

Station d'ail des ours © R. Garreta/CBNPMP



RAPPORT D'ETUDE 2022-2024



**CONSERVATOIRE
BOTANIQUE NATIONAL
PYRÉNÉES
ET MIDI-PYRÉNÉES**

AMELIORATION DES CONNAISSANCES SUR LA BIOLOGIE DES ESPECES SAUVAGES CUEILLIES

Tests de germination et essais de culture

Laurent Bourgne

SOMMAIRE

1. CONTEXTE	
2. RECOLTE	
3. TESTS DE GERMINATION.....	
3.1. ELABORATION D'UN PROTOCOLE DE GERMINATION FAVORABLE SUR SEMENCES FRAICHES	
3.2. VIABILITE DES SEMENCES APRES DESSICCATION	
3.3. TEST SUR LA TEMPERATURE ET LA DUREE DU PRETRAITEMENT DES SEMENCES EN CONSERVATION	
4. TESTS DE CROISSANCE	
5. CONSERVATION <i>EX SITU</i> DES GRAINES	
6. ESSAI DE CULTURE	
6.1. CULTURE D'ALLIUM URSINUM EN SERRE	
6.2. CULTURE AU JARDIN DU CBNPMP ET MODALITES DE CUEILLETTE	
<i>6.2.1. MISE EN PLACE D'UNE CULTURE D'ALLIUM URSINUM</i>	
<i>6.2.2. CULTURE D'ARNICA MONATANA</i>	
BIBLIOGRAPHIE & SITOGRAPHIE.....	
ANNEXES	

À citer sous la référence :

Bourgne L., (2024). Amélioration des connaissances sur la biologie des espèces sauvages cueillies-Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées (CBNPMP). 28 p.

1. CONTEXTE

La conservation *ex situ* est une des missions fondamentales des Conservatoires botaniques nationaux (CBN). A cet effet le CBNPMP constitue des collections de sauvegarde sous la forme d'une banque de semences dans ses locaux à Bagnères-de-Bigorre. Ainsi stockées, ces ressources végétales et leur patrimoine génétique restent à disposition pour des recherches ou des opérations de restauration.

La banque de semence du CBNPMP rassemble actuellement 243 espèces, certaines étant considérées comme communes et d'autres en voie de disparition, menacées et/ou protégées.

L'Ail des ours fait partie des espèces traditionnellement et/ou commercialement cueillie pouvant subir une pression qui pourrait avoir un impact sur la dynamique des populations. Même si le genre *Allium* reste relativement documenté, peu d'études ou alors anciennes ont été réalisées sur les conditions de germination de l'espèce concernée. La connaissance sur les conditions d'émergence d'*Allium ursinum* est nécessaire afin de pouvoir mesurer les éventuels impacts que représentent des prélèvements répétés au sein d'une même station. Sachant que l'Ail des ours a une durée de vie moyenne de 8-10 ans, qu'il devient apte à se reproduire sexuellement lors de sa 5^{ème} année et que la reproduction végétative représente une part infime (1 à 2 bulbes filles) dans sa stratégie de reproduction (Ernst, 1979), la connaissance sur les conditions favorables à sa germination ainsi que sur la viabilité des semences produites apparaît nécessaire afin de mieux appréhender le suivi et les préconisations de gestion *in situ*.

Dans le cadre du programme Pycup+, visant à mesurer la pression que les cueillettes peuvent représenter sur les populations, le CBNPMP a programmé des récoltes de graines d'*Allium ursinum* en vue d'étudier les conditions de germination de l'espèce, de réaliser des essais de culture avec suivi phénologique et aussi pour une mise en conservation afin de disposer de matériel pour différentes études comme la viabilité des semences dans le temps suite à dessiccation et conservation froide. La continuité des programmes Pycup et Pycup+ nous a également permis de mettre en place une culture expérimentale d'*Arnica montana* afin d'étudier les impacts de différentes modalités de cueillette sur cette espèce.

2. RECOLTE

D’après la bibliographie, il est nécessaire de prélever sur au moins 50 pieds différents afin d’avoir un échantillonnage correct de la diversité génétique de la station. En cas de population de petite taille, les prélèvements respectent la règle des 20% des graines matures le jour de la collecte pour assurer la pérennité de la station (ENSCONET, 2009).

Les graines ont été collectées dans la mesure du possible par temps sec, directement sur les pieds dans des sachets en papier, puis mises à sécher.

L’objectif de la récolte est d’obtenir des lots de graines. Un lot ou accession est constitué des graines d’une seule espèce, récoltées à une date donnée et sur un seul site.

Chaque lot de graines est accompagné d’un bordereau qui permet de caractériser la population et la station. Le type de matériel récolté ainsi que la méthode de récolte (aléatoire ou systématique) sont également précisés.

La station d’ail des ours étant dense et assez étalée, la distinction entre individus difficile et la maturation des fruits échelonnée dans le temps, trois récoltes ont été effectuées avec un échantillonnage des capsules à maturité.

Il est apparu nécessaire de faire plusieurs passages car il y avait à chaque période des semences matures et vertes au même moment (figure 1). D’après Ernst, plus de 75% des hampes florales se couchent d’ailleurs avant la maturation de toutes les semences (Ernst, 1979). Les accessions ainsi créées sont présentées tableau 1.

Tableau 1 : Récoltes et accessions d’*Allium ursinum* pour l’année 2022

Accessions	Dates de récolte	Nombre de semences	Récolteur(s)	Communes	N° dpt
2022002	18/05/2022	2405	LB	Benqué	65
2022003	08/06/2022	948	LB	Benqué	65
2022004	10/06/2022	1810	LB	Benqué	65



Figure 1 : *Allium ursinum* en pleine fructification © L. Bourgne/CBNPMP

Les ombelles sont composées au maximum de 14 capsules qui contiennent chacune 3 graines (figure 2). Suite à la récolte, les semences ont été triées et nettoyées (figure 3) au laboratoire avant d'être utilisées pour les tests de germination ou de suivre le protocole de mise en conservation (dessiccation, conservation au froid à +4°C ou -21°C).



Figure 2 : Capsule d'*Allium ursinum* avec les 3 loges ©L.Bourgne/CBNPMP

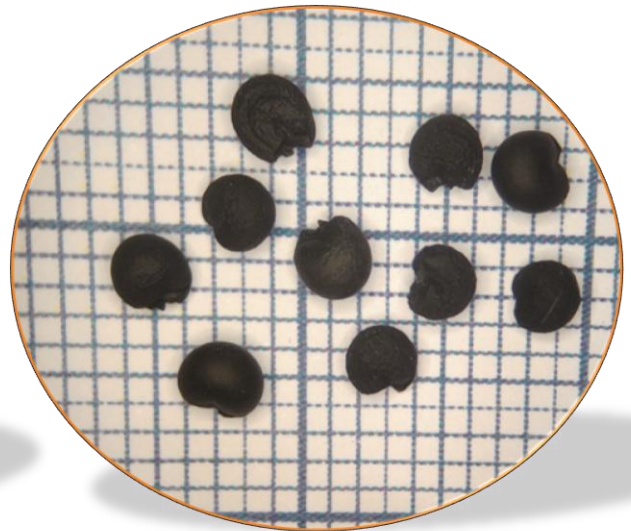


Figure 3 : Graines d'*Allium ursinum* ©L.Bourgne/CBNPMP

3. TESTS DE GERMINATION

3.1. ELABORATION D'UN PROTOCOLE DE GERMINATION FAVORABLE SUR SEMENCES FRAICHES

D'après la bibliographie *Allium ursinum* présente une double dormance morpho-physiologique qui consiste en une dormance embryonnaire et une dormance au niveau de l'épicotyle (Baskin&Baskin, 1998). Ainsi, même si les semences germent ou que les bulbes émettent des racines dès l'automne, en laboratoire, seules des températures basses (10°C ou moins) sont capables de déclencher la croissance et l'émergence des feuilles après une exposition à des températures de 15-20°C pendant plusieurs mois. « *As indicated by laboratory experiments, exposure of seeds to temperatures of 15-20°C for several months is necessary for germination. Thereafter, a cold storage for at least 2 months gives reasonable germination.* » (Ernst, 1979).

Les tests de germination ont pour objectifs de mettre au point un protocole de germination favorable et de vérifier la viabilité des lots. Les données sur la germination de ce taxon ne sont pas très nombreuses et parfois contradictoires sur le rôle notamment de la lumière et des températures (ex. :Sid SER ou Encosbase, 15°C avec photopériode). Disposant de suffisamment de matériel, une batterie de tests a pu être lancée avec ou sans prétraitement afin de déterminer les conditions optimales de germination de l'espèce. En accord avec la phénologie du taxon qui présente une émergence des plantules en fin d'hiver/début printemps et une maturation en juin avec dissémination des graines, les conditions retenues sont présentées tableau 2.

Tableau 2 : Protocoles de germination testés sur *Allium ursinum*

Prétraitements	Conditions
Aucun	25°C/10°C-obscurité
Aucun	25°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité
Aucun	10°C-obscurité
Aucun	10°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité

Stratification 25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité
Stratification 25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité
Stratification 25°C-12h.lumière/25°C-12h.obscurité	10°C-obscurité
Stratification 25°C-12h.lumière/25°C-12h.obscurité	10°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité

En parallèle, 50 semences ont été placées en barquette dans du terreau semis et à l’extérieur pour essayer de déterminer la période de germination « naturelle ». En effet, la question était de savoir si les semences *in situ* germent à l’automne dans la litière forestière avec une croissance plus tardive ou si la croissance succède directement à la germination en Février/Mars.

Pour chaque prétraitement, deux conditions ont été testées (obscurité ou photopériode) afin de déterminer le rôle de la lumière et de valider ou non la nécessité d’une stratification. La thermopériodicité (25°C/10°C) a été testée sans prétraitement afin de vérifier si l’alternance des températures pouvait à elle seule induire la germination. La stratification chaude a été retenue en raison de la phénologie de l’ail des ours mais aussi d’informations trouvées en bibliographie (Ernst, 1979 ; tests CBNA).

Dans tous les tests suivants, les semences d’Ail des ours ont été systématiquement désinfectées (hypochlorite de calcium 10% pendant 10 minutes) avant d’être placées sur gélose (Agar 0,8%) dans des boîtes de Pétri fermées par un film poreux aux gaz. Pour la photopériode, l’éclairage présente les caractéristiques suivantes : IRC 80, 4000 Kelvins. Pour chaque condition testée, 20 semences sont placées par boîte avec systématiquement un réplicat soit 40 graines par condition.

320 semences fraîches de l’accession 2022003 ont été testées et les résultats sont présentés tableau 3.

Tableau 3 : Taux de germination des semences fraîches d’*Allium ursinum* par conditions testées

Prétraitements	Conditions	% germination	Délais 1 ^{ère} germination (en jours)	Délais 50% germination (en jours)
Aucun	Extérieur/terreau	60	235	262
Aucun	10°C-obscurité	2.5	36	
Aucun	10°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité	0		
Aucun	25°C/10°C-obscurité	0		
Aucun	25°C-12h.lumière/25°C-12h.obscurité	0		
25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	100	28	28
25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité	0		
25°C-12h.lumière/25°C-12h.obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	97.5	28	28
25°C-12h.lumière/25°C-12h.obscurité pendant 6 semaines	10°C-12h.lumière/10°C-12h.obscurité	10		

La stratification chaude (25°C) suivie d’une température plus basse (10°C) est donc adaptée à la levée de dormance sur *Allium ursinum* (figures 4 et 5). Au vu des résultats, ce taxon présente une photosensibilité négative. En effet, après 295 jours en photopériode, quelles que soient les conditions de températures, les semences ne germent pas. Par contre, dans la phase de prétraitement en stratification chaude, la lumière ne joue pas de rôle déterminant. Nous constatons également que sans cette stratification, les semences ne germent pas même si elles sont exposées à une température favorable (10°C) et restent à l’obscurité. Il en est de même pour une exposition à une alternance de température (25°C/10°C), la dormance n’est pas levée et aucune germination n’est observée.



Figure 4 : Germinations d'Ail des ours ©L. Bourgne/CBNPMP



Figure 5 : Emergence de la première feuille et développement du système racinaire ©L. Bourgne/CBNPMP

Les semences placées en terrine à l'extérieur présentent un taux de germination de 60%. Les délais de 1^{ère} et 50% de germination apparaissent longs car le comptage n'a pu se faire que lors de l'émergence des premières feuilles et non de la radicule comme sur gélose. La croissance foliaire correspond à la phénologie de la plante *in situ* et les premières observations ont eu lieu mi-février. Cependant, ces expérimentations permettent de valider que la germination d'*Allium ursinum* a bien lieu en fin d'automne/début hiver, suite à l'exposition des semences à des températures élevées (Juillet-Septembre) suivi d'une baisse des températures (Novembre-Décembre). « *In general, epicotyl dormancy means emergence of the radicle in autumn and emergence of the shoot the following spring. Thus far, the species with epicotyl dormancy that have been studied grow in temperate regions of the world.* » (Baskin & Baskin, 1998). Les figures 6, 7 et 8 montrent d'ailleurs les semences germées mi-décembre, après avoir délicatement gratté le substrat. L'émergence des feuilles 2 mois plus tard tend à valider les informations de la bibliographie concernant une dormance au niveau de l'épicotyle levée par les températures froides. De futurs tests seront réalisés pour étudier cette question.



Figure 6 : Terrine avec substrat



Figure 7 : Graine germée déterrée avec racine d'environ 6cm



Figure 8 : Graine germée rincée et photographiée à la loupe binoculaire

Ces résultats vont dans le même sens que ceux exposés par W.H.O. Ernst (1979) avec une exposition des semences à des températures élevées (minimum 15°C) puis exposition à des températures plus froides (5°C ou 10°C). Ernst évoque par contre des expositions d'au moins 4 mois pour chaque condition. Les résultats obtenus ici montrent qu'une exposition de 6 semaines à 25°C suffit à induire la germination des semences (100% en 70 jours).

3.2. VIABILITE DES SEMENCES APRES DESSICCATION

Les semences fraîches présentant une forte capacité germinative, d'autres tests ont été réalisés suite à la dessiccation afin de déterminer si cette étape avait une influence sur les graines d'*Allium ursinum*. Après 3 mois en chambre de dessiccation à 20°C et avec une hygrométrie relative (HR) de 20%, les semences ont été testées suivant le protocole décrit précédemment à savoir désinfection, stratification à 25°C pendant 6 semaines puis 10°C à l'obscurité et les résultats sont présentés tableau 4.

Tableau 4 : Taux de germination des graines d'*Allium ursinum* par accession suite à dessiccation

Accessions	Prétraitements	Conditions	% germination	Délais 1 ^{ère} germination (en jours)	Délais 50% germination (en jours)
2022002	25°C-obscurité pendant 6	10°C-obscurité	60	31	37.5
2022003	25°C-obscurité pendant 6	10°C-obscurité	97.5	14	22
2022004	25°C-obscurité pendant 6	10°C-obscurité	90	22	22

Ces résultats montrent que la dessiccation n'impacte pas la capacité germinative des semences d'*Allium ursinum* et que ces dernières sont donc orthodoxes et à même d'être conservées.

Le résultat moyen de l'accession 2022002 s'explique par le fait que sur les 40 semences de départ, 11 ont moisie malgré la désinfection et 5 étaient non-viables. Un facteur lié à la récolte peut être pris en compte car l'accession 2022002 correspond au premier passage sur la station et les semences collectées le 18/05/22, bien qu'elles présentaient un aspect mature, ont une masse moins importante que les graines récoltées début juin comme présenté dans le tableau 5.

Tableau 5 : Nombre et masse des graines d'Ail des ours par accession

Accession	Date de récolte	Nombre total de semences	Masse moyenne pour 100 graines (en gramme)
2022002	18/05/2022	2405	0.3689
2022003	08/06/2022	948	0.8172
2022004	10/06/2022	1810	0.7175

Nous constatons que la masse moyenne pour 100 graines varie plus que du simple au double (x 2,2) entre l'accession 2022002 et 2022003. Les semences issues de la même population ont donc vu leur masse doubler en l'espace de 21 jours entre le 18/05/22 et le 08/06/22. Malgré cette différence, les semences de l'accession 2022002 apparaissent quand même viables et si nous appliquons un taux de germination corrigé en écartant les semences moisies et non viables, le pourcentage final est de 87.5%.

En parallèle, la stratification froide a également été testée avec l'accession 2022004 pour voir si ce prétraitement était à même d'induire la germination. 40 graines ont donc été placées en chambre à froide à 4°C à l'obscurité pendant 6 semaines puis à 10°C à l'obscurité. Les résultats sont présentés tableau 6.

Tableau 6 : Comparaison des taux de germination des semences d'*Allium ursinum* suite à stratification chaude ou froide

Prétraitements	Conditions	% germination	Délais 1 ^{ère} germination (en jours)	Délais 50% germination (en jours)
25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	90	22	22
4°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	0		

Nous notons que la stratification froide n’a aucun effet sur la dormance des graines et qu’aucune germination n’a été observée suite à ce prétraitement en accord avec les travaux réalisés par J. Leo dans « *The effect of cold stratification on germination in 28 cultural relict plant species* » (2013).

3.3. TEST SUR LA TEMPERATURE ET LA DUREE DU PRETRAITEMENT DES SEMENCES EN CONSERVATION

Des graines de l’accession 2022004 en conservation à -21°C depuis 2 mois ont été utilisées pour cette expérimentation. Le protocole avec 6 semaines de stratification à 25°C ayant donné des résultats élevés (100%), une nouvelle série de tests a été lancée afin de déterminer la durée d’exposition minimum nécessaire pour induire la germination et si des températures plus ou moins élevées avaient un impact sur la durée d’exposition. Dans le but d’optimiser le protocole de germination et de mieux maîtriser les conditions nécessaires à la levée de dormance, des semences ont donc été traitées de la même façon que précédemment et mises en stratification chaude à 15°C ou 25°C pour une durée de 1, 2, 3, 4, 5 et 6 semaines puis placées à 10°C à l’obscurité. La stratification à 15°C a ici été ajoutée afin de déterminer le rôle de la température dans la levée de dormance mais également pour comparer avec les résultats trouvés dans la bibliographie (Ernst, 1979). En parallèle, 40 semences ont été placées en stratification à 20°C pendant 6 semaines puis à 10°C à l’obscurité et les résultats sont présentés tableau 7 et figure 7.

Tableau 7 : Taux de germination de l’ail des ours en fonction de la durée du prétraitement et des températures

Durée prétraitement en semaines	Température prétraitement (en °C)	% germination	Délais 1 ^{ère} germination (en jours)	Délais 50% de germination (en jours)
Aucun (témoin)	/	42.5	45	
1	15	52.5	29.5	75
	25	57.5	29	50.5
2	15	45	23	54
	25	77.5	29	50.5
3	15	80	12	19
	25	92.5	18.5	22
4	15	87.5	8	24
	25	77.5	16.5	22.5
5	15	95	12	17
	25	75	17	21
6	15	92.5	11	24
	20	77.5	15	20.5
	25	100	14	19

Ces résultats font apparaître que la dormance est levée sur certaines semences dès 1 semaine d'exposition à une température de 15°C ou 25°C. Nous observons cependant que le taux de germination final est en relation avec la durée d'exposition et qu'un maximum semble être atteint après 3 semaines. Il en est de même en ce qui concerne le délai de germination. Les semences exposées plus longtemps aux températures de 15 et 25°C, germent plus rapidement et un optimum semble là aussi atteint après 3 semaines (figure 9).

Le lot témoin, sans prétraitement, atteint un taux de germination de 42.5%. Lors de nos premiers tests avec des semences fraîches, seulement 2.5% des graines avaient germées (tableau 3) dans les mêmes conditions. L'exposition pendant 3 mois à une température de 20°C durant la phase de dessiccation peut être une des causes de cette différence. D'autres tests seront nécessaires pour comparer le niveau de dormance entre semences fraîches, post-dessiccation et conservées.

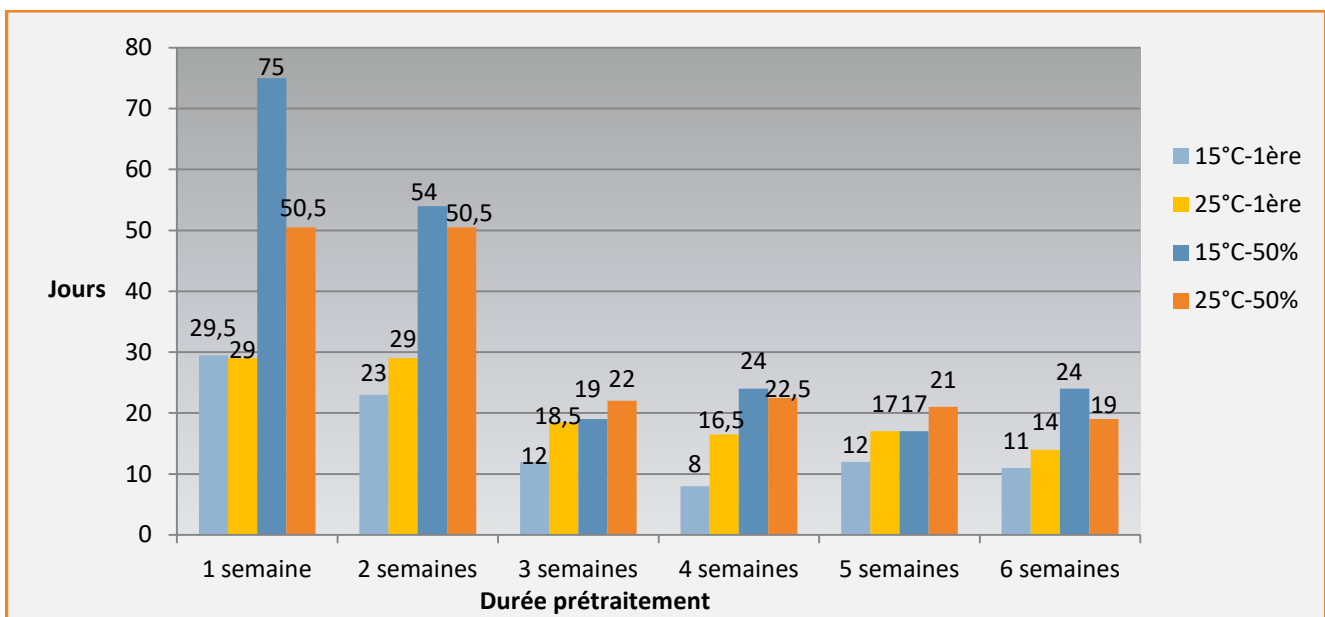


Figure 9 : Délais moyens de 1^{ère} et 50% de germination des graines d'*Allium ursinum* en fonction de la durée et de la température du prétraitement

La figure 9 rend visuel le délai moyen de première germination et le délai pour avoir 50% de germination des semences d'ail des ours. La différence devient significative après 3 semaines de prétraitement ou la durée de première germination atteint son optimum avec un délai moyen de 13.6 jours.

Les 3 accessions ont été testées après la mise en conservation à -21°C suivant le même protocole que précédemment et les résultats sont présentés tableau 8.

Tableau 8 : Taux de germination des semences d'*Allium ursinum* en conservation à -21°C

Accessions	Prétraitements	Conditions	% germination	Délais 1 ^{ère} germination (en jours)	Délais 50% germination (en jours)
2022002	25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	65	19	30
2022003	25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	100	15	19
2022004	25°C-obscurité pendant 6 semaines	10°C-obscurité	100	14	19

Ce test valide la possibilité de mettre en conservation froide les semences d'*Allium ursinum* sans perte de viabilité. Comme évoqué précédemment, l'accession 2022002 se caractérise par un taux de germination moyen et un délai de germination plus long lié au facteur récolte.

4. TESTS DE CROISSANCE

Un protocole favorable ayant pu être validé pour la germination des graines d'*Allium ursinum* et la bibliographie faisant état d'une dormance au niveau de l'épicotyle (Ernst, 1979 ; Baskin&Baskin, 1998), un test de croissance a été mis au point afin de vérifier les conditions nécessaires à l'émergence du feuillage de l'ail des ours. Pour l'espèce étudiée ici, le méristème apical ne se « réveillerait » qu'après une longue période (3 mois) d'exposition à de basses températures (entre 4°C et 10°C). Les observations menées par Ernst évoquent même un développement identique du feuillage et des inflorescences que le sol soit à une température moyenne de 8°C ou à la limite du gel.

Pour cette expérimentation, 320 graines en conservation de l'accession 2022004 ont été mises à germer selon le protocole identifié comme optimal précédemment (désinfection, stratification 25°C pendant 6 semaines puis 10°C à l'obscurité). Le taux de germination moyen a été de 97.2%. Comme évoqué ci-dessus, les germinations apparaissent pour la majeure partie dans un laps de temps assez court et cette synchronisation nous a permis d'avoir les 280 graines germées nécessaires au test sur 2 jours (J et J+1). Ces dernières ont été récupérées pour être mises sur gélose (agar 0.8%) dans des boîtes de Pétri et être placées dans les 5 conditions retenues (tableau 9). En parallèle, 2 fois 40 graines germées ont été placées dans des barquettes remplies de terreau horticole et l'une a été mise dans une serre hors gel et l'autre à l'extérieur.

Tableau 9 : Conditions testées pour la croissance d'*Allium ursinum*

Conditions
5°C-12h lumière/5°C-12h obscurité
10°C-12h lumière/10°C-12h obscurité
20°C-12h lumière/20°C-12h obscurité
30°C-12h lumière/30°C-12h obscurité
30°C-12h lumière/15°C-12h obscurité

Pour chaque condition, 4 boîtes contenant 10 graines germées ont été préparées. Ce sont donc 200 graines avec une radicule de 2-3 mm qui ont été mises en conditions contrôlées le même jour ainsi que les 80 graines dans les 2 barquettes (10/11/2023).

Pour assurer le suivi de croissance en boîtes de Pétri, les germinations ont été individualisées avec un numéro (figure 10) et 4 stades ont été identifiés. Le tableau 10 et la figure 11 présentent ces stades.



Figure 10 : Mise en place du test de croissance d'*Allium ursinum* avec individualisation des germinations ©L. Bourgne/CBNPMP

Tableau 10 : Différents stades de croissance identifiés lors du développement d'*Allium ursinum*

Stade	Développement	Abréviation
1	Graines germées, radicule 2-3 mm	GG
2	Apparition des poils absorbants, élongation racine principale	PA
3	Développement racines secondaires	RS
4	Apparition 1 ^{ère} feuille = dormance épicotyle levée	F



Figure 11 : Différents stades de croissance d'*Allium ursinum* photographiés à la loupe binoculaire ©L. Bourgne/CBNPMP

Si les stades présentés ici sont ceux observés la plupart du temps, il arrive que les racines latérales se développent et non la centrale. Dans tous les cas, suite à la germination *stricto sensu*, nous observons la spécialisation des tissus avec le début de la photosynthèse et la coloration des cellules ainsi que la naissance des 3 premières racines (1 centrale et 2 latérales). Enfin, en conditions favorables, apparaît la première feuille ce qui signifie que la dormance de l'épicotyle est levée.

Les résultats de ce test avec les délais moyens pour atteindre chaque stade sont présentés tableau 11.

Tableau 11 : Résultats du test de croissance des germinations d'*Allium ursinum* en conditions contrôlées

Conditions	Délai moyen stade 2 (PA) en jours	Délai moyen stade 3 (RS) en jours	Délai moyen stade 4 (F) en jours
5°C-12h lumière/5°C-12h obscurité	43.5	61.7	78.2
10°C-12h lumière/10°C-12h obscurité	25	31.7	58.6
20°C-12h lumière/20°C-12h obscurité	Non atteint	Non atteint	Non atteint
30°C-12h lumière/30°C-12h obscurité	Non atteint	Non atteint	Non atteint
30°C-12h lumière/15°C-12h obscurité	Non atteint	Non atteint	Non atteint

Ce test valide la nécessité d'une exposition à des températures froides (10°C ou moins) pour lever la dormance de l'épicotyle de l'ail des ours. Une limite de température semble être atteinte entre 10°C et 20°C, et à 20°C le développement des graines précédemment germées est alors stoppé. Les germinations placées à 20°C et 30°C/15°C ont pu débuter la photosynthèse (coloration verte) mais aucun développement racinaire ou foliaire n'a été observé. Les germinations placées à 30°C n'ont pas dépassé le stade 1 et aucune coloration n'a été observée. Après 1.5 mois, un dessèchement des tissus était observable. Seuls les graines germées placées à 5°C et 10°C ont continué leur croissance avec pour seule différence un développement plus rapide à 10°C.

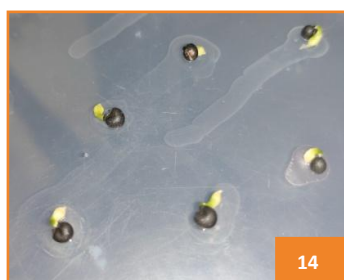
Les figures 12 à 16 présentent le développement global des germinations par conditions après 3 mois de test.



5°C : bon développement racinaire et apparition des premières feuilles.



10°C : bon développement racinaire, 1 ère feuille bien visible. Condition optimale de croissance.



20°C : pas de développement racinaire. La seule différence avec le stade 1 est une légère coloration verte prouvant la viabilité des tissus.



30°C : aucun développement, dessèchement des tissus, mortalité.



30°C/15°C : développement assez semblable à 20°C. Aucune croissance observée mais une pigmentation des tissus visible.

Figure 12 à 16 : Développement des germinations d'*Allium ursinum* par conditions testées après 3 mois de culture©L. Bourgne/CBNPMP

Pour les germinations placées en barquettes à l'extérieur et dans la serre, la première observation de l'émergence du feuillage s'est faite le 16/01/2024. 3 mois après le début de l'expérimentation, 27 plantules (67.5%) étaient visibles dans la barquette à l'extérieur et 23 (57.5%) pour celle placée en serre (figure 17).



Figure 17 : Emergence des plantules d'*Allium ursinum* © L. Bourgne/CBNPMP

CONCLUSION :

Ces séries de tests ont permis la validation d'un protocole favorable à la germination des graines d'*Allium ursinum* à savoir une stratification chaude (25°C) suivie de températures basses (10°C). Si ces données sont en accord avec les travaux réalisés par Ernst (1979), les temps de prétraitement et de germination observés ici sont bien plus courts (70 jours vs 8 mois). Ces tests valident également que la germination de l'ail des ours commence dès que les températures baissent à l'automne et que l'émergence du feuillage apparaît en fin d'hiver suite à l'exposition à de basses températures nécessaires pour lever la dormance au niveau de l'épicotyle. Il apparaît que l'espèce étudiée ici a adopté une stratégie de multiplication essentiellement axée sur la reproduction sexuée (Ernst, 1979 ; Oborny B. & *al.*, 2011) où l'énergie allouée à la floraison et la fructification permet une production de graines à forte viabilité lui assurant plus de chance face à la concurrence. De plus, la phénologie de l'ail des ours lui permet une parfaite adaptation à son milieu avec un développement des parties aériennes qui intervient avant la frondaison et lui laisse ainsi un accès à la lumière durant tout son cycle. Enfin, les tests sur les conditions de croissance et de levée de dormance de l'épicotyle font apparaître une limite au développement des germinations comprise entre 10°C et 20°C, limite qui peut soulever la question de l'adaptation face aux changements climatiques pour cette espèce hygrophile habitante des sous-bois.

5. CONSERVATION EX SITU DES GRAINES

Les graines fraîches non utilisées lors des tests de germination sont temporairement stockées dans une chambre de dessiccation pour une durée moyenne de trois mois. A l'intérieur de cette chambre, la température et l'humidité sont contrôlées (20°C et 15 % HR).

En fonction du nombre de graines, le lot est ensuite divisé. Une partie des sous lots sera stockée en chambre froide à 4°C et l'autre partie sera stockée en congélateur à -21 °C. Ces lots seront testés idéalement tous les 5 ans pour vérifier le pourcentage de graines viables. Lorsque le nombre de graines viables est faible (<50%), il est nécessaire de procéder à une nouvelle récolte.

6. ESSAI DE CULTURE

6.1. CULTURE D'*ALLIUM URSINUM* EN SERRE

Suite aux tests réalisés en laboratoire, les germinations ont été repiquées dans des barquettes remplies de terreau horticole (figure 18) et placées en serre froide afin de suivre la croissance des plantules. La bibliographie ne mentionne le développement que d'une seule feuille la première année de croissance (Ernst, 1979). Or, nous avons observé rapidement l'émergence d'une deuxième feuille sur certaines plantes, et un comptage précis a été réalisé afin d'avoir une idée du pourcentage de jeunes plantes avec 2 feuilles (figure 19).



Figure 18 : Jeunes plants d'*Allium ursinum* en barquette ©L. Bourgne/CBNPMP



Figure 19 : Jeunes plants d'*Allium ursinum* présentant 2 feuilles ©L. Bourgne/CBNPMP

Sur les 372 jeunes plants d'*Allium ursinum* mis en culture, 66 individus présentaient 2 feuilles dès la première année, soit 17.74%.

6.2. CULTURE AU JARDIN DU CONSERVATOIRE BOTANIQUE ET MODALITES DE CUEILLETTE

La continuité des programmes Pycup et Pycup+ nous a permis de mettre en culture 2 taxons étudiés afin de pouvoir suivre leur développement phénologique mais également de pouvoir étudier l'impact de différentes modalités de cueillette sur le développement ou la survie des espèces concernées ici.

6.2.1. MISE EN PLACE D'UNE CULTURE D'ALLIUM URSINUM

Afin d'étudier l'impact des différentes modalités de cueillette pratiquées sur l'ail des ours, une culture a été mise en place sur le site du conservatoire. Un emplacement propice a été identifié avec la présence d'arbres et d'ombre sur la parcelle. Le sol n'étant quant à lui pas favorable au développement de l'espèce, nous avons opté pour une culture en bacs. Ces derniers ont été remplis d'humus forestier présent autour de la parcelle avec l'apport de terreau horticole en surface pour faciliter le repiquage. Les plantules ont été repiquées après 5 mois de culture en barquette lorsque la/les premières feuilles été bien développées. 1600 plants ont ainsi été installés avec 400 individus par bac correspondant aux trois modalités de cueillette identifiées et un témoin. La figure 20 présente cette installation.



Figure 20 : Culture expérimentale d'*Allium ursinum* au jardin du CBNPMP ©L. Bourgne/CBNPMP

Dès que les plants seront développés (N+1), nous pratiquerons les modalités de cueillette identifiées à savoir : coupe des limbes à ras du sol, prélèvement de feuilles entières ou coupe d'un tiers des limbes. Le témoin ne subira aucun prélèvement et nous permettra la comparaison dans le développement des plantes et leur phénologie.

6.2.2. CULTURE D'ARNICA MONTANA

De même que pour l'ail des ours, une culture d'*Arnica montana* a été mise en place en 2021 afin d'observer la phénologie de cette espèce et d'étudier l'impact des cueillettes sur la plante. 400 plants ont été mis en place correspondant là aussi aux 3 modalités de cueillette identifiées et au témoin. Cette installation est présentée sur la figure 21.



Figure 21 : Culture expérimentale d'*Arnica montana* au jardin du CBNPMP@L. Bourgne/CBNPMP

Avant la plantation, le sol a été superficiellement travaillé à l'aide d'une motobineuse et un apport de tourbe blonde (150L par plate-bande) a été fait pour acidifier légèrement les bandes de culture. Les plants ont été repiqués au stade 4-6 feuilles sur une toile de paillage afin de limiter la concurrence le temps de la reprise mais également pour des raisons d'entretien et de temps de désherbage. Le système de goutte à goutte installé sous la toile pour d'éventuel apport d'eau pour la première année, n'a pas empêché 35.5% de perte en 2022 lié aux conditions caniculaires et de forte sécheresse. Une marge de sécurité ayant été anticipée dès le début de l'expérimentation, 68 plants ont pu être rajoutés (sur 142 pertes) en Novembre 2022 lors du retour des pluies et de la baisse des températures.

Afin d'assurer le suivi, une grille avec individualisation des plantes a été mise en place et permet de suivre le taux de mortalité mais également le développement végétatif avec le décompte de rosette par plante (annexes 1).

Les résultats observés sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats de la culture expérimentale d'*Arnica montana* années N et N+1

	Pourcentage de plants morts	Nombre moyen de rosettes par plant	Nombre de plants ayant fleuri
2022 (N)	35.5	1	0
2023 (N+1)	13.5	2	1

Nous avons observé plus de 2 fois moins de perte sur la seconde année de culture. Ce résultat se justifie par un climat plus favorable et au fait que les plants restants ont développé leur système racinaire et présentent plus de résistance que les plantules installées en 2022 juste avant la canicule. Nous constatons également que le nombre moyen de rosettes a doublé. Aucun ravageur n'a été constaté à ce stade si ce n'est quelques prélèvements foliaires par des gastéropodes. Une seule plante a fleuri en 2^{ème} année. La floraison devrait commencer pour la plupart des plants en 2024 et si 50% de floraison est observée, alors nous commencerons à appliquer les différentes modalités de cueillette afin d'étudier l'impact sur le développement de l'Arnica.

En parallèle, 50 pieds d'Arnica ont été plantés sur une plate-bande séparée (figure 22) afin d'observer les différents modes de multiplication. L'intérêt est de voir si une différenciation est possible entre la multiplication sexuée et végétative afin de déterminer si une jeune rosette éloignée d'un pied mère est issue d'une graine ou d'un marcottage. Cette différenciation permettrait une meilleure estimation du nombre d'individus observés sur les stations *in situ* mais également une meilleure connaissance de la stratégie reproductive de l'espèce (clonage ou brassage génétique).



La mise en place sur une plate-bande désherbée permet une observation aisée des jeunes plantules émergentes. En grattant la surface du sol, nous pouvons déterminer si la rosette est rattachée à un individu plus âgé ou si c'est une germination. Aucune nouvelle rosette observée pour le moment mais 6 individus ont fleuri en 2023 avec production d'akènes.

Figure 22 : Culture expérimentale d'*Arnica montana* au jardin du CBNPMP@L. Bourgne/CBNPMP

CONCLUSION :

L'acquisition des données durant les phases d'étude en laboratoire afin de déterminer les conditions optimales nécessaires à la germination des deux espèces étudiées ici ainsi que les premières observations effectuées lors de culture en serre, nous ont permis de mettre en place des cultures expérimentales d'*Arnica montana* et d'*Allium ursinum* dans le jardin du conservatoire. La proximité de ces cultures va nous permettre d'étudier la phénologie des ces espèces (nombre de feuilles/rosettes, année de première floraison...), leurs exigences climatiques et pédologiques ainsi que d'éventuelles sensibilités à certains ravageurs ou maladies cryptogamiques. Ces cultures nous permettront surtout d'avoir le matériel nécessaire à disposition afin de déterminer l'impact que les différentes modalités de cueillette identifiées peuvent avoir sur le développement des plantes et leur stratégie de reproduction.

BIBLIOGRAPHIE & SITOGRAFIE

- Bacchetta G., Fenu G., Mattana E., Piotto & Virevaire M. 2006. Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma. APAT, Agenzia per la Protezione dello Ambiente. Roma
- ENSCONET, 2009. ENSCONET Seed Collecting Manual for Wild Species.
- W.H.O. Ernst, 1979. Population Biology of *Allium ursinum* in Northern Germany. *Journal of Ecology*, Vol. 67, N°1 (Mar., 1979), pp. 347-362
- Baskin CC& Baskin JM, 1998. *Seeds. Ecology, Biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press.
- Philips N., 2010. Seed and Bulb Dormancy characteristics in New World *Allium* L. (Amaryllidaceae) : A Review. *International Journal of Botany*, 6 (3), pp. 228-234.
- J. Leo, 2013. The Effects of Cold Stratification on Germination in 28 Cultural Relict Plant Species. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Oborny B. & *al.*, 2011. Population ecology of *Allium ursinum* a space-monopolizing clonal plant. *Acta Botanica Hungarica*, September, 2011.
- Morschhauser T. & *al.*, 2014. Characteristics of Reproductive Strategies in Wild Garlic (*Allium ursinum* L.). *The international Journal of Plant Reproductive Biology*, 6(1), pp. 21-29, 2014.
- Soblewska D. & *al.*, 2015. *Allium ursinum* : botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev*, 14, pp.81-97.
- Ser-sid.org, Seed Information Database
- Encobase : the Ensconet Virtual Seed Bank



**CONSERVATOIRE
BOTANIQUE NATIONAL
PYRÉNÉES
ET MIDI-PYRÉNÉES**