Production de plants de châtaignier de la variété Marigoule, *Castanea crenata* x *Castanea sativa*, par multiplication *in vitro*

Chestnut plant production of Marigoule variety, Castanea crenata x Castanea sativa, by in vitro multiplication

L. BOURRAIN, J.C. NAVATEL

CTIFL, Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes
Centre de Balandran, BP 32, 30127 Bellegarde
Tél : 04 66 01 10 54 • Fax : 04 66 01 62 28 • Email : bourrain@ctifl.fr

Résumé : La mise en place d'un schéma de certification du châtaignier sous-entend la possibilité de produire du matériel de base sain et authentique pour les variétés intéressant les professionnels de la castanéiculture. Marigoule, variété aujourd'hui demandée par les producteurs, n'est pas disponible en plants certifiés, faute de matériel sain. La production de plants par micropropagation *in vitro* est une des solutions retenues pour remédier à ce déficit et approvisionner rapidement les pépiniéristes en plants de base. Si la phase de multiplication est aujourd'hui maîtrisée, des progrès restent à faire concernant la phase de rhizogenèse. Il est possible d'enraciner des plants et de diminuer le prix de revient de la phase d'enracinement *in vitro* par l'utilisation de riboflavine. Les plants sont enracinés dans un milieu contenant 2 mg/l d'AIB, 2 mg/l de riboflavine et de la vermiculite pendant une durée de 1 à 7 jours à l'obscurité suivi d'une mise directe à la lumière sans changement de milieu de culture.

Mots clés : *Castanea crenata x Castanea sativa*, châtaignier, culture *in vitro*, Marigoule, micropropagation, rhizogenèse, riboflavine

Abstract : *The implementation of a certification scheme for chestnuts implies the possibility of producing healthy and authentic basal material of the varieties of interest to professional growers. Marigoule, a variety currently in demand by the producers is not available as certified plants, due to a lack of healthy material. The plant production by in vitro micropropagation is one of the solutions retained to remedy this deficit and to provide the nursery men quickly with basal plants. Whereas the phase of multiplication is already mastered, progress still remains to be made concerning the phase of rhizogenesis. It is possible to root plants and to decrease the cost production of the in vitro phase by the use of riboflavin. Plants are rooted in a medium supplemented with 2 mg/l of IBA, 2 mg/l of riboflavin and vermiculite during a period of 1 to 7 days in darkness followed by a period in light without transfer to a new medium.*

Keywords : *Castanea crenata x Castanea sativa, chestnut, in vitro culture, Marigoule, micropropagation, rhizogenesis, riboflavin*

1 Introduction

La châtaigneraie française est à l'heure actuelle décimée par deux maladies cryptogamiques, l'encre des racines (*Phytophthora cinnamomi* Rands et *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis) et le chancre de l'écorce (*Cryphonectria [Endothia] parasitica* (Murril) Barr.) ainsi que par le virus de la mosaïque (ChMV : Chestnut Mosaic Virus). Le renouveau de la culture ne saurait être réel sans sélection d'un matériel végétal sain, performant et résistant aux maladies.

Différents essais d'évaluation ont révélé deux nouvelles variétés : Marigoule et Bouche de Betizac qui intéressent les professionnels pour leurs qualités (taille et qualité gustative des marrons). Elles sont issues du programme INRA de création d'hybrides interspécifiques entre l'espèce indigène *Castanea sativa* et l'espèce japonaise *Castanea crenata.* Marigoule, possédant un certain niveau de résistance vis-à-vis de l'encre, peut être utilisée soit comme variété fruitière greffée ou cultivée sur ses propres racines soit éventuellement comme porte-greffe.

L'utilisation de ces variétés est envisageable uniquement s'il est possible d'approvisionner les professionnels de la castanéiculture avec des plants de qualité certifiés, c'est-à-dire sains et authentiques. La multiplication classique par bouturage et marcottage est une technique longue, de faible multiplication et pose des problèmes de recontamination par le virus de la mosaïque. La micropropagation *in vitro* a donc été testée et utilisée afin de produire rapidement des pieds-mères indemnes de virus destinés à l'établissement de marcottières saines et à la diffusion de plants de qualité auprès des castanéiculteurs.

2 Objectif : mise en place d'un schéma de certification

Alors que la demande en plants de variétés classiques, et encore plus de variétés résistantes à l'encre, telle que Marigoule, se fait de plus en plus pressante au niveau national et européen, la production s'avère chaque année insuffisante. Face à cette situation les plantations sont réalisées avec du matériel végétal venant de toutes origines et souvent de qualité sanitaire douteuse. La solution pour résoudre ce type de problème consiste à mettre en place un schéma de production parfaitement codifié qui aboutira à l'obtention de plants certifiés, la totalité de la filière production de plants étant alors contrôlée. La certification permettra ainsi aux producteurs d'acheter en toute confiance du matériel végétal authentique et indemne de virus.

Le Ctifl, le SPV et l'INRA, en collaboration avec les pépiniéristes, sont les différents intervenants de la certification.

Cette initiative volontaire permet aux pépiniéristes de proposer aux arboriculteurs des plants certifiés assurant une qualité maximale au point de vue sanitaire et pomologique.

L'espèce châtaignier est depuis longtemps inscrite dans la liste des espèces sous certification publiée chaque année. Neuf variétés sont annoncées sous certification sous réserve de disponibilité effective. A l'heure actuelle, aucun plant de Marigoule (ni d'autre variété) n'a pu encore être certifié faute de production de plants indemnes de virus par bouturage, marcottage ou culture *in vitro*. Cette dernière voie semble être aujourd'hui la méthode la plus rapide pouvant mener à la production de plants sains et authentiques grâce aux potentialités de la micropropagation.

La multiplication de Marigoule par micropropagation *in vitro* est proposée pour les raisons suivantes :

- Difficultés de produire des plants sains à partir du matériel végétal existant actuellement sur le marché par les techniques classiques de multiplication : bouturage ou marcottage.
- La micropropagation par bourgeonnement axillaire permet de combiner un taux de multiplication élevé et l'éradication des virus présents par la régénération à partir de méristèmes.
- Elle permet, lorsque la technique est maîtrisée, de mettre rapidement sur le marché de nouveaux clones sélectionnés et ainsi favoriser plus rapidement le renouveau de la filière par la mise en place de marcottières saines.

La multiplication *in vitro* du châtaignier et plus particulièrement celle de Marigoule est considérée par les différentes équipes de recherche comme difficile. Depuis 1996, dans le cadre des programmes européens COST (European cooperation in the field of scientific and technical research), un groupe de travail "COST Action G4" intitulé "Multidisciplinary Chestnut Research" a été mis en place. En raison des difficultés rencontrées par tous les laboratoires dans la maîtrise de la multiplication, un sous-groupe de recherche thématique regroupant une quinzaine de chercheurs européens a décidé de développer les études sur la multiplication *in vitro* et a choisi la variété Marigoule comme modèle. Le Ctifl réalise une partie de ces recherches dans le cadre de ce groupe de travail (Bourrain et Navatel, 1999 ; Bourrain *et al.*, 1998 et 1997).

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériel végétal : Marigoule

Synonyme et numéro d'étude	M. 15
Clone observé	CA 15
Inscription CTPS	1986
Protection	non
Origine	hybride naturel *C. crenata* x *C. sativa* observé à Migoule en Corrèze (19) et sélectionné par l'INRA
Utilisation	Utilisé à la fois comme variété et éventuellement comme porte-greffe

3.2 Méthodes

✓ Etablissement *in vitro* de la culture

La mise en culture de Marigoule a été effectuée en mars 1995 à partir de plants greffés sur semis de *Castanea sativa* et élevés en container en serre. Le pied-mère est garanti indemne de virus par test immunologique Elisa.

Les explants (microbouture à un œil) ont été mis en culture individuellement en tube après désinfection par nettoyage au Mercryle Laurylé et à l'alcool à 70° suivi d'une désinfection à l'hypochlorite de sodium (Javel) (20 minutes à 2% puis 2 minutes à 12%) et trois rinçages à l'eau distillée stérile. Les plants obtenus après environ 5 semaines (22°C, photopériode 16 heures) sont

contrôlés visuellement pour les contaminations fongiques et à l'aide d'un milieu de détection pour les contaminations bactériennes. Seuls les explants sains sont conservés pour débuter la phase de multiplication.

✓ Multiplication

- Composition du milieu de multiplication témoin :

Celle-ci est résumée dans le tableau n°1.

Macro-éléments	Driver Kuniyuki Walnut modifié (cf Annexe n°1)
Micro-éléments	Driver Kuniyuki Walnut
Fer	Fer sous forme de Nafe EDTA 80 mg/l
Vitamines	Driver Kuniyuki Walnut
Inositol	Myo-inositol : 100 mg/l
BAP	0.1 mg/l
Source de carbone	Glucose : 30 g/l
Gélose	Bacto Agar : 8.5 à 9.5 g/l
pH	5.6 ajusté avec KOH 0.1 M avant autoclavage
Autoclavage	25 minutes à 116-118°C
Container	Type Meli, 130 ml de milieu par pot

Tableau n°1 : Composition du milieu de multiplication témoin

- Conditions de culture :

15 à 20 explants sont repiqués par pot et repris en culture toutes les 4 à 5 semaines.
La photopériode est de 16 heures, éclairage par tubes fluorescents de type lumière du jour : 40-50 µmol/s/m^2, la température étant régulée à 24-25°C sans alternance jour/nuit.
A la fin de la phase de multiplication seules les pousses de 3 à 4 cm minimum sont sélectionnées pour les essais d'enracinement. Elles doivent être totalement indemnes de nécroses ou de vitrescence. En effet la qualité des pousses issues de la phase de multiplication est primordiale afin de pouvoir envisager la réussite de la rhizogenèse (cf Photo n°1).

Photo n° 1 : Touffes en fin de multiplication

✓ Rhizogenèse

Deux techniques sont testées en parallèle. La première (technique témoin) fait appel à une succession de deux milieux de culture : milieu d'induction contenant de l'AIB (Acide Indole Butyrique) et milieu d'expression racinaire sans régulateur de croissance (cf Tableau n°2). La deuxième est réalisée en un seul milieu permettant de combiner induction et expression par l'exploitation des propriétés de la riboflavine (photo-oxydation des auxines).

	Induction : BdR 2 mg/l AIB	**Expression : MS ¼**
Macro-éléments	BdR	MS dilué au ¼
Micro-éléments	Lepoivre (cf Annexe n°1)	Murashige et Skoog
Fer	Fer sous forme de Nafe EDTA 40 mg/l	
Vitamines	Murashige et Skoog (cf. Annexe n°1)	
Inositol	Myo-inositol : 100 mg/l	
AIB	2 mg/l	Aucun régulateur de croissance
Source de carbone	Saccharose : 30 g/l	Glucose : 30 g/l
Gélose	HP 696 de la société Kalys : 8.5 g/l	
pH	5.6 ajusté avec KOH 0.1 M avant autoclavage	
Autoclavage	25 minutes à 116-118°C	
Container	Type Meli, 130 ml de milieu par pot	Type Meli, 135 ml de milieu par pot
Vermiculite	-	170 ml/l de milieu

Tableau n°2 : Composition des milieux témoins d'induction et d'expression racinaire

- Technique d'enracinement témoin :

Le milieu témoin d'induction racinaire est le milieu BdR (Balandran rhizogenèse) contenant 2 mg/l d'AIB. Les plants sont placés sur ce milieu à l'obscurité pendant 7 jours puis transférés sur le milieu d'expression racinaire, MS dilué au ¼ sans régulateur de croissance contenant de la vermiculite afin d'assurer l'élongation racinaire et favoriser le redémarrage de l'apex (cf Annexe n°1) (Jay-Allemand et Capelli,1992 ; Navatel et Bourrain, 1994).

- Technique utilisant les propriétés de la riboflavine[1] :

Le rôle de la riboflavine dans la photo-inactivation des auxines a été montré dès 1949 par Galston et Baker. De nombreux chercheurs ont alors employé la riboflavine dans les expériences de photo-destruction de l'AIA (Acide Indole Acétique). Cette technique permet de s'affranchir du transfert du milieu d'induction contenant l'auxine vers un milieu d'expression sans régulateur de croissance. En effet, l'induction peut être réalisée à l'obscurité, ensuite le passage à la lumière permet par l'action de la riboflavine de détruire l'auxine sans avoir recours à un milieu sans hormone.

[1] La riboflavine est une vitamine connue sous divers noms : vitamine B2, lactoflavine, vitamine G.
Formule : $C_{17}H_{20}N_4O_6$ - Poids moléculaire : 376.36. Elle est soluble dans l'alcool.
Elle est impliquée chez les végétaux dans le processus de photo-oxydation des auxines.

L'enracinement est réalisé sur le milieu témoin BdR contenant 2 mg/l d'AIB auxquels sont ajoutés 2 mg/l de riboflavine dilués dans quelques gouttes d'éthanol et 170 ml de vermiculite. Les plants sont placés sur ce milieu pendant une durée variable : 1, 3, 5 et 7 jours à l'obscurité suivie d'une mise à la lumière sans changement de milieu de culture.

En raison de la photo-oxydation de l'AIB par la riboflavine sous l'effet de la lumière, il est porté un soin particulier à la préparation des milieux de culture. Dès la fin de leur préparation, ils sont autoclavés puis stockés au froid à 2°C à l'obscurité pendant quelques jours. En aucun cas ils ne doivent séjourner à la lumière. Lors des repiquages, ils sont sortis au fur et à mesure des besoins et mis à l'obscurité dès la fin du repiquage.

- Conditions de culture :

Pendant la phase d'enracinement les conditions de culture sont identiques à celles utilisées en multiplication.

✓ Acclimatation

Les plants sont acclimatés en serre sur des tablettes chauffées (21°C minimum) recouvertes d'une bâche plastique afin de maintenir pendant les premiers jours d'acclimatation une hygrométrie à saturation. L'hygrométrie est progressivement diminuée. L'acclimatation dure 3 à 4 semaines.

Les plants sont repiqués dans des godets horticoles plastiques de dimension 7x7x8 cm avec un substrat du commerce à base de tourbe (75%) et perlite (25%) : Steckmedium de la société Klasmann. Ce substrat est enrichi d'un engrais de type PG MIX 0.5 kg/m^3, équilibre 1-1.15-1.3-0.45 (N-P_2O_5-K_2O-MgO).

Les plants sont traités au Pomarsol ultradispersible (matière active : thirame) le jour du repiquage.

4 Discussion

4.1 Influence de la riboflavine sur l'enracinement

De nombreux paramètres ont été enregistrés. Aucune différence significative n'est observée pour les paramètres suivants : pourcentage d'enracinement, nombre de nécroses totales ou d'abscission d'apex, taille des pousses, pourcentage de réussite à l'acclimatation. Seul le critère « nombre moyen de racines par plant » est amélioré de manière significative et reproductible par l'utilisation de la technique BdR sans toutefois influencer le taux de réussite à l'acclimatation (cf Tableau n°3).

Le rendement de la technique correspond au pourcentage de plants obtenus en fin de phase d'acclimatation par rapport au nombre de plants mis en enracinement.

La durée d'exposition la plus faible (1 jour) est très hétérogène pour de nombreux paramètres mesurés.

La technique utilisant la riboflavine n'a pas montré de résultats qualitatifs et quantitatifs supérieurs au témoin sans toutefois lui être inférieur (cf Photo n°2). Il n'a pu être mis en évidence une durée optimale d'exposition à l'obscurité avec le milieu contenant de la riboflavine, les durées les plus courtes étant toutefois plus hétérogènes. Les doses d'AIB ainsi que de riboflavine doivent pouvoir être optimisées l'une par rapport à l'autre afin peut-être d'améliorer cette technique.

Traitements	Pourcentage de plants racinés de qualité		Pourcentage de réussite à l'acclimatation		Nombre moyen de racines par plant		Rendement de la technique en pourcentage	
BdR, témoin	78.0 ± 11.3	A	76.8 ± 10.5	A	4.4 ± 0.9	A	59.6 ± 9.7	A
Ribo 1 jour obscurité	71.8 ± 15.5	A	65.6 ± 26.4	A	2.5 ± 0.5	B	50.6 ± 28.4	A
Ribo 3 jours obscurité	77.0 ± 9.5	A	65.6 ± 17.0	A	2.4 ± 0.5	B	51.4 ± 19.0	A
Ribo 5 jours obscurité	79.8 ± 9.5	A	74.8 ± 17.3	A	2.7 ± 0.6	B	59.6 ± 16.4	A
Ribo 7 jours obscurité	72.2 ± 9.2	A	76.6 ± 12.4	A	2.5 ± 0.5	B	56.2 ± 11.6	A

Tableau n° 3 : Pourcentage de plants racinés, pourcentage d'acclimatation, nombre moyen de racines par plant et rendement de la technique en pourcentage

Photo n° 2 : Plants racinés, à gauche sur milieu témoin, à droite en présence de riboflavine

4.2 Incidence sur les coûts de production

Une étude des coûts de production (consommables, main d'œuvre, charges fixes…) a été réalisée parallèlement aux essais. Elle a permis de mettre en évidence la possibilité de réduire les coûts de production grâce à l'utilisation de la riboflavine. En effet, la technique BdR consistant en deux milieux successifs (milieu inducteur et milieu d'expression racinaire) et nécessitant un repiquage supplémentaire entraîne un coût supérieur par rapport à la technique utilisant la riboflavine (un seul milieu, un seul repiquage).

Les coûts ont été calculés en tenant compte uniquement de la phase enracinement et des différences entre les deux techniques (coût des milieux de culture et repiquage supplémentaire). Le coût calculé ne représente pas le prix d'un plant qui devrait se situer entre 1.22 et 1.52 €. L'utilisation de la riboflavine permet une diminution du coût de production d'environ **0.04 €** par plant par rapport au milieu témoin BdR. Cette diminution du coût parait justifier l'utilisation de cette technique dans la mesure où les résultats obtenus ne mettent pas, de manière significative, en évidence d'effets négatifs tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Par rapport au témoin, seul le nombre moyen de racines par plant est inférieur, ce qui *a priori* n'affecte pas la réussite de la technique.

4.3 Perspectives

Des essais complémentaires pour améliorer le rendement de la technique ont été mis en place. Le charbon actif a été utilisé dans le but d'endurcir les plants en fin de phase de multiplication. Lors du dernier repiquage en multiplication une dose de 30 mg/l de charbon actif et une augmentation de la BAP (Benzyl Amino Purine) à 0.15 mg/l (pour compenser une partie du piégeage des cytokinines par le charbon actif) a permis d'augmenter légèrement les pourcentages d'enracinement. Ils sont passés de 70% environ à 80%. Le taux de réussite à l'acclimatation a également été amélioré passant en moyenne de 70 à 90%. Cette technique entraîne donc un rendement supérieur. Malheureusement le charbon actif ne peut être utilisé en continu, car s'il améliore les paramètres de réussite à l'enracinement et à l'acclimatation, il réduit par contre presque totalement le potentiel de multiplication. Il devra être intégré dans le schéma de production au niveau du dernier cycle de multiplication uniquement, juste avant la phase d'induction racinaire.

5 Conclusion

Si la technique utilisant la riboflavine ne donne pas de résultats supérieurs au témoin en terme de quantité et de qualité, elle permet toutefois d'améliorer la productivité de la micropropagation *in vitro* de la variété Marigoule par une réduction des coûts de production. Ce résultat est loin d'être inintéressant pour un laboratoire commercial qui envisagerait de produire cette variété. Cette technique peut de plus être appliquée à de nombreuses autres espèces ligneuses avec le même objectif. Elle est à l'heure actuelle utilisée avec succès au laboratoire du Ctifl sur d'autres espèces telles le chêne, le mirabellier et le cerisier.

Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'un rendement maximum de la technique d'environ 60% n'est pas entièrement satisfaisant pour envisager la production industrielle de la variété Marigoule. Cette technique aura cependant permis d'approvisionner les pépiniéristes en plants de base certifiés, c'est-à-dire authentiques et indemnes de virus. En effet, 11.000 plants de Marigoule ont été produits en 1999-2000 afin de mettre en place chez les pépiniéristes des plants de base afin de débuter la production certifiée de cette variété (cf Photo n°3).

Photo n° 3 : Production de pieds-mères de Marigoule par micropropagation dans le cadre de la certification : plants âgés de 2 mois

Les possibilités qu'offrent l'utilisation du charbon actif par l'endurcissement des pousses dans la dernière phase de multiplication associée à un enracinement en présence de riboflavine et de vermiculite nous permet d'envisager une production *in vitro* commerciale de la variété Marigoule.

Annexes

	DKW[2]	BdR	MS [(4)]
MACRO-ELEMENTS en mg/l		**BdR[3]**	
NH_4NO_3	708	140	412.5
$CaCl_2$, $2H_2O$	73.5	440	110
$Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$	490	500	-
$MgSO_4$, $7H_2O$	739	184	92.5
KH_2PO_4	258	270	42.5
K_2SO_4	1560	-	-
KNO_3	-	360	475
$Mg(NO_3)_2$, $6H_2O$	-	256	-
MICRO-ELEMENTS en mg/l		**LP[4]**	
$CuSO_4$, $5H_2O$	0.25	0.025	0.025
$MnSO_4$, H_2O	33.8	0.758	16.9
Na_2MoO_4, $2H_2O$	0.4	0.25	0.25
$ZnSO_4$, $7H_2O$	16.5	8.6	10.6
H_3BO_3	4.8	12.4	12.4
$CoCl_2$, $6H_2O$	-	0.025	0.025
KI	-	0.08	0.83
Nafe EDTA	80	40	40
VITAMINES en mg/l		**Vitamines MS[5]**	
Acide nicotinique	2	1.0	1.0
Glycocolle	4	4.0	4.0
Thiamine	4	0.2	0.2
Pyridoxine	-	1.0	1.0
Inositol	100	100	100

Annexe n° 1 : Formulation des milieux de culture

Bibliographie

BOURRAIN L., NAVATEL J.C., 1999, Incidence of agar brand and riboflavin on the *in vitro* production of Marigoule – *COST G4 Multidisciplinary chestnut research*, working group 1 : Tree physiology – Meeting held at Sopron, Hungary 5/05-9/05/1999

[2] **DKW** : d'après Driver et Kuniyuki, 1984
[3] **BdR** : Milieu mis au point par le Ctifl pour l'enracinement des arbres fruitiers
[4] **LP** : d'après Quoirin et Lepoivre, 1977
[5] **MS** : Murashige et Skoog

BOURRAIN L., NAVATEL J.C., CORNAGGIA D., 1998, Multiplication, rooting and weaning of three chestnut clones - *COST G4, Multidisciplinary chestnut research*, 2nd meeting, Santiago de Compostela, Spain, 14/05-16/05/1998

BOURRAIN L., NAVATEL J.C., CORNAGGIA D., 1997, Preliminary *in vitro* trials on two chestnut varieties : Bouche de Bétizac and Marigoule – *COST G4, Multidisciplinary chestnut research*, Comunita Montana Val Pellice, Torre Pellice (Torino), Italy 18/06-21/06/1997

DRIVER J.A., KUNIYUKI A.H., 1984, *In vitro* propagation of walnut rootstock, *Hortscience*, 19, 507-509

GALSTON A.W., BAKER R.S., 1949, Studies on the physiology of light action. II. The photodynamic action of riboflavin, *American Journal of Botany*, 36, 773-780

JAY-ALLEMAND C., CAPELLI P., 1992, Root developpement of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium, *Scient. Hort*., 51, 335-342

NAVATEL J.C., BOURRAIN L. 1994, Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting, *Advances in Horticultural Science*, 8, 57-59

PIAGNANI C., ZOCCHI G., MIGNANI I., 1996, Influence of Ca^{2+} and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis, *Plant Science*, 118, 89-95

QUOIRIN M., LEPOIVRE P., 1977, Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*, *Acta Hortic*., 78, 437-442