1978. Suberization : Inhibition by washing and stimulation by abscisic acid in potato disks and tissue culture. *Plant Physiol.* **61** : 170-174.

- **Sticher L., Mauch-Mani B. et Métraux JP**. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. **35** : 235-270.

- **Tippett JT. et Shigo AL**. 1981. Barriers to decay in conifer roots. *Eur. J. For. Pathol.* **11** : 51-59.

- **Tyree MT**. 1983. Maple sap uptake, exudation, and pressure changes correlated with freezing exotherms and thawing endotherms. *Plant Physiol.* **73** : 277-285.

- **Tyree MT**. 1984. Maple sap exudation : how it happens. *The Maple Syrup Journal*. **4** : 10-11.

- **van Loon LC**. 1983. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth. J. Plant Pathol*. **89** : 265-273.

- **Vernooij B., Friedrich L., Morse A., Reist R., Kolditz Jawhar R., Ward E., Uknes S., Kessmann H. et Ryals J**. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*. 1994; **6** : 959-965.

- **Vézina P-E. et Roberge M-R**. 1981. Comment aménager nos forêts. Les Presses de l'Université Laval, Québec. 266 pages.

- **Walters RS. et Shigo AL**. 1978a. Discolouration and decay associated with paraformaldehyde-treated tapholes in sugar maple. *Can. J. For. Res*. **8**: 54-60.

- **Walters RS. et Shigo AL**. 1978b. Tapholes in sugar maples: what happens in the tree. Forest Service technical report. Rep. NE-47. 11 pages.

- **Wang SY., Steffens GL. et Faust M**. 1986. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator, TDZ. *Phytochemistry*. **25** : 311-317.

- **Wasternack C. et Parthier B**. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci*. **2** : 302-307.

- **Weretilnyk EA. et Hanson AD**. 1990. Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87** : 2745-2749.

- **Willits CO. et Hills CH.** 1976. Maple syrup producers manual. Agriculture Handbook No. 134. Agricultural research service. United States department of agriculture. Washington. 134 pages.

- **Xing W. et Rajashekar CB**. 2001. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* **46** : 21-28.

- **Xu Y., Chang PFL., Liu D., Narasimhan ML., Raghothama KG., Hasegawa PM. et Bressan RA**. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*. **6** : 1077-1085.

- **Zabel RA. et Morrell JJ**. 1992. Wood microbiology : decay and its prevention. Academic Press, inc. San Diego. 476 pages.

2 Effet de phytohormones sur les réactions de défense de l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh) suite à l'entaillage.

2.1 Résumé

Le compartimentage est un mécanisme de défense permettant entre autres de limiter le développement du bois coloré improductif qui apparaît suite à l'entaillage de l'érable à sucre (*Acer saccharum*). L'étude visait à stimuler le compartimentage à l'aide de phytohormones afin de limiter le développement du bois coloré suite à l'entaillage. Six substances régulatrices, l'acide jasmonique, l'acide abscissique, l'éthylène, une cytokinine, l'acide salicylique et la bétaïne, incorporées à trois concentrations différentes (10, 100 et 1000 μM) à de la lanoline, ont été injectées aux blessures d'entaillage. Chacun des 192 arbres traités a reçu, en plus des témoins (lanoline seule et aucun traitement), un traitement dans deux types d'entaille, soit une fraîchement percée et une autre vieille de quelques semaines équivalant à la période de coulée. Quelque 3000 échantillons prélevés dans les murs 3 et 4, dans le bois coloré et le bois sain ont été préparés pour différents examens microscopiques. L'analyse des résultats n'a démontré aucune différence significative entre les divers traitements et les témoins. Néanmoins, les examens microscopiques ont révélé de nouvelles caractéristiques du compartimentage chez les arbres. Par exemple, une zone d'autofluorescence jaune révélée sous illumination bleue se trouve régulièrement accolée à la subérine présente dans les murs 3 et 4. Cette fluorescence rend la continuité des murs 3 plus complète que ce que l'on connaît théoriquement. La nature chimique de cette fluorescence n'a pu être précisée par les tests utilisés mais il est fort probable que des phénols soient des constituants de cette zone. La présence de subérine révélée sous excitation violette a aussi été confirmée en microscopie électronique à transmission (MET) par l'observation de lamelles typiques dans les parois.

2.2 Introduction

L'entaille faite à l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) pour permettre à la sève sucrée de s'écouler du xylème est une blessure importante pour l'arbre. La réponse de l'arbre est avant tout non spécifique répondant ainsi à une embolie créée par l'ouverture du xylème (Boddy, 1992). En effet, l'arbre réagit à l'entrée d'air car la dessiccation nuit au bon fonctionnement des cellules et crée un environnement très favorable à la multiplication des microorganismes. Ces derniers, souvent des champignons, peuvent alors causer des maladies, de la carie et du bois coloré. Les colonnes de bois coloré peuvent atteindre, longitudinalement, jusqu'à 50 cm de part et d'autre de l'entaille (Allard, 1999). Autour de ces zones, on retrouve diverses barrières qui empêchent les microorganismes de se propager vers le bois sain. Ces murs ont été largement décrits par Shigo qui a proposé un modèle de compartimentage, nommé CODIT (**C**ompartmentalization **o**f **D**ecay **I**n **T**ree) (figure 1) (Shigo et Marx, 1977). Ce modèle permet d'expliquer comment le développement des champignons de carie est limité par l'arbre. Ces colonnes de bois coloré sont des zones improductives pour les exploitants acéricoles et il est donc fort souhaitable de minimiser leur développement. Il est par ailleurs nécessaire d'approfondir nos connaissances du compartimentage si l'on veut développer un jour des applications intéressantes en foresterie. De cette façon, on pourrait tenter d'améliorer la production acéricole, et même l'état de santé général des érablières. L'application de substances sur une blessure vise à bloquer l'entrée d'air, à accélérer la fermeture de la blessure et aussi à favoriser un compartimentage plus rapide et efficace. Ces trois facteurs permettraient de réduire le volume de bois coloré. La plupart des composés testés à ce jour étaient à base de goudron, d'asphalte ou de colle. La plupart des recherches effectuées ont montré qu'aucune substance ne peut prévenir complètement la dégradation du bois et que la plupart ont des effets limités sur la fermeture des blessures et peuvent même être préjudiciable pour l'arbre (Shigo et Shortle, 1983; Shigo 1981; Shigo et Wilson, 1971). Les recherches effectuées en ce sens par rapport à l'entaillage des érables à sucre sont plutôt rares. Un antiseptique à large spectre, le paraformaldéhyde (PFD), a été couramment utilisé jusqu'au début des années 1990 pour augmenter la production à court terme, en détruisant la flore peuplant l'entaille que l'on croyait responsable de l'arrêt précoce de la coulée.

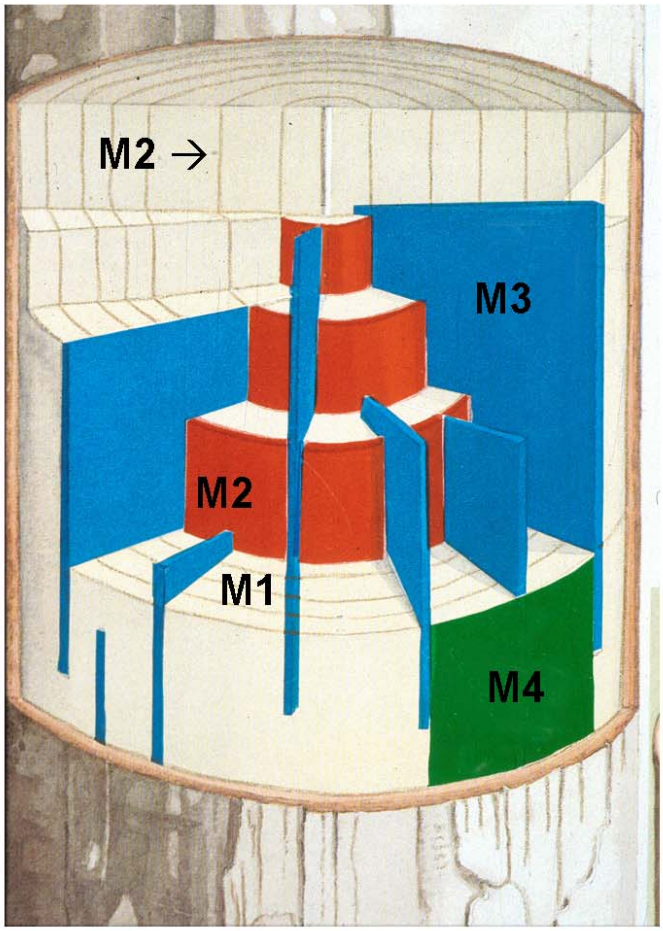


Figure 1 : Schématisation du modèle CODIT, adapté de Shigo et Marx (1977). Le mur 1 (M1) est formé par les occlusions dans les vaisseaux. Le mur 2 (M2) est constitué des fins de cerne annuel. Le mur 3 (M3) est discontinu par définition car il est formé par les cellules de rayons. Le mur 4 (M4) est nouvellement formé après la blessure par le cambium avec des cellules spécialisées. C'est le mur le plus fort du modèle.

L'utilisation du PFD a été bannie au Canada et aux États-Unis car il a été démontré que la substance pouvait être récurrente dans le sirop et aussi parce qu'elle nuisait au compartimentage (Walters et Shigo, 1978a; Houston et Fagan, 1997).

Les substances utilisées au cours de la présente étude sont de type régulateur de croissance. Étant donné les nombreux effets de nouveaux régulateurs de croissance décrits dans la littérature ces dernières années (Kozlowski et Pallardy 1997), on est en droit d'espérer qu'ils aient aussi des rôles à jouer lors de la mise en place des processus de compartimentage et des autres mécanismes de défense de l'érable à sucre. Les régulateurs de croissance n'ont jamais été utilisés auparavant pour le traitement exogène des blessures d'entaillage et cette utilisation pourrait peut-être déboucher éventuellement sur des applications avantageuses pour l'industrie acéricole. Par ailleurs, une étude de Houston en 1971 montre que seules les substances freinant l'entrée d'air permettaient de réduire la zone de bois coloré. La mise en solution des régulateurs de croissance dans une substance inerte épaisse et visqueuse telle que la lanoline pourrait permettre de bloquer l'entrée d'air de façon efficace.

Les résultats de cette étude ont été partiellement présentés lors de la réunion annuelle de la SPPQ (Société de protection des plantes du Québec) de 2002 (Grondin et al., 2002).

2.3 Matériel et Méthodes

2.3.1 L'échantillonnage : arbres, entailles et traitements

Tous les érables de cette étude ont été prélevés dans l'érablière expérimentale non exploitée de St-Louis-de-Gonzague dans la région de la Beauce (Québec) : latitude (DMS) 46º7'0N et longitude (DMS) 70º40'0W. Les érables de cette expérimentation étaient entaillés pour la première fois. Cent quatre-vingt seize érables à sucre ayant un diamètre variant entre 15 à 25 cm au DHP (diamètre à hauteur de poitrine) ont tous eu cinq entailles la première année, soit au printemps 1999. L'expérience s'est déroulée sur deux ans et cinq entailles ont aussi été percées dans chaque arbre l'année suivante. Les entailles effectuées dans cette expérience sont des entailles à diamètre réduit (voir

revue de littérature), soit 7,4 mm (19/64''). Les échantillons ont été prélevés dans les murs 3 et 4 entourant les entailles de même que dans le bois sain et le bois coloré comme le montre la figure 2. Les entailles 1, 2 et 3 ont été faites au début de la période de coulée. Suite à la coulée, l'entaille 1 nommée «Témoin» n'a subi aucun traitement. L'entaille 2 dite «Lanoline», n'a reçu que de la lanoline, tandis que l'entaille 3 a reçu un traitement avec un régulateur de croissance incorporé à de la lanoline. Une seule phytohormone à une concentration donnée a été appliquée à l'arbre. La lanoline a été utilisée car c'est une substance passablement inerte avec une consistance et une viscosité permettant de bien boucher l'entaille et d'empêcher l'entrée d'air. L'entaille 4 servait de témoin positif car elle a été traitée avec du PFD. Le PFD est reconnu pour favoriser le développement de grands volumes de bois coloré (Walters and Shigo, 1978a) tout en augmentant la coulée. Dans cette entaille, le traitement a été administré sous forme d'une capsule de 250 mg insérée dans l'entaille. L'entaille numéro 5, quant à elle, était fraîchement percée à la fin de la période de coulée et traitée sur le champ en même temps que les autres entailles. Le but de cette entaille était de visualiser l'effet de la lanoline et des phytohormones sur une entaille fraîche. Les régulateurs de croissance utilisées étaient l'acide jasmonique, l'acide abscissique, l'éthylène, une cytokinine (la thidiazuron), l'acide salicylique et la bétaïne, incorporées à trois concentrations différentes (10, 100 et 1000 μM) à de la lanoline. À l'automne 1999, la moitié des arbres ainsi traités, soit 96 arbres, ont été disséqués pour mesurer les volumes de bois coloré. Chacune des découpes, comme celle montrée à la figure 3, a été sablée, vernie et numérisée, pour calculer le volume de bois coloré (figure 4). L'année suivante au printemps, des entailles semblables ont été percées sur les érables restants et ils ont été récoltés à l'automne 2000. Les échantillons comprenaient donc des tissus vieux de 6 mois récoltés en 1999 et en 2000 et des échantillons de 18 mois, soit ceux percés au printemps 1999 mais récoltés seulement à l'automne 2000. Les volumes de bois coloré ont été mesurés pour chacune des ces entailles. Les échantillons destinés à l'enrobage dans une résine étaient fixés sur place alors que les échantillons requis pour les tests histochimiques furent d'abord conservés dans de la glace sèche avant de les garder au froid à –80 °C.

2.3.2 Fixations et enrobage

Une fois les échantillons prélevés, ceux destinés à l'enrobage dans le Quétol 651 ont été doublement fixés. La fixation a débuté dans le glutaraldéhyde 4% dans du cacodylate 0,1 M (pH 6,8) pendant 2,5 h sous vide. Par la suite, les échantillons ont été rincés trois fois pendant 10 min dans le même tampon. Le tétroxyde d'osmium 1% a été utilisé par la suite en post-fixation pendant 1 h sous vide. Cette fixation a aussi été suivie par des rinçages dans le tampon (3 x 10 min) et avec de l'eau par la suite. Les échantillons ont ensuite été progressivement déshydratés en passant du Quétol 50% dans l'eau (24 h), au Quétol 75% (7 jours), pour passer au Quétol pur (24 h) qui a été ensuite changé et laissé pendant 6 jours pour s'assurer d'une très bonne infiltration. On a ensuite remplacé le milieu par la formulation d'enrobage sans le catalyseur (DMP-30). Après 5 h dans ce milieu, on l'a remplacé par une solution fraîche pour toute une nuit. Les échantillons ont ensuite été enrobés dans la formulation complète (Quetol 651, 7,5 g; NSA, 10 g; NMA, 6 g; DMP-30, 0,3 g). Les échantillons enrobés ont été mis au four à 52°C pendant trois jours.

2.3.3 Les coupes

Pour la microscopie photonique, des coupes entre 1 et 3 μm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un microtome Ultracut E (Reichert-Jung, Vienna, Austria). Ces coupes étaient mises sur lames traitées à la poly-L-lysine 10% (Sigma) pour favoriser l'adhérence avant de les colorer avec le bleu de toluidine O à 2% suivi par de la safranine O à 1% (Rioux et Ouellette, 1989).

2.3.4 Microscopie

Les coupes ont été observées avec un microscope Orthoplan de Leitz Wetzlar à des grossissements variant de 4 à 100X. La fluorescence et l'autofluorescence étaient révélées avec ce même microscope aux longueurs d'onde BP 340-380 pour l'illumination ultra-violette (par le filtre excitant composé d'un miroir séparateur RKP 400 et du filtre d'arrêt LP425) et BP 450-490 pour l'illumination bleue (par le filtre excitant composé d'un miroir séparateur RKP 510 et du filtre d'arrêt LP515). L'observation de la biréfringence avec la lumière polarisée a aussi permis de mettre en évidence des

substances ayant des structures cristallines. Pour ce faire, des unités polarisantes sont ajoutées au microscope Leitz pour observer les échantillons enrobés dans l'Épon. Les échantillons frais et les blessures ont aussi été observés avec un binoculaire de marque Leitz dont le grossissement varie de 6,3 à 32X. Les photos ont été prises avec la caméra numérique Spot RT Slider (Diagnostic Instruments, Inc.) et le logiciel l'accompagnant, soit le SPOT RT v3.1 pour Windows. Les photos ont été retouchées à l'aide du logiciel Adobe PhotoShop 6.0.

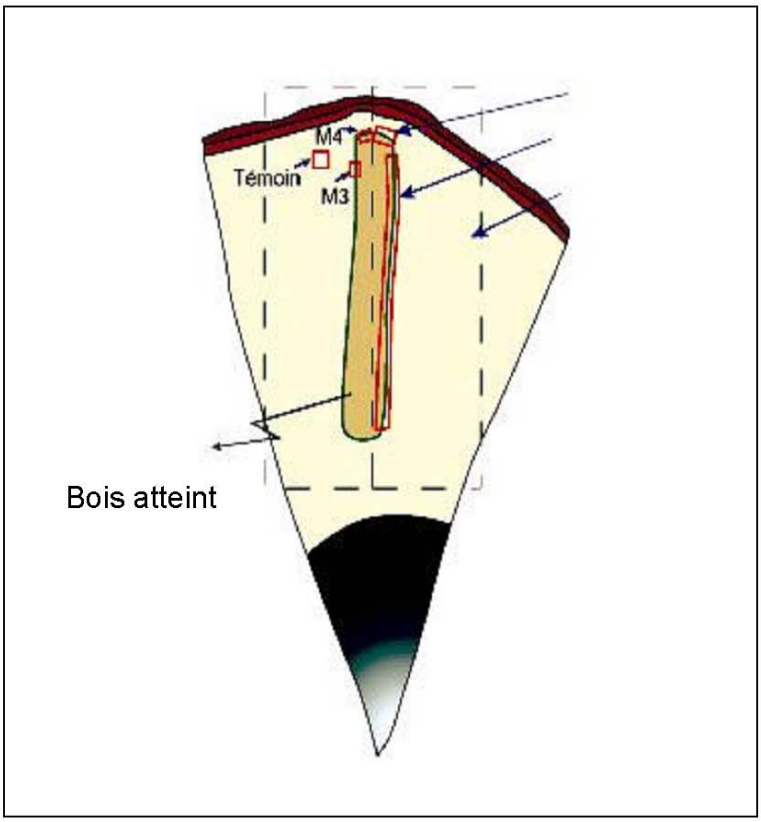


Figure 2 : Prise des échantillons à chacune des entailles. Les échantillons, bois sain, bois atteint, M3 et M4 étaient pris chaque fois que c'était possible. Sinon, on se limitait au M3 et M4.

Des coupes ultrafines (jaune paille) contrastées avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds 1963, cité dans Rioux et Ouellette, 1991) ont été observées avec un Philips 420 TEM (80kV).

Les polysaccharides pectiques ont été détectés par l'utilisation d'anticorps monoclonaux de rat contre l'acide polygalacturonique. Ces anticorps, JIM5 et JIM7 (fournis par le Dr K. Roberts de l'Institut Jonh Innes, Royaume-Uni), reconnaissent les épitopes des pectines non estérifiées et estérifiées respectivement. La méthode complète utilisée est décrite dans Rioux et al., 1998.

2.3.5 Histochimie

Les échantillons frais non fixés ont été refroidis rapidement et gardés à -80°C. Par la suite, ils ont été enrobés dans le Tissue-Tek O.C.T. Compound (Miles Scientific, Slough, UK) et des coupes d'environ 30 μm ont été obtenues avec un Histostat cryomicrotome (Reichert, Vienna, Austria) à -20°C. Pour détecter la lignine, les coupes ont été traitées avec le phloroglucinol-HCl et examinées sous lumière normale (Jensen, 1962). La présence de subérine est révélée à l'aide de ces mêmes coupes observées sous épifluorescence violette puisque le phloroglucinol masque l'autofluorescence de la lignine et laisse celle de la subérine s'exprimer (Biggs, 1984). Les coupes, colorées ou non, ont aussi été examinées sous illumination bleue.

Plusieurs colorations ont été essayées au cours des manipulations des échantillons frais comme la réaction acide nitrique de Hoepfner-Vorsatz décrite dans Reeve (1951) qui permet de détecter certains phénols, la coloration à la vanilline-HCl (Sakar et Horwarth, 1976) qui met en évidence les tannins condensés et la réaction au $FeCl_3$ (Mace, 1963), un colorant pour les phénols en général. La coloration Maüle (Gerlach, 1969) a aussi été utilisée pour mettre en évidence des lignines de type syringyl.

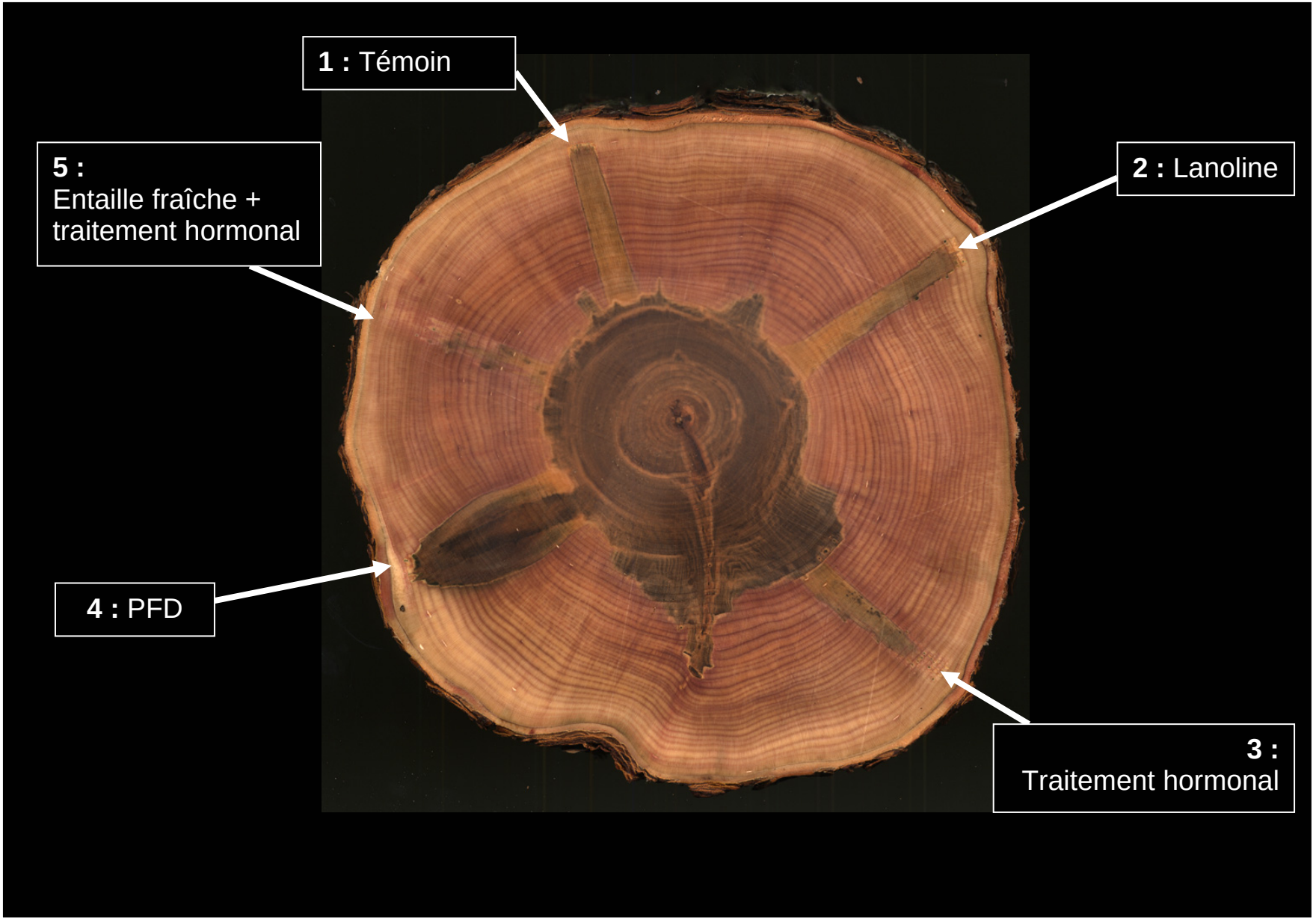
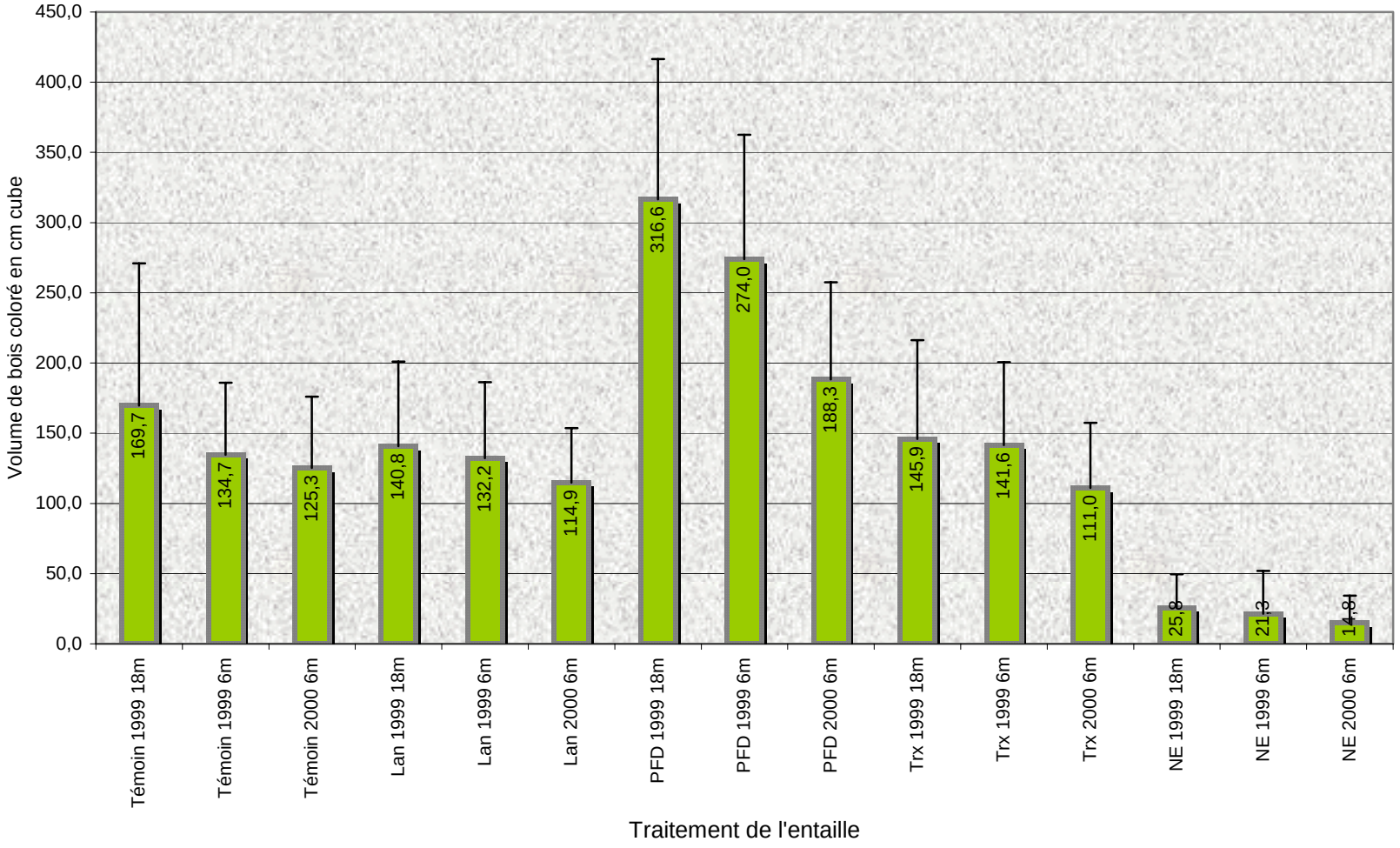


Figure 3 : Découpe de tige pour la mesure des volumes de bois coloré récoltée à l'automne 1999 qui montre bien l'emplacement des entailles autour de l'arbre et les traitements attribuées à chacune d'elles.

Figure 4 : Moyenne des volumes de bois coloré en fonction du traitement de l'entaille



Légende des abréviations de la figure 4. Lan : lanoline. PFD : paraformaldéhyde. Trx : ensemble de tous les traitements phytohormonaux appliqués à de vieilles entailles. NE : tous les traitements phytohormonaux appliqués à des entailles fraîches.

2.3.6 Échantillonnage pour la mesure des volumes de bois coloré

Les érables récoltés ont aussi été utilisés pour mesurer les volumes de bois coloré. Les arbres ont été sectionnés en billes de 4 pieds (120 cm) de longueur laissant l'entaille au centre de la bille. À l'aide d'une scie mobile, des tranches transversales de 2 cm d'épaisseur ont été coupées au dessus et en dessous de l'entaille et leurs surfaces ont été sablées pour être ensuite numérisées. Les mesures de surface puis de volume de bois coloré ont pu être réalisées à partir de l'analyseur (Regent equipment) et de Wincell. Ces mesures ont été réalisées au Centre Acer ainsi que les statistiques reliées à l'analyse des données brutes obtenues. L'analyse statistique s'est faite principalement par des analyses de variance de type ANOVA avec le test apparié de Tuckey-HSD.

2.4 Résultats et discussion

2.4.1 Volume de bois coloré

L'étude des volumes de bois coloré est un bon moyen de déterminer comment un arbre réagit à une blessure. Plus le volume créé sera important, moins l'arbre aura bien compartimenté les zones affectées. L'étude statistique réalisée pour connaître l'action de chaque traitement sur l'arbre suite au calcul de volume de bois coloré a été effectuée par Stéphane Guay, biologiste spécialisé en écophysiologie et écologie, au Centre Acer.

Le paraformaldéhyde a engendré de très grands volumes de bois coloré et ils sont beaucoup plus important que ceux créés par les autres traitements et les témoins (figure 4). Ces résultats concordent avec ceux de la littérature (Houston et Fagan, 1997; Shigo et Laing, 1970 cité dans Walters et Shigo 1978a et b ; Walters et Shigo, 1978a, 1978b). En outre, le volume de bois coloré continue d'évoluer dans le temps, soit entre 6 et 18 mois. Le test dépendant de Wilcoxon est hautement significatif à plus de 0,001. Il est important de noter que c'est dans les 6 premiers mois que le plus grand volume de bois coloré est produit.

On constate que les deux séries de témoin de 6 mois sont semblables aux traitements lanoline de 6 mois. Pourtant, un test statistique non paramétrique, soit celui de Mann-Whitney à un seuil de 1%, montre qu'après 6 mois, le volume de bois coloré des blessures traitées avec la lanoline n'évolue plus, contrairement aux témoins. Cette différence se chiffre à une diminution de près de 17% avec l'utilisation de la lanoline après 18 mois par rapport au témoin. La lanoline semble avoir freiné le développement de la coloration après 6 mois, ce qui est notable puisque ce développement se poursuit habituellement sur au moins deux saisons de croissance. Si l'on considère qu'une blessure d'entaillage prend en moyenne trois ans à se refermer complètement, on peut s'attendre aussi à ce que le bois coloré puisse se développer pendant au moins ce laps de temps quoique le compartimentage autour des colonnes et la fermeture des blessures soient deux mécanismes indépendants (Shigo, 1984). En fait, selon Walters et Shigo (1978a), les colonnes de bois coloré associées à l'entaillage augmentent en hauteur pendant 44 mois (soit quatre saisons de croissance) avant de se stabiliser.

Puisque le traitement lanoline est différent du témoin, il devient en conséquence notre point de comparaison pour tous les autres traitements. Les régulateurs de croissance ne diminuent pas le volume de bois coloré. Une analyse multivariée montre qu'aucune phytohormone ne se comporte différemment des autres. En combinant les différents traitements, on extrait l'effet ''lanoline''. De ce fait, cette association des traitements permet d'augmenter le nombre d'échantillons. En faisant un test de Mann-Whitney à un seuil de 1%, on peut valider les résultats concernant l'effet de la lanoline sur une blessure d'entaillage. Donc, même imprégnée de régulateurs de croissance, la lanoline permet de réduire considérablement la progression du bois coloré entre 6 et 18 mois.

Pour ce qui est de l'entaille fraîche faite en fin de saison (soit environ deux mois après les premières entailles), n'ayant pas coulé et ayant été traitée immédiatement, il n'y a pas de différences entre les traitements hormonaux. Cependant, la moyenne des volumes de ce traitement pour chaque temps de récolte (figure 4), montre qu'il y a une différence évidente et que le volume de bois coloré est nettement inférieur lorsque les entailles sont traitées immédiatement après avoir percé l'arbre. La comparaison avec l'entaille traitée de la même façon sur le même arbre encore une fois avec le test de

Wilcoxon (analyse pairée), montre une différence très hautement significative à plus de 0,001. Donc, le fait de traiter une blessure fraîche avec de la lanoline et une substance phytohormonale est très intéressant. Dans ce cas-ci, vu qu'aucune entaille fraîche n'a été traitée avec de la lanoline seulement, on ne peut savoir si la diminution importante de la colonne est due à la substance phytohormonale ou à la lanoline seule. Il est cependant plus que probable que l'effet observé vient de la lanoline car aucune différence significative n'a été notée entre les divers traitements. Cependant, on ne sait pas si les volumes de ces entailles dites « nouvelles » continue d'évoluer après 18 mois et à quelle vitesse cette évolution se fait. Cependant, on a noté avec le traitement paraformaldéhyde que la plus grande partie du bois coloré se forme au cours des 6 premiers mois suivant la blessure. Il est conséquent de se demander si toutes les blessures réagissent de la même façon et selon nos observations, c'est fort probable.

Les arbres ont tous été entaillés à la même date lors des deux années de l'expérience. Cependant, la date de la reprise de la croissance est différente d'une année à l'autre. Ceci permet peut-être d'expliquer la différence quant aux volumes de bois coloré entre les deux échantillons pour les années 1999 et 2000. Cependant, il n'y a pas de différence significative dans les comparaisons de volumes de bois coloré entre les deux années pour le témoin et la lanoline. Même chose pour la combinaison des traitements phytohormonaux et les entailles fraîches. Ce serait la date de reprise de croissance, variable elle, qui aurait modulé les volumes de bois coloré.

Les volumes de bois coloré dans cette étude sont parmi les premiers rapportés suite à l'entaillage à diamètre réduit. Quoique inappropriée, si l'on compare les volumes générés par nos témoins après deux saisons de croissance à ceux de Houston et Fagan (1997) après la même période de temps avec des entailles conventionnelles de 11 mm de diamètre, on note que les petites entailles ont induit environ 50% moins de bois coloré (169,7 cm^3 versus 338,2 cm^3). La comparaison des chiffres n'est pas valable statistiquement, mais elle demeure tout de même une bonne indication des diminutions possiblement attendues.

2.4.2 Observations en microscopie photonique

Le nombre d'échantillons recueillis est imposant. Les diverses observations microscopiques se sont appuyées sur quelque 3600 spécimens. Les observations ont été faites principalement sur deux murs, soit le M4 et le M3. De plus, des comparaisons ont été faites avec du bois sain prélevé dans une zone non affectée près de la blessure, et du bois atteint par la coloration. Comme c'était le cas pour les volumes de bois coloré, le nombre restreint d'échantillons pour chacun des traitements ne permet pas de déclarer qu'un traitement phytohormonal est meilleur qu'un autre en ce qui a trait à la formation des murs de compartimentage. Il semble pourtant ressortir que les échantillons traités avec le paraformaldéhyde ont des murs 4 plus souvent discontinus que les entailles non traitées ou les entailles ayant reçu de la lanoline. Cependant, aucun calcul statistique ne peut confirmer ce résultat pour le moment. Il est cependant à noter qu'une donnée binaire comme c'est le cas ici, soit présence ou absence de M4, demande un nombre d'échantillons important. Il est donc malaisé dans le cas de nos expérimentations avec un n petit (moins de 10) de faire ressortir des données significatives. Néanmoins, les observations de ces murs amènent des résultats intéressants quant aux réactions de l'érable à sucre à une blessure d'entaillage étant donné que ces réactions ont été peu étudiées à ce jour.

2.4.2.1 **Bois sain** (BS) **et bois atteint** (BA)

Après l'examen de plusieurs coupes, il était pratiquement impossible de différencier le bois sain du bois atteint. Dans les deux cas, les rayons étaient unisériés et comprenaient peu de phénols. Les vaisseaux étaient rarement bouchés par des occlusions. Le bois sain (figure 5) ne présentait aucune particularité anatomique inhabituelle. Ces échantillons permettaient aussi de mieux connaître l'anatomie de l'érable à sucre. L'érable à sucre est un arbre à pores diffus. Les vaisseaux sont presque de la même taille tout au long du cerne de croissance annuel et ils sont répartis uniformément. La taille des vaisseaux diminue très graduellement vers la fin du cerne. Les rayons sont pour la plupart uni ou bisériés, quoiqu'on rencontre aussi quelques rayons multisériés. Le bois atteint est assez semblable au bois sain, sauf que les rayons contiennent une bonne quantité de phénols tel que révélé par le bleu toluidine O

(Baayen et al., 1996). Certains vaisseaux contiennent des occlusions alors que des fibres entre les rayons réagissent en accumulant aussi des substances ressemblant aux occlusions.

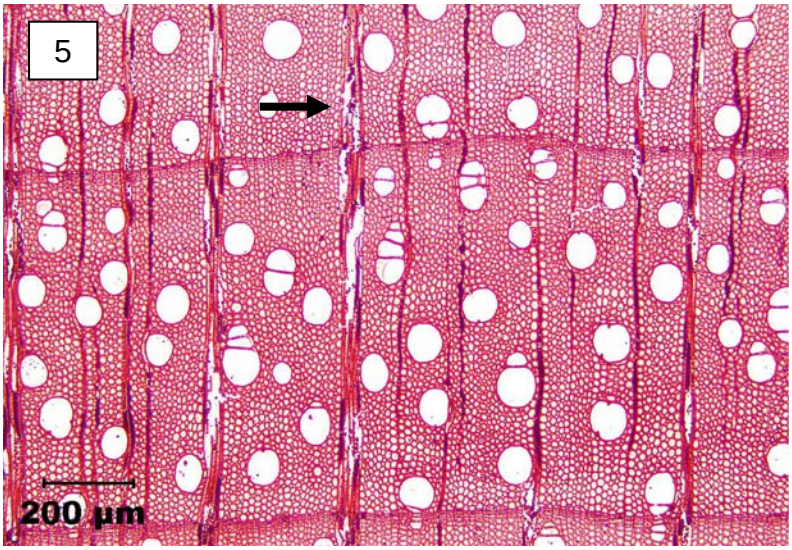
2.4.2.2 Murs 3 (M3)

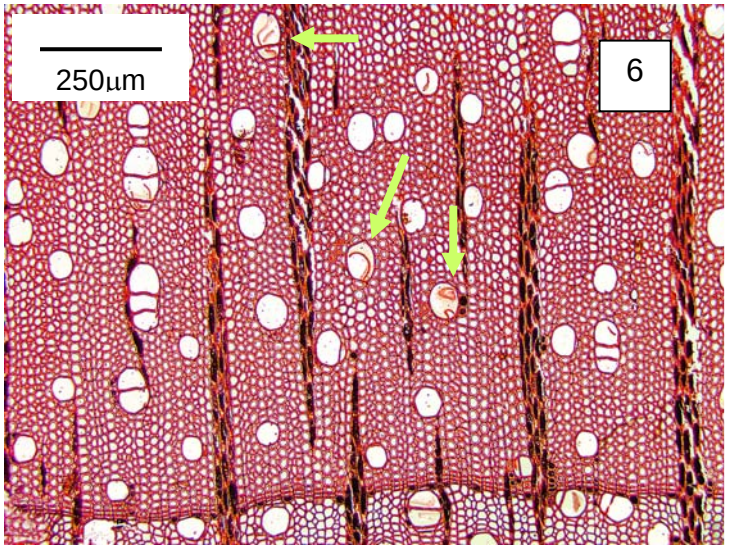
Les M3 ont été peu décrits à ce jour. Ce sont surtout les M4 qui ont retenu l'attention. Par définition, un M3 est une barrière discontinue. Le M3 se compose des cellules de rayons qui s'activent et s'emplissent de substances antimicrobiennes. Les rayons ont des hauteurs et des longueurs variables. Suite à nos observations, il semble cependant que les M3 ne sont pas aussi discontinus qu'on pourrait le croire. A vrai dire, de nombreuses réactions inattendues ont été observées dans les rayons et entre ceux-ci. Celles-ci tendent à renforcer le mur, à le rendre plus étanche. L'étude des volumes de bois coloré a permis de déterminer que le bois coloré s'étendait peu de chaque côté de l'entaille. En se rapportant à la figure 3, on constate qu'à part le traitement ''PFD'', le bois coloré se limitait généralement tangentiellement à ce qui correspondait à peu près au diamètre de l'entaille. Ceci porte à croire que le mur 3 est fort et qu'il permet de bien contenir le bois atteint. Les discontinuités dans les M3 autour des entailles traitées au PFD n'ont été notées que rarement, probablement parce que la plupart des échantillons étaient pris autour du bois atteint, donc dans un endroit où le M3 était probablement alors efficace. Les différences obtenues avec le PFD montrent à tout le moins que les murs 3 se sont formés plus tardivement avec celui-ci comparativement à tous nos autres échantillons. De plus, la différence entre complet ou non dans le cas des M3 est très subtile et beaucoup plus difficile à évaluer qu'avec les M4.

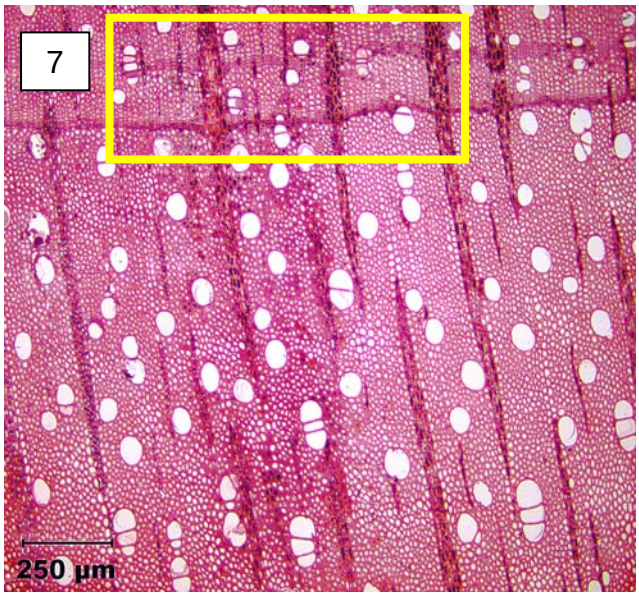
Les cellules de rayons sont habituellement allongées radialement et ont des parois relativement minces. Cependant, certains érables présentaient des particularités à ce niveau. Des cellules de rayon très trapues, soit courtes et à parois épaisses, étaient particulièrement évidentes à l'occasion chez certains arbres (figure 6). L'activation des rayons amène une grande accumulation de produits de défense qui sont souvent de nature phénolique. Les rayons composant les M3 contiennent donc beaucoup de bleu comme on le voit bien à la figure 8.

Les fins de cerne annuel réagissent elles aussi de façon plus ou moins variable (figure 7). Ces réactions permettent souvent de mieux localiser la position des murs 3. L'accumulation de phénols à cet endroit est souvent notable (figure 8). On voit aussi à la figure 6 une grande quantité de substances réagissant entre les rayons. Ceci est très intéressant et laisse présager un M3 très fort.

Les vaisseaux contiennent fréquemment des occlusions colorées en rouge par la safranine O. Ce rouge semble bien correspondre à des descriptions précédentes d'occlusions des vaisseaux qui contenaient de la pectine (Rioux et al. 1998) (figures 6, 8, 9 et 10). Toutefois, les essais de marquage avec un anticorps contre la pectine n'ont pas permis à ce jour de prouver hors de tout doute la présence de cette substance chez ces occlusions. Il est important de préciser ici que l'érable est un bois très dur et donc particulièrement difficile à travailler. Obtenir des coupes très minces pour la MET n'est pas tâche facile et souvent les grilles utilisées doivent être recouvertes de Formvar pour s'assurer d'une bonne stabilité sous le faisceau d'électrons. Ainsi traitées, il est par contre un peu plus difficile d'obtenir une bonne résolution en MET. L'observation des coupes sous lumière polarisée révèle la présence de cristaux chez certaines de ces occlusions. Le vaisseau au centre de la figure 11 semble contenir des cristaux qui pourraient bien être composés de silicium et/ou de calcium. Ces éléments ont été détectés par microanalyse aux rayons X dans des vaisseaux obstrués de l'érable à sucre (D. Rioux et J.P. Renaud, résultats non publiés). Le silicium peut être présent dans différentes structures de défense (Heath 1981) et récemment il a aussi été associé à la production de phytoalexines de nature phénolique (Bélanger et al. 1995, Fawe et al. 1998). La présence de calcium a aussi été mentionnée chez le hêtre (Bonsen et Walter, 1991) et s'il était prouvé que la pectine se retrouve dans ces mêmes vaisseaux, il serait possible de penser que des pectates de calcium pourraient former certains de ces bouchons. Les pectates de calcium aideraient à maintenir la bonne cohésion des parois cellulaires (Alberts et al. 1989) et ils pourraient ainsi fortifier la structure de certaines occlusions observées dans les vaisseaux. Même sans connaître la composition exacte de ces occlusions à ce stade-ci, leur présence dans les vaisseaux du M3 est des plus intéressante. En effet, elles sont souvent nombreuses dans les M3, permettant ainsi une meilleure étanchéité des murs en hauteur.







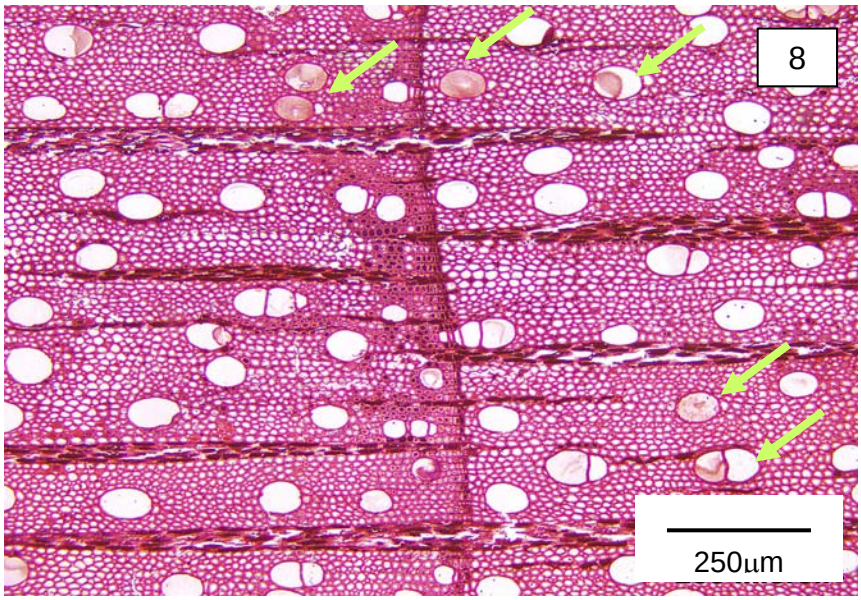
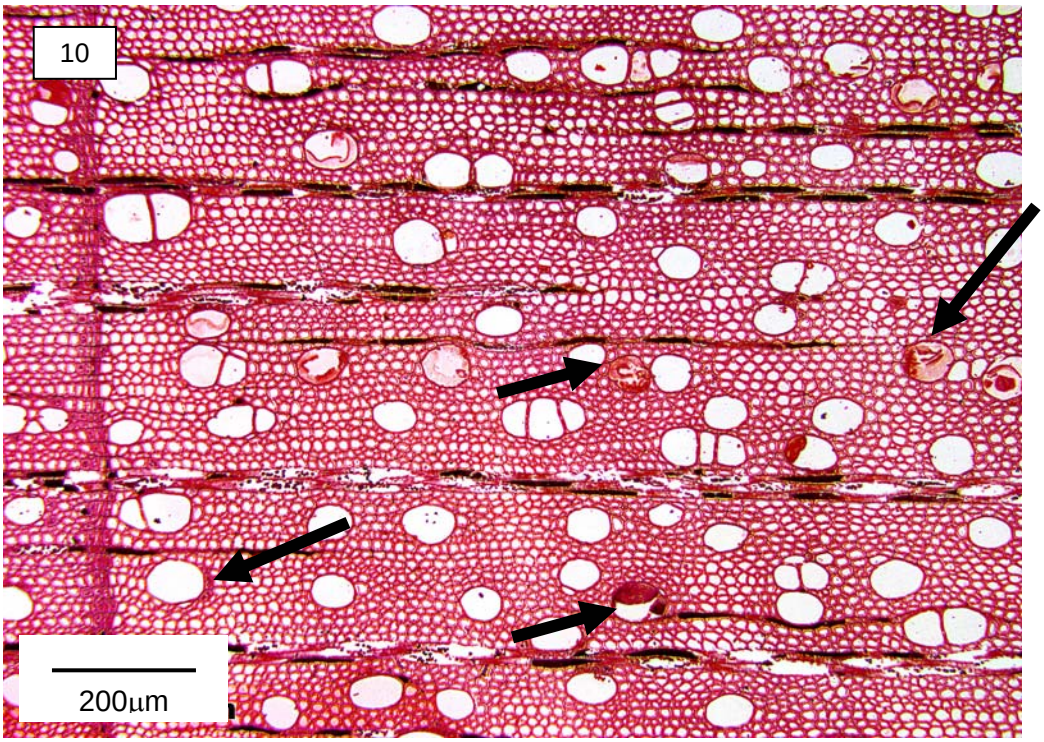




Figure 5-7-9 : le cambium est situé vers le haut. Figure 8 : le cambium est vers la droite. **Fig. 5** : Bois sain. Les vaisseaux sont bien visibles et la majorité des rayons sont unis ou bisériés (flèche noire : rayon multisérié). **Figures 6 à 9** : Mur 3. Sur toutes les figures de cette page, les flèches vertes indiquent des occlusions dans les vaisseaux qui renforcent les barrières et qui pourraient contenir de la pectine. **Fig. 6** : Cet arbre présentait la particularité d'avoir des cellules de rayons très courtes et épaisses ayant accumulé des composés phénoliques, ce qui pouvait conférer des propriétés antimicrobiennes à ce mur. **Fig. 7** : Voici un exemple d'un M3 très fort et bien colmaté autant au niveau des rayons qu'entre eux. De plus, les cellules formant la fin de cerne semblent réagir elles aussi (rectangle jaune). **Fig. 8** : Fin de cerne très réactive dans un M3 contenant beaucoup de phénols. On voit bien la délimitation du mur de part et d'autre de la zone réactive. **Fig. 9** : Rayons très réactifs d'un M3 bien formé.



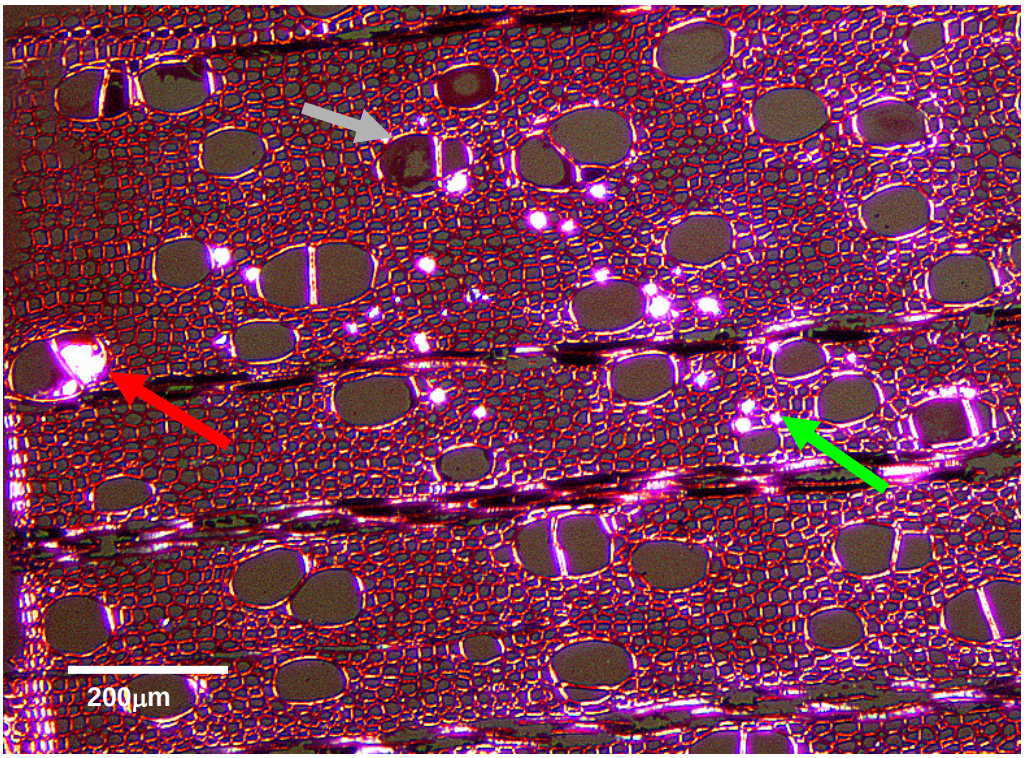


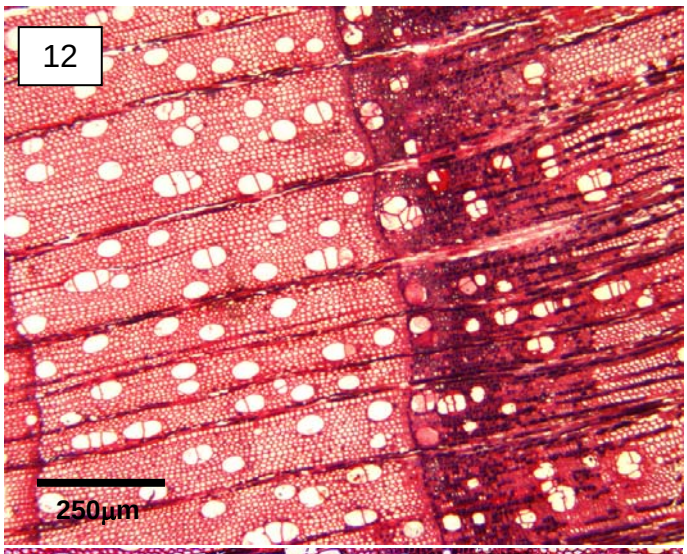
Figure 10 : M3 complet comprenant au centre beaucoup de dépôts pouvant être de la pectine (flèche noire). **Figure 11** : M3 observé sous lumière polarisée. La flèche rouge indique un vaisseau avec la présence de cristaux. Les cristaux sont aussi présents dans des cellules de parenchyme (flèche verte). La flèche grise indique une occlusion pouvant contenir de la pectine.

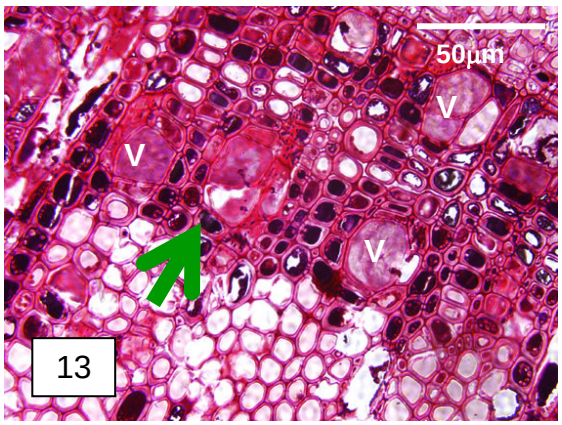
2.4.2.3 Description anatomique des murs 4

Les M4 sont beaucoup plus évidents que les M3. Ils sont habituellement bien délimités et facilement observables en microscopie si les échantillons ont été pris à l'endroit approprié. Ceci est assez facile car les M4 sont aisément repérables à l'œil nu. En effet, une coloration verte ou noire aux abords du bois coloré brunâtre permet habituellement de localiser la barrière. Les M4 débutent avec le nouveau cerne au printemps (figure 12) et ils sont produits en réaction à la blessure. Les M4 sont différenciés par le cambium qui déclenche la formation de cellules adaptées à la défense du xylème. Au moment de la lésion, ces cellules n'existent pas. On retrouve dans les M4 différents types de cellules, soit majoritairement des cellules de parenchyme accompagnées de quelques fibres et vaisseaux. Un de rôles du mur 4 serait de protéger le cambium; en effet, un cambium trop endommagé signifierait la mort de l'arbre (Rioux, 1995).

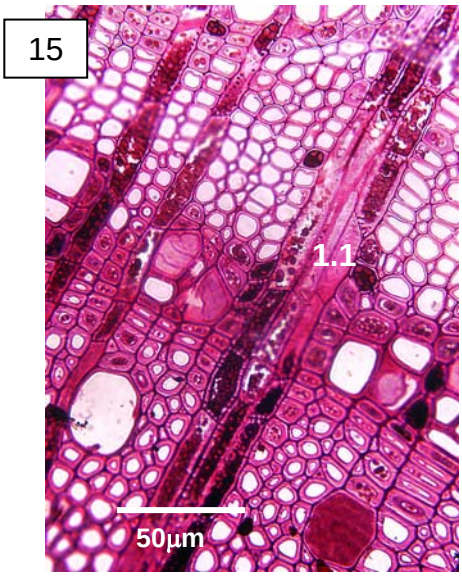
Le M4 est le mur le plus efficace du système et le plus durable aussi (Shigo 1984). Un beau M4 sera homogène et fort et composé de plusieurs couches de cellules activées. Les M4 de ce type seront dit normaux, surtout s'ils sont de largeur et d'intensité uniformes (figures 12, 14, 24 et 28). L'accumulation de phénols dans les différents types de cellules de ce mur a été notée fréquemment. Dès le début du cerne, une importante coloration bleue foncée, presque noire, est observée. Cette coloration est due à la toluidine O qui se lie aux différents phénols présents (figures 13, 15, 25). Ces phénols sont opaques aux électrons en microscopie électronique (figures 31, 33, 35, 36 et 37). Ces phénols assureront principalement la défense en évitant la colonisation du bois sain produit suite à la lésion. Les substances de défense produites servent avant tout à empêcher la propagation des microorganismes, principalement des champignons associés à la coloration et la carie du bois.

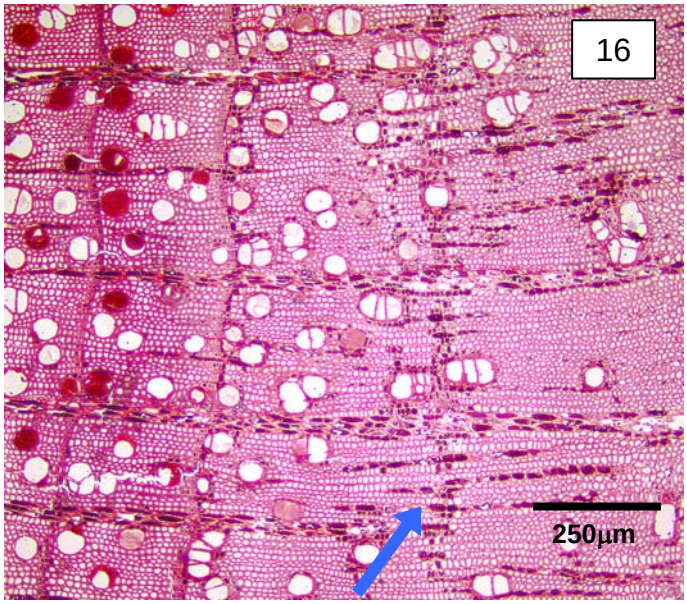
Le cambium va aussi faciliter la défense en limitant la production de vaisseaux. Peu de vaisseaux sont retrouvés dans un M4, surtout au début, et leur taille est relativement petite (la figure 12 est encore ici un bon exemple). S'ils sont plus gros, ils deviennent

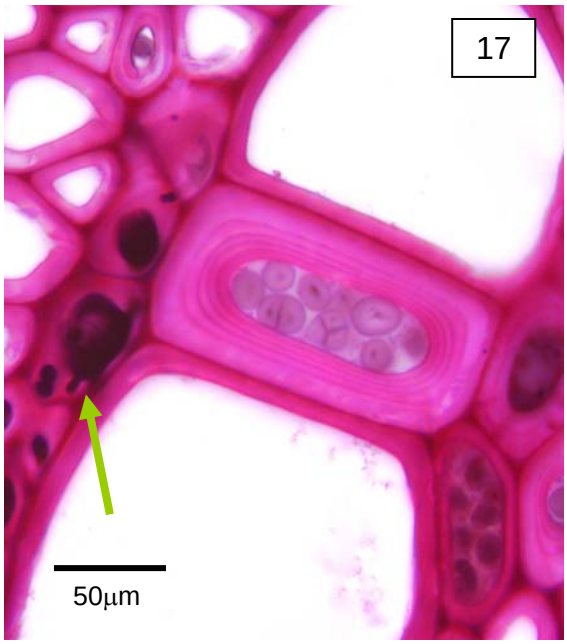

12
250µm

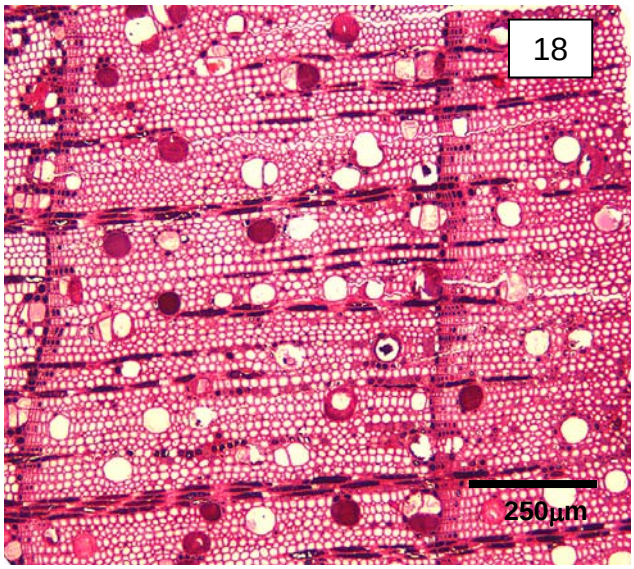

50µm
V
V
V
13

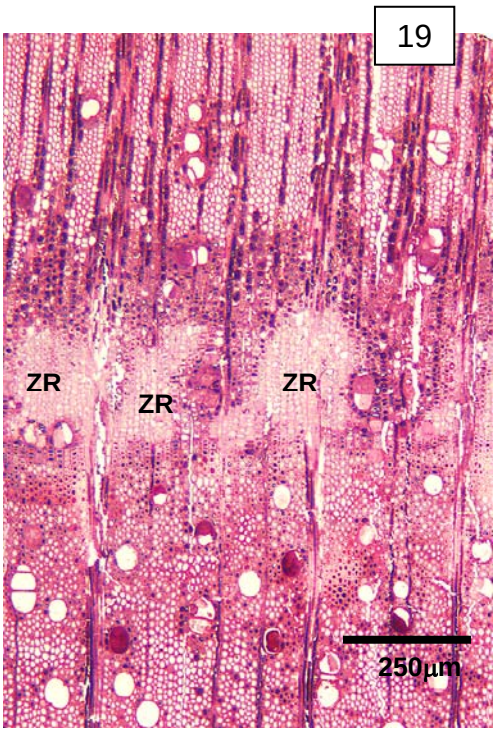

14
250µm

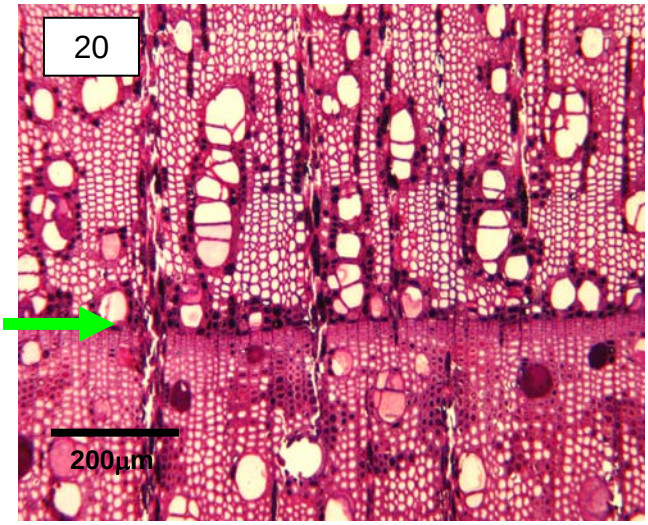

15
1.1
50µm

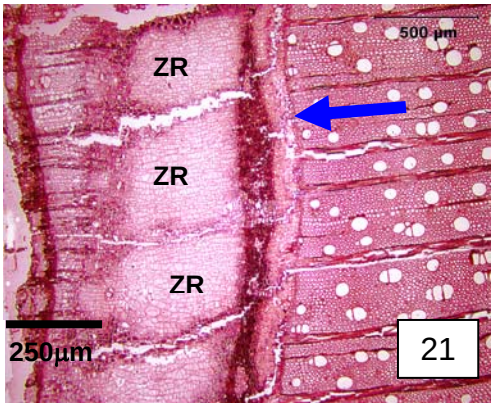

16
250µm

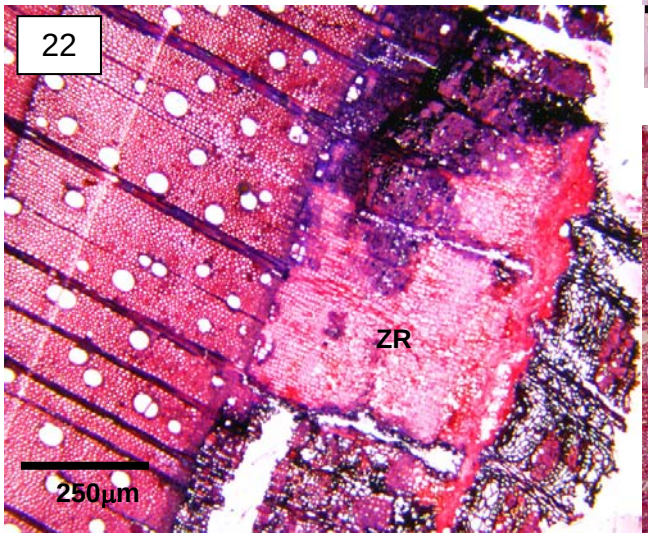

17
50µm

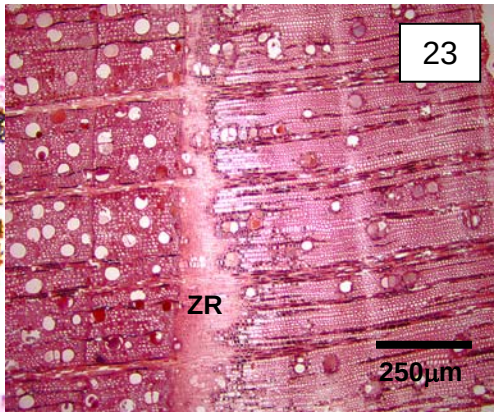

18
250µm


19
ZR
ZR
ZR
250µm


20
200µm


500 µm
ZR
ZR
ZR
250µm
21


22
ZR
250µm


23
ZR
250µm

Description des figures 12 à 23.

Pour les figures 12 à 17, 22 et 23. le cambium est à droite. Pour les figures 19 et 20 le cambium est vers le haut. Pour les figures 18 et 21, il est à gauche.

Figure 12 : M4 dit ‘’normal’’. Il contient une grande quantité de substances antimicrobiennes au départ, peu de vaisseaux (V) et des rayons multisériés. Il est d’une largeur uniforme.

Figure 13 : M4 normal à fort grossissement. Les vaisseaux contiennent des occlusions et sont souvent segmentés (flèche). Il y a beaucoup de bleu associé aux phénols.

Figure 14 : M4 comme à la figure 12, mais un peu moins uniforme et dense.

Figure 15 : Cellules de rayon activées d’un M4. Le rayon (R) est multisérié. Il y a peu de vaisseaux, ils sont petits et contiennent des occlusions. Les substances foncées correspondent à des phénols.

Figure 16 : M4 incomplet. On note peu de réactions qui pourraient être associées à un M4. La flèche bleu indique l’endroit le plus probable du M4 qui est peu évident. Il y a beaucoup d’occlusions dans les vaisseaux du bois affecté par l’entaillage.

Figure 17 : Cellule entre deux vaisseaux avec des parois multiples et une grande quantité de grains d’amidon à l’intérieur. Il y a aussi des cellules emplies de phénols (flèche).

Figure 18 : Il n’y avait pas de M4 dans cet échantillon. Une grande variété de réactions sont notées comme les occlusions dans les vaisseaux et beaucoup de phénols dans les rayons.

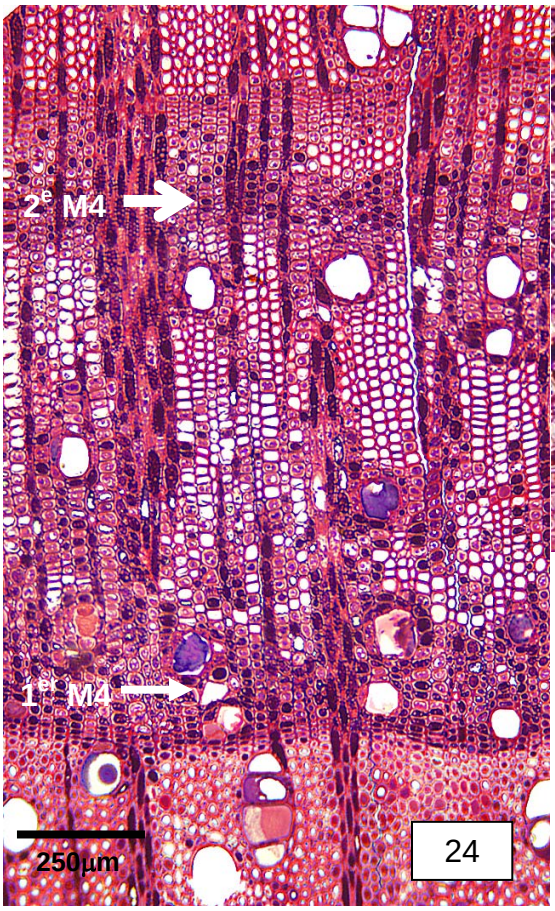
Figure 19 : M4 complet comprenant plusieurs zones rosées (ZR) dans lesquelles il n’y a pas de vaisseaux. Il y a de fortes réactions dans le bois atteint.

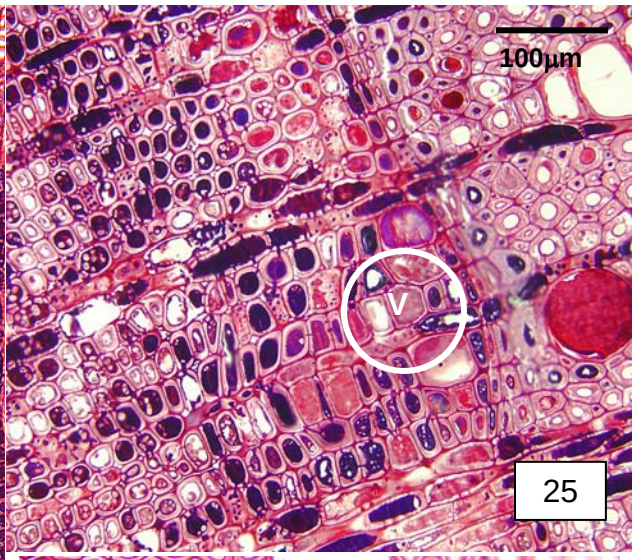
Figure 20 : M4 (flèche) incomplet et très mince. Les réactions qu’on y observe sont peu intenses. Il y a beaucoup de gros vaisseaux.

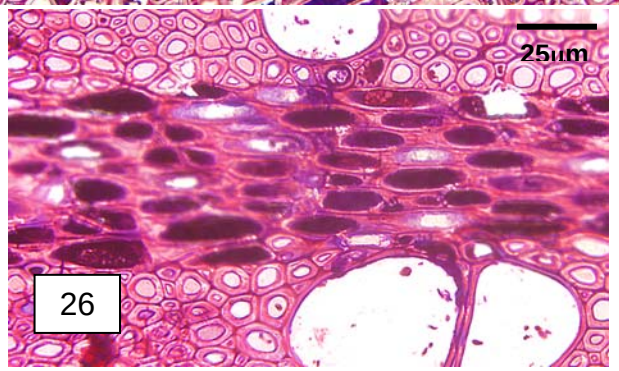
Figure 21 : Le M4 semble débuter normalement au départ (flèche bleue), mais rapidement, le cambium s’est mis à produire d’importantes zones rosées.

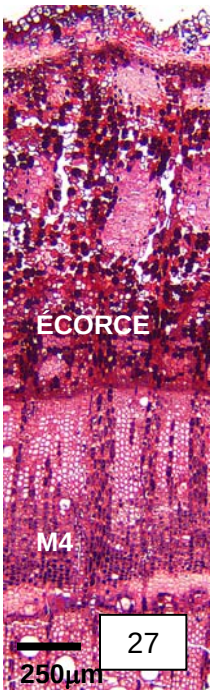
Figure 22 : Échantillon probablement pris trop près de la blessure, car la zone rosée fait ici partie de l’écorce qui est reconnaissable aux différentes couches la composant.

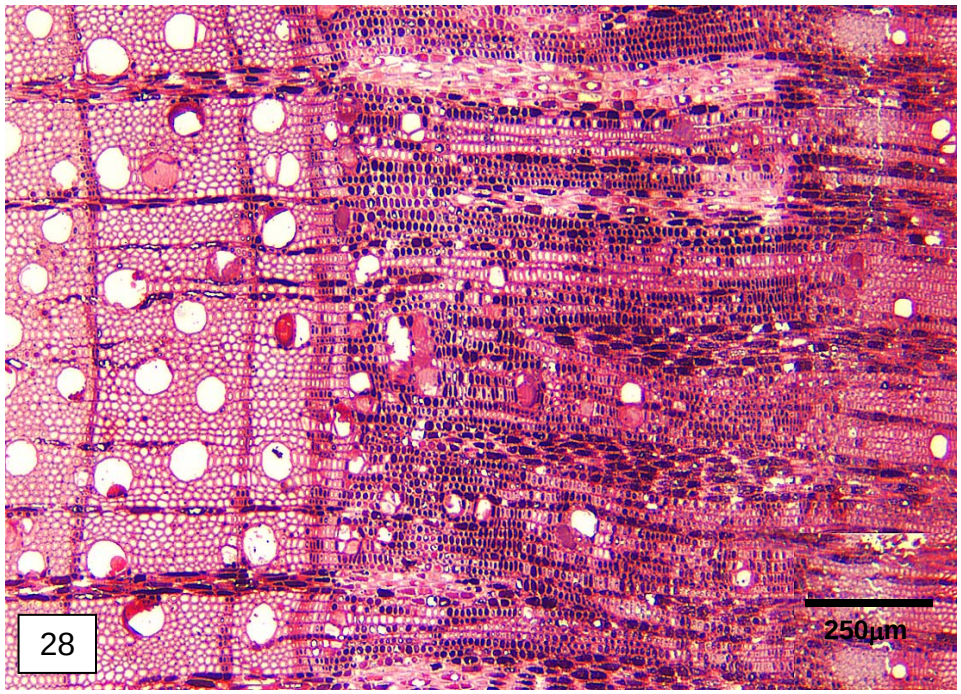
Figure 23 : Mince bande rosée au début d’un M4. Cependant, le M4 qui suit est peu large et faible.


2e M4
1er M4
250µm
24


100µm
V
25


25µm
26


ÉCORCE
M4
250µm
27


250µm
28

Description des figures 24 à 28

Sur les figures 24 et 27, le cambium est vers le haut. Sur la figure 25 et 26 le cambium est à droite. Sur la figure 28, le cambium est à gauche.

Figure 24 : M4 en deux parties aussi fortes l'une que l'autre. Le premier M4 débute avec le nouveau cerne et contient quelques vaisseaux. Ce mur semble complet. Après un retour à la normale, il y a un nouveau M4. Des occlusions contenant des composés phénoliques en bleu sont aussi visibles dans certains vaisseaux.

Figure 25 : Grossissement du premier M4 de la figure 24. Il y a beaucoup de phénols et peu de vaisseaux (V).

Figure 26 : Rayon fortement activé. Il est large de plusieurs cellules qui sont trapues. Ces cellules contiennent beaucoup de phénols.

Figure 27 : Après le M4, il est facile d'apercevoir l'écorce de l'arbre.

Figure 28 : M4 très large avec beaucoup de réactifs réagissant au bleu de toluidine O. Il est aussi intéressant de remarquer que la croissance avant la blessure était lente et que suite à celle-ci, elle a été activée.

---

alors souvent obstrués (figure 15). Ceci a pour but de limiter encore une fois la propagation longitudinale des microorganismes, les vaisseaux étant les éléments assurant le passage de la sève brute. Les vaisseaux produits au début du M4 sont fréquemment segmentés et emplis de phénols et d'autres types d'occlusions. Graduellement, les vaisseaux retrouvent leur taille et forme habituelles lorsque le cambium recommence à produire du bois sain (figure 28).

Comme mentionné plus tôt, les rayons des érables à sucre sont ordinairement unis ou bisériés. Cependant, dans un M4, presque tous les rayons deviennent multisériés, ayant 5 à 8 cellules de large. Des rayons plus larges ont aussi été rapportés dans des murs 4 par d'autres chercheurs (Rioux et Ouellette, 1991; Shigo et Tippett 1981). Ces rayons contiennent aussi généralement des phénols (figures 15 et 26). Cette réaction

était observée chez presque tous les M4. Avec la formation de rayons plus imposants, l'arbre nuit à la propagation des microorganismes et favorise l'accumulation d'une bonne quantité de produits antimicrobiens. Un champignon qui voudrait traverser un rayon de cette composition rencontrerait une résistance importante qui diminuerait grandement ses chances de réussite.

Une autre substance souvent retrouvée dans les M4 est l'amidon (figures 17, 29, 30, 31 et 32). Les grains sont souvent très nombreux au début du mur. On note leur présence principalement dans les cellules de parenchyme axial, mais aussi dans les rayons. L'amidon est la principale substance de réserve des plantes. C'est à partir de ces sucres que les phénols de défense sont produits. L'accumulation d'amidon se produit surtout au cours de la saison chaude, soit d'avril à octobre (Kozlowski et Pallardy 1997). Comme les échantillons ont tous été prélevés au début de l'automne, il est normal de retrouver beaucoup de grains d'amidon. Cependant, les quantités retrouvées dans certains murs 4 sont plus importantes que celles rapportée dans la littérature. De plus, l'accumulation d'amidon dans le bois atteint et sain, de même que dans les M3, n'a été que rarement observée. Comme le M4 est un moyen de défense actif de l'érable à sucre, il est normal que l'arbre tende à emmagasiner divers composés pouvant faciliter sa survie. En favorisant le dépôt d'amidon, l'arbre peut ainsi s'assurer qu'il aura les ressources nécessaires au déploiement de sa résistance. La fabrication de composés secondaires comme les phénols demande beaucoup d'énergie à l'arbre, comme démontré lors de la formation de murs 4 chez des ormes atteints par la maladie hollandaise de l'orme (Shigo et al. 1986). Il est approprié de se demander ce qui pousse l'arbre à stocker ainsi l'amidon dans cette zone particulière. Il a été déjà rapporté que les M4 contiennent habituellement une grande quantité de phytoalexines (Shigo 1984), mais aucune mention d'amidon sans transformation subséquente en matériaux de défense n'a pu être retrouvée dans la littérature. L'amidon est retrouvé autant dans les échantillons prélevés suite à des blessures vieilles de 6 mois que celles de 18 mois. Aucun des six traitements phytohormonaux ne semble favoriser une plus grande déposition d'amidon. En outre, l'accumulation est considérable dans des zones intimement associées à des cellules ayant aussi accumulé des phénols (figure 30). L'amidon est aussi retrouvé dans les rayons médullaires qui sont des tissus spécialisés

dans ce genre de stockage. Il est important pour l'arbre de maintenir ses réserves à un certain niveau s'il veut survivre aux divers stress qu'il va inévitablement rencontrer. Selon Pearce (1996), la chute des réserves en amidon pourrait nuire aux possibilité de défense des plantes en réduisant la qualité des réactions de défense.

Lorsque le cambium forme un M4, il semble devenir hyperactif. Il produit une grande quantité de cellules diverses, qui contiennent généralement diverses substances reliées à la défense. Lorsque la coupe est assez grande, on peut noter que la croissance est de beaucoup plus importante à partir du nouveau cerne qui forme le M4 (figure 28). Les parois des cellules sont en général plus épaisses et peuvent être formées de couches multiples.

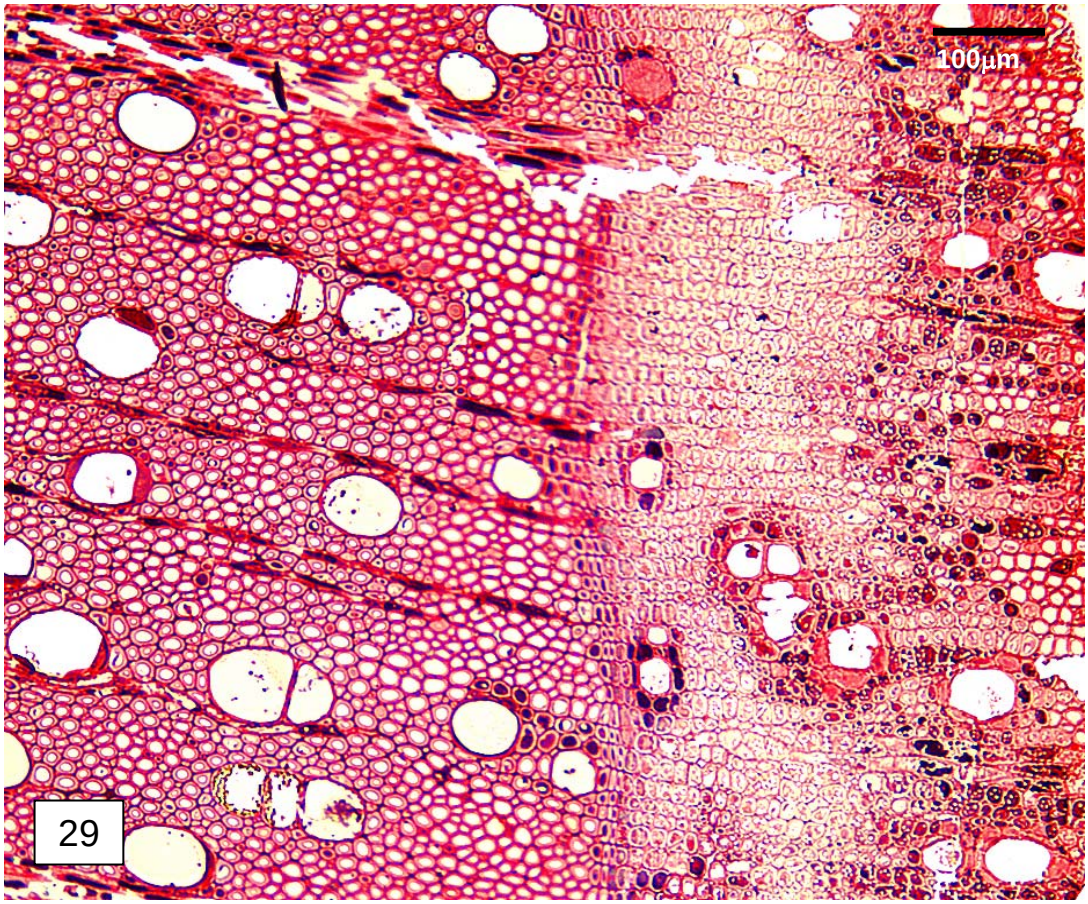
2.4.2.4 Variabilité des murs 4 chez l'érable

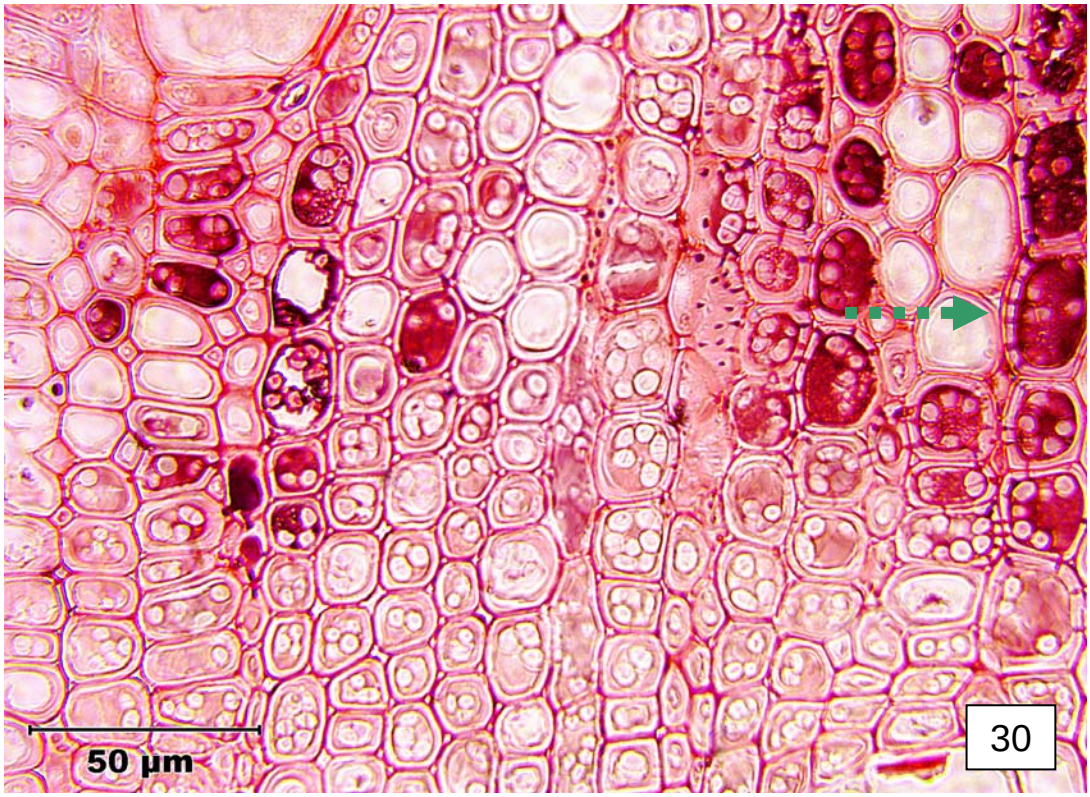
Les M4 observés chez l'érable à sucre présentaient une grande variabilité. Il y avait des M4 complets et comme ils étaient les plus fréquents, ils étaient dit ''normaux''. Ces murs étaient de largeur et d'intensité uniformes (figure 12). Les rayons étaient plus larges et les vaisseaux rares dans ces murs Ces murs ne pouvaient pas être reliés à un traitement particulier ou à une concentration de celui-ci.

Un fait nouveau remarqué chez les murs 4 des érables à sucre est la présence d'une importante zone rosée au début du mur suite à une coloration toluidine-safranine décrite plus tôt (figures 19, 21, 22, 23, 27 et 29). Cette zone contient ou non de l'amidon (figure 30) et semble ne pas absorber les colorants. La cause de cette étanchéité n'a pu être analysée en profondeur, mais ne semble pas due à la subérine. La résine utilisée pour enrober les échantillons ne semble pas avoir bien pénétré cette zone puisque les coupes se brisaient souvent à ce niveau. La zone rosée ne semblait pas interrompre la continuité des murs 4. Les M4 à zone rosée n'ont pu être associés à un traitement bien que certains arbres semblaient plus enclins à en former. Les zones rosées ressemblaient beaucoup à certaines zones de l'écorce particulièrement lorsque les échantillons étaient prélevés très près des blessures (figures 22 et 27). Mais ce raisonnement n'a pas permis d'expliquer la présence de toutes ces zones. Certaines n'étaient pas très grandes et étaient localisées tout juste au début du M4, ce qui ne

correspondait pas à la proximité de la blessure d'entaillage. En microscopie électronique, ces zones ne présentaient aucune caractéristique particulière, à part un épaississement des parois des cellules (figures 17 et 34).

On a aussi rencontré des murs incomplets. Ces murs contenaient peu de phénols et les réactions semblaient aléatoires. De plus, on ne retrouvait pas de barrière évidente dans l'échantillon. Un bon exemple est la figure 16. Habituellement, un M4 débute avec un nouveau cerne, sauf qu'ici, le M4 est faible au début du cerne et l'arbre a fait un second essai de barrière un peu plus tard qui est loin d'être aussi efficace que les murs dit ''normaux''. Cependant, dans certains cas comme celui présenté à la figure 18, l'échantillon ne comprenait tout simplement pas de M4 et seulement du bois atteint. Il est possible que cet échantillon ait été prélevé au mauvais endroit car l'observation macroscopique du bois avant fixation avait permis de distinguer une bande verte qui paraissait être un M4. Le M4 présenté à la figure 20 est lui aussi incomplet, même s'il est au début du cerne. Il y a, par endroit, une seule bande de cellules qui réagit, ce qui est peu et ne saurait probablement pas restreindre le passage des microorganismes.


100µm
29


50 µm
30

Description des figures 29 et 30

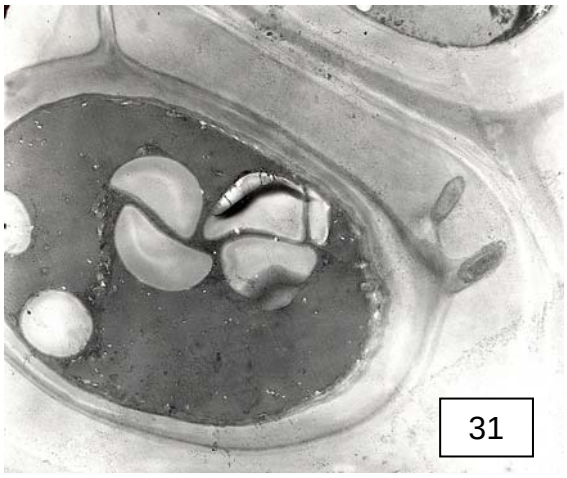
Le cambium est à droite sur la figure 29 et vers le haut sur la figure 30.

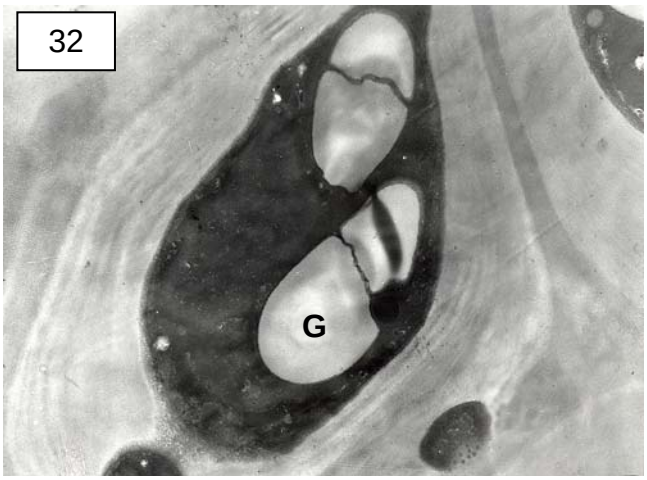
Figure 29 : Zone rosée intéressante car elle contient une grande quantité d'amidon et un peu de phénols en plus.

Figure 30 : À plus fort grossissement, on voit bien la quantité impressionnante de grains d'amidon retrouvée dans ce M4. Les ponctuations sont aussi évidentes dans certains cas (flèche).

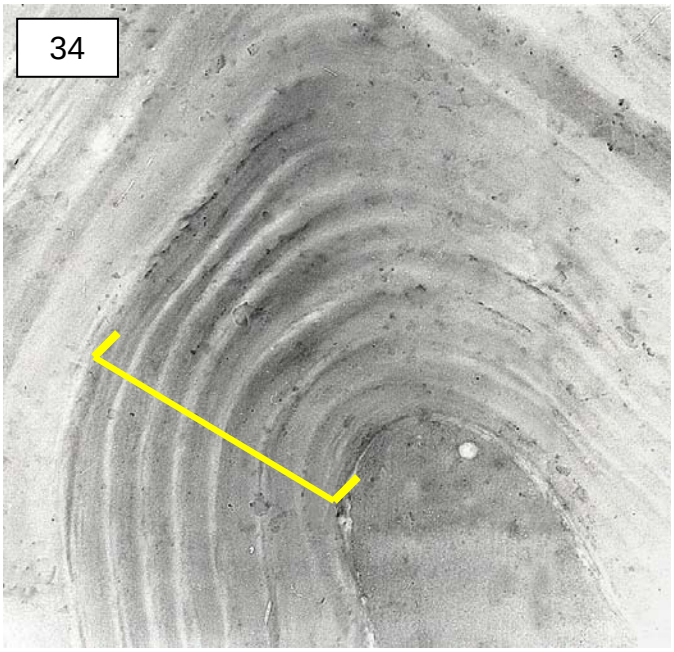
2.4.2.5 La subérine dans les murs.

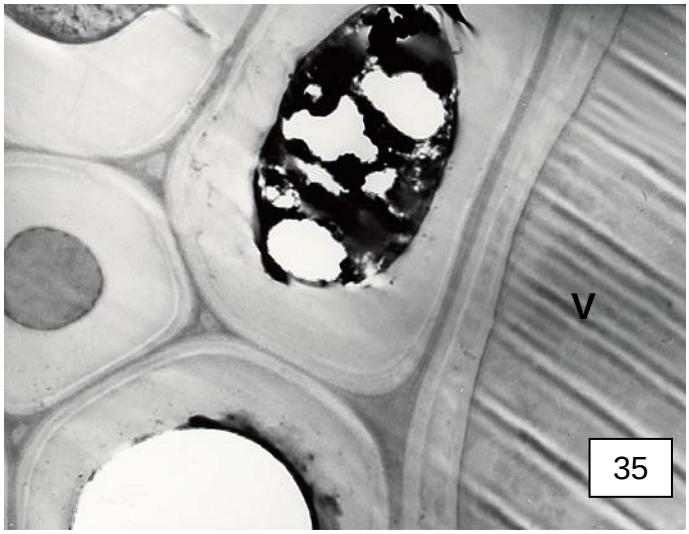
La subérine est généralement retrouvée dans le suber de l'écorce chez les plantes. Cette substance a pu être localisée aussi à plusieurs occasions dans des barrières de défense (Pearce 1996; Rioux 1995; Shigo 1984). La subérine sert ici à assurer l'étanchéité des murs. Ainsi, peu de substances peuvent sortir ou pénétrer dans cette zone. La localisation de cette substance se fait généralement en fluorescence ultraviolette. Comme la lignine émet elle aussi de la fluorescence, une coloration préalable de celle-ci avec le phloroglucinol-HCl facilite l'observation puisque le colorant annule l'autofluorescence de la lignine (figure 42). On retrouve la subérine dans les murs 3 et 4. On constate que la subérine est souvent au début du mur dans la zone la plus forte. On peut aussi localiser la subérine en microscopie électronique à transmission. Les couches de subérine ont alors une structure lamellaire très typique (Figure 39). De plus, les cellules ont alors des formes particulières, comme celles montrées dans la figure 38. L'érable à sucre est déjà au départ un bois très dur et difficile à travailler en microscopie.


31

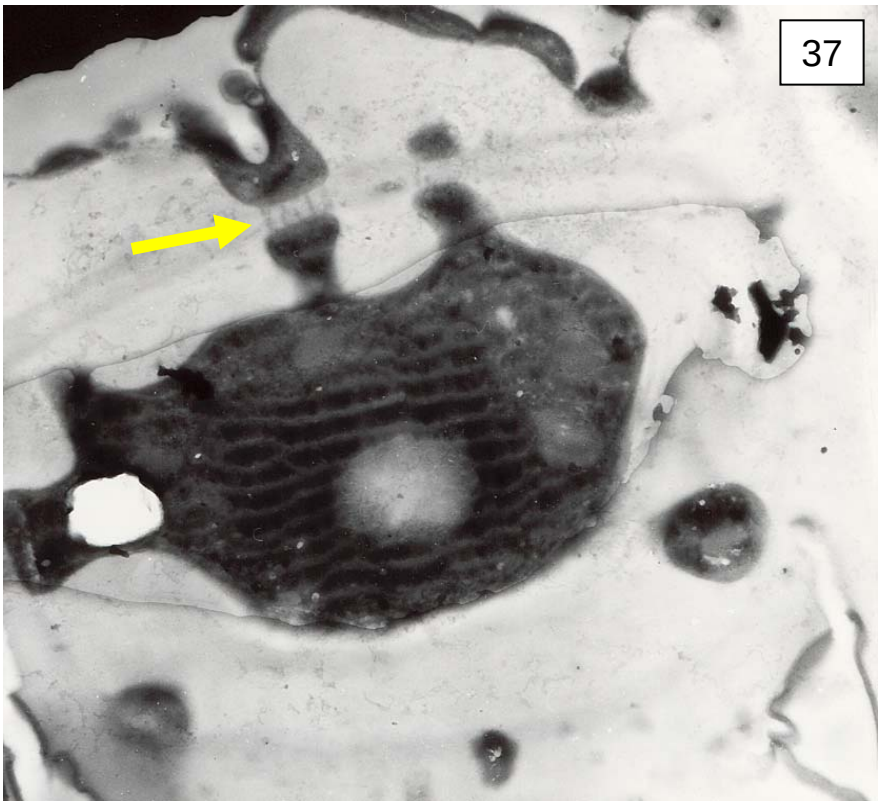

32
G

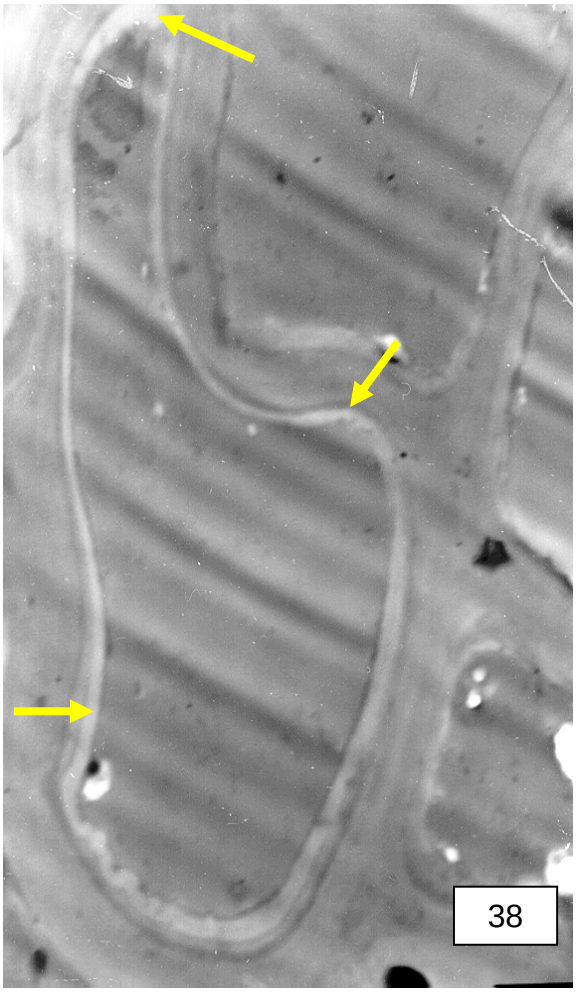

33

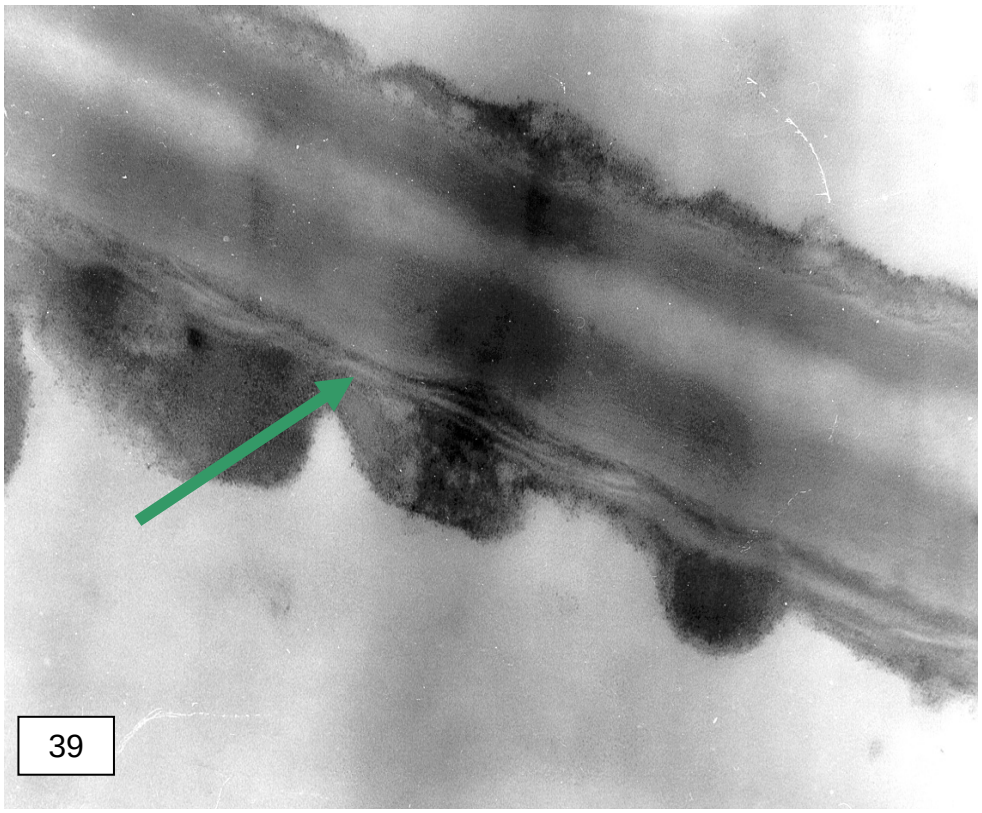

34


V
35


P
V
36


37


38


39

Description des figures 31 à 39.

Figure 31 : Dans un M4, grains d'amidon dans une cellule de parenchyme dont le cytoplasme contient des phénols. Gross : 11840.

Figure 32 : Dans un M4, grains d'amidon (G) dans une cellule de parenchyme dont la paroi contient plusieurs parois secondaires. Gross : 19920.

Figure 33 : Cellules avec des ponctuations contenant des phénols. Gross : 10260.

Figure 34 : Cellules de parenchyme d'un M4 qui possède sept couches de parois secondaires (montrées par la bande jaune). Gross : 13680.

Figure 35 : Grande quantité de phénol dans le cytoplasme d'une cellule de parenchyme au début d'un M4 à côté d'un vaisseau (V). Gross : 4655.

Figure 36 : Ponctuations (P) entre un vaisseau (V) et une cellule de parenchyme. La cellule de parenchyme contient des composés opaques aux électrons qui sont probablement des phénols. Gross : 12950.

Figure 37 : Ponctuations et plasmodèmes (flèche) qui permettent probablement le passage des phénols d'une cellules à l'autre (flèche jaune). Gross : 15030.

Figure 38 : Cellule subérisé ayant une forme anormale. Les flèches jaunes indiquent des endroits où la couche subérisée qui confère cette forme à la cellule est évidente. Gross : 5150.

Figure 39 : Lamelles de subérine présente dans la membrane (flèche verte). Gross : 41200.

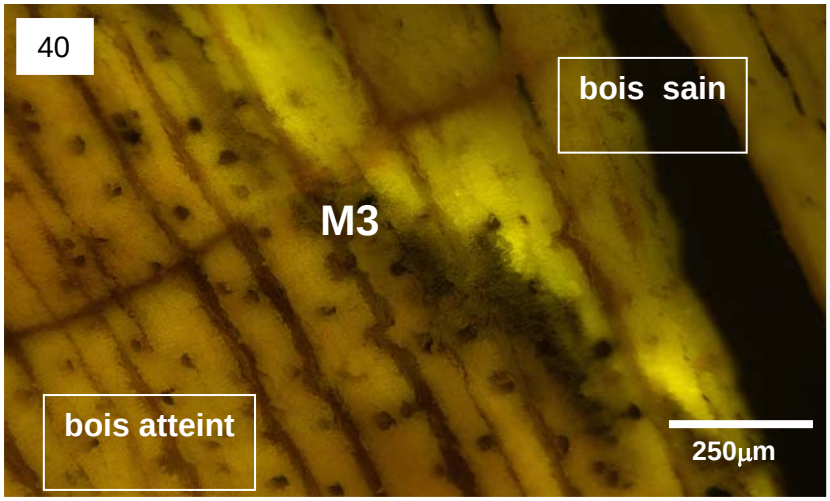


Figure 40 : Zone d'autofluorescence jaune dans un M3. La zone est adjacente au bois sain.

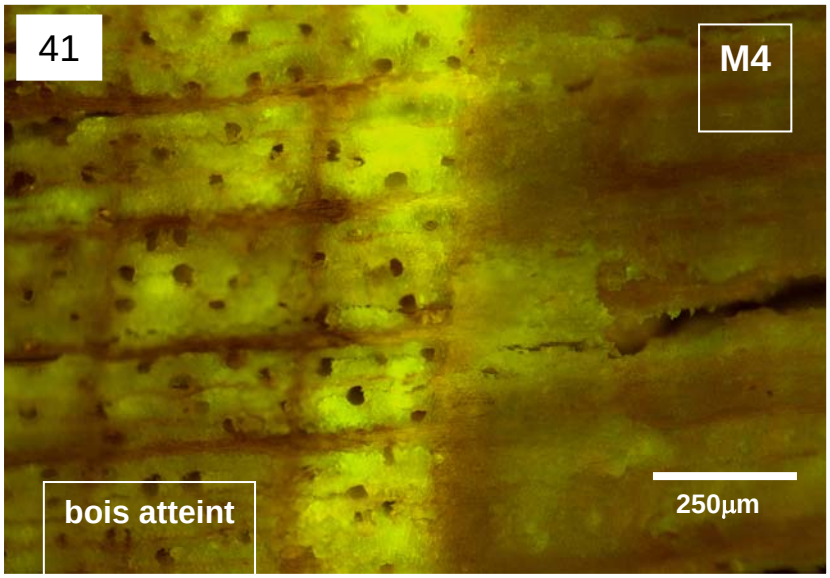


Figure 41 : Zone d'autofluorescence jaune dans un M4. La zone est accolée au mur du côté du bois atteint. La substance impliquée est abondante et répartie uniformément.

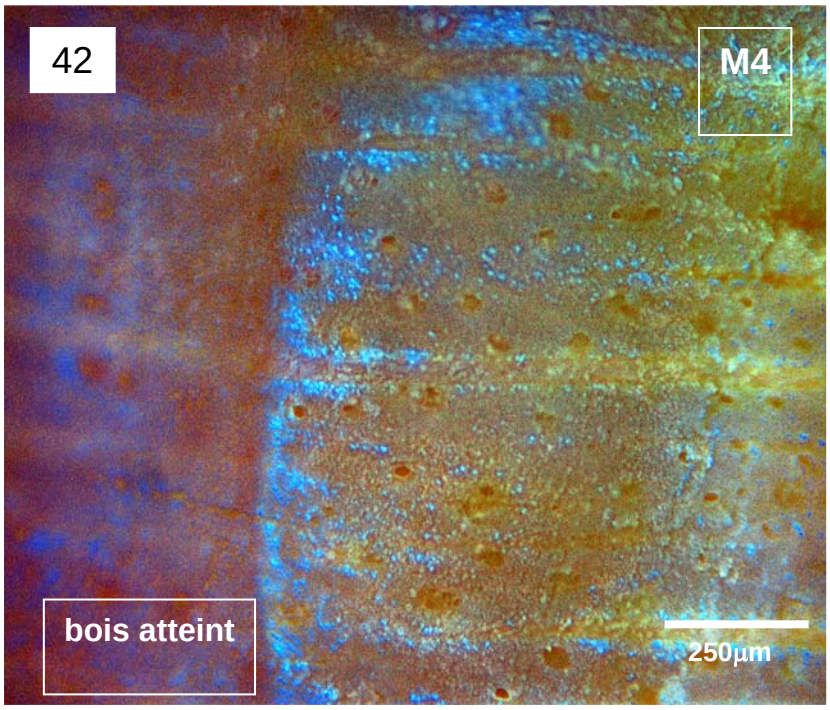


Figure 42 : Coupe fraîche de M4 colorée au fluoroglucinol-HCl et observée sous lumière ultraviolette. L'autofluorescence de la lignine est éteinte par la coloration, mais pas celle de la subérine que l'on voit très bien en bleu au début du M4 et accolée aux rayons.

Il est ardu d'imprégner les échantillons avec les agents fixateurs et l'enrobage demande beaucoup de soins. Trouver des lamelles de subérine, en microscopie électronique spécialement, devient dès lors une tâche difficile puisque les tissus subérisés s'imprègnent difficilement et les bris de coupe sont fréquents à ce niveau.

2.4.2.6 L'autofluorescence jaune dans les murs 3 et 4

Une caractéristique nouvelle des murs a été découverte au cours de ce projet chez l'érable à sucre. En effet, une autofluorescence jaune a d'abord été localisée dans les murs 3 et ensuite dans les murs 4 sous lumière ultra-violette. Sous lumière bleue, cette autofluorescence jaune devient encore plus évidente (figures 40 et 41). Cette autofluorescence rend généralement les murs continus, ces derniers ayant été décrits originalement comme étant discontinus (Shigo 1984). Cette substance est souvent accolée à la subérine présente aussi dans ces murs. Elle persiste à de longues périodes d'entreposage au froid, mais pas aux traitements de fixation et d'enrobage des échantillons. Cette coloration est observée seulement dans les coupes fraîches obtenues à partir du matériel gardé à –80 °C. Plusieurs colorations ont été essayées pour déterminer la nature chimique de cette autofluorescence comme la réaction acide nitrique de Hoepfner-Vorsatz (Reeve, 1951) qui permet de détecter certains phénols, la coloration à la vanilline-HCl (Sakar et Horwarth, 1976) qui met en évidence les tannins condensés et la réaction au $FeCl_3$ (Mace, 1963), un colorant pour les phénols en général. Aucune d'elles n'a permis de déterminer la composition exacte de la substance autofluorescencente jaune. Néanmoins, certains résultats intéressants sont apportés par la coloration de Maüle (Gerlach, 1969) qui éteint partiellement cette autofluorescence. Ceci porte à penser que la substance pourrait contenir des phénols associés aux lignines de type syringyl car le test de Maüle permet de colorer ces lignines. Il aurait été souhaitable de tenter d'extraire le composé responsable de cette autofluorescence et de l'analyser par HPLC

(chromatographie liquide haute performance) par exemple. Des contraintes de temps et de disponibilité n'ont pas permis de réaliser de tels essais. Et-touil (2000) a lui aussi repéré une autofluorescence ressemblant à celle décrite dans cette étude. L'autofluorescence décrite par Et-touil semble être liée aux réactions de défense de l'orme à une infection par *Ophiostoma novo-ulmi*. La nature chimique de la ou des substances n'a pu être déterminée dans l'étude d'Et-touil.

2.5 Conclusion

Aucun traitement phytohormonal n'a influencé le volume de bois coloré. Toutefois, le volume de bois coloré semble influencé par deux facteurs. Le premier est que l'utilisation de la lanoline avec ou sans traitement phytohormonal permet de réduire le développement de bois coloré dans le temps si elle est appliquée suite au désentaillage. Le second point tiré de l'analyse des volumes de bois coloré est le fait qu'une entaille fraîchement faite et traitée sur le champ avec la lanoline produira très peu de bois coloré. Même si cette dernière découverte ne peut être applicable en acériculture, c'est tout de même intéressant pour le traitement des arbres en milieu urbain. Les données de la présente étude montrent, de plus, que les volumes de bois coloré suite à l'utilisation des petites entailles semblent beaucoup moins importants que ceux apparaissant suite à l'entaillage conventionnelle (voir p.).

Le compartimentage n'est pas influencé positivement ou négativement par l'utilisation de l'acide abscissique, de l'acide jasmonique, de l'acide salicylique, de l'éthylène, du thidiazuron ou de la bétaïne. L'échantillonnage insuffisant ne permettait pas de faire de différences nettes entre les divers traitements. Cependant, des données nouvelles sur le compartimentage chez l'érable à sucre ont pu être mises en évidence. Quoique discontinu par définition, le M3 peut devenir plus complet lorsque les réactions entre les rayons sont importantes. Ceci est le cas lorsque des occlusions dans les vaisseaux sont nombreuses et que les cellules en fins de cerne annuel contiennent des phénols. De plus, la présence probable de silicium et de calcium dans les vaisseaux montre que les

occlusions sont semblables à celles observées chez d'autres plantes.

Les M4 sont plus faciles à localiser que les M3, mais ils sont aussi plus variables. La majorité des M4 observés étaient complets et bien formés. Ils contenaient beaucoup de phénols, les vaisseaux étaient petits et les rayons généralement multisériés. Cependant, certains M4 comprenaient d'importantes zones rosées imperméables aux fixateurs et aux colorants. Ces zones contiennent régulièrement des grains d'amidon. La présence d'amidon représenterait une source d'énergie pour former des composés secondaires nécessaires à la défense.

Un fait nouveau a été remarqué dans les échantillons de ce projet. En effet, une autofluorescence jaune a été décelée dans les M4 et les M3 accolée à la subérine. La composition des substances amenant cette fluorescence n'a pu être déterminée par les quelques tests histochimiques utilisés. Cependant, les soupçons sont dirigés vers des phénols ou même des lignines.

Même si le projet n'a pas amené les résultats escomptés, les découvertes et les analyses que nous avons faites sont intéressantes et pourraient être applicables à d'autres domaines que l'acériculture. En somme, plus les connaissances se développeront sur l'érable à sucre et ses mécanismes de défense, plus les acériculteurs pourront espérer voir un jour apparaître un traitement permettant de limiter le développement du bois coloré suite à l'entaillage, ce qui devrait résulter en de meilleurs rendements de sève et permettre aussi d'améliorer la santé générale des arbres à long terme.

2.6 Références

- **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson JD.** 1989. Biologie moléculaire de la cellule. Deuxième édition, Flammarion, Paris, France. 1219 pages.

- **Allard G**. 1999. L'entaillage des érables. Info-fiche acéricole no.140a0599 du Centre ACER, Saint-Hyacinthe (Qc), Canada. 10 pages.

- **Baayen RP., Ouellette GB et Rioux D**. 1996. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* **86** : 1018-1031.

- **Bélanger RR., Bowen PA., Ehret DL. et Menzies JG**. 1995. Soluble silicon. Its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Dis.* **79:** 329-336.

- **Biggs AR**. 1984. Intracellular suberin : occurrence and detection in tree bark. *IAWA Bull. New Ser*. **5** : 243-248.

- **Boddy L**. 1992. Chapter 6 : Microenvironmental aspects of xylem defenses to wood decay fungi. Tiré du livre de RA Blanchette et AR Biggs (Éds) : Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi , Springer-Verlag. Allemagne. Éditeur de la série : T.E. Timell. pp. 96-132.

- **Bonsen KJM. et Walter M**. 1991. Calcium-layers in xylem vessels*. IAWA Bulletin n.s.* **12:** 67-69.

- **Et-touil A.** 2000. Étude génétique, biochimique et physiologique de la pathogénicité d'*Ophiostoma novo-ulmi*. Thèse de doctorat. Université Laval. Foresterie et géodésie. 154 pages

- **Fawe A., Abou-Zaid M., Menzies JG. et Bélanger RR**. 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* **88:** 396-401.

- **Gerlach D**. 1969. Botanische mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.

- **Grondin J., Rioux D., Guay S., Chevrier N., Renaud J.-P. et Bernier L**. 2003. Effet de phytohormones sur les réactions de défense de l'érable à sucre suite à l'entaillage. *Phytoprotection* **83** : 159-160.

- **Heath MC**. 1981. Insoluble silicon in necrotic cowpea cells following infection with an incompatible isolate of the cowpea rust fungus. *Physiol. Plant Pathol*. **19:** 273-276.

- **Houston DR.** 1971. Discoloration and decay in red maple and yellow birch: reduction through wound treatment. *For. Sci.* **17** : 402-406.

- **Houston DR. et Fagan JC**. 1997. Reexamination of effects of paraformaldehyde on tissues around tapholes in sugar maple trees. *USDA For. Serv. Res. Pap.* NE-706.

- **Jensen WA**. 1962. Botanical histochemistry. W.H. Freeman, San Francisco, USA.

- **Kozlowski TT. et Pallardy SG**. 1997. Physiology of woody plants. Second edition, Academic Press, San Diego, California, USA. 411 pages.

- **Mace ME**. 1963. Histochemical localization of phenols in healthy and diseased banana roots. *Physiol. Plant*. **16** : 915-925.

- **Pearce RB**. 1996. Tansley Review No.87. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol*. **132** : 203-233.

- **Reeve RM**. 1951. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain Techn*. **26** : 91-96.

- **Reynolds ES**. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol*. **17**: 208-212.

- **Rioux D.** 1995. Le compartimentage : un mécanisme de défense de l'arbre. *L'aubelle.* **107** : 1-11.

- **Rioux D. et Ouellette GB.** 1989. Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various nonhost trees and shrubs. *Can. J. Bot*. **67** : 2335-2351.

- **Rioux D. et Ouellette GB**. 1991. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry. *Can. J. Bot*. **69** : 2055-2073.

- **Rioux D., Nicole M., Simard M. et Ouellette GB**. 1998. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. *Phytopathology* **88 :** 494-505.

- **Sakar SK. et Howarth RE**. 1976. Specificity of vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem*. **24** : 317-320.

- **Shigo AL**. 1981. To paint or not to paint. *Brooklyn Bot. Gard. Rec. Plants Gard.* **37** : 20-22.

- **Shigo AL**. 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 189-214.

- **Shigo AL. et Marx HG**. 1977. Compartmentalization of decay in trees. *Agric. Inf. Bull. USDA For. Serv*. No: 405, 73 pages.

- **Shigo AL. et Shortle WC**. 1983. Wound dressings : results of studies over 13 years. *J. Arboriculture* **9** : 317-329.

- **Shigo AL. et Tippett JT**. 1981. Compartmentalization of American elm tissues infected by *Ceratocystis ulmi*. *Plant Dis*. **65**: 715-718.

- **Shigo AL., Gregory GF., Campana RJ., Dudzik KR. et Zimel DM**. 1986. Patterns of starch reserves in healthy and diseased American elms. *Can. J. For. Res*. **16:** 204-210.

- **Shigo AL et Wilson CL**. 1971. Are tree wound dressings beneficial? *Arborist's News* **36** : 85-88.

- **Walters RS. et Shigo AL**. 1978a. Discolouration and decay associated with paraformaldehyde-treated tapholes in sugar maple. *Can. J. For. Res*. **8**: 54-60.

- **Walters RS. et Shigo AL**. 1978b. Tapholes in sugar maples: what happens in the tree. Forest Service technical report. Rep. NE-47. 11 pages.

3 Effet de phytohormones sur les réactions de défense de boutures d'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) suite à des blessures mécaniques.

3.1 Résumé

Cette partie de l'étude a été réalisée pour parfaire le projet principal. Les effets escomptés des phytohormones sur les blessures d'entaillage d'érables matures n'ont pu être démontrées. Les phytohormones ne semblaient pas avoir d'influence sur le compartimentage suite à la coulée. L'utilisation de boutures permettait dans un laps de temps relativement court de mieux comprendre l'effet possible des phytohormones sur des blessures fraîches. Des boutures de deux ans ont été blessées et certaines ont été traitées avec de la lanoline comprenant ou non une substance phytohormonale. Le prélèvement des échantillons a eu lieu trois mois plus tard. La lanoline semble nuire à la fermeture des blessures. Cependant, la lanoline ne semble pas influencer négativement le compartimentage. Le thidiazuron et la bétaïne semblent favoriser les processus physiologiques menant à la formation des murs 4.

3.2 Introduction

Les échantillons préparés pour les observations microscopiques du chapitre 2 de cette étude étaient nombreux mais il y avait peu de répétitions par traitement. Il était difficile de déterminer s'il existait une différence entre les réactions aux divers régulateurs. L'analyse des volumes de bois coloré créé pour chacune des entailles a cependant permis de mettre en lumière certains faits. Aucun régulateur de croissance ne peut diminuer le volume de bois coloré. Toutefois, les entailles fraîchement percées et traitées sur le champ produisent beaucoup moins de bois coloré qu'une entaille traitée après avoir coulé pendant plusieurs jours. La diminution se situe à environ 85%, ce qui est considérable. Il nous est apparu nécessaire de savoir si un traitement hormonal sur une blessure fraîche

pouvait également avoir une influence sur les réactions associées au compartimentage. L'expérience a été quelque peu modifiée et reprise sur des boutures de façon à réduire le temps nécessaire à une nouvelle expérimentation tout en amenant des réponses aux interrogations en seulement quelques semaines. L'utilisation de jeunes boutures d'érable permettait en effet de restreindre certaines difficultés, en particulier le nombre d'arbres à sacrifier pour chacun des traitements. L'application d'un traitement lanoline avec ou sans phytohormones pourrait induire des réactions associées au compartimentage rarement décrites à ce jour chez l'érable à sucre. Comme des études semblables ont déjà été effectuées dans d'autres contextes, l'obtention de résultats valables et facilement comparables entre eux est possible. En effet, dans une étude de Rioux et Ouellette (1991a), l'inoculation du champignon pathogène *Ophiostoma ulmi* à de petites branches d'ormes (*Ulmus americana)* chez des arbres hôtes et non-hôtes de la maladie a permis de démontrer que la vitesse d'établissement des barrières histochimiques est primordiale dans la résistance à la maladie hollandaise de l'orme. Il est fort possible que la présente étude permettra de préciser les effets des régulateurs de croissance et de les comparer. Les résultats de cette étude ont été partiellement présentés lors de la réunion annuelle de la SPPQ (Société de protection des plantes du Québec) de 2002 (Grondin et al., 2002).

3.3 Matériel et Méthodes

3.3.1 L'échantillonnage : arbres, blessures et traitements

Vingt-cinq boutures d'érable à sucre de deux ans, gracieusement fournies par le Ministère des Ressources Naturelles du Québec, ont été empotées dans des contenants de six litres. Ces boutures étaient constituées de trois clones que les responsables du Ministère n'étaient malheureusement pas en mesure d'identifier. Les boutures sont entrées en dormance avant même le début du projet soit en janvier 2002 et par conséquent elles ont dû être gardées au froid pour une période de 3 mois (2°C). Le débourrage s'est effectué graduellement

en serre en exposant les plants à des températures de plus en plus chaudes pour finalement les placer en serre à 22°C le jour et 16°C la nuit avec un minimum de 16 heures de lumière par jour. Le débourrage a amené une poussée de croissance importante. La plupart des plants ont doublé de taille en moins d'un mois. Cette poussée de croissance a permis de séparer en trois blocs les boutures selon leur taille. Ces trois groupes étaient très évidents et il y a de fortes chances qu'ils représentent en fait les trois clones. La terre était gardée humide en permanence car les érables de petite taille supportent très mal le manque d'eau. Les plants étaient fertilisés deux fois par semaine avec une solution d'engrais du commerce de type 20-20-20 à une concentration de 13 mg par litre. Une fois la croissance stabilisée au début de mai 2002, des blessures mécaniques (l'écorce a été enlevée) de 2 mm par 17 mm ont été effectuées sur la tige principale à 15 cm de hauteur sur les 24 arbres séparés en trois blocs selon la taille des plants, soit les petits (moins de 76 cm), les moyens (autour de 92 cm) et les grands (plus grand que 120 cm). Huit traitements ont été effectués et distribués de façon entièrement aléatoire dans chaque bloc de la façon suivante : A : sans lanoline et sans traitement hormonal; B : lanoline seulement; C : acide abscissique; D : acide jasmonique; E : acide salicylique; F : éthylène; G : thidiazuron (une cytokinine); H : bétaïne. Nous avions choisi pour chacun des traitements la concentration de 100 μM dans une pâte de lanoline, soit la concentration intermédiaire parmi celles utilisées précédemment avec nos gros érables. Quelques semaines après les traitements, les plants ont été sortis de la serre et placés en ombrière à l'extérieur, car la forte intensité lumineuse de la serre semblait nuire à la santé des plants.

Les échantillons pour la microscopie ont été prélevés trois mois après les traitements, soit à la mi-août 2002 à deux endroits sur chaque arbre. Tous les échantillons étaient pris en vue de réaliser des coupes transversales. D'abord, l'échantillon dit près de la blessure était prélevé en moyenne dans les 5 mm suivant celle-ci vers le haut. Ensuite, d'autres échantillons ont été prélevés à environ 8 cm en haut de la blessure (figure 1). Ceci est une distance

considérable sur des boutures de cette taille. Ce sont donc des échantillons qui ne devraient pas présenter de réactions typiques de compartimentage, ressemblant donc ici à des témoins.

3.3.2 Fixations et enrobage

Une fois les échantillons prélevés, ceux destinés à l'enrobage dans le Quétol 651 ont été doublement fixés. La fixation a débuté dans le glutaraldéhyde 4% dans du cacodylate 0,1 M (pH 6,8) pendant 2,5 h sous vide. Par la suite, les échantillons ont été rincés trois fois pendant 10 min dans le même tampon. Le tétroxyde d'osmium 1% a été utilisé par la suite en post-fixation pendant 1 h sous vide. Cette fixation a aussi été suivie par des rinçages dans le tampon (3 x 10 min) et avec de l'eau par la suite. Les échantillons ont ensuite été progressivement déshydratés en passant du Quétol 50% dans l'eau (24 h), au Quétol 75% (7 jours), pour passer au Quétol pur (24 h) qui a été ensuite changé et laissé pendant 6 jours pour s'assurer d'une très bonne infiltration. Le milieu a ensuite été remplacé par la formulation d'enrobage sans le catalyseur (DMP-30). Après 5 h dans ce milieu, il a été remplacé par une solution fraîche pour toute une nuit. Les échantillons ont ensuite été enrobés dans la formulation complète (Quetol 651, 7,5g; NSA, 10g; NMA, 6g; DMP-30, 0,3g). Les échantillons enrobés ont été mis au four à 52°C pendant trois jours.

3.3.3 Les coupes

Pour la microscopie photonique, des coupes entre 1 et 3 μm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un Ultracut E microtome (Reichert-Jung, Vienna, Austria). Ces coupes étaient mises sur lames traitées à la poly-L-lysine 10% (Sigma) pour favoriser l'adhérence avant de les colorer avec le bleu de toluidine O à 2% suivi par de la safranine O à 1% selon une méthode décrite précédemment (Rioux et Ouellette, 1989).

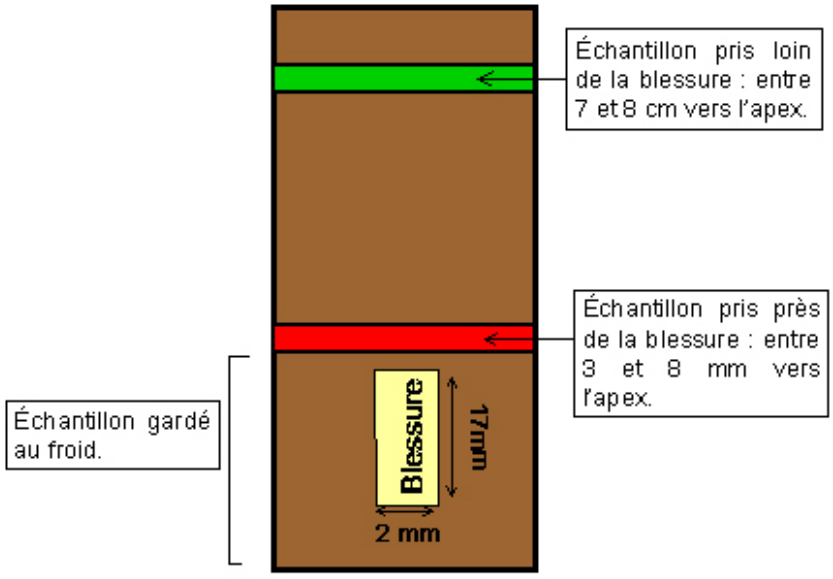


Figure 1 : Schématisation de la prise des échantillons près et loin de la blessure, ainsi que ceux gardés au froid pour analyse histologique.

3.3.4 Microscopie

Les coupes ont été observées à l'aide d'un microscope Orthoplan de Leitz Wetzlar à des grossissements variant de 4 à 100X. La fluorescence et l'autofluorescence étaient révélés à l'aide de ce même microscope aux longueurs d'onde BP 340-380 pour l'illumination ultra-violette (par le filtre excitant composé d'un miroir séparateur RKP 400 et du filtre d'arrêt LP425) et BP 450-490 pour l'illumination bleue (par le filtre excitant composé d'un miroir séparateur RKP 510 et du filtre d'arrêt LP515). L'observation de la biréfringence avec la lumière polarisée a aussi permis de mettre en évidence des substances ayant des structures cristallines. Pour ce faire, des unités polarisantes sont ajoutées au microscope Leitz pour observer les échantillons enrobés dans l'Épon. Les échantillons frais et les blessures ont aussi été observés avec un binoculaire de marque Leitz dont le grossissement varie de 6,3 à 32X. Les photos ont été prises avec la caméra numérique Spot RT Slider (Diagnostic Instruments, Inc.) et le logiciel l'accompagnant, soit le SPOT RT v3.1 pour Windows. Les photos ont été retouchées avec le logiciel Adobe PhotoShop 6.0.

Des coupes ultrafines, de couleur jaune paille lorsqu'elles flottaient sur l'eau, contrastées avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds 1963, cité dans Rioux et Ouellette, 1991b) ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Philips 420 (80kV).

3.3.5 Histochimie

Les échantillons frais non fixés ont été refroidis rapidement et gardés à -80°C. Par la suite, ils ont été enrobés dans le Tissue-Tek O.C.T. Compound (Miles Scientific, Slough, UK) et des coupes d'environ 30 μm ont été obtenues à l'aide d'un cryomicrotome Histostat (Reichert, Vienna, Austria) à -20°C. Comme décrit au chapitre précédent, les coupes ont été traitées au pholoroglucinol-HCl et examinées sous lumière normale pour détecter la lignine. La présence de subérine est révélée à l'aide de ces mêmes coupes observées sous

épifluorescence violette puisque le phloroglucinol masque l'autofluorescence de la lignine et laisse celle de la subérine s'exprimer (Biggs, 1984). Les coupes ont aussi été examinées sous excitation avec un filtre bleu.

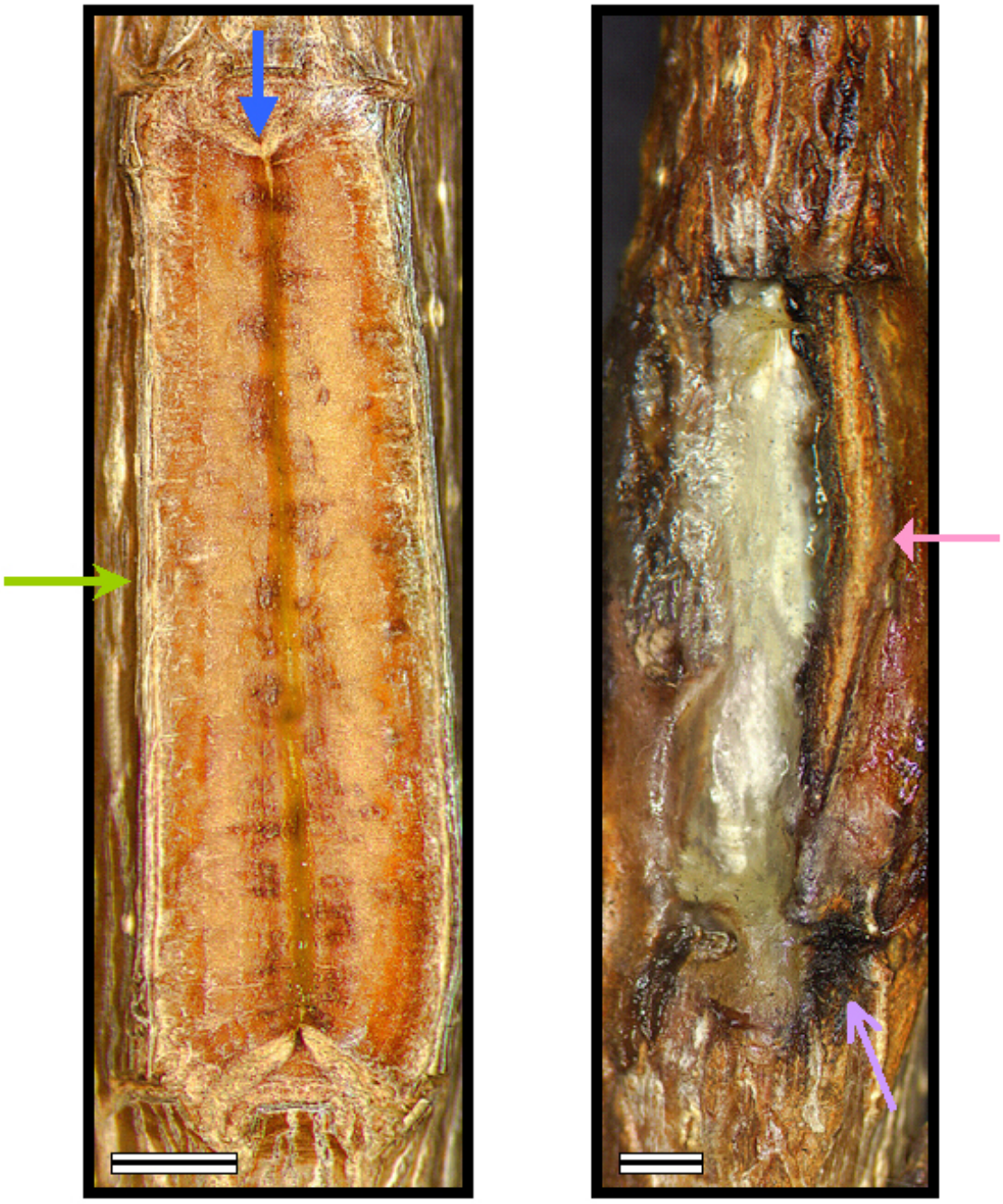
3.4 Résultats et discussion

3.4.1 Fermeture des blessures

Des examens périodiques suite aux blessures ont permis de déterminer que les blessures n'ayant reçu ni lanoline, ni phytohormones, se refermaient beaucoup plus rapidement que celles ayant reçu de la lanoline avec ou sans phytohormones (figure 3). Chez ces témoins, la fermeture des blessures était complète environ 21 jours après le début de l'expérience (figure 2). Au moment de fixer le matériel pour la microscopie, seuls les échantillons témoins montraient une fermeture complète des blessures.

Les réactions de fermeture observées chez les blessures traitées étaient beaucoup plus variables. Cependant, avec la lanoline, contenant ou non un régulateur de croissance., aucune réaction de fermeture n'a été observée jusqu'à la toute fin du projet, soit trois mois suivant le dommage. Chez certaines blessures traitées aux phytohormones, la tentative de fermeture avait débuté au moins un mois plus tard que chez les témoins. Plusieurs blessures présentaient un renflement important de l'écorce vers l'extérieur (figure 3). En définitive, Il aurait fallut plusieurs semaines additionnelles pour permettre une fermeture complète de tous les échantillons ayant été traités à la lanoline.

La réaction inverse était attendue. En effet, McDougall et Blanchette en 1996 ont induit une meilleure fermeture de blessures fraîches en appliquant une pellicule de polyéthylène (PEP). Cependant, la nature de la lanoline est considérablement différente de celle de la PEP. En effet, la lanoline colle bien dans la blessure et elle reste en place facilement. La lanoline pénètre dans la blessure, elle ne demeure pas en surface comme le fait une pellicule.



Figures 2 et 3 : Suivi de la fermeture des blessures. Fig. 2 : Blessure n'ayant subi aucun traitement. Fermeture complète de la blessure rapidement. Le centre de la blessure (flèche bleue) est bien lié et il n'y a aucune nécrose d'observée sur le pourtour de la blessure (flèche verte). Fig.3 : Blessure ayant subi le traitement phytohormonal THIDIA dans de la lanoline. Essai de fermeture infructueux. Beaucoup de nécrose (flèche violette). Il y a aussi un important renflement du côté droit de la blessure qui semble sain. Ceci semble être un essai de fermeture de la blessure (flèche rose).

(Barre = 1 mm)

La lanoline nuit donc à la fermeture des blessures, probablement en causant une certaine nécrose des cellules entourant la zone blessée.

3.4.2 Observations microscopiques

Contrairement à ce à quoi on s'attendait, les différences histologiques ne furent pas très évidentes entre les différents traitements hormonaux sur les boutures d'érable suite à des blessures. Néanmoins, certaines particularités ont pu être notées bien qu'il soit difficile de les attribuer directement aux traitements car les réponses étaient hétérogènes entre les différents arbres. C'est le cas notamment pour un arbre traité à l'acide abscissique qui présentait une réaction très intéressante, mais que l'on ne retrouvait pas de façon aussi nette chez les deux autres arbres.

Les réactions de compartimentage découlant des blessures sans aucun traitement (figure 4) et celles des blessures traitées avec la lanoline seule étaient très semblables en ce sens qu'aucun changement histologique important n'était noté. L'observation des échantillons sans aucun traitement a permis de constater qu'il y a très peu de vaisseaux dans le second cerne et qu'ils sont de taille réduite. Du côté des échantillons traités uniquement avec la lanoline, les vaisseaux étaient en nombre plus important, mais ils étaient souvent déformés et affaissés. La lanoline ne semble pas influencer le compartimentage des blessures chez les boutures.

On constate rapidement que le traitement à la cytokinine thidiazuron (THIDIA) ainsi que le traitement à la bétaïne (Bx) ont provoqué des réactions intenses tout à fait différentes des deux types de témoin et des autres traitements. De plus, il y a des différences particulières entre les réponses suite à l'application de THIDIA et de Bx.

Pour le THIDIA, les trois arbres présentent une réaction très semblable près de la blessure (figure 6). Les observations microscopiques des trois arbres sont constantes d'une bouture à l'autre. Un peu après le début du second et plus

récent cerne de croissance, une forte réaction est observée où, soudainement, les vaisseaux sont de taille réduite et ne sont pas aussi nombreux que précédemment. Suite à la coloration avec le bleu de toluidine O, on observe beaucoup de bleu foncé localisé surtout dans les rayons, mais aussi dans des vaisseaux et des fibres (figure 7). Cette coloration est habituellement associée aux phénols (Baayen et al., 1996). Cette forte réaction ressemble à celle généralement observée dans un mur 4. Dans le cerne précédant la blessure, les rayons sont pour la plupart unis ou bisériés alors que suivant la formation du M4, ils sont majoritairement multisériés et contiennent beaucoup de phénols. De plus, du côté de la blessure, il y a une forte excroissance et un épaississement important de l'écorce (figure 8). La réaction est forte et facilement repérable sur les coupes. Ces caractéristiques sont aussi observables à 8 cm de la blessure mais elles sont atténuées (figure 5). Le THIDIA pouvait probablement voyager dans la plante ou à tout le moins causer une réaction à distance. Ceci laisse supposer qu'il est plus persistent que ce que l'on croyait au départ et qu'il n'est pas aussi volatil que prévu. Cependant, on sait qu'une exposition rapide des tissus au THIDIA est suffisante pour stimuler la régénération des cellules (Visser et al., 1992 ; Hutchinson et Saxena, 1996 tous les deux cités dans Murthy et al, 1998). De plus, seulement une faible concentration de THIDIA, 10 pM par exemple, semble suffisante pour provoquer une forte réponse des cellules (Preece et al., 1991 cité dans Murthy et al., 1998). La concentration ajoutée à la lanoline dans ce cas-ci est de 100 μM, donc 10^7 fois plus que rapporté dans la littérature. Ainsi, le THIDIA a pu facilement jouer son rôle dans ces cas-ci. Les cytokinines jouent un rôle central dans le cycle cellulaire et elles favoriseraient la division et la différenciation des cellules. C'est un fait intéressant dans l'éventualité de la formation des M4 vu que ceux-ci sont en fait nouvellement synthétisés par le cambium. La formation d'un M4 demande un grand nombre de divisions cellulaires et ces nouvelles cellules sont spécialisées dans la défense de l'arbre. Ceci porte à croire que c'est la cytokinine qui aurait agi ici et qu'elle aurait facilité la formation d'un M4 fort et complet dans la bouture.

Le traitement Bx comporte lui aussi ses particularités. Ces réactions sont très différentes de celles observées chez les autres arbres, mais elles se répètent tout de même chez les trois arbres. La principale réaction se trouve à la toute fin du cerne et il y a une différence notable entre l'échantillon pris près de la blessure (figure 9) et celui pris à 8 cm de celle-ci (figure 10). On remarque sur les coupes ce qui semble être des arrêts de croissance un peu avant le cambium occasionnant la formation de cernes très étroits. Dans ces zones de ''fausses'' fins de cerne, il n'y a peu ou pas de vaisseaux et il y a beaucoup de phénols colorés en bleus par le bleu de toluidine O. Cependant, cette coloration est peu évidente dans les rayons (figure 11). Le fait que les réactions soient similaires chez les trois arbres et ne se retrouvent chez aucun des autres arbres, exclut des arrêts de croissance dus à des facteurs extérieurs aux traitements phytohormonaux. Malgré cet arrêt de croissance en fin de cerne, la figure 12 présente une croissance stimulée du côté de la blessure avec des bandes noires qui rappellent fortement l'apparence des M4. Donc, l'arrêt de croissance se ferait en fin de cerne seulement. La bétaïne est un osmoprotecteur. Lors d'un stress, cette substance peut s'accumuler en grande quantité sans risque de toxicité chez la plante. Les osmoprotecteurs permettent un fonctionnement normal du métabolisme dans les cellules où le potentiel osmotique est désajusté. Les modes d'action de ces molécules ne sont pas encore tous élucidés, mais il est évident que, jusqu'à un certain point, la bétaïne agirait comme un ''capteur d'eau'' qui permettrait de stabiliser la conformation quaternaire des protéines leur permettant ainsi d'être fonctionnelles même lorsque les conditions sont préjudiciables (McNeil et al., 1999). La bétaïne ordonnerait davantage la structure des membranes souvent mise à rude épreuve lors des différents dommages pouvant affecter un organisme (Gorham, 1955 cité dans Sakamoto et Murata, 1999). Comme une blessure est un stress important pour une bouture d'érable à sucre, on peut de ce fait s'attendre à une production importante d'osmoprotecteurs divers. Cependant, il n'est pas encore connu à ce jour si l'érable à sucre est un accumulateur de bétaïne. Néanmoins, il est fréquemment mentionné que l'application exogène de bétaïne sur les feuilles ou les racines de

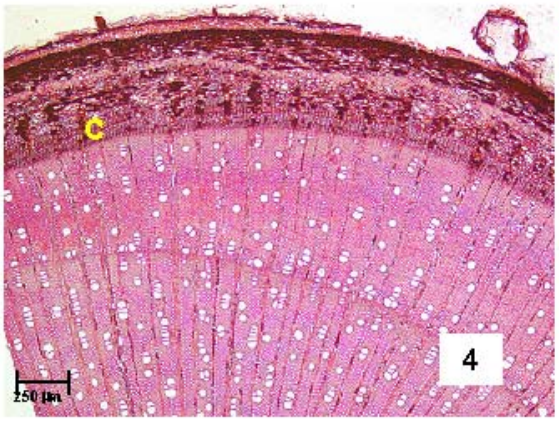
plantes améliore considérablement la résistance aux stress (Itai et Paleg, 1982; Harinasut et al., 1996; Mäkelä et al., 1996; Hayashi et al., 1998 ; tous cités dans Sakamoto et Murata, 1999). L'application d'une couche de lanoline contenant de la bétaïne permettrait de protéger l'arbre du stress encouru par la blessure. En stabilisant les cellules près de la blessure, la Bx a probablement favorisé la formation d'un genre de M4, mais la substance semble avoir retardé la croissance des arbres ainsi traités. Il n'y avait pratiquement pas de vaisseaux et peu de rayons à la suite du traitement. La réaction se situait à la toute fin du cerne. Ainsi, l'arbre a pris un certain temps à percevoir l'effet de la blessure que lui cachait probablement la bétaïne, ou la lanoline, ou l'effet combinée des deux substances.

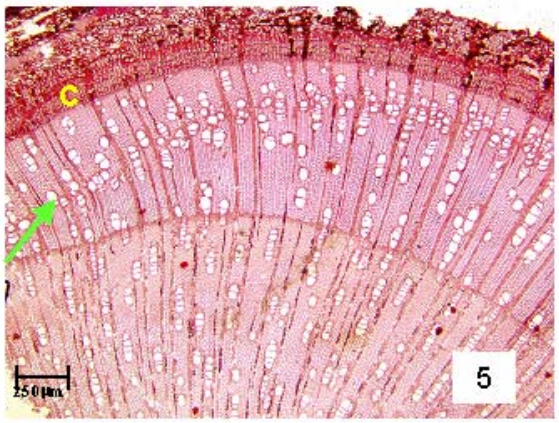
Les autres traitements phytohormonaux montrent d'autres particularités, bien qu'elles ne se répètent pas d'un arbre à l'autre. C'est le cas notamment du petit arbre traité avec l'acide abscissique. Il y a une forte coloration à la toluidine O, qui semble montrer un amas de phénols surtout dans les rayons devenus fortement multisériés au centre du second cerne de croissance. Les vaisseaux sont de très petite taille et souvent segmentés. Le tout forme une barrière facilement distinguable du reste. De plus, tout le cerne semble subir les contrecoups de la blessure en réagissant faiblement. Mais aucune réaction semblable n'est retrouvée chez les autres arbres. Ces petites particularités, en particulier l'accumulation de phénols, sont retrouvées autant chez des arbres témoins que dans les échantillons pris loin de la blessure.

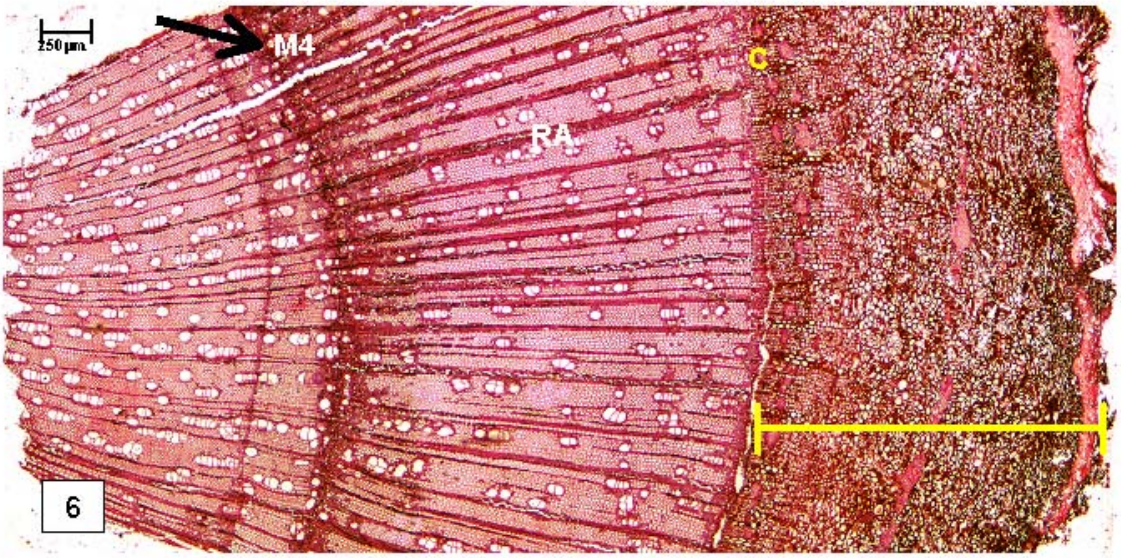
3.5 Conclusion

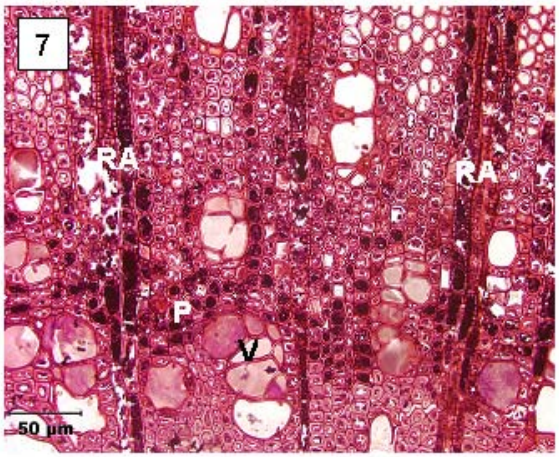
Finalement, à part les traitements Bx et THIDIA, aucune différence frappante et, surtout, attribuable aux traitements n'a pu être décelée. De plus, même si les réponses aux traitements étaient observées de façon systématique sur chacun des arbres, il a été impossible pour Mme Michèle Bernier-Cardou, statisticienne pour Ressources naturelles Canada au Centre de foresterie des Laurentides de démontrer par un test statistique une différence significative entre les différents

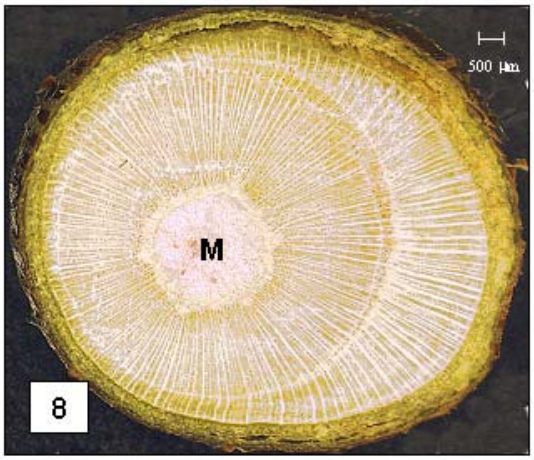
traitements. Au minimum, pour les calculs de résultats binaires, il aurait fallu avoir au moins 10 arbres pour chacun des traitements. Vu la rareté de boutures saines et la difficulté d'en produire, il nous a été impossible d'en trouver plus pour cette expérience. Cependant, le projet a bien rempli son principal objectif, soit de donner des pistes de recherches intéressantes pour le projet principal. Ainsi, on apprend que l'application de THIDIA peut favoriser le développement d'un mur 4, probablement en facilitant la division des cellules. La bétaïne, par contre, semble créer un exutoire à l'arbre, qui ne perçoit pas la nécessité d'avoir une croissance stimulée pour répondre à la blessure. Reste à savoir si les autres phytohormones amènent, elles aussi, des changements anatomiques intéressants qui n'ont pu être décelés au cours de la présente étude vu la petite taille de l'échantillonnage. L'application exogène est une méthode intéressante pour évaluer l'effet des phytohormones sur un arbre.

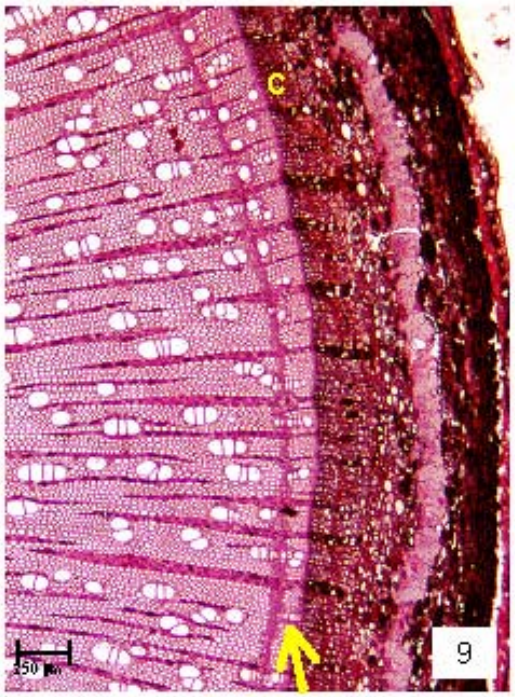

C
250 µm
4

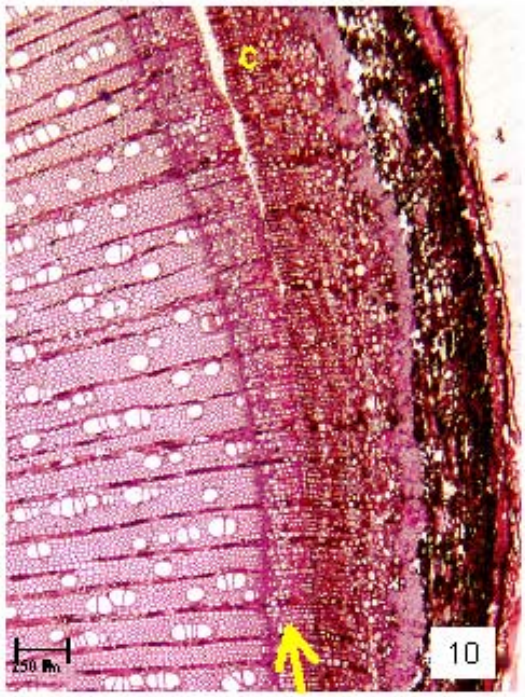

C
250 µm
5

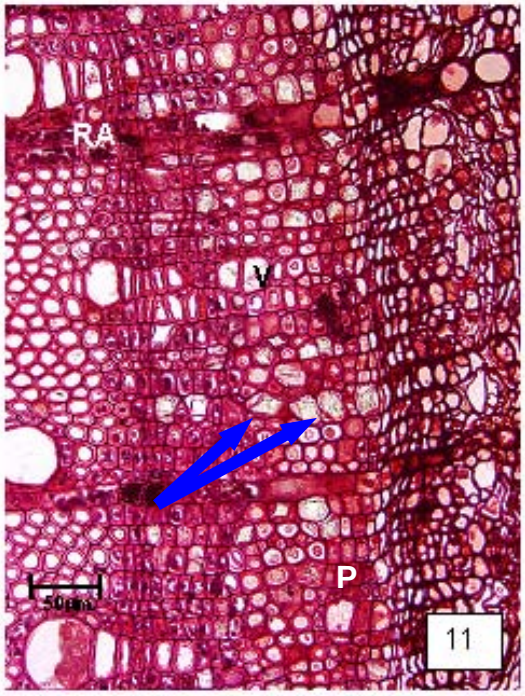

250 µm
M4
RA
C
6


7
RA
RA
P
V
50 µm


500 µm
M
8


C
9


C
10


RA
V
P
11

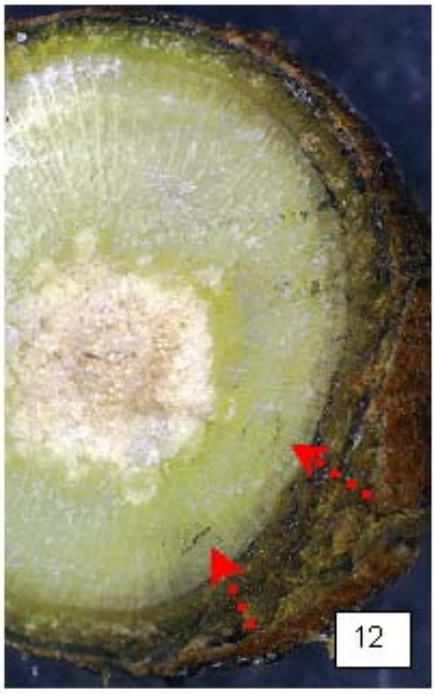

12

Figure 4 à 8. Réactions anatomiques des boutures d'érable à sucre aux divers traitements. **Fig. 4** : Presque aucune réaction chez un témoin même près de la blessure. Il y a peu de vaisseaux dans le second cerne qui n'est pas de largeur uniforme. **Fig. 5** : Échantillon à 8 cm d'une blessure traitée avec le THIDIA. On voit un amas de petits vaisseaux (flèche verte) au centre du cerne qui semble indiquer une réaction de genre M4 fortement atténuée. **Fig. 6** : Échantillon pris près d'une blessure traitée avec le THIDIA. Réaction forte dans le mur 4 (M4) (flèche noire). Peu de vaisseaux suite au M4 et ils sont petits. Beaucoup de rayons activés qui passent d'unisériés à bi ou trisériés après le mur 4. L'écorce (ligne jaune) est plus épaisse que chez les témoins. **Fig. 7** : Une partie du M4 de la figure 6 à plus fort grossissement. Les cellules de parenchyme (P) contiennent une quantité importante de composés colorés foncés semblant indiquer la présence de phénols. Les rayons activés (RA) suite au mur sont évidents, colorés foncés et élargis. Plusieurs vaisseaux (V) sont obturés. **Fig. 8** : Échantillon montrant une forte croissance du côté de la blessure (à droite) seulement.

Légende **C** = cambium ; **M** = moelle; **RA** = rayons.

Figure 9 à 12. Réactions anatomiques des boutures d'érable à sucre aux traitements Bx. **Fig. 9** : Échantillon pris loin de la blessure. La flèche jaune indique l'endroit où la réaction apparaît habituellement près de la blessure (ceci pour faciliter la comparaison). **Fig. 10** : Échantillon pris près de la blessure. La réaction juste avant le cambium est montrée par la flèche jaune; il n'y a aucun vaisseau visible et les parois des fibres semblent épaissies. Remarquer la différence évidente avec la figure 9. **Fig. 11** : Une partie de la réaction de la figure 10 à plus fort grossissement. Les cellules de parenchymes (P) à parois épaisses contiennent une quantité importante de composés colorés foncés semblant indiquer la présence de phénols. Les rayons activés (RA) suite au mur ne sont pas très évidents. Les rares vaisseaux présents sont très petits, segmentés et semblent contenir des occlusions (flèches bleues). **Fig. 12** : Échantillon montrant une croissance plus forte du côté de la blessure (en haut seulement). Les flèches rouges indiquent des bandes noires qui se rapprochent grandement d'un M4, qui serait toutefois discontinu. Ces bandes n'ont pas été retrouvées dans les échantillons fixés et enrobés dans la résine.

Légende **C** = cambium ; **M** = moelle.

3.6 Références

- **Baayen RP., Ouellette GB. et Rioux D**. 1996. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* **86** : 1018-1031.

- **Biggs AR.** 1984. Intracellular suberin: occurrence and detection in tree bark. *IAWA Bull*. **5** : 243-248.

- **Grondin J., Rioux D., Guay S., Chevrier N., Renaud J.-P. et Bernier L**. 2003. Effet de phytohormones sur les réactions de défense de l'érable à sucre suite à l'entaillage. *Phytoprotection* **83** : 159-160.

- **McDougall DN. et Blanchette RA.** 1996. Polyethylene plastic wrap for tree wounds: a promoter of wound closure on fresh wounds. *J. Arboriculture*. **22** : 206-210.

- **McNeil SD., Nuccio ML. et Hanson AD.** 1999. Betaines and related osmoprotectrants. targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* **120** : 945-949.

- **Murthy BNS., Murch SJ. et Saxena Praveen K.**. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant.* **34** : 267-275.

- **Rioux D. et Ouellette GB.** 1989. Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various nonhost trees and shrubs. *Can. J. Bot*. **67** : 2335-2351.

- **Rioux D. et Ouellette GB.** 1991a. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry. *Can. J. Bot*. **69** : 2055-2073.

- **Rioux D. et Ouellette GB.** 1991b. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi* II. Ultrastructure. *Can. J. Bot*. **69** : 2074-2083.

- **Sakamoto A. et Murata N**. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants : current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **51** : 81-88.

CONCLUSION DU MÉMOIRE

Étant donné l'importance de l'acériculture dans l'économie québécoise, il était opportun d'élaborer un projet de recherche visant à mieux comprendre l'érable à sucre et particulièrement ses mécanismes de défense. Même si ce mémoire n'a pas répondu à toutes les attentes quant aux effets possibles des régulateurs de croissance sur la stimulation des réactions de défense de l'érable à sucre suite à l'entaillage, il a tout de même permis de mieux comprendre le compartimentage chez cet arbre suite à ce type de blessure. Par exemple, des composés intimement associés aux murs 3 et 4 et présentant une autofluorescence particulière ont été observés pour la première fois chez cette essence. Ces composés semblent améliorer sensiblement la continuité des murs, particulièrement les murs 3.

Plusieurs de nos résultats montrent qu'il serait possible d'améliorer la production à moyen terme des érablières en favorisant un meilleur compartimentage qui réduirait le développement des zones improductives dans le bois. En effet, le développement de bois coloré peut être stabilisé en utilisant la lanoline dont l'effet principal est probablement de bloquer l'entrée d'air dans l'arbre. De plus, l'utilisation d'entailles à diamètre réduit permet de diminuer considérablement le développement du bois coloré improductif dans le xylème. Les résultats obtenus avec les boutures d'érable à sucre démontrent aussi que certains régulateurs ont un effet positif sur les mécanismes de compartimentage. Encore une fois, une analyse plus poussée amènerait un complément d'information qui pourrait aisément mener à des nouveautés dans la façon de percevoir les mécanismes de défense, ceci pouvant aussi être utile pour le traitement des blessures des arbres en milieu urbain

ANNEXE 1

J'ai participé au cours de ma maîtrise à un projet sur les conséquences du verglas dans les érablières. Mes connaissances acquises lors de la manipulation d'échantillons d'érable à sucre ont été mises à profit au cours de la présente étude. Voici les actes d'un colloque sur le verglas tenu en 2003 pour lequel je suis quatrième auteur.

Le compartimentage des zones entaillées chez des érables à sucre affectés par la tempête de verglas de 1998

Rioux, D.[1], Guay, S.[2], Raulier, F. [1], Grondin, J.[1] et Renaud, J.-P.[2]

1 Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Laurentides, 1055, rue du P.E.P.S., Case postale 3800, Sainte-Foy (Québec) G1V 4C7
2 Centre ACER, 3600, boul. Casavant Ouest, St-Hyacinthe (Québec) J2S 8E3

Introduction

Le compartimentage est probablement le mécanisme de défense le mieux connu chez l'arbre. Suite à une revue des études réalisées au cours du dernier siècle sur les mécanismes de défense pour contrer l'envahissement du bois par différents microorganismes, et en tenant compte de leurs propres observations, Shigo et Marx (1977) proposèrent le modèle CODIT (Compartmentalization Of Decay In Trees) pour expliquer comment l'arbre se défend face aux champignons de carie. Le compartimentage a par la suite permis d'expliquer comment l'arbre résiste à d'autres dommages affectant le bois telles les maladies vasculaires (Tippett et Shigo 1981) et les blessures mécaniques (Shigo 1984). On allait par la suite étendre le même principe à d'autres parties de l'arbre, par exemple à l'écorce ayant subi des blessures mécaniques ou des attaques par des agents causant des chancres (Biggs et al. 1984). Succinctement, le compartimentage fait appel à la formation de différentes zones de protection qui vont cloisonner la zone endommagée avant de former

des tissus sains autour des tissus compartimentés. Dans le bois, ces zones sont aussi appelées « murs ». Les murs 1, 2 et 3 sont formés par des cellules déjà présentes au moment de l'invasion et ils limitent respectivement la colonisation longitudinale, radiale et tangentielle des microorganismes. Le cambium, qui génère le xylème (bois) et le phloème (écorce interne), contribue au processus en formant le mur 4 qui est aussi appelé « barrière de protection ». Ce mur est le plus efficace du modèle, isolant le bois atteint du bois sain que le cambium produira ultérieurement. Pour le lecteur intéressé, il existe des articles de synthèse sur le compartimentage (Pearce 1996, 2000; Rioux 1995; Shigo 1984).

Suite à la tempête de verglas de 1998, une des principales questions que plusieurs se sont posés était de savoir jusqu'à quel point le potentiel de défense des érables à sucre allait être affecté considérant qu'une bonne partie des réserve de l'arbre allait devoir être consacrée à la reconstitution des cimes. À cet égard, le développement des champignons de coloration et de carie du bois dans les parties endommagées de l'arbre était une préoccupation. Une autre interrogation était de déterminer si les arbres endommagés par le verglas allaient toujours pouvoir bien fermer les blessures d'entaillage et compartimenter la zone d'exploitation du bois suite à la collecte de sève. La présente étude traite du développement de structures associées au compartimentage visant à limiter le développement du bois improductif suite à l'entaillage chez des arbres affectés par le verglas.

Matériel et méthodes

Les arbres étudiés avaient des cimes résiduelles variant de 0 à 90 % et provenaient d'érablières privées situées dans le comté du Haut-Saint-Laurent, en Montérégie (voir Raulier et al. dans le présent document pour plus de détails). À l'automne 2001, 23 arbres affectés par la tempête de verglas et ayant été entaillés ont été abattus pour étudier le développement des zones de bois coloré ainsi que pour préparer des échantillons pour la microscopie. Des découpes de tronc couvrant entièrement le bois coloré généré par l'entaillage ont été polies avant d'être analysées pour calculer les longueurs des colonnes de bois coloré. Comme le développement radial et tangentiel du bois coloré était constant et

sensiblement égal aux dimensions du trou d'entaillage, le calcul des longueurs nous a semblé être une méthode facile et fiable d'obtenir une bonne approximation du volume de bois coloré dans l'arbre. Pour la microscopie, les échantillons ont été prélevés dans les murs 3 et 4 entourant les entailles, dans le bois sain et dans le bois coloré (Fig. 1). Les échantillons ont été fixés dans du glutaraldéhyde et du tétroxyde d'osmium, tel que décrit dans Rioux et Ouellette (1989), avant d'être enrobés dans le Quétol suivant la méthode de Abad et al. (1988). Quatre blocs ont été préparés pour chacune des 82 zones étudiées (p. ex., quatre blocs pour le mur 3 d'une des entailles étudiées). Les coupes (environ 1 μm) obtenues avec un microtome Ultracut Reichert-Jung ont été colorées avec le bleu de toluidine O et la safranine O (Rioux et Ouellette 1989). Environ 40 échantillons additionnels ont été congelés en vue d'effectuer des tests histochimiques visant à préciser la nature chimique des structures observées en réponse à l'entaillage. Le matériel était alors enrobé dans le Tissue-Tek O.C.T. et les coupes (environ 40 μm) étaient obtenues à l'aide d'un cryomicrotome Reichert HistoStat. Plusieurs de ces coupes ont été colorées avec le phloroglucinol-HCl qui révèle la présence de lignine. Les échantillons ont été observés à l'aide d'un binoculaire Wild Heerbrugg M400 ou d'un microscope Leitz Orthoplan muni d'un dispositif d'épifluorescence sous lumières violette et bleue. Les photographies ont été prises avec une caméra numérique Spot RT Slider.

Résultats

L'analyse d'images de découpes de tronc n'a pas permis d'obtenir de corrélation entre les longueurs des colonnes de bois coloré et la sévérité des dommages (Fig. 2). En regroupant les données selon les années où l'entaillage avait été réalisé, il a été impossible d'établir une relation entre les années d'entaillage et l'importance du développement du bois coloré dans l'arbre, à l'exception d'une différence significativement plus faible pour l'année 2001. Considérant que les arbres ont été abattus à l'automne 2001, ce dernier résultat n'est pas surprenant puisque le bois coloré se développe pendant au moins deux saisons de croissance. Une autre difficulté rencontrée au cours de l'étude était l'impossibilité occasionnelle d'évaluer le bois coloré associé à certaines entailles étant donné les

chevauchements inévitables avec d'autres blessures d'entaillage chez des arbres ayant été surexploités (Fig. 3). Par conséquent, ces trous d'entaillage n'ont pu faire l'objet d'une analyse.

L'examen microscopique des échantillons révélait que les murs 3 et 4 étaient généralement continus autour du bois affecté par l'entaillage. Au binoculaire, les murs 3 et 4 apparaissaient souvent comme une bande verte autour du bois bruni par la blessure (Fig. 4). Le mur 4 était particulièrement facile à détecter à l'aide du microscope photonique et était généralement constitué de plusieurs couches de cellules qui contenaient des composés phénoliques détectés à l'aide du bleu de toluidine O (Fig. 5). Toutefois, il arrivait que des zones de compartimentage qui semblaient continues lorsque observées à l'œil nu présentaient des discontinuités lorsque des examens plus poussés étaient réalisés (Fig. 6). L'inverse était aussi possible puisqu'à l'occasion, aux endroits où nous pensions qu'il y avait des discontinuités, l'observation de coupes sous fluorescence révélait la présence de composés autofluorescents. Ces derniers étaient probablement de nature phénolique; ces derniers sont capables de freiner la propagation des bactéries et champignons fréquemment observés dans le bois affecté par l'entaillage. Le tableau 1 résume les données recueillies concernant les murs 3 et 4 et les dommages que les arbres avaient subis. Les analyses statistiques n'ont pas permis de dégager de différences significatives avec ces données.

Les nombreux examens microscopiques ont révélé de nouveaux faits relativement au compartimentage chez l'arbre. En particulier, l'utilisation du phloroglucinol-HCl, qui permet de détecter la lignine et d'autres polyphénols complexes, a mis en évidence pour la première fois des murs 3 tout à fait spectaculaires en bordure du bois affecté par l'entaillage (Fig. 7). Ces murs 3 étaient constitués en grande partie de cellules des rayons ayant accumulé ces substances et d'occlusions présentes dans de nombreux vaisseaux contigus à ces rayons. Une autofluorescence jaune détectée sous lumière bleue dans les murs 3 et 4 était un autre résultat inédit. Il semble que cette autofluorescence soit associée aux zones vertes entourant le bois affecté. Des tests histochimiques additionnels devront toutefois être conduits afin de préciser la nature chimique de ces composés.

Discussion

Toutes les données recueillies au cours de cette étude semblent indiquer que les arbres ayant perdu une bonne partie de leur cime suite à la tempête de verglas de 1998 sont capables de bien compartimenter les blessures d'entaillage. Il est possible qu'à long terme l'influence des dommages dus au verglas se fasse tout de même sentir. Pour le moment, il nous a été impossible d'établir une relation entre la sévérité des dommages et la présence de discontinuités dans les tissus de compartimentage. Il faut cependant dire que seulement la moitié des blocs de chaque zone étudiée ont été coupés pour faire les examens microscopiques. Quoique ce nombre soit amplement suffisant dans plusieurs types d'étude microscopique, il apparaît maintenant clairement que les tissus de compartimentage devront être étudiés plus minutieusement dans toute leur longueur si l'on souhaite y évaluer la présence de discontinuités. Il est probable que si nous trouvons les ressources nécessaires pour couper les 164 blocs restants, une relation entre la fréquence des discontinuités et la sévérité des dommages pourra être établie.

Le fait que les microorganismes associés à la coloration et à la carie du bois restent confinés à plus ou moins la largeur de l'entaille au-dessus et au-dessous de celle-ci, en dépit des discontinuités, suggère deux explications qui ne s'excluent pas forcément l'une l'autre. La première est que le bois envahi par les bactéries et champignons a accumulé de nombreux composés possédant des propriétés antimicrobiennes, généralement appelés phytoalexines (Gottstein et Gross 1992; Kuć 1972), qui freinent considérablement la croissance des microorganismes et les empêchent ainsi d'envahir les tissus sains adjacents. L'autre explication concerne la forte concentration en eau du bois sain entourant le bois affecté par l'entaillage. Ce bois saturé d'eau ne favoriserait pas le développement des microorganismes, en particulier parce qu'il contient trop peu d'oxygène (Boddy 1992). Avec le temps, ce bois sera de moins en moins impliqué dans le transport de la sève brute et il deviendra alors un milieu plus propice au développement des champignons de coloration et de développement du bois. Comme plusieurs discontinuités ont été notées dans les tissus de compartimentage, et bien qu'il soit difficile à ce stade de faire des prédictions, il est

possible que la coloration se répandra plus rapidement dans ces arbres dans quelques années.

Il reste donc du chemin à parcourir afin de mieux comprendre comment la tempête de verglas aura affecté le pouvoir de défense des arbres endommagés. Pour le moment, il semble opportun de souligner que les arbres affectés sont capables de réagir beaucoup plus efficacement que les premières prédictions le suggéraient. La présente étude aura permis de révéler, entre autres, de nouvelles caractéristiques anatomiques associées au compartimentage chez l'arbre. Malheureusement, nos connaissances des processus physiologiques à la base de cet important mécanisme de défense demeurent pour le moment très fragmentaire. Il serait grandement souhaitable dans un proche avenir que les recherches dans ce domaine portent sur les hormones impliquées lors de l'induction du compartimentage. À l'exception de quelques rares études, comme celle de Smith et Shortle (1990) chez l'érable rouge, les efforts en ce sens ont été très limités. Il est clair pour nous que des percées dans ce domaine pourraient permettre de stimuler le compartimentage de l'arbre suite à des blessures mécaniques tel l'entaillage.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les personnes suivantes du Centre ACER pour leur aide lors du prélèvement des échantillons : Guy Boudreau, Michel Cartier, René DesRuisseaux et Julien Lavoie. Nos remerciements vont aussi à Marie Simard (Service canadien des forêts) pour son aide précieuse lors du prélèvement et de la préparation des échantillons pour les examens microscopiques.

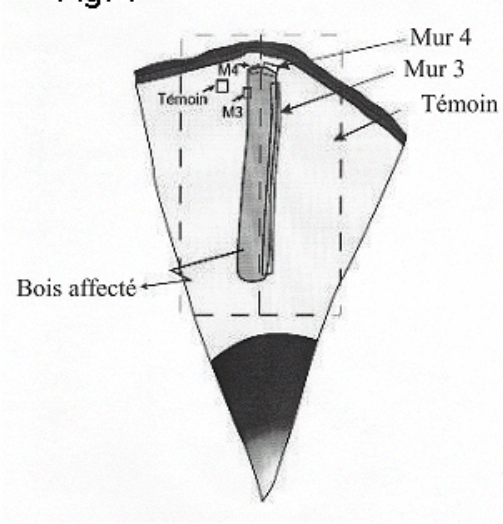
Références

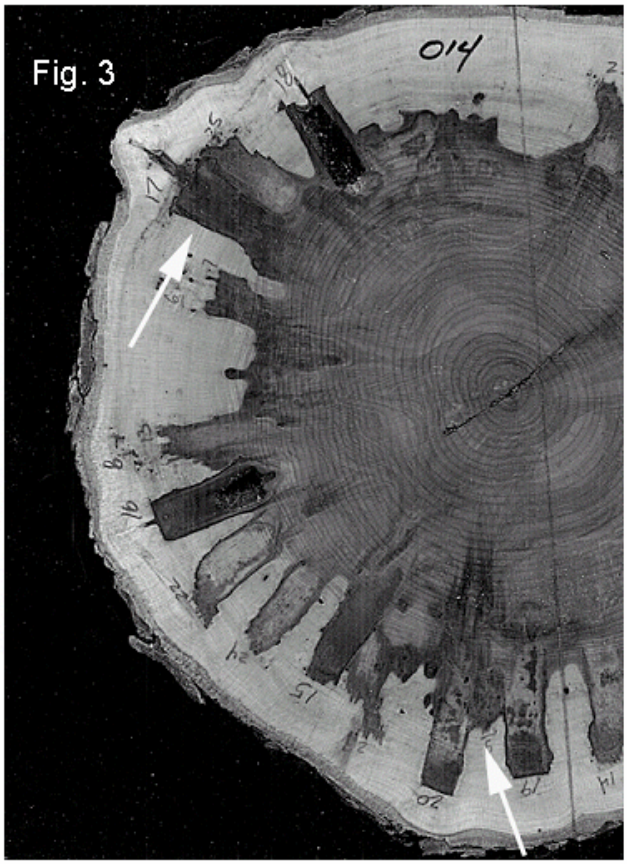
- Abad, A.R., Cease, K.R., et Blanchette, R.A. 1988. A rapid technique using epoxy resin Quetol 651 to prepare woody tissues for ultrastructural study. Can. J. Bot. 66: 677-682.

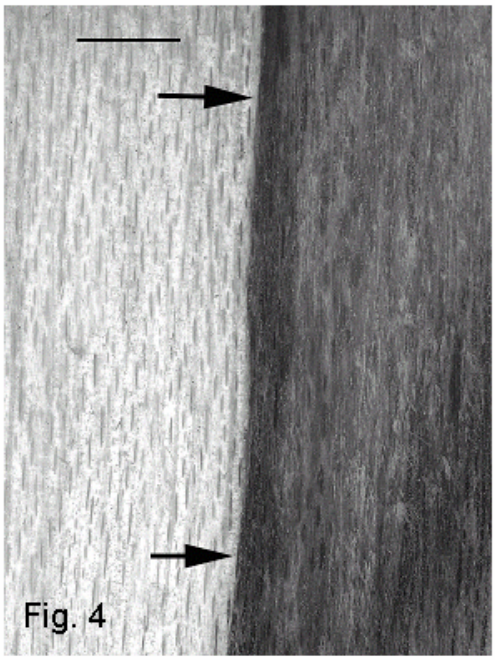
- Biggs, A.R., Merrill, W., et Davis, D.D. 1984. Discussion: Response of bark tissues to injury and infection. Can. J. For. Res. 14: 351-356.
- Boddy, L. 1992. Microenvironmental aspects of xylem defenses to wood decay fungi. Dans: Defense mechanisms of woody plants against fungi (R.A. Blanchette et A.R. Biggs, éditeurs). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 96-131.
- Gottstein, D., et Gross, D. 1992. Phytoalexins of woody plants. Trees 6: 55-68.
- Kuć, J. 1972. Phytoalexins. Annu. Rev. Phytopathol. 10: 207-232.
- Pearce, R.B. 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. New Phytol. 132: 203-233.
- Pearce, R.B. 2000. Decay development and its restriction in trees. J. Arboriculture 26: 1-11.
- Rioux, D. 1995. Le compartimentage: un mécanisme de défense de l'arbre. Formation continue, cours no. 34, encart de l'Aubelle No. 107 (avril).
- Rioux, D., et Ouellette, G.B. 1989. Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various nonhost trees and shrubs. Can. J. Bot. 67: 2335-2351.
- Shigo, A.L. 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. Annu. Rev. Phytopathol. 22: 189-214.
- Shigo, A.L., et Marx, H.G. 1977. Compartmentalization of decay in trees. USDA For. Serv., Agric. Inf. Bull. No. 405, 73 pp.

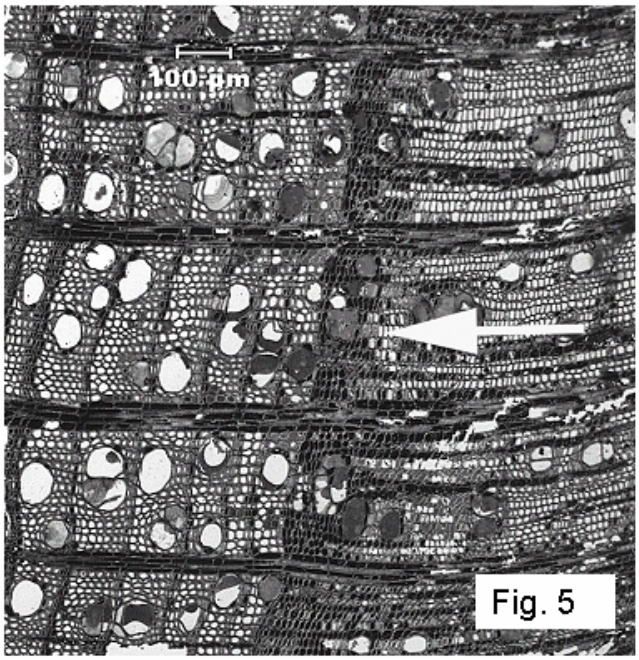
- Smith, K.T., et Shortle, W.C. 1990. IAA oxidase, peroxidase, and barrier zone formation in red maple. Eur. J. For. Path. 20: 241-246.
- Tippett, J.T., et Shigo, A.L. 1981. Barrier zone formation: a mechanism of tree defense against vascular pathogens. IAWA Bull. 2: 163-168.

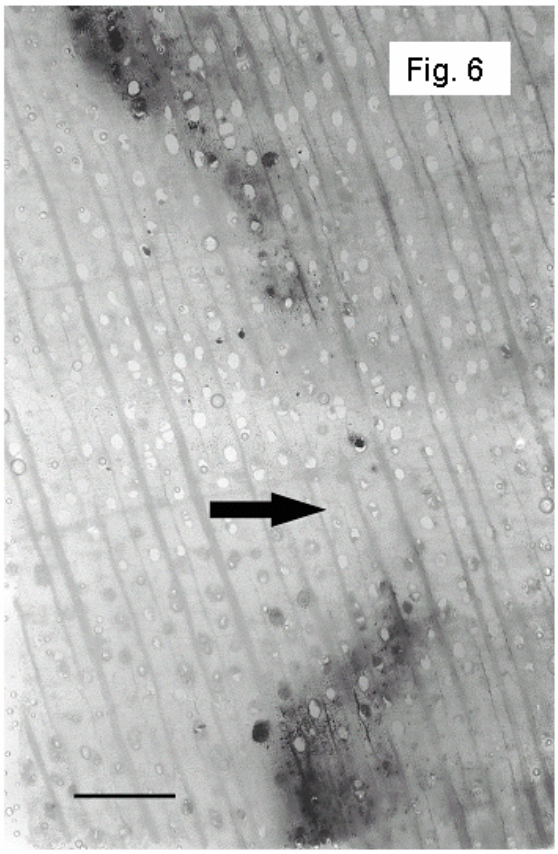
Fig. 1


Mur 4
Mur 3
Témoin
M4
Témoin
M3
Bois affecté


Fig. 3
014


Fig. 4


100 µm
Fig. 5


Fig. 6

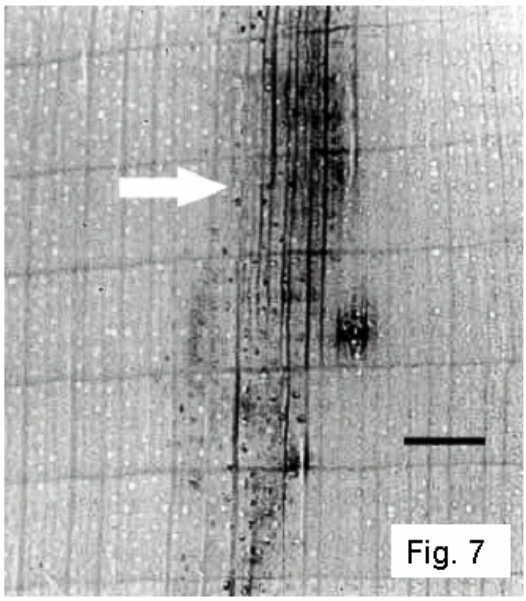

Fig. 7

Figure 2. Graphique donnant la hauteur des colonnes de bois coloré en fonction du pourcentage de cime résiduelle chez les arbres échantillonnés.

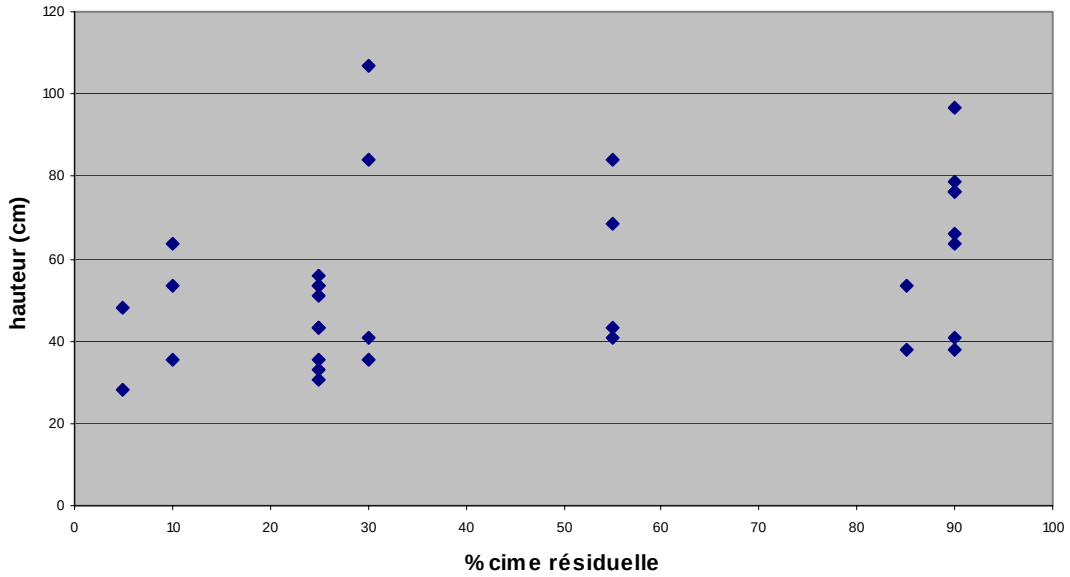


Figure 1. Schéma montrant où les échantillons ont été prélevés et leur grosseur (carrés sur la gauche) relativement à la blessure d'entaillage.

Figure 3. Chevauchements de trous d'entaillage (flèches) empêchant d'évaluer le bois coloré généré par une entaille en particulier.

Figure 4. Coupe tangentielle montrant un mur 3 continu (flèches) qui avait une couleur verte naturelle. Le bois affecté était de couleur brune et est ici moins foncé que le mur 3. Échelle = 1 mm.

Figure 5. Mur 4 évident (flèche) constitué de plusieurs couches de cellules dont le contenu foncé est composé majoritairement de phénols révélés par le bleu de toluidine.

Figure 6. Discontinuité (flèche) dans ce mur 3. Les composés foncés sont probablement de nature phénolique. Échelle = 300 μm.

Figure 7. Coupe colorée au phloroglucinol-HCl mettant en évidence un mur 3 (flèche) séparant le bois affecté (à droite) du bois sain (à gauche). Le colorant révèle que la lignine et des composés phénoliques complexes sont présents en plus grande quantité dans les rayons du mur 3. Échelle = 1 mm.

Tableau 1. Continuité (cont.) et discontinuité (disc.) observées chez les murs 3 et 4 entourant le bois affecté par l'entaillage chez les arbres étudiés.

Entailles	Cime résiduelle	Continuité des murs
1998	90 %	Cont. (murs 3 & 4)
1998	90 %	Cont. (murs 3 & 4)
1999	90 %	Cont. (murs 3 & 4)
2000	90 %	Disc. (mur 3) Cont. (mur 4)
1998	85 %	Cont. (murs 3 & 4)
1999	85 %	Cont. (murs 3 & 4)
2000	85 %	Cont. (mur 4)
1998	60 %	Cont. (mur 3) Disc. (mur 4)
2001	60 %	Disc. (mur 4)
1999	55 %	Disc. (mur 4)
1999	50 %	Disc. (murs 3 & 4)
1998	45 %	Cont. (mur 4)
2000	45 %	Cont. (mur 3) Disc. (mur 4)
1999	30 %	Cont. (mur 3) Disc. (mur 4)
2000	30 %	Disc. (mur 3) Cont. (mur 4)
2000	30 %	Cont. (mur 4)
1998	25 %	Disc. (murs 3 & 4)
2000	25 %	Cont. (mur 3) Disc. (mur 4)
2000	25 %	Disc. (mur 4)
2001	25 %	Disc. (murs 3 & 4)
1998	20 %	Disc. (mur 3) Cont. (mur 4)
1998	20 %	Cont. (mur 3)
2001	20 %	Disc. (murs 3 & 4)
1999	10 %	Disc. (murs 3 & 4)
2000	10 %	Cont. (murs 3 & 4)
2001	10 %	Disc. (mur 3) Cont. (mur 4)
1999	5 %	Cont. (murs 3 & 4)
2000	5 %	Cont. (mur 4)
2001	5 %	Disc. (murs 3 & 4)
2001	0 %	Cont. (murs 3 & 4)