

Microgreffage *in vitro* du châtaignier

Premiers résultats

C.L. LÊ, Agroscope RAC Changins, case postale 254, CH-1260 Nyon 1

S. ABDELHAMID, Laboratoire de botanique évolutive, Université de Neuchâtel, CH-2000 Neuchâtel

 E-mail: cong-linh.le@rac.admin.ch
Tél. (+41) 22 36 34 422.

Résumé

Dans cet article, nous décrivons la méthode de multiplication *in vitro* de trois clones du châtaignier (Maraval CA-74, Lüina et Verdanesa), la technique adaptée pour leur enracinement, ainsi que celle que nous avons développée pour le greffage *in vitro*.

La composition du milieu de culture et le choix du stade physiologique adéquat pour le greffage jouent un rôle important dans la réussite du microgreffage.

Afin de s'assurer de la compatibilité entre le porte-greffe et le greffon, un examen histologique a été réalisé sur des plantes greffées pour visualiser au niveau tissulaire le degré de compatibilité entre partenaires.

des arbres virosés, la sensibilité des racines aux maladies du sol et l'adaptation des variétés aux aléas pédologiques et climatiques (JONARD *et al.*, 1988).

La technique de greffage *in vitro* a été appliquée chez plusieurs espèces fruitières ligneuses (NAVARRO, 1988), notamment chez les cerisiers (DEOGRATIAS et DOSBA, 1986), les pommiers (HUANG et MILLIKAN, 1980), les pêcheurs (BARBA *et al.*, 1995) et les agrumes (GUO et DENG, 1998).

Durant ces dernières décennies, la culture du châtaignier a subi un fort déclin en raison, d'une part, du bouleversement socio-économique entraînant la dépopulation des régions montagneuses et, d'autre part, du changement dans les habitudes alimentaires. En plus, le châtaignier européen a sérieusement souffert, au niveau de ses racines, de la maladie de l'encre causée par les agents pathogènes *Phytophthora cambivora* et *P. cinnamomi* (CRADDOCK et BASSI, 1999).

Récemment, l'intérêt porté à la culture du châtaignier a augmenté pour répondre à la demande du marché en fruits et en bois. Cela a entraîné la recherche de nouveaux cultivars producteurs ayant une architecture de la couronne appropriée à la récolte et la sélection de nouveaux porte-greffes permettant une meilleure adaptation de l'arbre greffé à l'environnement de culture et lui offrant une meilleure résistance à la maladie de l'encre (GOMES PEREIRA *et al.*, 1993).

En Suisse, des programmes de sélection et de croisement ont été réalisés dès les années cinquante pour améliorer la résistance de l'espèce européenne indigène (*Castanea sativa*) (BAZZIGHER et

Introduction

La propagation et la domestication des arbres fruitiers et forestiers sont assurées par la multiplication sexuée qui fait intervenir des structures reproductrices particulières, les organes floraux. Ces derniers, après fécondation, forment des graines. Le semis des graines donne naissance à des arbres différents de la variété mère et différents entre eux. En revanche, les plantes fruitières qui sont multipliées par la voie asexuée, par laquelle un organisme est capable d'en générer un autre sans intervention de structures reproductrices spécifiques, maintiennent les caractéristiques de leur parent. Ce mode de reproduction est largement pratiqué par les arboriculteurs et comprend plusieurs techniques, comme le marcottage, le bouturage et le greffage; ce dernier est appliqué chez la majorité des arbres fruitiers (COUTANCEAU, 1962).

Parmi les méthodes de propagation asexuée, on trouve aussi la culture *in vitro* qui a été retenue par de nombreux

cultivateurs et sélectionneurs afin de propager intensivement et conformément leur matériel végétal de base (ALTMAN et LOBERANT, 1998). L'utilisation de cette biotechnologie est satisfaisante par rapport aux méthodes traditionnelles et offre plusieurs avantages, notamment pour l'obtention de matériel sain et dans un temps relativement court. A cet égard, plusieurs études ont montré l'utilité du greffage d'apex *in vitro* pour la multiplication et l'assainissement des arbres fruitiers (CORNAGGIA, 1986; DEOGRATIAS et DOSBA, 1986). A l'origine, cette technique fut mise au point pour les agrumes par MURASHIGE *et al.* (1972) et NAVARRO *et al.* (1975) pour être améliorée ensuite par ROISTACHER *et al.* (1986).

De nombreux programmes d'amélioration génétique des arbres fruitiers ont utilisé le greffage *in vitro* comme solution d'appoint aux problèmes de la reproduction végétative et comme moyen de résoudre des problèmes agronomiques majeurs tels que l'enracinement, le contrôle de la vigueur, l'assainissement

MILLER, 1987). Pour cela, des espèces asiatiques ont été introduites en Europe et surtout l'espèce japonaise (*Castanea crenata*), relativement résistante à la maladie de l'encre et à celle du chancre de l'écorce causée par l'agent pathogène *Cryphonectria parasitica*. Ces variétés exotiques ont été utilisées comme géniteur pour des croisements contrôlés et naturels, qui ont abouti à la création des hybrides interspécifiques utilisés par la suite comme porte-greffe (BREISCH, 1995).

Cependant, le greffage du châtaignier est fréquemment limité par des phénomènes d'incompatibilité qui peuvent se manifester au champ même après plusieurs années de croissance normale, comme l'ont montré ORAGUZIE *et al.* (1999) chez le châtaignier néo-zélandais, PEREIRA-LORENZO et FERNANDEZ-LOPEZ (1997) chez le châtaignier espagnol et UFUK et SOYLU (1999) chez le châtaignier turc.

Dans notre étude, l'hybride interspécifique utilisé comme porte-greffe est le clone multiplié *in vitro* Maraval CA-74, qui présente des caractéristiques intéressantes. Il offre aux variétés à greffer une bonne résistance à l'encre, une résistance au gel précoce, une bonne vigueur, une rapidité de mise à fruits et une grande compatibilité (BREISCH, 1995).

Nous rapportons ici les résultats concernant la multiplication, l'enracinement et le greffage *in vitro* d'apex entre le porte-greffe Maraval CA-74 et les deux variétés suisses Lüina et Verdanesa qui sont les plus répandues sur le territoire du sud des Alpes.

Ce travail a été entrepris dans le cadre d'une collaboration entre le Service de biologie végétale (culture *in vitro*) d'Agroscope RAC Changins, la sous-station du sud des Alpes de l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL, Birmensdorf) et le laboratoire de botanique évolutive de l'Université de Neuchâtel.

Matériel et techniques

Matériel expérimental

Le porte-greffe est constitué par le clone Maraval CA-74 qui est un hybride interspécifique naturel issu d'une pollinisation de *Castanea crenata* par *Castanea sativa*. Le matériel végétal nous a été fourni par le Ctifl, centre de Balandran (France).

Les greffons sont constitués par deux variétés suisses, Lüina et Verdanesa. Ces variétés sont établies et multipliées *in vitro* dans le service de culture *in vitro* d'Agroscope RAC Changins (Lê, 1992).

Multiplication *in vitro*

La multiplication *in vitro* du châtaignier est reconnue difficile en raison de l'absence d'un protocole fiable pour cette espèce (BALLESTER *et al.*, 2001). Dans ce travail, nous avons choisi à dessein pour ces trois clones de châtaignier, comme pour la majorité des espèces ligneuses, la propagation *in vitro* par la multiplication de bourgeons axillaires (SNIR, 1982; DEOGRATIAS et DOSBA, 1986). Pour ce faire, des segments de tige renfermant chacun un bourgeon axillaire (env. 2-4 mm de longueur) sont cultivés dans des conteneurs en plastique contenant 60 ml d'un milieu nutritif de base DKW (DRIVER et KUNYUKI, 1984) où la concentration de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et NaFe EDTA est respectivement de 147,950 et 40 mg/l. A ce milieu sont ajoutés 0,2 mg/l de benzylaminopurine (BAP), 0,02 mg/l d'acide 3-indolylbutyrique (IBA), 4 mg/l de thiamine, 2 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol, 4 mg/l de glycine, 3% de fructose et 0,9% d'agar (Bacto® Agar). Le pH du milieu nutritif est ajusté à 6,2 avec du NaOH ou du HCl à 0,1 N avant l'autoclavage à 121 °C (1,1 kg/cm² de pression) pendant 15 minutes.

Les cultures sont maintenues dans un environnement climatique avec un éclaircissement dont l'intensité est de 50 $\mu\text{mole/m}^2/\text{s}$, fourni par des tubes fluorescents de type Philips TLD 58 W/89, à une température alternée (25 \pm 1 °C le jour, 18 \pm 1 °C la nuit) selon une photopériode de 16 heures par jour. L'humidité relative est de 60% dans la chambre de culture pendant toute la durée de l'expérimentation.

Les nouveaux bourgeons obtenus *in vitro* sont excisés et transférés sur le même milieu toutes les quatre semaines afin de produire du matériel expérimental.

Enracinement

De jeunes pousses feuillées de quatre à cinq semaines de développement cultivées sur le milieu de multiplication sont coupées à leur base (env. 2-3 cm de longueur) et repiquées sur un milieu d'enracinement, selon la technique BdR/Ctifl-Balandran, France (BOURRAIN et NAVATEL, 2000), contenant 2 mg/l d'acide 3-indolylbutyrique (IBA). Les pousses sont maintenues pendant sept jours à l'obscurité, ensuite elles sont transférées sur un milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962), sans régulateurs de croissance, contenant de la vermiculite pour permettre l'émergence des racines durant deux semaines.

Les conditions de stérilisation et de culture sont identiques à celles de la phase de multiplication *in vitro* (voir ci-dessus).

Technique de greffage *in vitro*

Au cours des essais préliminaires, l'influence du stade de croissance des greffons a été examinée. De ces résultats, nous avons retenu des apex-greffons de deux semaines de culture *in vitro*, qui, dans nos conditions d'expérimentation, nous ont permis d'obtenir les meilleures réponses au greffage. Aussi avons-nous poursuivi les essais de microgreffage des variétés Lüina et Verdanesa avec cette contrainte. Pour le greffage *in vitro*, la greffe en fente simple qui est la plus adaptée à notre matériel a été retenue dans cette étude. Des apex-greffons (env. 1 cm de longueur) sont coupés et maintenus d'abord dans une solution de diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA) pendant cinq minutes, afin de prévenir l'oxydation des composés phénoliques rendant toxiques les tissus endommagés. Ensuite, dans des conditions d'asepsie rigoureuses, les greffons sont taillés en biseau de manière à éviter une ouverture trop large et trop profonde du porte-greffe. Parallèlement, on procède à la préparation du porte-greffe enraciné de Maraval CA-74 en créant une fente simple pour recevoir le greffon. Tous les bourgeons axillaires du porte-greffe sont éliminés par la même occasion. Puis, sous une loupe binoculaire, on procède à l'assemblage des deux partenaires à l'aide de pinces fines. Les plants greffés sont alors cultivés sur le milieu d'enracinement et maintenus ensuite dans la chambre de culture dans les mêmes conditions climatiques que pendant la phase de multiplication.

Examen histologique

L'incompatibilité au greffage, aussi bien intra- qu'interclonale, est un phénomène très fréquent chez le châtaignier (ORAGUZIE *et al.*, 1999). Aussi, des examens histologiques ont été réalisés afin de s'assurer de l'affinité entre les deux cultivars et le porte-greffe. L'examen histologique consiste à fixer des plants de deux semaines greffés dans une solution de formaldéhyde-acide acétique-alcool (FAA). Ensuite, les échantillons sont soumis à une déshydratation graduelle dans l'éthanol de 20% à 100%, suivie d'un enrobage par infiltration



Fig. 1. Explants initiaux de châtaignier (Maraval CA-74) obtenus après quatre semaines de culture à partir de bourgeons axillaires.



Fig. 2. Jeunes pousses feuillées du clone porte-greffe Maraval CA-74 développées à partir d'explants initiaux. Barre = 1 cm.

dans une solution de 50% d'Historesin® et de 50% d'éthanol absolu et enfin dans une solution pure d'Historesin®, selon les indications de la firme Reichert-Jung (Heidelberg). Ils sont ensuite découpés au microtome à une épaisseur de 5 µm, colorés par la réaction de l'acide périodique de Schiff (PAS) et contre-colorés au Fast green. Enfin, les coupes sont montées dans l'Eukitt® puis observées au microscope.

Résultats et discussion

Multiplication *in vitro*

La multiplication *in vitro* des trois clones de châtaignier selon la méthode mentionnée ci-dessus a permis d'obtenir sans difficulté plus de 95% d'explants qui ont repris leur croissance et leur développement normal par la suite, sans nécrose apicale et sans chlorose (fig. 1 et 2). Le choix du milieu de culture solide et la présence de la benzylaminopurine (BAP) et de l'acide 3-indolylbutyrique (IBA) (à respectivement 0,2 mg/l et 0,02 mg/l) dans le milieu nutritif ont permis le développement d'un nombre élevé de bourgeons utilisables par explant pour le porte-greffe Maraval CA-74 (fig. 3). La multiplication *in vitro* du châtaignier est plus couramment pratiquée par le biais des bourgeons axillaires que par les apex, parce que le pourcentage de bourgeons utilisables est plus élevé. Cette méthode de multiplication était recommandée par

plusieurs auteurs pour la famille des fagacées, reconnue difficile à reproduire, comme le chêne et le hêtre (SAN-JOSÉ *et al.*, 1988). Chez le châtaignier, la différence entre les deux méthodes peut être expliquée par l'effet de dominance produit par l'apex, ainsi que par le développement maximal et l'orientation morphogénétique des bourgeons axillaires qui sont utilisés pour la remise en culture (SANCHEZ *et al.*, 1997). Toutefois, on remarque la présence de cals à la base des bourgeons issus de cette phase de multiplication et, dans certains cas, de plantes à feuilles vitreuses. Ce même phénomène, observé sur les jeunes pousses développées *in vitro*, a été relevé auparavant par VIEITEZ *et al.* (1986) et MIRANDA-FONTAINE et FERNANDEZ-LOPEZ (2001) sur les clones de châtaignier espagnols. De

nombreux facteurs d'ordre nutritionnel, hormonal et physique (consistance du gel d'agar entrant dans la composition du milieu nutritif) pourraient être à l'origine de ce défaut dans la formation des jeunes pousses feuillées (PAQUES et BOXUS, 1987).

Le nombre de bourgeons utilisables par explant au cours des repiquages successifs est également illustré dans la figure 3. On observe une variation importante du nombre total de bourgeons (NTB) ainsi que du nombre de bourgeons utilisables (NBU) au cours de ces repiquages. Le nombre de bourgeons utilisables est notamment plus élevé en juillet que durant les mois d'hiver. Cette variation dans le nombre de bourgeons peut être expliquée, selon GONÇALVES *et al.* (1998), par l'activité spécifique des peroxydases qui, en fonc-

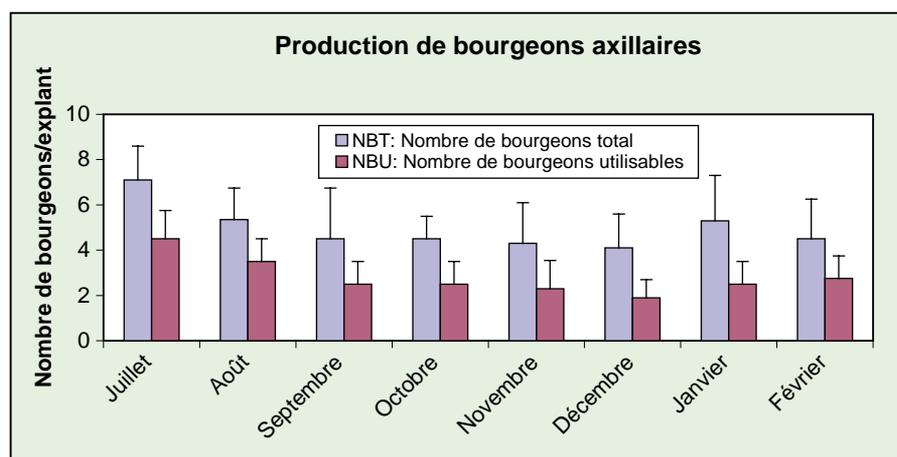


Fig. 3. Nombre de bourgeons produits par explant au cours des repiquages successifs.

tion des conditions climatiques environnantes, pourraient influencer la capacité de prolifération du châtaignier. Par ailleurs, le problème majeur survenant lors de la multiplication *in vitro* est le brunissement du milieu nutritif causé par l'oxydation des composés phénoliques libérés par le tissu végétal, comme nous l'avons observé auparavant (LÊ, 1992) sur les clones de châtaignier suisses. Afin de remédier à cette difficulté, les explants sont maintenus pendant quatre à cinq jours à l'obscurité lors de chaque remise en culture. A cet égard, SANCHEZ *et al.* (1997) et MATO et VIEITEZ (1986) ont suggéré pour plusieurs espèces ligneuses le maintien à l'obscurité des explants fraîchement inoculés. Cela contribue à diminuer de façon importante la contamination du milieu nutritif par des composés phénoliques exsudés lors des repiquages.

Enracinement *in vitro*

Au cours de multiples repiquages sur le milieu de multiplication contenant 0,2 mg/l de BAP, nous avons isolé les pousses feuillées et les avons transférées sur un milieu d'enracinement approprié pour qu'elles développent de nouvelles racines adventives. Cela a permis de reconstituer des plantes entières capables de subir des expériences de greffage *in vitro* (fig. 4). L'examen des résultats après deux semaines de culture montre qu'un taux d'enracinement important (env. 95%) a pu être ob-

tenu avec une concentration de 2 mg/l d'IBA. On dénombre en moyenne quatre nouvelles racines produites par explant et par cycle de culture, avec une longueur de 12 à 15 mm environ. Elles sont vigoureuses et dotées parfois de racines secondaires. Une forte concentration d'auxine (1 à 5 mg/l) pour induire la formation de racines adventives sur le porte-greffe du châtaignier est, dans le cas présent, indispensable, comme l'ont démontré XING *et al.* (1997) pour la micropropagation du châtaignier américain. A ce propos, des travaux antérieurs montrent que l'enracinement du châtaignier peut être obtenu soit par la culture de jeunes pousses feuillées sur un milieu contenant 1 à 5 mg/l d'acide-3-indolylbutyrique (IBA), soit par un trempage des bourgeons axillaires dans une solution d'IBA à forte concentration (0,5 à 1,0 g/l) pendant 30 à 120 secondes (SANCHEZ *et al.*, 1997; CHAUVIN et SALESSES, 1988).

Cependant, l'inconvénient majeur qui apparaît au stade de l'enracinement est la présence de nécroses apicales. En effet, nous avons relevé une partie non négligeable (env. 25%) de pousses feuillées présentant ce défaut après le cycle d'enracinement. Des observations similaires ont été également faites par XING *et al.* (1997). VIEITEZ *et al.* (1989) ont aussi constaté ce défaut physiologique et ont tenté d'expliquer ce phénomène par une déficience en calcium, le manque de cytokinines dans le milieu de culture et par une connexion vasculaire incomplète entre les bourgeons et les racines développées *in vitro*. Cela empêche,

par conséquent, l'absorption des éléments nutritifs indispensables à leur croissance. Afin de parer à ce défaut physiologique, divers moyens ont été suggérés lors de la phase d'enracinement, tels que l'apport de calcium (SHA *et al.*, 1985; YANG *et al.*, 1985; SINGHA *et al.*, 1990), des cytokinines (KATAEVA *et al.*, 1991; PIAGNANI *et al.*, 1996) ou encore l'incorporation des vitamines dans le milieu nutritif jouant le rôle d'antioxydant à l'encontre des composés phénoliques (LÊ, 2001). Dans cette étude, nous avons utilisé des plantes dont l'apex présentait une croissance normale pour l'opération de greffage ultérieure.

Greffage *in vitro* et examen histologique

La technique de greffage *in vitro* décrite plus haut permet d'obtenir les plantes greffées avec les cultivars Verdanesa et Lüina nécessaires à l'examen histologique (fig. 5a et b).

La reprise de greffes effectuées sur des plantes âgées de deux semaines de culture montre que nos conditions d'expérimentation sont favorables au développement des plantes greffées. La détermination des conditions physiologiques de deux partenaires est primordiale pour établir un certain équilibre entre la vigueur du porte-greffe et du greffon, facilitant la reprise de croissance ultérieurement. Dans notre expérience, l'assemblage du greffon, âgé de



Fig. 4. Clones de Maraval CA-74 enracinés sur le milieu d'enracinement selon la technique BdR.



Fig. 5a. Plant greffé du clone Lüina sur Maraval CA-74. Arrêt de croissance (flèche) montrant l'incompatibilité des partenaires après deux semaines en culture *in vitro*.

deux semaines, sur le porte-greffe raciné paraît correspondre aux exigences d'ordre pratique pour réussir le greffage *in vitro* chez le châtaignier. En ce qui concerne les plantes ligneuses, FRANCKET (1981) montre que le greffage d'apex prélevé sur des explants cultivés *in vitro* est avantageux parce qu'il entraîne un rajeunissement du matériel adulte.

De même que lors de l'opération d'enracinement, nous avons constaté que le problème majeur du greffage *in vitro* était la présence de nécroses sur les apex des greffons de la variété Lüina. Ce phénomène peut être la manifestation des symptômes d'incompatibilité dite localisée (HERRERO, 1951) entre variété et porte-greffe. Les coupes histologiques (fig. 6a et b) montrent bien l'existence d'une barrière constituée par un précipité dense et l'absence de connexion entre les deux partenaires. Des résultats similaires ont été aussi trouvés par HUANG *et al.* (1994) qui relèvent le même phénomène d'incompatibilité de greffage chez les châtaigniers asiatiques. Ces auteurs montrent qu'il n'y a pas de relation étroite entre l'activité des peroxydases dans l'apex et son développement après le greffage. En fait, cette incompatibilité localisée semble être due à une diffusion des substances inhibitrices provenant des cellules de deux partenaires (BRIAN et DURON, 1971) ou du greffon, qui empêchent le développement des cellules du porte-greffe comme le montre MOORE (1986) dans ses travaux portant sur la compatibilité entre poirier et cognas-



Fig. 5b. Plant greffé du clone Verdanesa sur Maraval CA-74. Reprise de greffe (flèche) montrant la compatibilité des partenaires après deux semaines en culture *in vitro*.

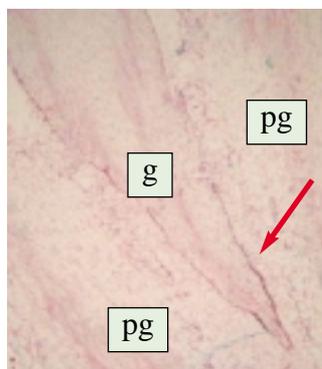


Fig. 6a. Coupe longitudinale d'un plant greffé après deux semaines de culture. g = greffon Lüina; pg = porte-greffe Maraval CA-74. Grossissement $\times 5$.

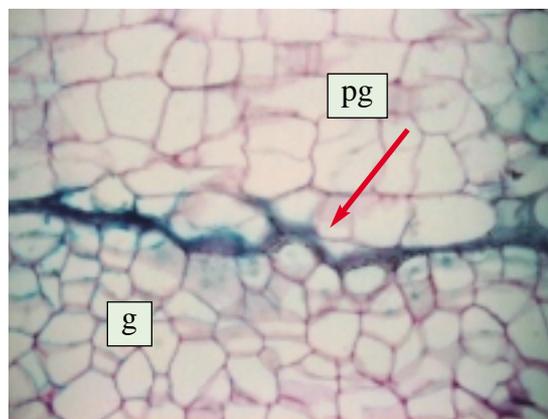


Fig. 6b. Ligne dense montrant la séparation des deux partenaires et matérialisant leur incompatibilité. Grossissement $\times 40$.

sier. De même, le stade physiologique de la plante (DEGRATIAS *et al.*, 1991) ainsi que l'oxydation des polyphénols produits à la surface des coupes par les deux partenaires jouent également un rôle important dans la réussite du greffage (RAMANAYAKE et KOVOOR, 1999). Contrairement à la variété Lüina, après deux semaines de greffage *in vitro* entre Verdanesa (greffon) et Maraval CA-74 (porte-greffe), les tissus s'interpénètrent et entrent en division active de part et d'autre (fig. 7a et b). Les observations histologiques montrent des zones de prolifération plus larges et plus nombreuses, alors que ces zones demeurent en petit nombre et peu développées chez Lüina. Les tissus vasculaires entrent en contact avec les tissus cambiaux, offrant la possibilité d'une connexion vasculaire ultérieure, comme l'a observé HERRERO (1951) sur le pêcher (var. Hale's early) greffé sur le porte-greffe Brompton. L'auteur signale qu'un contact est très rapidement établi entre les deux partenaires et que l'activité des tissus vasculaires respectifs contribue à produire une connexion continue entre le porte-greffe et le greffon: c'est

un cas de compatibilité entre les deux partenaires. A ce propos, BRIAN et DURON (1971) ont aussi rapporté que lorsqu'une combinaison entre le poirier (var. Passe-Crassane) et un cognassier (*Cydonia oblonga*) est compatible, un cambium continu se met en place, constituant une véritable différenciation histologique, et la combinaison évolue alors normalement.

Ainsi, le greffage *in vitro* nous permet d'obtenir des plantes greffées et de détecter précocément les incompatibilités qui se manifesteront au champ, parfois très tardivement après plusieurs années, entraînant par conséquent des pertes considérables pour les producteurs (JONARD *et al.*, 1983). Cette constatation permet d'améliorer les conditions de greffage traditionnel, en recourant d'une part à des plants de *C. sativa* sélectionnés issus de semis et en plantant d'autre part directement des hybrides interspécifiques sélectionnés et compatibles avec plusieurs variétés. Ces deux moyens peuvent être utilisés efficacement par les sélectionneurs de plants du châtaignier pour réussir le greffage au champ.

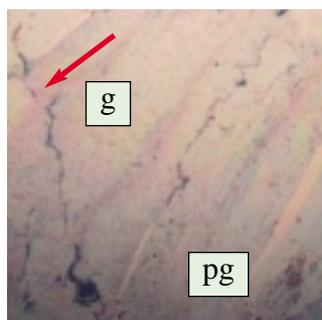


Fig. 7a. Coupe longitudinale d'un plant greffé après deux semaines de culture. g = greffon Verdanesa. pg = porte-greffe Maraval CA-74 (flèche = zones de connexion). Grossissement $\times 5$.



Fig. 7b. Zone montrant le début de la connexion des deux partenaires (flèche). Grossissement $\times 40$.

Conclusion

- L'ensemble des résultats expérimentaux concernant les conditions de multiplication, d'enracinement et de greffage du châtaignier *in vitro* réalisés dans ce travail permettent de tirer les conclusions suivantes:
 - il est possible de faire proliférer des pousses feuillées utilisables de trois clones de châtaignier (Maraval CA-74, Verdanesa et Lüina) grâce à l'action conjuguée de la benzyladenine (0,2 mg/l) et de l'acide-3-indolylbutyrique (IBA 0,02 mg/l);
 - l'enracinement des pousses feuillées (clone Maraval CA-74) servant de porte-greffe peut être obtenu avec le traitement à l'IBA à 2 mg/l;
 - le greffage *in vitro* des cultivars Verdanesa et Lüina sur porte-greffe Maraval CA-74 est réalisable en utilisant des greffons âgés de deux semaines;
 - l'examen histologique effectué sur des sujets greffés permet de visualiser, au niveau de la greffe, le degré de compatibilité entre les deux partenaires.
- Des travaux ultérieurs effectués sur d'autres génotypes sélectionnés sont en cours de réalisation, afin de vérifier l'efficacité de cette nouvelle technique, cela en rapport avec le contrôle au verger.
- Dans cette étude, le protocole expérimental mis au point – à notre connaissance pour la première fois – peut constituer, en l'absence d'une technique de détection fiable et reproductible sur la compatibilité (ou incompatibilité) au greffage du châtaignier, une alternative avantageuse permettant d'éviter de longues années d'observation au champ.

Remerciements

La direction d'Agroscope RAC Changins est vivement remerciée pour avoir autorisé la réalisation de cette étude à Changins, dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Neuchâtel et l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL, Birmensdorf). Nos remerciements s'adressent également au professeur Philippe Küpfer, de l'Université de Neuchâtel, pour nous avoir accueillis dans son laboratoire de botanique évolutive et avoir facilité le développement d'un nouveau sujet de recherche, et à M. Marco Conedera (WSL, Birmensdorf) pour son intérêt porté à cette étude et pour ses conseils avisés. Notre gratitude s'exprime également à l'Action COST 843 (OFES) pour son encouragement au dé-

veloppement des biotechnologies végétales appliquées en Suisse. Notre reconnaissance va aussi à M^{me} Maria Lafargue (INRA-Bordeaux), M^{me} Laurence Bourrain et M. Jean-Claude Navatel, Ctifl, centre de Balandran (France) pour la mise à disposition du matériel végétal indispensable à la réalisation de ce travail. De même, nos remerciements sont adressés à MM. Alberto Sassella et Mauro Jermini (RAC-Cadenazzo) pour leur intérêt porté à ce travail, ainsi qu'à tous nos collègues du service de culture *in vitro* pour leur précieuse collaboration permettant le bon déroulement de cette étude.

Bibliographie

La liste complète des références bibliographiques peut être obtenue auprès du premier auteur.

Summary

In vitro micrografting of chestnut (*Castanea sativa* Mill.)

A method for *in vitro* propagating, rooting and grafting of three clones of chestnut (Maraval CA-74, Lüina and Verdanesa) is described in this paper.

The composition of the nutrient medium and the choice of the physiological stage suitable for grafting can play an important role for the successful result in the micrografting process.

To ensure the compatibility between scion and rootstock, an histological study was realized on the grafted plantlets in view to visualize the compatibility degree between partners at the tissue level.

Key words: *Castanea crenata* × *Castanea sativa*, chestnut, *in vitro* grafting, apical necrosis, compatibility.

Zusammenfassung

In vitro Mikro-Veredelung des Kastanienbaums (*Castanea sativa* Mill.)

In diesem Artikel wird eine Methode zur Massenvermehrung, Wurzelbildung und Veredelung von drei Kastanien-Klonen (Maraval CA-74, Lüina und Verdanesa) beschrieben.

Die Zusammensetzung des Nährmediums und die Wahl der für die Veredelung geeignete physiologische Phase könnten eine wichtige Rolle spielen für den Erfolg des Mikro-Veredelungs-Prozesses.

Um auf dem Niveau des Gewebes den Kompatibilitätsgrad der Sorte mit der Unterlage sicherzustellen wurde eine histologische Studie durchgeführt.



Vitesses surface
Heures



Débitmètres



Contrôle pulvérisation

**Tous les compteurs
pour l'agriculture de précision**

AgriTechno L'agriculture de précision

Case postale 24 – CH-1066 Epalinges

Tél. 021 784 19 60 – Fax 021 784 36 35 – GSM 079 333 04 10

E-mail: agritechno-lambert@bluewin.ch

BOUCHONS Schittler
FABRIQUE DE BOUCHONS ET DE LIÈGE AGGLOMÉRÉ

E. & H. Schittler Frères SA
Autschachen 41
CH-8752 Naefels / Gl
Tél. +41 (0)55 618 40 30
Fax +41 (0)55 618 40 37
info@swisscork.ch

PIÈCES BOURGOGNE OU
BORDEAUX DE FABRICATION
ARTISANALE?
CONSULTEZ LE SITE
WWW.SWISSCORK.CH



Framboises Plants mottés

Fraisiers



TULAMEEN GLEN AMPLE^(R)

Robust, fort rendement, gros fruits.

WILLAMETTE, MEEKER, FERTÖDI ZAMATOS,
MALAHAT^(S), WEI-RULA^(S), REMETTE^(R), MARLA^(R),
ELIDA^(R), NINIANE^(R), BLISSY^(R), GOLDEN BLISS^(R)

Petits fruits



Exempt de virus et origine contrôlée
= plus de sécurité pour vos investissements
dans vos nouvelles cultures.

Ronces



Häberli^(R)

Plants de fruits et petits fruits

Häberli
centre de fruits et petits fruits SA
CH/1997 Haute-Nendaz
Tel. +41(0)27 288 18 30, Fax +41(0)27 288 18 35
www.haerberli-beeren.ch, info@haerberli-beeren.ch

EFFEUILLEUSES

Vous avez le choix des armes!



SOUSLIKOFF

- Effeuilleuse thermique
- utilisation de juin à septembre
 - nécessite peu de puissance

COLLARD RAPTOR

- Pneumatique GALVIT
- nettoyage des grappes
 - intervention précoce



GRUNDERCO
Satigny 022 989 13 30
Mathod 024 459 17 71

www.grunderco.ch

CABRIDO^(R) PACK

Combinaison fongicide hautement actif et à large spectre d'efficacité pour la viticulture. Contre toutes les maladies de la vigne!

**Nouvelle homologation pour
traitement par voie aérienne!**



Leu+Gygax SA, 5413 Birmenstorf Téléphone 056-201 45 45
3075 Rüfenacht Téléphone 031-839 24 41
Chef de vente Suisse Romande: Raymond Christen Natel 079 434 92 18

Un produit de BASF SA
Classe de toxicité 4:
Observer la mise en garde sur l'emballage.

Martin Auer
Pépinières viticoles
8215 Hallau



C'est le bon moment pour votre choix !

Assortiment complet des variétés,
clones et porte-greffes
et raisins de table

Service de plantation à la machine

Demandez nos conseils
et notre brochure en couleur, gratuite,
sur les variétés

www.rebschulen.ch

E-mail: auer@rebschulen.ch

Tél. 052 681 26 27 • Fax 052 681 45 63



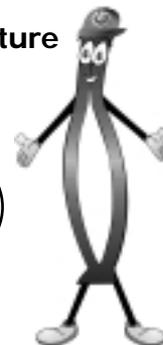
Chers Vignerons et Arboriculteurs

Plus de 10 années d'expérience
et de savoir-faire dans la

Lutte par confusion

Viticulture et Arboriculture

Dès 2004
Distribution exclusive
de la gamme innovatrice
ISONET et ISOMATE



C'est avec plaisir que nous répondrons à toutes vos
demandes, alors n'hésitez pas à nous contacter

Antenne romande

Michel Jeanrenaud
1166 Perroy
Natel 079 632 35 63
Tél./Fax 021 825 13 68

Siège central

Stahlermatten 6
6146 Grossdietwil
Tél. 062 917 50 05
Fax 062 917 50 06

Dés herbants sans compromis



Plus performant,
plus rapide,
plus sûr!



CHIKARA 25 WG

Le moment viendra pour traiter avec Chikara 25 WG

ALCE

Le mélange éprouvé pour des traitements souples.

Classes de toxicité: ROUNDUP MAX frei;
CHIKARA 25 WG 5s; ALCE 5

Un programme
complet
et réussi pour
le désherbage



Stähler Suisse SA, 4800 Zofingen
Tél. 062 746 80 00, Fax 062 746 80 08
www.staehler.ch