

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

INSTITUT DE BOTANIQUE

LABORATOIRE DE  
BOTANIQUE ÉVOLUTIVE

**ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE**  
**ET**  
**CULTURE *IN-VITRO***  
**DU CHÂTAIGNIER (*Castanea sativa* Mill.)**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de  
Neuchâtel

Par

**Abdelhamid Sofiane**

2004

*Un guerrier de la lumière se décourage souvent.*

*Il pense que rien ne parviendra à susciter l'émotion qu'il espérait.*

*Il passe des après-midi ou des nuits entières à tenir une position conquise, sans qu'aucun événement nouveau vienne raviver son enthousiasme.*

*Sea amis commentent : « peut-être sa lutte est – elle déjà terminée. »*

*Le guerrier ressent douleur et confusion en écoutant ces paroles parce qu'il sait qu'il n'est pas parvenu là où il voulait.*

*Mais il est têtu, et il n'abandonne pas ce qu'il a décidé de faire.*

*Alors, au moment où il s'y attend le moins,*

*Une porte s'ouvre.*

*Paulo Coelho*

# Table des matières

Remerciements	i
1. Introduction	1
2. Diversité des châtaigniers cultivés	6
3. Biologie florale	12
4. Multiplication des porte-greffes et des variétés de châtaignier	19
5. Objectifs de la thèse	29
<b>6. Chapter I</b> : Genetic variation and characterization of Swiss chestnut cultivars ( <i>Castanea sativa</i> Mill.) in southern switzerland using RAPD, AFLP, ISSR and SSR markers.	31
6.1. Introduction	33
6.3. Material and methods	36
6.4. Results	42
6.5. Discussion	56
6.6. Conclusion	59
<b>7. Chapter II</b> : Molecular techniques as tools for studying genetic variation and relationship in chestnut species ( <i>Castanea sativa</i> , <i>Castanea mollissima</i> and <i>Castanea crenata</i> ).	60
7.1. Introduction	62
7.2. Material and methods	64
7.3. Results	65
7.4. Discussion	79
7.5. Conclusion	82
<b>8. Chapitre III</b> : Apport de techniques de greffage d'apex <i>in vitro</i> pour la micropropagation du châtaignier ( <i>Castanea sativa</i> Mill.)	83
8.1. Introduction	85
8.2. Matériel et méthodes	87
8.3. Résultat et discussion	89
8.4. Conclusion	96

<b>9. Conclusions générales</b>	97
Bibliographie	99
Annexes	113

## *Remerciements*

Je voudrais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont permis de réaliser cette thèse et ce à tous les niveaux.

D'abord, je tiens particulièrement à remercier le professeur Philippe K pfer pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour sa disponibilité pendant les moments difficiles. Je lui suis tout particulièrement reconnaissant pour son amitié, sa compréhension et pour ses aides précieuses tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également à Dr Linh-Cong L  pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à la station de Changins. Plus que codirecteur de ma thèse, il m'a fait découvrir la culture *in vitro* et il m'a encouragé tout au long de ce travail par sa disponibilité et ses conseils avisés. Il m'a transmis en plus de son savoir-faire, sa gentillesse et son ouverture d'esprit tout au long de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier M. Marco Conedera de la Sous-Station du sud des Alpes de l'Institut Fédéral de Recherches sur la Forêt, la Neige et le Paysage qui est à l'origine de la réalisation de cette thèse. Marco n'a pas hésité à aucun moment de me conseiller et de m'aider à mener à bien ce travail. Je lui suis tout particulièrement reconnaissant pour ses suggestions prodiguées ainsi que les longues discussions et son aide précieuse lors de la rédaction (ce n'était pas facile) qui m'ont été d'une grande utilité pour l'élaboration de ce travail. Un très grand merci à toi Marco!

Je remercie également tous les collègues de la station de Changins (totalement dans le désordre): Daniel, Fred, Jean Pierre, Santiago, Eric, Florian, Corinne, Lotti, Hélène, Odile, Stéphanie, Bintou et tous les autres qui me pardonneront de les avoir oublié, pour leur collaboration, leur disponibilité et leurs discussions constructives. Qu'ils trouvent dans ces petits mots mes sincères amitiés!

Un grand merci pour les personnes que j'ai côtoyées dans le laboratoire de Botanique évolutive de l'Université de Neuchâtel: Roberto, Yuan yong ming, Dessi, Guillhem, Martin, Philippe Chassot, Nicolas, Luigi, François, Annouk, Olivier, Ernest pour leur compétence,

conseils et aides (informatique, statistique...) pour le bon déroulement de ce travail. Encore une fois merci!

Je voudrais particulièrement remercier Frédéric Bilat pour son aide pratique pour la réalisation de ce travail et pour son amitié. Fred est un très bon ami à moi, et je voudrais juste lui dire que tu as une volonté assez solide et je suis sûr et certain que tu arriveras à réaliser tes buts. Mille fois merci Fred!

Je tiens à remercier spécialement tous mes ami(e)s de Neuchâtel ainsi que mes ami(e)s du logis de la Station de Changins pour leur gentillesse, leur ouverture d'esprit et nos discussions autour de bonnes tables.

Enfin, mes remerciements sont adressés aux personnes qui me sont les plus chères, mes parents, mon frère, mes sœurs et ma fiancée. Je voudrais juste leur dire qu'en aucun moment, vous avez quitté mes pensées et à tel point vous étiez très proche de moi, même avec la distance qui parfois n'arrange pas les choses. Je voulais juste aussi vous dire que « loin des yeux, près du cœur », c'est mon sentiment majeur pendant mon séjour en Suisse, car vous étiez tout le temps dans mon cœur et j'ai partagé plein de chose avec vous, même si vous étiez éloignés. Merci pour vos coups de fils quotidiens (surtout Dorra) pour m'encourager, car j'avais bien besoin d'entendre vos voix pour me remonter le moral. Un grand merci sincère du fond du cœur pour vos aides morales et financières.

## **1. Introduction**

Américains, Européens ou Asiatiques parlent tous avec la même éloquence gourmande de la châtaigne, cette compagne des bons et des mauvais jours, celle qui les a nourris depuis des générations. Avant l'introduction de la pomme de terre, la châtaigne a été la ressource alimentaire essentielle des pays pauvres sur terrain siliceux (Lieutaghi, 1969). L'arbre et son fruit furent au cœur de groupes humains qui en dépendaient étroitement. Tant de techniques, de pratiques paysannes et domestiques, tant de traditions y sont associées, qu'il est permis de parler d'une vraie civilisation du châtaignier. La culture du châtaignier est donc très ancienne, elle s'est probablement développée simultanément en plusieurs endroits du globe, proportionnellement aux populations locales, et ceci bien avant l'époque romaine.

L'homme et la châtaigne ne vivent que l'un pour l'autre. Seul le châtaignier, si justement nommé « l'arbre à pain », a permis à des vallées de topologie accidentée, au sol acide et au climat sans complaisance, d'accueillir des populations dix fois plus denses qu'aujourd'hui (Rousseaux, 1987). Il existe peu d'arbres dont on se soit autant préoccupé que le châtaignier. Cela tient à l'étendue de son aire de répartition, aux usages très variés de ses produits et à son importance dans certains paysages tant forestiers qu'agricoles. Depuis les temps anciens, les châtaignes ont largement contribué à la nourriture des populations des régions pauvres en Europe, où le châtaignier a été introduit et réintroduit par l'homme au cours des siècles passés, chaque fois que sa culture devenait indispensable à l'économie rurale locale. Grâce à la sélection et à la multiplication par greffage, la châtaigne est devenue une source importante de nourriture pour beaucoup de populations montagnardes, au Moyen âge, en particulier. Parallèlement, les variétés cultivées et les produits dérivés connaissent une très forte diversification (Pitte, 1986).

Aujourd'hui, le châtaignier représente un patrimoine qui mérite d'être valorisé dans les zones montagneuses, en raison de la demande croissante des marchés en fruits et en bois, mais aussi en raison de la valeur très variable des plantes sur le terrain, résultant soit de semis spontanés soit d'anciennes cultures dont l'entretien avait été négligé au cours des dernières décennies.

### **1.1 Le châtaignier au sud des Alpes**

Actuellement, la Suisse compte 26 000 ha de forêts de châtaigniers. La majorité des forêts en surface (92%) et en variétés inventoriées (98%) se situent au Tessin. La production en fruits est insuffisante pour alimenter le marché suisse qui importe chaque année des châtaignes pour

une valeur de l'ordre de quinze millions de francs. Cette situation peut être corrigée par une révalorisation de la production des fruits et du bois.

Le sud des Alpes suisse, par son substrat cristallin, est une région qui se prête à la culture du châtaignier depuis 1000 ou 2000 ans. Des recherches bibliographiques anciennes montrent que plus de 100 variétés existent au Tessin, dont seulement 51 variétés ont été identifiées (Conedera et al. 1997). Il est encore difficile de différencier les peuplements d'origine spontanée de ceux d'origine cultivée.

Le Tessin se distingue par l'amplitude accordée à la culture du châtaignier qui a connu une forte expansion au détriment des céréales et de la vigne. La valeur de ses produits a entraîné une augmentation démographique importante. Les habitants n'hésitaient pas à appeler le châtaignier « l'ARBUR », expression qui en dialecte, signifie l'arbre par excellence (Conedera et al. 1997). Les paysans ont profité aussi de son bois pour faire diverses constructions, pour le chauffage ainsi que pour la fabrication d'outils de travail quotidien. Son feuillage servait de fourrage pour les animaux et de litière en hiver. Le châtaignier a joué aussi un rôle important dans l'organisation de la vie politique, sociale et administrative de la société paysanne. Vers 1200, à Locarno et Bellinzona, des marchés de farine de châtaigne très fréquentés par les habitants de la région se tenaient tous les quinze jours. Il est courant au Tessin que les redevances se payaient en châtaignes (Pittet, 1986).

Au Tessin, la variabilité de *Castanea sativa* est très grande, si l'on prend en considération les individus semi-sauvages, les individus francs issus d'hybrides intervariétaux, autant que les variétés cultivées. Ces dernières reflètent l'usage local des produits : les variétés sont nombreuses dans les grandes châtaigneraies vivrières, alors que les variétés de marron sont plutôt rares (témoignage de la vocation vivrière pour les populations montagnardes de ces châtaigniers). La diversité des cultivars témoigne des origines lointaines de l'espèce. Elle reflète aussi les facteurs socio-économiques locaux voire les besoins individuels de chaque famille. Pour répondre à leurs besoins alimentaires personnels pendant l'hiver, la population montagnarde a diversifié son choix en variétés cultivées selon leurs besoins. Quelques paysans cultivent des variétés de châtaignier en raison de leurs périodes de maturité (précoce, tardive) en fonction de leurs exigences écologiques (écotype de basse ou de haute altitude), pour la qualité de leurs fruits (consommation à l'état frais, conservation, séchage, farine). Le châtaignier a donc été l'objet d'une diversification régionale et locale conduisant à un large

assortiment de variétés et de produits dérivés. Chaque village peut offrir entre 4 à 15 variétés, particulièrement dans les communautés de montagne (Conedera, 1997).

A part la châtaigneraie à fruit, on trouve aussi les bois de futaie ou de taillis qui sont destinés à la production de matériaux utilisés pour la menuiserie, la charpente, le palissage et comme poteaux télégraphiques.

### **1.2 Exemple de nomination d'une variété**

L'origine des noms de variétés en Europe est directement liée à la toponymie, à des caractères génétiques propres à la variété considérée voire à des faits historiques (Pittet, 1986) : un nom de lieu ou d'une localité, la forme et la couleur du fruit, l'architecture de l'arbre (forme de la couronne), les noms, d'origines très anciennes, comme ceux du premier sélectionneur, d'un excellent cultivateur, d'un marchand de fruits ou de plants réputés (Tableau.1). Les noms des variétés connues au Tessin portent l'empreinte des flux d'échanges commerciaux trans-régionaux ou transfrontaliers, avec l'Italie en particulier. Les grands axes de circulation de la châtaigne sont bien connus en Europe puisque la châtaigne est consommée et circule bien au-delà de ses zones de culture. L'introduction d'une variété sélectionnée dans un autre pays, dans un autre village et dans une autre région est très fréquente dans les communautés rurales cherchant à assurer leur ressource alimentaire.

L'ancienneté de la culture du châtaignier et l'importance alimentaire de son fruit ont favorisé l'optimisation des méthodes de multiplication (greffage) et la diversité locale des variétés, chacune répondant aux divers besoins de chaque famille (bois, farine, fourrage, etc.). En voyageant, les noms des variétés ont subi une déformation quand ils n'ont pas volontairement été changés. Aucun nom de variété est similaire entre deux pays en Europe. Par exemple, la variété « Verdanesa » est largement répandue en Suisse, mais devient « Verdone » en Italie, « Verde » en Espagne et « Verdal » au Portugal! (Bruneton-Governatori, 1984).

A l'origine, la création d'une nouvelle variété du châtaignier a été fondée sur la sélection massale en fonction des objectifs de production (fertilité, dimension du fruit). Le sélectionneur a dû disposer d'une large variabilité répondant aux exigences variées des utilisateurs. Ensuite, pendant plusieurs années consécutives, le sélectionneur a contrôlé son comportement aux variations climatiques et écologiques. Lorsque le comportement répondait aux finalités attendues, alors, la multiplication à grande échelle par greffage était assurée.

**Tableau 1.** Origine de noms de quelques variétés du châtaignier d’Ardèche d’après (Reyne, 1984).

Variété	Aspect	Lieu	Autre hypothèse
Sardonne			-Piémont (Etat sarde) -Sardes (Lydie) -Chastanier-sarde
Aguyanne	Forme pointue		
Comballe		Ferme des combeaux	
Merle		Lieu dit merle	
Bouche-rouge	Couleur de l’écorce		
Ronde des Vans	Forme		
Sablierasso		Sablières	
Grosse pourette	Taille		Pourette :plant sauvage
Embounière		Vallée de la borne	
Georges			Nom du premier sélectionneur
Roussette	Couleur		
Duralin			Bogue difficile à ouvrir
Neyronne	Couleur presque noire		
Grossoune	Très gros fruit		
Bouche jaune	Couleur claire		
Marron vincent			Nom du premier sélectionneur
Bastarde du gua		St-Julien-du-Gua	
Fourchane			Branches fourchues
Ente noir	Fruit très sombre		

### 1.3 La castanéiculture fruitière au sud des Alpes: situation actuelle et possibilités de relance

La châtaigneraie traditionnelle au sud des Alpes à vocation fruitière et forestière est implantée dans des zones à relief accidenté et au sol relativement pauvre. Elle a été délaissée à cause de sa faible rentabilité autant qu’en raison des changements socio-économiques affectant les communautés rurales. Un autre facteur biotique a profondément affecté la castanéiculture : l’émergence de la maladie cryptogamique du chancre de l’écorce causé par l’agent pathogène *Cryphonectria parasitica*. Aujourd’hui, la situation est moins alarmante avec l’arrivée d’une forme moins virulente du champignon en Europe (Bounous and Paglietta, 1982). On assiste ainsi à une reprise naturelle des châtaigniers.

L’identification des variétés cultivées en Suisse est fondée sur des critères géographiques, phénologiques et morphologiques ayant trait au fruit ou à la couronne de l’arbre (Conedera et al.1993). Cependant, il n’est pas établi d’une manière sûre si les caractères morphologiques

reposent sur une base morphologique ou répondent aux facteurs environnementaux, voire sur une interaction entre facteurs génétique et environnementaux.

Avec l'accroissement de l'intérêt porté au châtaignier, des programmes de recherches ont été instaurés au sud des Alpes afin d'enrayer le processus de dégradation des cultures et pour soutenir encore le retour aux usages traditionnels (bois, fruits, cuisine). Plusieurs voies sont prospectées pour redonner au châtaignier la place qu'il mérite dans la vie et l'économie du sud des Alpes : inventaire des variétés encore présentes sur le territoire du Tessin, mise en évidence de leurs caractéristiques tant morphologiques qu'organoleptiques et identification génétique. Pour assurer le maintien du patrimoine variétal, il est nécessaire de constituer dans différentes régions des vergers-collection assurant la conservation de tous les phénotypes inventoriés. Des pépinières de multiplication des meilleures variétés locales, du point de vue agronomique, commercial, doivent aussi en assurer la diffusion. La création de ces vergers de référence est d'une grande importance aussi pour expérimenter les méthodes de conduite rationnelle des arbres. Ils constituent ainsi un exemple pour les agriculteurs intéressés.

Pour améliorer les rendements des vieilles châtaigneraies à fruits et les remettre en production, il est conseillé de choisir les variétés en fonction des exigences du marché, en tenant compte en particulier de la qualité des fruits ou du bois et de leur destination (vente du produit brut ou pour transformation industrielle). Il est aussi recommandé de créer de nouveaux hybrides susceptibles de remplacer ou de compléter la gamme variétale actuelle. Le recours à de nouvelles biotechnologies, comme la culture *in vitro*, pour multiplier le meilleur matériel à grande échelle et dans des conditions sanitaires rigoureuses, est importante. La recherche des porte-greffes pour leur vigueur et leur mise à fruit rapide, exprimant de surcroît une bonne compatibilité avec les variétés fruitières, constitue un aspect fondamental dans la création de nouveaux vergers de châtaignier.

La revalorisation du châtaignier passe aussi par l'amélioration de la structure des vergers et celle des techniques de récoltes, de conservation et de conditionnement des produits. La pollinisation croisée est une règle impérative afin d'obtenir une production adéquate et régulière. Dans les vergers, il est nécessaire de planter, à côté des individus producteurs de fruits, des cultivars pollinisateurs, en étant attentif à la compatibilité phénologique et génétique des variétés associées. Afin de pouvoir mener à bien ce programme de relance, il

convient de mettre à la disposition des praticiens des techniques de lutte biologique contre les pathogènes et les parasites.

## 2. Diversité des châtaigniers cultivés

### 2.1 Classification botanique du genre *Castanea*

Les châtaigniers appartiennent à la classe des Dicotylédones et à la famille des Fagacées qui comprend les genres suivants: *Fagus*: les hêtres, *Quercus*: les chênes, *Castanea*: les châtaigniers. Ils sont diploïdes : ( $2n = 2x = 24$  chromosomes).

Le genre *Castanea* occupe de vastes territoires de l'hémisphère Nord, en Amérique, en Europe, en Asie et dans quelques stations d'Afrique du Nord, entre le 35° et le 45° parallèle. Il comprend nombreux espèces dont les principales sont présentées à la Figure 1.

**Figure 1.** Les principales espèces fruitières du châtaignier.



*Castanea sativa*

*Castanea crenata*

*Castanea mollissima*

### 2. 1.1 Les principales espèces fruitières

#### 2. 1.1.1 Le châtaignier européen indigène: *Castanea sativa* Miller.

Son aire d'expansion couvre pratiquement toute l'Europe, mais ses zones de prédilection se rencontrent dans les terrains anciens, acides. Qu'il ait été cultivé pour son bois ou ses fruits, on le rencontre en Italie, en France, en Espagne, au Portugal, en Turquie et en Suisse...

**Sa croissance** est rapide surtout dans son jeune âge. Il vit très longtemps (nombreux sujets pluricentennaires) et atteint des dimensions considérables (30 mètres de haut).

**Sol:** Il se développe sur des sols légers, à base de sable siliceux et d'argile en quantité peu élevée, de graviers granitiques, des terres volcaniques, des alluvions plus récentes, profondes à taux d'argile peu élevé et dépourvu de calcaire dont le pH se situe entre 6 à 6.5.

Les racines sont sensibles à une humidité excessive. Il aime cependant les sols frais mais bien drainés, il redoute les terrains trop mouillés, compacts et mal aérés. Peu exigeant quant à la

richesse du sol, il se développe même sur des terres médiocres. En terre profonde il développe aisément son système racinaire.

Le châtaignier pousse sous les **climats** suivants:

- maritime atlantique (hiver doux et été pluvieux)
- méditerranéen (été chaud et sec)
- continental (hiver rigoureux et été chaud)

Il peut être sensible aux gelées de printemps pour les variétés à débourrement précoce. Par contre, il ne craint pas les froids rigoureux de l'hiver. Ses besoins en eau sont de l'ordre de 700 mm d'eau par an. Ses exigences sont plus élevées en août-septembre, pendant lesquels les fruits atteignent leur grosseur définitive.

**Son port** varie selon la variété et la densité de plantation et de peuplement (type érigé ou semi-érigé). En verger, après avoir subi une taille de formation au cours des deux ou trois premières années, les arbres adoptent un port de type goblet ouvert (boule).

**Les bourgeons** sont très gros (Figure 2), de forme triangulaire à base large et à pilosité faible avec disposition phyllotaxique 2/5.

**Les feuilles** sont grandes, de formes ovales, allongées et très dentées (Figure 1).

**Les bogues** sont de dimensions variables selon les types considérés: pour les types sauvages et forestiers, elles sont à petites bogues (4 à 5 cm dans la plus grande largeur), et peuvent être grosses à très grosses dans les types fruitiers des bonnes variétés (8 à 15 cm de diamètre). Elles sont portées par les rameaux de l'année par un pédoncule plus ou moins long et situées dans la partie terminale à sub-terminale des rameaux. Les aiguillons sont rigides à ramifications enchevêtrées et masquent la paroi externe de la bogue. La déhiscence est variable, chez certaines variétés, les bogues s'ouvrent entièrement en deux ou quatre valves laissant tomber les châtaignes. Chez d'autres, l'ensemble bogue et fruits tombent au sol.

**Les fruits:** Leurs formes sont variables. Le péricarpe est plus ou moins épais, de couleur variable. La base du fruit porte une cicatrice, trace de son insertion dans la bogue. Cette cicatrice est de dimension variable, sa ligne de contact avec le péricarpe peut être ondulée et porteuse de pilosité. La grosseur des fruits est évaluée en calibre qui correspond au nombre de fruits frais contenu dans un kilogramme, variable selon la variété.

Comme **géniteur** *Castanea sativa* présente une diversité génétique très large et le plus souvent très ancienne. La sélection naturelle a contribué au choix de plusieurs variétés fruitières et à bois: les unes rares avec de larges possibilités d'adaptation aux zones castaneïcoles, les autres plus nombreuses, avec une plasticité d'adaptation réduite.

Le châtaignier Européen est utilisé comme **porte-greffe** pour les variétés fruitières avec lesquelles il manifeste une bonne compatibilité. Il est utilisé pour résoudre des problèmes agronomiques et apporter des solutions supplémentaires (résistance) par croisement avec d'autre espèce exotique pour résoudre les problèmes dus à la maladie de l'encre.

**Maladies:** Le châtaignier indigène est sensible à la maladie de l'encre, provoquée par un champignon pathogène, *Phytophthora* spp. L'infection se fait par les racines. Il est aussi sensible à la maladie du chancre de l'écorce (*Cryphonectria parasitica*), pour ce qui est du système aérien, mais un peu moins que l'espèce américaine *C. dentata*. On trouve aussi des types sensibles à la septoriose des feuilles, dont l'agent fongique responsable est *Septoria castanicola*.

### 2. 1.1.2 Le châtaignier japonais: *Castanea crenata* (Sieb et Zucc.)

Dans son aire d'origine, cette espèce est cultivée dans des régions de montagnes, depuis le niveau de la mer jusqu'à 1200 à 1300 mètres d'altitude dans les îles du sud. Il pousse sous un climat caractérisé par des pluies abondantes pendant la saison chaude estivale et des températures hivernales douces.

**Les sols:** les terres à châtaignier au Japon sont en général d'origine volcanique récente et fertile. Introduit en Europe dans le but d'établir des croisements pour la création de nouvelles variétés résistantes (hybrides interspécifiques) pour lutter contre la maladie de l'encre, le châtaignier japonais a des dimensions plus réduites que dans son pays d'origine. Il se révèle sensible à la sécheresse de l'été et pousse mal dans des terrains de qualité médiocre. Même dans les meilleures conditions, les dimensions atteintes par les arbres sont toujours plus réduites que chez *C. sativa*.

**Le port** est généralement étalé, l'arbre prend alors à l'état adulte, une forme de boule enveloppante avec les premières branches charpentières retombantes, touchant le sol. Les plants issus de semis ont un aspect plus grêle que ceux de l'espèce *C. sativa*: la taille est plus grande et le diamètre du collet moins épais.

**Les rameaux** d'un an sont grêles, flexueux et cassants et en général de couleur brun-jaune.

**Les bourgeons** sont petits, de disposition phyllotaxique  $\frac{1}{2}$  de type distique alterne.

**Les feuilles** à leur base sont rondes, ovales, allongées et non dentées (Figure 1).

**Les bogues** sont de forme ovoïde, de dimensions variables allant de 4-5 cm de large pour les arbres à petits fruits, à 15-20 cm pour ceux à gros fruits. Leur déhiscence est variable (chute de l'ensemble bogue et fruit ou de fruit seulement). Elles sont placées sur le rameau en position médiane voire sub-terminale.

La forme **des fruits** est variable, elle est le plus souvent elliptique-longue ou elliptique-triangulaire (Figure 2). Les fruits se caractérisent par une cicatrice très large qui remonte parfois jusqu'à la partie médiane du fruit. La grosseur des fruits est très variable et l'amande est plus souvent entière (fruits non cloisonnés).

Le châtaignier japonais est peu cultivé en Europe, mais il est utilisé dans des croisements. L'intérêt pour cette espèce tient: i) à sa résistance à la maladie de l'encre (*Phytophthora* Spp.) ii) à sa relative tolérance au chancre de l'écorce causé par l'agent pathogène fongique (*Cryphonectria parasitica*) iii) à l'intérêt de son fruit non cloisonné et à la précocité de maturité de certains génotypes. En revanche, il induit une sensibilité accrue au froid printanier à cause d'un débourrement végétatif précoce.

### 2. 1.1.3 Le châtaignier chinois: *Castanea mollissima* (Blume.)

Cette espèce est originaire de la Chine orientale et méridionale et pousse dans des régions très diverses du point de vue climatique et édaphique ainsi que dans un gradient altitudinal assez large (jusqu'à 2 000 m). Les variétés cultivées en Europe semblent redouter les terrains pauvres et les étés secs. Les terres de l'espèce *C. mollissima* sont en général à sols profonds et perméables à l'eau.

**Le port** est étalé, quelquefois semi-érigé, souvent retombant. Dans leur pays d'origine, les arbres peuvent atteindre des dimensions importantes comparables à celles de *C. sativa*.

**Les rameaux** ont une vigueur variable, plutôt grêles, flexueux et cassants et sont revêtus d'une très forte pilosité (qui se transmet lors de croisement avec les autres espèces). Comme chez *C. crenata*, les rameaux ont une allure générale en zig-zag.

**Les bourgeons** sont plus gros que ceux des châtaigniers japonais et plus petits que ceux des châtaigniers indigènes (Figure 1), fortement pileux, insérés sur le rameau en disposition phyllotaxique<sup>1/2</sup> alternée et distique.

**Les feuilles** sont moyennes à grandes, elliptiques larges, à limbe plat et épais, pourvues d'une forte pilosité (Figure 2). La base est ronde-ovale. La couleur est d'un vert brillant à la face supérieure et pouvant être rougeâtre à l'état jeune et moyennement blanchâtre à la face inférieure. Elles jaunissent précocement à l'automne, virant au brun avant de chuter.

**Les bogues** sont de dimensions variables mais le plus souvent de petites taille comparées à celles des *C. sativa* et *C. crenata*.

**Les fruits** ont une forme en général globuleuse à elliptique courte. La torche est couverte d'une forte pilosité en général de couleur blanche, qui peut s'étendre de façon plus ou moins dense sur la totalité du péricarpe. La cicatrice est réduite, de forme circulaire ou rectangulaire.

Les fruits sont de calibre petit à moyen, à amande peu cloisonnée et de saveur plus ou moins sucrée.

Les châtaigniers chinois sont les meilleurs pollinisateurs des variétés indigènes japonaises et des hybrides *C. crenata* x *C. sativa*. Le châtaignier chinois possède des gènes de résistance à *Cryphonectria parasitica*, et comme le châtaignier japonais, il peut être utilisé pour des travaux de sélection, comme géniteur dans les croisements artificiels et naturels avec l'espèce indigène.

**Figure 2.** Aspect morphologique des principales espèces fruitières du châtaignier



#### 2.1.1.4 Autres espèces du genre *Castanea*

Outre les trois espèces mentionnées précédemment, il en existe d'autres dans le genre *Castanea*, dont on peut citer:

***Castanea dentata* Borkh.:** ce châtaignier indigène des U.S.A, ressemble plus à un type forestier que fruitier, les arbres pouvant atteindre de grandes dimensions. Cependant, plus de 95% des arbres vivant sur le continent américain ont été détruits par l'agent pathogène *Cryphonectria* à la fin du 19<sup>e</sup> siècle.

***Castanea seguinii* Dode:** originaire de la Chine centrale, cet arbre est de dimension moyenne. Les types introduits en Europe forment des arbrisseaux dont la particularité est de présenter sur le rameau de l'année une succession continue de chatons androgynes à tous les stades de

végétation. Les fruits sont petits (plus de 300 au kilogramme). Cet arbre pourrait être utilisé comme arbre ornemental.

***Castanea pumila* Miller:** originaire des U.S.A de l'est. C'est un petit arbre à feuillage dense, vert foncé avec des reflets bronzés, les fruits sont plutôt petits assez savoureux. Il pourrait servir également à titre ornemental.

***Castanea floridana* Ashe:** originaire des U.S.A du sud. C'est un arbrisseau peu vigoureux, à fruits très petits et uniques dans la bogue à épines.

***Castanea henryi* Rehd. et E.H. Wils.:** originaire de Chine où il peut atteindre de bonnes dimensions. Ses fruits sont très petits.

## 2. 2 Les hybrides interspécifiques

Les hybrides interspécifiques peuvent être obtenus soit par une pollinisation contrôlée soit par une pollinisation naturelle. Les premiers hybrides interspécifiques du châtaignier ont été obtenus par un croisement naturel entre l'espèce *Castanea sativa* et les deux espèces asiatiques (*C. crenata* ou *C. mollissima*) (Solignat et Chapa 1975 a). D'autres ont été créés par des croisements contrôlés qui ont permis de sélectionner divers caractères génétiques parentaux intéressants:

- résistance aux maladies ;
- vigueur et rapidité de mise à fruits ;
- productivité ;
- débourrement tardif ;
- sélection du caractère marron ;
- adaptation écologique des géniteurs indigènes.

Dans les croisements avec *C. crenata* et *C. mollissima*, *C. sativa* peut être utilisé comme géniteur femelle ou mâle. Les hybrides F1 obtenus sont désignés respectivement par les formules *C. sativa* x *C. crenata* ou *C. sativa* x *C. mollissima* dans lesquelles *C. sativa* représente le parent femelle ou *C. crenata* x *C. sativa* et *C. mollissima* x *C. sativa* lorsque *C. sativa* est utilisé comme parent mâle.

Les hybrides, obtenus entre châtaigniers exotiques et indigènes, sont dans leur grande majorité, mal adaptés aux terrains secs et pauvres. Ils ont une vigueur variable et leur débourrement est plus précoce que celui de *Castanea sativa*. D'autre part, leur résistance aux maladies est variable selon les individus.

Dans la pratique, les hybrides sélectionnés peuvent être utilisés soit comme porte-greffes résistant aux maladies pour les variétés indigènes, soit comme producteurs directs selon

l'intérêt de leur fruits, ou encore comme plants forestiers pour des reboisements (production de bois).

### 3. Biologie florale

Le châtaignier est un arbre monoïque dicline, avec fleurs mâles et femelles sur le même pied, nettement séparées les unes des autres (Figure 3) . Comme pour toutes les autres espèces fruitières, le châtaignier a une période de repos hivernal et une période active de végétation s'étendant selon les espèces et les variétés, d'avril à novembre (Solignat, 1973). La première condition d'entrée en activité de l'arbre est le débourrement végétatif qui se produit différemment, selon les espèces et selon les individus au sein de chaque espèce. Les dates de débournement, pour une variété donnée, sont variables selon les années et dépendent des conditions de température des mois de janvier à mars.

Les inflorescences prennent naissance sur les rameaux de l'année. Les premières inflorescences, unisexuées, mâles apparaissent à l'aisselle des feuilles. Après l'anthèse, ces inflorescences tombent alors qu'apparaissent, un peu plus haut, des inflorescences androgynes, femelle à la base et mâle au sommet (Figure 3).

**Figure 3.** Chatons mâles d'un châtaignier sauvage en floraison (Conedera et al. 1997).



### 3. 1. Les fleurs mâles

Elles sont groupées en glomérules sur des chatons unisexués (dits mâles) ainsi qu'à la partie supérieure de chatons androgynes avec, à la base, les inflorescences de fleurs femelles.

Selon la présence ou l'absence d'étamines d'une part, et la longueur de celles-ci par rapport au périclype de la fleur d'autre part, les châtaigniers peuvent être :

- astaminés : sans étamines donc sans pollen (Figure 4).
- brachystaminés : filet des étamines de 1 à 3 mm de long : anthères ne dépassant pas le périclype : peu de pollen.
- mésostaminés : filets des étamines de 3 à 5 mm de long : anthères ne dépassant que peu le périclype, peu de pollen.
- longistaminés : filets des étamines de 5 à 7 mm de long, anthère dépassant largement le périclype, pollen abondant.

En conséquence, les châtaigniers astaminés sont morphologiquement, et nécessairement fonctionnellement, mâles stériles, les brachystaminés et les mésostaminés sont aussi pratiquement mâles stériles. Les variétés de ces types ne pourront fructifier que grâce à une pollinisation croisée assurée par des châtaigniers longistaminés à pollen abondant et de bonne valeur germinative. En conséquence, la pollinisation croisée est nécessaire pour avoir une bonne fructification.

La floraison des fleurs mâles se produit pour les châtaigniers exotiques, ainsi que pour leurs hybrides, de fin mai à fin juin. Pour les individus les plus précoces de *C. sativa*, en revanche, elle a lieu de la deuxième quinzaine de juin et pour les plus tardifs à mi-juillet.

**Figure 4.** Fleurs mâles de la variété Boné negro, type astaminées (Conedera et al. 1997).



### 3. 2. Les fleurs femelles

Elles sont groupées de un à cinq dans une cupule dont le développement ultérieur donnera la bogue. Les inflorescences femelles sont situées à la base des chatons androgynes portés sur le rameau de l'année, en position terminale à subterminale chez les châtaigniers indigènes et médiane à subterminale chez les châtaigniers exotiques et leurs hybrides. Les fleurs femelles sont considérées en pleine floraison, quand tous les stigmates des fleurs centrales et latérales sont pleinement épanouis.

Chaque fleur femelle renferme plusieurs ovules fécondables donnant ainsi un fruit à une ou plusieurs graines. Le nombre des graines fait la différence entre châtaigne et marron (Figure 5). La châtaigne est un fruit à plusieurs graines (fruit cloisonné) et le marron est un fruit à une seule graine (fruit non cloisonné). Sur un même arbre, les deux types de fruits peuvent se rencontrer, dont la proportion est variable selon les variétés. Certains d'entre eux produisent en moyenne moins de 12% de fruits cloisonnés, ce sont les châtaigniers à marrons, tandis que les châtaigniers à châtaignes donnent plus de 12% de fruits cloisonnés.

**Figure 5.** Fleur femelle de la variété Verdanesa fécondée (Conedera et al.1997)



### **3. 2. La pollinisation**

La partie mâle des chatons androgynes fleurit approximativement au moment de la chute des chatons unisexués mâles. A la dioécie fonctionnelle, correspondant à l'anthèse des inflorescences unisexuées, succède un stade de monoécie fonctionnelle au moment de la floraison des inflorescences androgynes. Si nécessaire, l'autocompatibilité peut être contrôlée à ce stade. La complète réceptivité des fleurs femelles est atteinte lorsque tous les stigmates d'une inflorescence sont étalés. Le succès de la pollinisation du châtaignier est étroitement lié aux conditions climatiques qui règnent lors de la floraison: mi-juin à mi-juillet. En effet, le pollen ne peut se libérer des anthères qu'à la faveur d'une température élevée et d'une hygrométrie basse, facteurs qui favorisent son transport soit par les insectes ou soit par le vent (Fineschi et al. 2000).

L'odeur caractéristique que dégagent les chatons mâles au moment de la floraison, la déhiscence des anthères et les stigmates rigides sont des facteurs qui favorisent la pollinisation entomophile, en particulier les abeilles. Le vent peut disséminer efficacement le pollen à condition que l'hygrométrie ambiante soit faible.

### **3. 4 Auto-incompatibilité, intercompatibilité**

Les châtaigniers mésostaminés, les brachystaminés et les astaminés n'ont pas ou peu de pollen. L'autofécondation ne peut donc avoir lieu que sur les longistaminés et se révèle très faible (moins de 10 fruits dans 100 bogues). La fécondation croisée est nécessaire à une bonne fructification chez le châtaignier qui est donc partiellement autostérile. Dans les vergers de production, il est donc indispensable d'associer aux individus à fruits, quelques individus d'une variété pollinisatrice. La fécondation du châtaignier dépendra alors de la synchronisation aussi parfaite que possible de la réceptivité stigmatique et de l'anthèse des fleurs mâles.

La production maximale de fruits dépendra non seulement de la bonne adaptation des cultivars aux facteurs écologiques locaux (sol et climat) (Solignat et Chapa, 1975 b), mais aussi à une bonne intercompatibilité génétique entre les individus producteurs femelles et les individus pollinisateurs. L'intercompatibilité est considérée comme bonne si on obtient plus de 100 fruits dans 100 bogues en pollinisation contrôlée, elle est moyenne si on obtient de 75 à 100 fruits et faible si on obtient moins de 75 fruits.

Comme mentionné plus haut, le succès reproducteur dépend autant de l'intercompatibilité génétique que de la concordance étroite entre période d'émission du pollen par le pollisateur

et période de réceptivité maximale des fleurs femelles à féconder. Il est relativement facile de déterminer par notations phénologiques la période pendant laquelle un géniteur mâle libère son pollen. Il sera quelquefois nécessaire d'avoir recours à au moins deux pollinisateurs choisis afin que les périodes respectives d'émission de pollen, en se succédant, couvrent parfaitement la période de réceptivité des fleurs femelles. Il est même souhaitable que l'une débute avant et l'autre continue après cette période de réceptivité.

### 3. 5 Stades phénologiques caractéristiques du châtaignier

Les stades phénologiques du châtaignier, tels qu'ils ont été définis par Breisch (1995), sont représentés dans le (Tableau 2) et la (Figure 6).

**Table 2.** Stades phénologiques du châtaignier.

Stades phénologiques	Organes végétatifs
A	Dormance des bourgeons
B	Gonflement des bourgeons
C1	Eclatement des bourgeons, les écailles vertes sont plus longues que les brunes
C3	Les écailles vertes sont plus longues que les brunes
D	Apparitions des nervures et développement des feuilles
D <sub>i</sub>	Plein développement des feuilles
D <sub>j</sub>	Jaunissement des feuilles
D <sub>z</sub>	Chute des feuilles
	<b>Chatons mâles unisexués:</b> Ils se développent à l'aisselle des feuilles à la place d'un bourgeon.
Dm	Apparition des chatons mâles
Em	Les glomérules mâles sont bien individualisés, le chaton a pratiquement atteint sa longueur définitive
Fm	Apparition des étamines chez les staminés; chez les astaminés, éventuellement ouverture du périanthe des fleurs
Fm <sup>2</sup>	Toutes les étamines sont sorties sur au moins 50% des chatons, ouverture des anthères, émission du pollen: pleine floraison mâle
Gm	Fin d'émission du pollen, les anthères vides brunissent
Hm	Chute des chatons
	<b>Chatons androgynes portant des fleurs femelles et des fleurs mâles</b>
Da	Apparition des chatons androgynes
Ea	Les glomérules mâles sont bien individualisés
Ef	Les fleurs femelles sont bien différenciées
Ff	Apparition des stigmates (fleur centrale)
Ff <sup>2</sup>	Tous les stigmates de toutes les fleurs femelles du glomérule bien épanouis sur au moins 50% des chatons: pleine floraison femelle
Fa	Apparition des étamines
Fa <sup>2</sup>	Emission du pollen- pleine floraison mâle

Ga	Les anthères vides brunissent
I	Nouaison, l'inflorescence femelle est 2.5 fois plus grosse qu'en début Ff2. La floraison est terminée.
J	Grossissement de la bogue
K	Jaunissement de la bogue
Mo	Déhiscence de la bogue
M	Bogue vidée de ses châtaignes et restant sur l'arbre
N	Chute de la bogue
O	Chute des châtaignes

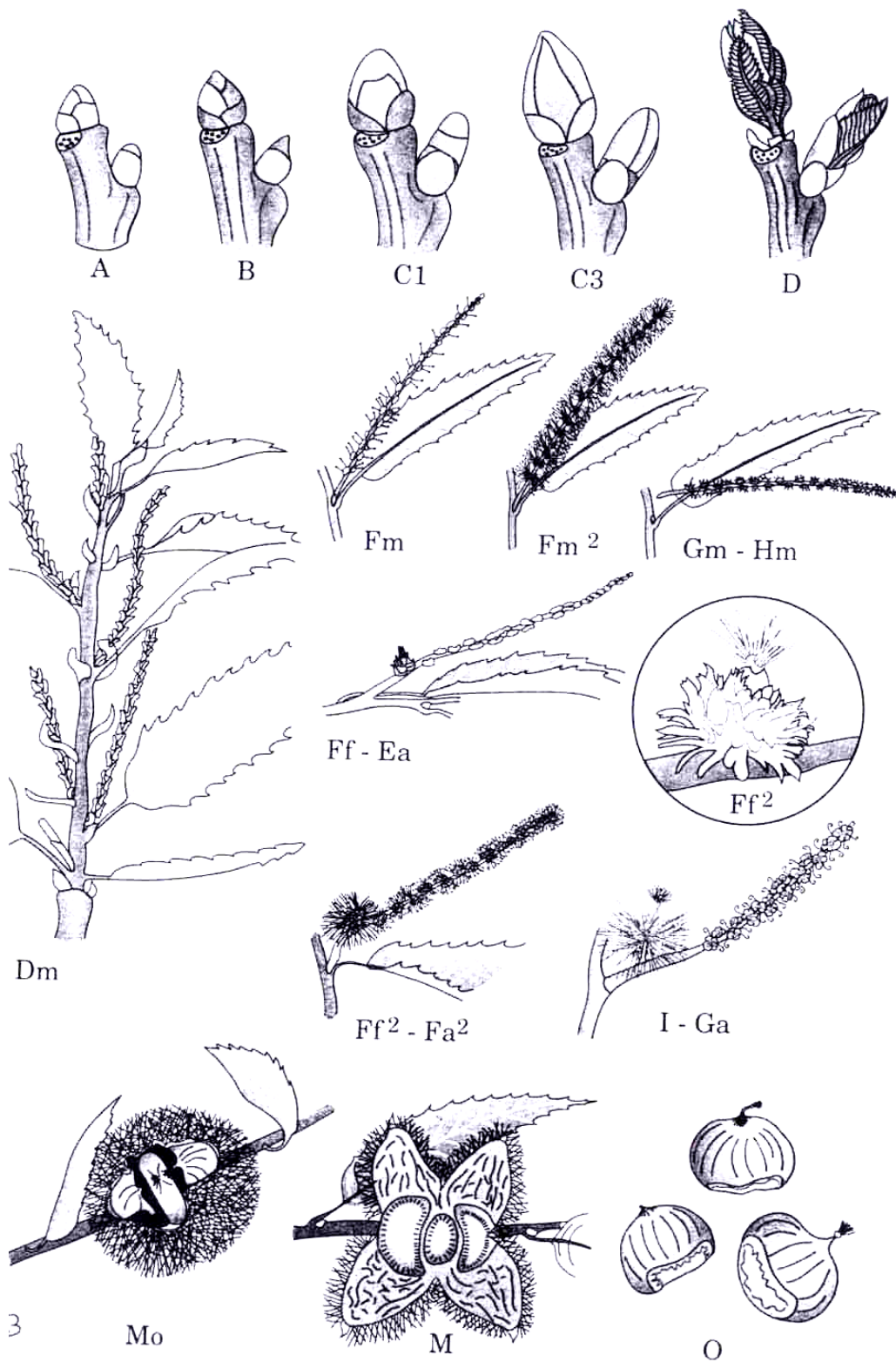
### 3.6. La fructification et la maturité des fruits

A la fin de la floraison, les bogues atteignent 2 à 2,5 cm et elles continuent leur croissance jusqu'à la maturité complète des fruits qui survient entre mi-septembre et fin octobre. La maturité des fruits est caractérisée soit par la chute des bogues à terre (mauvaise déhiscence) (stade Mo en phénologie), soit par la chute des fruits seulement, les bogues ouvertes restant attachées momentanément sur l'arbre (bonne déhiscence). La connaissance du nombre de jours qui s'écoulent depuis le débourrement jusqu'à la maturité des fruits est importante. En effet, elle permet de déterminer les variétés les plus adaptées aux conditions climatiques du milieu et de classer les variétés selon leur période de maturité (précoces, tardives...).

La châtaigne est un akène ; il continue d'évoluer (post-maturation) jusqu'à la germination.

Les fleurs non fécondées ne développent que leur paroi, le péricarpe, ce qui donne un fruit plat, vide, sans amande. La bogue peut arriver jusqu'à la date normale de maturité en l'absence de graine à l'intérieur: c'est un phénomène de parthénocarpie sans intérêt dans le cas du châtaignier. On signale aussi des glomérules androgynes ou hermaphrodites: ce sont des inflorescences femelles qui possèdent une rangée d'étamines, donc fleurs mâles, autour du groupe des stigmates.

**Figure 6.** Stade phénologique du châtaignier (Breisch, 1995)



### **3.7 Châtaignes et marrons**

La châtaigne contient sous la même enveloppe ou péricarpe, plusieurs graines qui lors d'un semis sont capables de donner chacune un plant, leur nombre pouvant varier de 2 à 5. La châtaigne peut être consommée à l'état frais ou après conservation. Le caractère marron correspond aux fruits constitués d'une seule graine (amande) sous la même enveloppe ou péricarpe. Le nombre de fruits à l'intérieur de la bogue est plus généralement compris entre 1 et 3, de ce fait, ces fruits ne sont pas cloisonnés. La chair est le plus souvent sucrée et de saveur agréable, de couleur blanche à blanc crème. Ils sont utilisés dans les industries de transformation (confiserie). Une variété est appelée marron lorsqu'il y a en moyenne moins de 12% de fruits cloisonnés.

Le terme de marron peut prêter à confusion car il est aussi utilisé pour désigner la graine, non comestible, du marronnier d'Inde *Aesculus hippocastanum*. Les genres *Aesculus* et *Castanea* n'appartiennent pas à la même famille.

### **4. Multiplication des porte-greffes et des variétés de châtaignier**

La multiplication du châtaignier peut être assurée par la voie sexuée (semis de fruits) autant que par la voie asexuée (marcottage, bouturage, greffage et culture *in-vitro*). Certaines variétés fruitières ne peuvent pas toutes être multipliées sur leur propre système souterrain, parce qu'elles présentent un faible taux d'enracinement ou manifestent une forte sensibilité aux maladies disséminées au niveau du sol comme la maladie de l'encre. Elles doivent être greffées sur un plant dont le système racinaire est bien adapté à la multiplication et possède une bonne résistance aux maladies. Le choix des porte-greffes est orienté en fonction de leur qualité fruitière ou de leur comportement écologique. Les critères sont les suivants :

- une bonne adaptation écologique aux sols et climats des régions de culture ;
- une bonne compatibilité et affinité avec les greffons des autres variétés fruitières indigènes ;
- un meilleur rendement ;
- une mise à fruit rapide, abondante et régulière ;
- une forme plus compacte de l'arbre afin de faciliter sa récolte et le traitement anticryptogamique et insecticide ;
- une résistance aux maladies du sol.

#### **4. 1 Multiplication par voie sexuée**

L'étude de la biologie florale met en évidence la nécessité d'une fécondation croisée. Tout châtaignier est donc un hybride. Les descendances obtenues par semis reflètent l'influence des deux géniteurs, mâle et femelle. Elles sont génétiquement hétérogènes en raison tant de l'hétérozygotie des parents que de la fécondation croisée.

Les châtaignes destinées au semis doivent être conservées au froid en stratification pendant tout l'hiver. Les fruits conserveront ainsi toute leur faculté germinative. Ils seront semés en mars ou avril et entretenus en pépinière pendant une ou deux années.

En pratique, cette technique est simple et peu onéreuse, mais elle a des inconvénients, parmi eux :

- une grande hétérogénéité des plants obtenus ;
- une sensibilité à la maladie de l'encre surtout pour les semis de l'espèce *C. sativa* ;
- des problèmes de conservation des semences.

#### **4. 2 Multiplication par voie asexuée**

La multiplication végétative reste le seul moyen de reproduire des plants racinés identiques à la variété dont ils sont issus. Cette méthode est utilisée pour multiplier les porte-greffes ou les variétés productrices sur leurs propres racines ou sur des souches d'une autre variété utilisée comme porte-greffe. Elle fait appel aux techniques du marcottage, du bouturage, du greffage (*in-vitro*) ou de la culture *in-vitro*.

##### **4. 2.1 Le marcottage**

Pour le châtaignier, le procédé ayant donné les meilleurs résultats est le marcottage en cépée avec étranglement de rejets de l'année et buttage. L'aptitude à l'enracinement varie selon les génotypes, elle varie selon les espèces et les clones. Les variétés de l'espèce *C. sativa* s'enracinent en général mieux que les *C. crenata*, eux-mêmes mieux que les *C. mollissima*. Cependant, à l'intérieur de chaque espèce, de grandes variations existent selon les individus (génotypes). Les différentes opérations du marcottage consistent à :

- opérer sur des rejets de l'année, suffisamment développés pour supporter sans dommage les opérations d'étranglement ;
- procéder à l'étranglement à la base des rejets avec une ligature ferme pour provoquer à ce niveau un ralentissement du flux de la sève élaborée pour l'émission des nouvelles racines ;
- butter les rejets étranglés dans un milieu acide ;

- maintenir les buttes fraîches pour obtenir des racines fibreuses dès la première année de végétation.

#### **4. 2. 2 Le bouturage**

Le procédé de marcottage en cépée est long et coûteux. Le bouturage mené avec des boutures herbacées à semi-ligneuses permet de produire de grandes quantités de plants enracinés.

Cette technique consiste à tremper la base des boutures herbacées, constituées par les parties terminales (apex) des rejets non étranglés de l'année dans une solution d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) pendant 15 minutes. Des nombreux problèmes techniques restent encore à résoudre pour obtenir une réussite optimale et un taux maximal d'enracinement.

#### **4. 2. 3 Le greffage**

C'est la méthode traditionnelle la plus utilisée pour la multiplication du châtaignier, elle est utilisée dans la majorité des pays européens. Elle est pratiquée pour assurer le greffage de semis, de rejets de taillis ou surgreffer des arbres adultes dont la variété ne correspond plus aux besoins souhaités et pour certaines variétés qui sont incapables de se multiplier sur leurs propres racines. Le greffage sur un porte-greffe cultivé *in-vitro* ou *in-vivo* adapté et résistant est pratiqué à cause de différents problèmes:

- une sensibilité aux maladies ;
- une mauvaise aptitude à la multiplication végétative ;
- des performances agronomiques modestes.

##### **4. 2. 3. 1 Procédés de greffage**

La première étape consiste à choisir les greffons, qui sont issus en général des variétés intéressantes pour leurs fruits mais qui doivent être affranchies du sol. Dans notre travail, les greffons utilisés appartiennent aux variétés Lüina et Verdanesa qui sont bien répandues dans le sud des Alpes.

Pour le greffage, la greffe en fente est choisie dans notre étude car elle est plus adaptée à notre matériel (porte greffe et greffon). Le greffage en couronne, à l'anglaise et en cadillac peut aussi être réalisé.

La greffe en fente simple, dans notre cas, s'effectue sur des bourgeons enracinés de 4 semaines. Dans un premier temps, on prépare le porte-greffe en créant une fente simple pour recevoir le greffon et on enlève tous les bourgeons axillaires.

Pour le greffon, on le taille en biseau avec épaulement pour éviter une ouverture trop large et trop profonde du porte-greffe. Ce greffon sera utilisé pour une greffe en fente simple. Avec deux pinces, on essaie de coller le deux partenaires. Les plants greffés sont alors cultivés sur un milieu d'enracinement et exposé à une lumière ( $50 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{Sec}$ , une photopériode de 16 heures par jour) par des tubes fluorescents de type Philips TLD 58 W/89 et à une température alternée ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  le jour,  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  la nuit). L'humidité relative est de 60 % dans la chambre de culture.

En pépinière, cette greffe est surtout utilisée en surgreffage (changement de variété au verger) ou en greffage de rejets sauvages (reconversion de taillis en châtaigneraie fruitière).

Le problème majeur de cette méthode de multiplication est l'incompatibilité au greffage entre la variété à greffer et le porte-greffe. C'est un phénomène très fréquent chez le châtaignier, aussi bien intra qu'inter-clonal.

#### **4. 2. 4. La multiplication par culture *in vitro***

##### **4. 2. 4. 1 Techniques de base des Cultures *in vitro***

Ces dernières décennies, le développement de la biologie végétale a permis une extension considérable des techniques de culture *in vitro* de cellules, d'organes et de tissus. Ceux-ci se développent dans un milieu nutritif, en conditions d'asepsie, pour une période de temps indéfinie. Cette nouvelle technologie est utilisée tant en recherche fondamentale que dans des domaines relevant de la biologie appliquée .

La possibilité d'isoler une cellule ou un tissu hors de l'organisme tout en leur permettant de conserver leur capacité de croissance (organes végétatifs et reproducteurs) et de différenciation cellulaire, permet de reconstituer une plante entière tout en gardant sa potentialité organogénétique: c'est l'expression de la totipotentialité cellulaire, c'est-à-dire l'aptitude des cellules à se diviser puis à se différencier de nouveau en fonction des conditions expérimentales (White. 1934).

Les cultures *in vitro* impliquent la croissance d'une cellule, d'un explant dans un environnement contrôlé (milieux définis) et aseptiques. Elles sont utilisées pour :

- la micropropagation ;
- la création de nouvelles variétés ;
- l'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycoses, mycoplasmoses et bactérioses) ;
- La conservation des ressources génétiques

Les méthodes se sont considérablement diversifiées et impliquent aujourd'hui la culture d'embryons, la culture de protoplastes, l'exploitation des variations somaclonales. Elles sont utilisées pour le transfert de gènes pour la réalisation d'hybrides interspécifiques lorsque les croisements par voie sexuée échouent, etc.

#### **4. 2. 4. 2 La micropropagation**

La multiplication végétative par bouturage, marcottage, greffage n'est pas exempte de difficultés :

- les risques de transmission des maladies virales et bactériennes des explants à leurs descendants sont élevés ;
- le taux de multiplication est faible ;
- la multiplication est tributaire du rythme saisonnier ;
- le taux de réussite est aléatoire ;
- les expériences sont longues et donc coûteuses.

Pour faire face à ces difficultés, les techniques de micropropagation, appelée aussi multiplication végétative accélérée, ont été développées. Elles permettent la propagation à grande échelle d'un génotype sélectionné (résistance aux maladies, meilleure productivité, haute teneur en matière nutritive) en utilisant les acquis de la culture *in vitro*. Cette technologie a été utilisée à l'échelle industrielle pour la commercialisation de plusieurs espèces végétales. Elle consiste à prélever des bourgeons préexistants sur les fragments de plantes mis en culture ou induits (bourgeons dits « adventifs ») sur des explants (Lê, 1985). L'organe mis en culture peut être un organe (bourgeon, racine, feuille, anthère, etc) ou un fragment d'organe (explant), prélevé sur une plante qui peut être cultivé isolément sur un milieu nutritif synthétique dans des conditions d'asepsie stricte. En pratique, pour produire des plants à grande échelle, la micropropagation est basée sur les quatre étapes suivantes:

##### **Stade 1: Stade de préparation du matériel stérile**

La plante mère sur laquelle le matériel sera prélevé doit être saine, dépourvue de carence minérale, en pleine croissance. Le prélèvement en période de dormance conduit à l'échec. L'explant (bourgeon terminal, bourgeon axillaire, pédoncule floral...) est alors désinfecté pour éviter, autant que possible, l'infection des cultures par des bactéries ou des champignons). Selon, la nature d'explant, la désinfection peut se faire par des traitements dans l'alcool à 70%, l'hypochlorite de calcium ou de sodium, en présence d'un agent

mouillant (tween 20 ou de triton X 100), des fongicides et enfin rinçage à l'eau distillée stérile.

### **Stade 2: Multiplication**

Cette étape consiste au repiquage des plantules obtenues au stade précédent. Les explants sont transférés sur un milieu de culture de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines, régulateurs de croissance). Cette étape est la plus importante car le coefficient de multiplication est le critère économique majeur en vue d'une propagation à des fins commerciales (Zrýd, 1988). La détermination du type de régulateurs de croissance par exemple pour les cytokinines (BAP, 2iP, Kinétine) et d'auxines (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) et leurs concentrations respectives dans le milieu de culture est une étape déterminante.

Au stade de multiplication, les cytokinines sont généralement présentes en plus grande concentration dans le milieu que les auxines. Ceci s'explique d'un point de vue physiologique par le fait que les cytokinines s'opposent à la dominance apicale, donc stimulent la croissance de nouvelles tiges.

Pour chaque espèce, il faut bien étudier l'environnement des cultures (taux d'échange de CO<sub>2</sub>, la concentration en source de carbone, la fermeture plus ou moins hermétique du récipient, etc). Chaque facteur influencera la réponse morphogénétique. En effet, le choix des conditions de culture (température, lumière, photopériode, humidité, etc) et le milieu nutritif, dont la composition doit changer à chaque étape de l'organogénèse (caulogénèse, rhizogénèse), sont très importants.

### **Stade 3: Rhizogénèse (enracinement)**

Ce stade se caractérise par la naissance de racines sur les tiges feuillées obtenues au stade de multiplication. L'enracinement n'est pas toujours une étape facile de la micropropagation. Ce stade influence directement le taux de survie, donc de la reprise uniforme de la croissance des miniboutures.

L'enracinement comporte trois étapes: l'induction, l'initiation, et l'élongation. Il arrive parfois que des espèces présentent des racines adventives généralement spontanées plus ou moins développées au stade de multiplication. Dans le cas contraire, l'apport d'auxines exogènes comme l'AIA, l'AIB ou l'ANA est nécessaire pour la rhizogénèse.

Pour chaque espèce étudiée, la nature et la concentration des auxines doivent être déterminées car de fortes concentrations peuvent inhiber le développement racinaire par la formation de

cal. La détermination de l'équilibre hormonal des phytorégulateurs du milieu nutritif se fera cette fois en faveur des auxines pour stimuler la rhizogénèse.

L'implication des auxines dans le processus d'organogénèse et surtout dans la néoformation des racines adventives est nécessaire. Le succès de la rhizogénèse dépend étroitement des conditions de culture (type d'auxine, concentration, pH, sels minéraux de base, vitamines, etc.) qui doivent être déterminées empiriquement. L'addition d'absorbant tel que le charbon actif ou le changement de la structure physique du milieu en ajoutant de la vermiculite au milieu de base peuvent faciliter l'émergence des racines.

Le nombre de miniboutures enracinées et la qualité du matériel végétal produit sont deux facteurs fondamentaux dans l'appréciation du résultat.

#### **Stade 4: Acclimatation**

C'est la dernière phase de la micropropagation, qui consiste à un retour graduel des vitroplants d'un environnement axénique à celui présentant des caractéristiques normales et des conditions qui prévalent dans les serres.

Le transfert en serre se déroule sur des plantules enracinées repiquées individuellement dans des pots contenant un substrat horticole, c'est-à-dire un mélange de terreau et de tourbe par exemple. Les parties aériennes des explants sont maintenues dans un environnement qui avoisine les 100% d'humidité relative. Vu l'état physiologique sensible, qui se manifeste par l'ouverture continue des stomates, laissant donc s'échapper l'eau de transpiration de manière continue, les risques de dessèchement sont très élevés. Il est par conséquent, nécessaire d'effectuer des arrosages fréquents et de maintenir une forte humidité relative par le biais d'un brouillard artificiel sec (fog system) durant les premiers jours afin d'éviter le flétrissement de l'appareil végétatif.

#### **4. 2. 4. 3 Les types de multiplication végétative *in vitro***

Les méthodes de propagation *in vitro* des végétaux sont basées soit sur la stimulation des bourgeons axillaires (chaque rameau latéral constitue potentiellement une nouvelle plantule), soit sur la stimulation des bourgeons adventifs (chaque plantule est une plantule potentielle), soit en favorisant la différenciation d'embryon (embryons somatiques). Il convient de prendre toutes les précautions pour éviter tout risque de modifications génétiques (mutations somaclonales).

#### **4. 2. 4. 3. 1 Multiplication par bourgeonnement axillaire**

L'explant initial est constitué soit d'un méristème isolé, soit d'un bourgeon terminal ou axillaire, soit une extrémité de tige, soit un fragment de tige comportant au moins un bourgeon axillaire. Le recours à un bourgeon accélère le processus de multiplication et d'organogenèse (stade de cal évité). L'incorporation des cytokinines dans le milieu de culture initie le développement des pousses axillaires ou des méristèmes en tiges feuillées. Découpées à leur tour, chaque segment comprenant un noeud sera repiqué sur un milieu identique et redonnera autant de tiges feuillées (Semal et al. 1989). Ces tiges formées peuvent alors être transférées sur un milieu enrichi en auxine pour provoquer leur enracinement.

#### **4. 2. 4. 3. 2 Multiplication par bourgeonnement adventif**

Le terme "adventif" s'applique à la formation d'organes en un site inhabituel. L'explant est constitué d'un fragment d'organe, d'une portion de tissu, ou même de cellules isolées (pollen protoplastes). Il est placé sur un milieu contenant des cytokinines. Des bourgeons peuvent être néoformés directement à partir des cellules de l'explant initial, mais cette situation favorable est rare. Plus souvent, des cellules de l'explant initial se divisent rapidement et forment un cal primaire (rattaché à l'explant) à partir duquel des bourgeons seront néoformés. Toutes les tiges obtenues dans les deux cas sont transférées sur un milieu enrichi en auxine afin de provoquer leur enracinement. Les plantules sont alors acclimatées en terre où elles deviennent des plantes normales.

Les méthodes fondées sur l'organogenèse des bourgeons adventifs peuvent induire une certaine instabilité génétique affectant le génome au niveau tant qualitatif que quantitatif. Ainsi, des perturbations du cycle mitotique peuvent conduire à des cellules polyploïdes ou aneuploïdes (Loudyi, 1993). Ces modifications au niveau du génome ne sont pas recherchées en micropropagation mais peuvent être exploitées dans la mesure où elles génèrent des caractères intéressants sur le plan agronomique. Par ailleurs, l'organogenèse adventive est la principale voie pour les applications des manipulations génétiques en culture *in vitro*.

#### **4. 2. 4. 3. 3 Multiplication par embryogenèse somatique**

Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. L'embryogenèse somatique consiste à provoquer l'apparition d'embryons à partir de tissus végétaux mis en culture *in vitro*. Elle apparaît le plus souvent dans les suspensions cellulaires, occasionnellement dans les cals, plus rarement sur les organes.

Pour induire l'embryogenèse somatique, le tissu végétal (cal ou organe) est dissocié et mis en culture sous forme d'une suspension cellulaire. Sous certaines conditions expérimentales; les cultures cellulaires s'organisent en nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème de tige et un méristème de racine) nommés embryons somatiques, embryoides ou embryons asexués. Cependant, le risque d'obtenir des plantes non conformes paraît être plus élevé.

La maîtrise de l'embryogenèse somatique devrait offrir une situation idéale (Dodeman et al. 1997): possibilité de multiplication presque infinie d'un génotype (potentiellement chaque cellule somatique pourrait produire une plante), obtention d'une plante morphologiquement identique à la plante issue de graine. Le conditionnement des embryons somatiques (encapsulation) pour conserver leur viabilité et permettre leur dissémination pourrait conduire à des semences (graines) artificielles.

#### **4. 2. 4. 4 Les régulateurs de croissance en culture *in vitro***

En général, selon le but poursuivi, micropropagation ou régénération de plantes indemnes de microorganismes, ont fait appel aux régulateurs de croissance suivants:

##### **4. 2. 4. 4. 1 Les cytokinines**

Les plus utilisées en culture *in vitro* sont: la 6-benzylaminopurine (BAP), la Kinétine (KIN), la 2-isopentyladénine (2iP) et la zéatine (ZEA). L'intervention des cytokinines est signalée dans des nombreux phénomènes physiologiques. Au niveau cellulaire, les cytokinines stimulent la division cellulaire, elles agissent aussi sur l'accroissement cellulaire et stimulent certaines synthèses protéiques. Au niveau de l'organisme, elles induisent la néoformation des bourgeons et font régresser l'inhibition exercée par la dominance apicale; alors qu'au contraire elles limitent le développement des racines, elles lèvent la dormance de certaines semences et stimulent la prolifération des méristèmes axillaires.

Les cytokinines sont des hormones de croissance naturelles ou de synthèse. Leur site principal de biosynthèse est la racine et sont distribuées dans la plante via le phloème.

##### **4. 2. 4. 4. 2 Les auxines**

La synthèse des auxines s'effectue dans l'apex des tiges, dans les méristèmes et les jeunes feuilles des bourgeons terminaux. De ces lieux de synthèse, les auxines migrent dans la plante jusque dans les racines ou elles s'accumulent. La conduction est polarisée c'est-à-dire qu'elle s'effectue plus facilement dans un sens que dans l'autre, de l'apex vers la base de l'organe.

En culture *in vitro*, les auxines les plus souvent utilisées sont de nature faibles ou fortes selon leur résistance pendant l'autoclavage du milieu de culture (Zrýd, 1988). Ils agissent à des concentrations très différentes variant entre  $10^{-6}$  et  $10^{-8}$  M. Parmi les auxines faibles on trouve l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) et l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) qui doivent être ajoutées après autoclavage et parmi les auxines fortes on trouve l'acide  $\alpha$ -naphtylacétique (ANA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), qui est souvent utilisée pour initier la culture de cals. L'AIA (Acide indole-acétique) reste l'hormone la plus répandue et la plus typique des auxines naturelles ou de synthèse.

Son rôle primordial est l'élongation cellulaire et la plasticité de la paroi. Dans la pratique, en culture *in vitro*, l'auxine joue un rôle important dans l'organogenèse, en particulier pour la rhizogénèse, dans la formation de cals et la stimulation des divisions cellulaires en présence de cytokinine.

#### **4. 2. 4. 4. 3 Les gibbérellines**

La plus répandue est l'acide gibbérellique  $GA_3$ . Cette substance favorise l'élongation de la tige avant l'enracinement, le développement des embryoides, la croissance des méristèmes et la prolifération axillaire. Elle est utilisée à des concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  M.

Généralement, selon la dose et le moment d'application, la gibbérelline est utilisée en mélange avec d'autres régulateurs de croissance, c'est au chercheur de déterminer la nature et l'équilibre des régulateurs de croissance en fonction du but recherché (callogenèse, rhizogénèse, production de cals, etc.).

#### **4. 2. 4. 4. 4 Acide abscissique**

L'acide abscissique est considéré comme un inhibiteur de croissance, au contraire des autres régulateurs de croissance (cytokinines et gibbérellines). En culture *in vitro*, l'acide abscissique favorise la formation de cals, le développement de bourgeons et l'initiation d'embryons somatiques.

## **5. Objectifs de la thèse**

La reconstitution du verger de châtaignier implique une bonne connaissance du patrimoine génétique existant, l'identification des variétés les plus intéressantes et la mise au point des techniques de multiplication conforme. Le présent travail s'attache au premier et au deuxième thèmes. Il vise à établir la diversité génétique des châtaigniers cultivés au Tessin et à affiner les méthodes de multiplications *in vitro*.

Les essais de recherche comportent les axes suivants :

- Recherche de marqueurs moléculaires et détection de la variabilité génétique du châtaignier suisse ;
- Etude de la variabilité génétique entre le châtaignier européen et asiatique ;
- Apport des techniques de greffage d'apex *in vitro* pour la micropropagation du châtaignier.

### **5.1 Recherche de marqueurs moléculaires et détection de la variabilité génétique du châtaignier Suisse**

La variabilité génétique intraspécifique est aujourd'hui un des facteurs pris en considération mentionnée dans les programmes de conservation de la biodiversité, au niveau des espèces tant sauvages que cultivées. L'agriculture durable, fondée sur la défense des appellations d'origine, repose sur l'originalité des produits régionaux auxquelles appartiennent les variétés locales de plantes cultivées. Le terme de variabilité est utilisé pour qualifier la différence qui existe entre les individus croissant dans une même population ou dans des populations différentes, ou appartenant à des cultivars ou variétés supposées différentes. L'accumulation de variabilité au sein des génomes conduit à leur différenciation. Selon la nature des caractères étudiés et de leur déterminisme génétique, divers outils d'analyse sont utilisés. Dans notre étude, des méthodes d'analyses génétiques moléculaires ont été utilisées. Elles devaient conduire à mettre au point des marqueurs moléculaires permettant d'identifier les variétés du châtaignier au sud des Alpes, d'établir les liens de parenté entre elles, voire de reconnaître d'éventuels synonymes.

Dans ce contexte, nous avons entrepris une analyse génétique moléculaire à l'aide de quatre méthodes moléculaires, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) et SSR (Simple Sequence Repeats = microsatellites), chez 9 individus sauvages et 43 individus cultivés du châtaignier suisse (*Castanea sativa*) appartenant à 5 variétés identifiées préalablement par des

caractères morphologiques. Notre intention était de détecter le polymorphisme produit par chaque méthode, comprendre la diversité génétique inter et intra-variétale pour établir, dans la mesure du possible, un profil génétique des différents cultivars. L'objectif pratique était de fournir un instrument permettant l'identification précise des variétés en vue de la constitution de vergers conservatoires et de la gestion, voire de la reconstitution, de vergers de production. Les résultats de cette étude sont présentés au **chapitre I**.

## **5. 2 Comparaison de la diversité génétique entre le châtaignier européen et les châtaigniers asiatiques**

Les objectifs sont: i) d'évaluer le niveau de la diversité génétique entre le châtaignier européen (*C. sativa*), le châtaignier chinois (*C. mollissima*) et le châtaignier japonais (*C. crenata*) pour comprendre les liens de parenté entre les différents taxons ii) tenter d'établir une relation entre certains génotypes et leur comportement en plein champs (**Chapitres II**). Pour établir les profils génétiques, différents marqueurs ont été utilisés (RAPD, AFLP, ISSR et microsatellites). Les résultats obtenus avec chaque marqueur ont été comparés.

A plus long terme, ces connaissances devraient permettre d'intégrer systématiquement la diversité génétique dans les programmes d'amélioration variétale et de gestion des forêts ou des vergers.

## **5. 3 Apport des techniques de greffage d'apex in vitro pour la micropropagation du châtaignier**

Dans le **Chapitre IV**, nous nous sommes intéressé au greffage *in vitro* du châtaignier. Ce thème de recherche est donc articulé autour des trois étapes suivantes:

- La multiplication *in vitro* du porte-greffe Maraval CA-74 ainsi que les deux greffons Lúina et Verdanesa sur un milieu de culture approprié.
- L'enracinement *in vitro* du porte-greffe Maraval CA-74 qui est un hybride interspécifique pour donner une plantule entière prête à être greffée et acclimatée.
- Le greffage *in vitro* entre les deux partenaires qui est un moyen de propagation des arbres fruitiers et étudier les facteurs influençant la réussite du greffage.

Comme l'incompatibilité est un phénomène fréquent chez le châtaignier, une étude histologique a été conduite pour tenter de mieux comprendre ce phénomène.

# Chapter I

Genetic variation and characterization of sweet chestnut cultivars (*Castanea sativa* Mill.) in southern Switzerland using RAPD, AFLP, ISSR and SSR markers.

## Abstract

In order to study the genetic variation and to provide specific markers for genetic characterisation and identification of Swiss chestnut cultivars, four sets of molecular markers were exploited, Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs), Amplified Fragments polymorphic DNAs (AFLPs), Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) and Simple Sequence Repeats: (microsatellites = SSRs). 98 RAPD, 222 AFLP, 35 ISSR, and 30 SSR polymorphic markers were amplified using 12, 5, 4 and 5 primer combinations respectively.

Clustering analysis performed with the four sets of markers to group cultivars according to their similarity coefficients separated the genotypes into clear groups with different grades of success. The genetic identification of cultivars was more carried by RAPD than ISSR and SSR, allowed us to conclude that the two formers methods were not suitable to characterise chestnut cultivars. It is interesting to note that AFLP generated the highest number of polymorphic bands and clustered fairly chestnut cultivars. These results allowed us to resolve problems generated by synonyms and homonyms in different chestnut accessions.

The possibility for cultivars identification for chestnut can have important implications in the protection and management of cultivars selections.

Molecular markers results are comparable. The similarity matrices based on the four sets of data give a high significant correlation between RAPD and AFLP, RAPD and ISSR data ( $r = 0.78$  and  $r = 0.75$  respectively).

## 6. 1. Introduction

European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is a species that, perhaps more than any other in Europe, has attracted a particular attention of man. During some historical periods, in various regions of Europe, chestnut cultivation became so dominant and indispensable for the survival of mountain populations, to the point that some authors do not hesitate to identify these cultures as “chestnut civilizations” (Lieutaghi, 1969).

Southern Switzerland is a mountainous region (approximately 26 000 ha of chestnut forests) in which chestnut is wide spread (Conedera et al. 1997). Chestnut is one of the most common forest trees and has been cultivated in this region since nearly 2000 years. In southern Alps, chestnut was considered as an important source of food for many human populations. Moreover, chestnut is widely known for its double usefulness. Its fruits satisfy the daily life need for nutrition (man and animal) and its wood is a means for providing either fire or stokes. For this purpose, chestnut has been subjected to a local diversification in the range of its products as well as in the range of its varieties; this is done by the majority of mountain populations. The choice of a large number of varieties was adopted by farmers to assure their personal needs. Some farmers possessed a typical combination of cultivars. Others, cultivated chestnut varieties for their quality and conserve of their fresh fruit as winter supply (Conedera et al. 1998). This resulted in a differentiation of the product and of the cultivated varieties.

Despite the great number of existing varieties, the need for a powerful determination method and the evaluation of genetic diversity and structure in cultivated varieties and in natural accessions is crucial for making conservation and management strategies and the utilization of the natural resources.

Traditionally, the identification of chestnut cultivars in southern Switzerland has been based on the combination of morphological, phenological characteristics and according to geographic origin. The varieties could be distinguished by the ripening period (early, mid-season, late), by the type of use (fresh consumption, long-term storage, drying, flour, animal feed), or by range of distribution (higher altitudes, lower slopes, ubiquitous, etc). On this basis, more than 100 names of varieties are known, 51 of these varieties have been located and identified in 30 townships (Conedera et al.1993). The assessment of genetic variability according to morphological features is influenced by the environmental factors, and does not allow to characterize very close genotypes such as clonal selections derived from a variety (Cervera et al. 1998). Moreover, this approach yielded considerable redundant number of

different chestnut cultivars. In fact, some chestnut cultivars have more than one name or the same name as different cultivars. Therefore, in order to verify the identity of uncertain cultivars, it is necessary to consider genetic characteristics.

Some authors applied isozymes techniques with more or less success, to identify and to study the genetic variability of European chestnut. Müller-starcket et al. (1993) for Swiss chestnut cultivars, Pereira-Lorenzo et al. (1996) for Spanish cultivars, Malvolti and Fineschi (1987) for Italian cultivars, Frascaria and Lefranc (1992) for French cultivars and Pereira et al. (1999) for Portuguese cultivars. The use of isozymes markers to characterize and to study the genetic variation between and within cultivars, depend on several factors (environmental, limited in number) that limit the wider adoption of this technique (Pereira-Lorenzo et al.1996).

Molecular markers were used to identify chestnut clones and cultivars. DNA molecular markers techniques based on *in-vitro* enzymatic amplification of specific fragments of DNA via PCR (polymerase chain reaction) are of greater suitability in genetic diversity estimations and identification of genotypes (Thomas et al. 1993). They are used in several studies of genetic population such as RAPDs (Storchova et al. 2002; Suh et al. 2002), AFLPs (Waugh et al. 1997; Evans et al. 2001), ISSRs (Panda et al. 2002) and SSRs (Meerow et al. 2003). Previous studies have assessed the genetic variability of chestnut using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) (Galderisi et al. 1998; Fineschi et al. 1993; Oraguzie et al. 1999), Amplified Fragment Length Polymorph (AFLPs) (Yamamoto et al.1998), Inter Simple Sequence Repeat (ISSRs) (Goulão et al. 2001; Casasoli et al. 2001) and Simple Sequence Repeats (SSRs or Microsatellites) (Botta et al. 1999). These molecular markers have successfully detected polymorphism also in different species of fruit trees such as peach (Aranzana et al. 2003), olive (Pasqualone et al. 2001; Cipriani et al. 2002), apple (Gianfranceschi et al. 1998) and grapevine (Cervera et al. 1998; Fossati et al. 2001).

The aims of this study were (i) to study the genetic diversity within and among Swiss clones and cultivars of chestnut, (ii) to characterize genetic variation between cultivars and natural chestnut of coppice shoots so that we can manage the utilization of the natural resources in southern Alps and (iii) to study the usefulness of 4 molecular markers: RAPD, AFLP, ISSR and SSR for the identification of chestnut varieties and clones.

## **6.2 Molecular marker techniques**

The RAPD, AFLP, ISSR and SSR molecular techniques were chosen in our study because of their efficiency in detecting genetic polymorphism. They are based on the in-vitro enzymatic amplification of specific fragments of DNA via PCR (polymerase chain reaction).

The technique of RAPD is based on the random amplification of unknown DNA sequences with single 10-mer-primers of arbitrary nucleotide sequence, under low annealing temperatures (Welsh and McClelland, 1990). Those primers detect polymorphisms in the absence of specific nucleotide sequence information (Williams et al.1990).

AFLP markers assay the presence/absence of restriction enzyme sites and sequence polymorphisms adjacent to these sites. Three crucial steps are followed in order to obtain AFLP markers: (i) digestion of genomic DNA by restriction endonucleases such as EcoRI and MseI; (ii) ligation of EcorI and MseI adapters. (iii) Selection of fragments by two successive PCR-based amplification steps using primers complementary to the adapter oligonucleotides with additionally one to three arbitrary nucleotides as selective sequences (Vos et al. 1995; Cervera et al. 1996; Maughan et al. 1996).

The choice of selective nucleotides in the primers for PCR and the combination of different restriction enzymes make AFLP a useful system for molecular typing of plants.

Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers involve PCR amplification of DNA. ISSR is based on the amplification of inter- repeat regions using microsatellite-anchored primers (Kantety et al. 1995). This method consists in the use of a single primer composed of a microsatellite sequence anchored at the 3' or 5' end by 2–4 arbitrary nucleotides. These primers target simple-sequence repeats (microsatellites) that are abundant throughout the genome (Zeitkiewiez et al. 1994; Wang et al. 1999). This technique does not require prior knowledge of DNA sequence for primer design (Hiromori et al. 1998).

Microsatellite (SSR) consists of two to eight (usually two or three) bases tandemly repeated within the genome (in which synthetic oligonucleotide probes containing repeats are hybridized to genomic DNA (Cipriani et al. 1999).

## 6.3 Material and methods

### 6.3.1 Plant material

In the present study, plant material was collected from morphologically different varieties of different areas in southern Switzerland. The origin of studied accessions of Swiss varieties and coppice shoots are listed in Table 3.

**Table 3.** Studied accessions of chestnut cultivars and their origin.

Accession order	Accession N°.	Accession name	Genotype	Origin
1	1	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Calonico 01.CH
2	2	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Calonico 04.CH
3	3	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Giornico 03.CH
4	4	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Giornico 06.CH
5	5	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Giornico 04.CH
6	6	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Chironico 02.CH
7	7	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Chironico 06.CH
8	8	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Chironico 10.CH
9	9	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Chironico 12.CH
10	10	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Chironico 13.CH
11	11	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Lodrino 04.CH
12	12	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Torricella 10.CH
13	13	<i>C. sativa</i>	Verdanesa	Torricella 13.CH
14	1	<i>C. sativa</i>	Lüina	Calonico 02.CH
15	2	<i>C. sativa</i>	Lüina	Calonico 07.CH
16	3	<i>C. sativa</i>	Lüina	Giornico 01.CH
17	4	<i>C. sativa</i>	Lüina	Giornico 02.CH
18	5	<i>C. sativa</i>	Lüina	Chironico 01.CH
19	6	<i>C. sativa</i>	Lüina	Chironico 05.CH
20	7	<i>C. sativa</i>	Lüina	Chironico 08.CH
21	8	<i>C. sativa</i>	Lüina	Chironico 14.CH
22	9	<i>C. sativa</i>	Lüina	Lodrino 03.CH
23	10	<i>C. sativa</i>	Lüina	Lodrino 05.CH
24	11	<i>C. sativa</i>	Lüina	Lodrino 14.CH
25	12	<i>C. sativa</i>	Lüina	Torricella 08.CH
26	13	<i>C. sativa</i>	Lüina	Torricella 09.CH
27	14	<i>C. sativa</i>	Lüina	Torricella 17.CH
28	1	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Calonico 03.CH
29	2	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Calonico 05.CH
30	3	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Calonico 06.CH
31	4	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Calonico 08.CH
32	5	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Chironico 03.CH
33	6	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Chironico 04.CH
34	7	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Lodrino 02.CH
35	8	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Lodrino 11.CH
36	9	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Lodrino 12.CH

37	10	<i>C. sativa</i>	Bonè negro	Lodrino 13.CH
38	1	<i>C. sativa</i>	Berögna	Lodrino 07.CH
39	2	<i>C. sativa</i>	Berögna	Lodrino 08.CH
40	3	<i>C. sativa</i>	Berögna	Prosita 07.CH
41	1	<i>C. sativa</i>	Pinca	Veizio 21.CH
42	2	<i>C. sativa</i>	Pinca	Veizio 22.CH
43	3	<i>C. sativa</i>	Pinca	Veizio 31.CH
44	1	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
45	2	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
46	3	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
47	4	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
48	5	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
49	6	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
50	7	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
51	8	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH
52	9	<i>C. sativa</i> : Coppice		CH

### 6.3.2 DNA extraction

Total DNA was extracted from small leaves using hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) according to the method described by Porebski et al. (1997). High salt concentrations and polyvinyl-polypyrrolidone were added separately to remove polysaccharides and polyphenol compounds. Extraction was performed by an extended RNase treatment and a phenol-chloroform method. The purification of DNA was achieved by prep-A-gene matrix (Biorad) and quantified spectrophotometrically. DNA was resuspended in TE (pH 8) solution and stored at – 20 °C.

### 6.3.3 Primers used in the PCRs

For RAPD, a total of 30 primers were screened from set OPA, OPB, OPD, OPE, OPM and OPX (Operon Technologies, Alameda, Calif.), twelve 10-mer oligonucleotides were selected (Table 4) according to the number and consistency of amplified specific markers.

For AFLP, 4 sets of selective primer combinations were used (E-AGG/M-CTT, E-AAC/M-CTT, E-AGT/M-CAT and E-AAC/M-CAT) (Table 5) from the GIBCO BRL AFLP™ Core Reagent Kit to generate AFLP fragments.

For ISSRs, 20 primers were screened and five were selected (Table 6) (obtained from UBC primer set 100/9, University of British Columbia, Canada) based on their capacity to amplify more polymorphic fragments.

The Microsatellites primers used in this study were originally developed for oak species (Steinkellner et al. 1997; Botta et al. 1999) and were selected for their usefulness in

genotyping chestnut cultivars. In total, we analysed 24 SSR primers isolated from *Quercus petraea* and *Q. robur*. Four primer pairs from *Q. petraea* and 1 primer isolated from *Q. robur* successfully amplified SSR fragments for chestnut and were used in our analyses (Table 7).

**Table 4.** Sequence of the random primers tested in RAPD analysis.

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA04	AATCGGGCTG
OPA10	GTGATCGCAG
OPB08	GTCCACACGG
OPD20	ACCCGGTCAC
OPE01	CCCAAGGTCC
OPE04	GTGACATGCC
OPE16	GGTGA CTGTG
OPE19	ACGGCGTATG
OPX17	GACACGGACC
OPA07	GAAACGGGTG
OPA15	TTCCGAACCC

**Table 5.** Details on primers used in AFLP analysis.

<b>Primer</b>	<b>Sequence 5'-3'</b>
EcoRI adapter	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC
EcoRI-+1 Primer	GACTGCGTACCAATTCA
EcoRI-+3 Primer	GACTGCGTACCAATTCAGT GACTGCGTACCAATTCAAC GACTGCGTACCAATTCAGG
MseI Adapter	GACGATGAGTCCTGAG AATTGGTACGCAGTCTAC
MseI-+1- Primer	GATGAGTCCTGAGTAACAA GATGAGTCCTGAGTAACAT
MseI-+3- Primer	GATGAGTCCTGAGTAACAT GATGAGTCCTGAGTAACTT

**Table 6.** Primer sequences and their annealing temperature used in ISSR analysis.

Primer type	Sequence primers	Annealing temperature °C
UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGATC	51
UBC 890	ATGGTGTGTGTGTGTGT	51
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	55
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	51
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAT	52

**Table 7.** Primer sequences and their annealing temperature used in SSR analysis.

Primer type	Sequence	Annealing temperature °C
QpZag108	CTAGCCACAATTCAGGAACAG CCTCTTTTGTGAATGACCAAG	45
QpZag9	GCAATTACAGGCTAGGCTGG GTCTGGACCTAGCCCTCATG	51
QpZag7	CGCACGACCGACCTAGGTA CTTATAGGAGACATGCCAG	45
QpZag110	GGAGGCTTCCTTCAACCTACT GATCTCTTGTGTGCTGTATTT	54
QrZag 121	GGCATGTGTATTGAAAGCTGTA GTACCCAAGATGTAAAATCACCC	51

### 6.3.4 DNA amplification

#### RAPD

PCR were performed in a total volume of 25 µl. The amplification reaction contained 1 x PCR buffer, 1.4 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM primer, 1U/µl Taq polymerase (Eurobiotaq) and 20 ng/µl template DNA. PCR was performed in a Hybaid PCR express thermal cycler (HBP x 220) with following cycling profile: an initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 38 cycles of 1 min at 93 °C, 1min at 45 °C and 1 min at 72°C with a final extension at 72 °C for 5 mn. PCR products were mixed with loading buffer and separated on 1.6% (w/v) agarose gel containing 0.4 µg/ml ethidium bromide, in 1X TBE at 100 V for 90 min. The DNA fragments were then visualized under UV light.

## **AFLP**

The DNA concentration was adjusted to 100 ng/μl, and digested in 40 μl and incubated for 2 h at 37 °C. Digestion was done with 5 U of *EcoR* I (Biolabs) and 5 U of *Mse* I (Biofinex) in T4-buffer. For the ligation reaction, the following mixture was added to the restriction-reaction mixture; *EcoR* I adapter (40 p mol/μl), *Mse* I adapter (40 p mol/μl), 1 U T4 DNA ligase, 1 x T4 DNA ligase buffer and incubated for 3 h at 37 °C.

Pre-amplification was carried out in volumes of 20 μl. Reactions contained 1 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 10 p mol/μl *EcoR* I-primer adapter, 1 U Taq polymerase (Qiagen AG, Basel) and 100 ng/μl template DNA. Pre-amplification with primers having a single selective nucleotide, were performed in a Biometra I thermocycler with the cycling following profile: 2 min DNA denaturation step at 94 °C, followed by 28 cycles of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 56 °C and 1 min at 72 °C. A final elongation step was done at 72 °C for 10 min. The reaction mixtures were diluted 10-fold for selective PCR.

Amplification with primers that have three selective nucleotides were conducted in 20 μl volume. Reactions contained 1 x PCR buffer, 0.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 0.25 μM primer *EcoRI*, 0.30 μM *Mse* I, 1 U Taq polymerase. PCR was performed for 36 cycles with the following cycle profile: a 30 sec DNA denaturation step at 94 °C, a 30 sec annealing step and a 1 min extension step at 72 °C. The annealing temperature in the first cycle was 65 °C, and was subsequently reduced by 0.7 °C each cycle for the next 13 cycles, and kept at 56 °C for the remaining 23 cycles. 1 μl of PCR product was mixed with a 12 μl volume of deionised formamide and 0.5 μl Gene Scan 500 (ROX) size standard marker. The resulting mixture was heated for 2 min at 95 °C and then quickly cooled on ice. Each sample was loaded and run on the ABI-310 automated DNA sequencer (capillary electrophoresis). GeneScan and Genotyper software (PE Applied Biosystems) were used to score the AFLP profiles.

## **ISSR**

Amplification reactions were carried out in volumes of 25 μl. Reaction contained 1 x PCR buffer, 1.4mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.4 μM of primer. 1U/μl Taq polymerase (Eurobiotaq) and 30 ng/μl template DNA. PCR reactions were performed with the following conditions: 4 min at 94°C for initial denaturation, 35 cycles of 35 sec at 93 °C (denaturation), 45 sec at optimal temperature ranging from 52 °C to 55 °C (annealing) (Table 6) and 90 sec at 72 °C (extension). A final extension step at 72 °C for 5 min followed. PCR products were mixed with 1/5 vol of loading buffer and separated on denaturing polyacrylamide gels multiphor II

(Pharmacia Biotech) flatbed electrophoresis system using "clean-gel" gels revealed with DNA silver staining kit (Pharmacia Biotech).

### **Microsatellites**

The amplification reaction in a total volume of 25 µl contained 1 X PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.4mM of each primer, 0.75 U/µl Taq polymerase (Eurobiotaq) and 50 ng/µl template DNA. Amplification were performed in a Hybaid PCR express thermal cycler (HBPX 220). Cycling conditions were: first a denaturation procedure at 93 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation (1min at 93 °C), annealing (1 min at the optimal temperature ranging from 47°C to 54 °C) and extension (90 sec at 72 °C); a final elongation step was done at 72 °C for 10 min. PCR products were mixed with loading buffer and separated on a mutiphor II (Pharmacia Biotech) flatbed electrophoresis system using "clean gel-10%" gels revealed with DNA silver staining kit (Pharmacia Biotech).

#### **6.3.5 Data scoring and analysis**

For each individual and for each primer that yielded a clear pattern, polymorphic DNA fragments for the four types of markers were scored as present (1) or absent (0). For the four data sets, dendrograms were constructed by UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) cluster analysis according to Jaccard's coefficient (Sneath and Sokal, 1973) using the cluster (<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto>) analysis software, and then visualized with TREEVIEW program.

In order to test the discrimination of the species by each genetic marker, Jaccard's (Sneath and Sokal, 1973) coefficient of similarity was calculated, and after conversion of the similarity matrices into distance matrices, to perform Principal Coordinates Analysis (PCoA). Similarity indices of Jaccard do not attribute any genetic meaning to the coincidence of band absence. The similarity was performed by modules SIMIL and PCOORD of the R4 (Beta version) package (Philippe Casgrain & Pierre Legendre, Dép. Des sciences biologiques, Université de Montréal) and is calculated as follows:

$$\text{Jaccard} = \text{Nab} / (\text{Nab} + \text{Na} + \text{Nb})$$

Where Nab is the number of polymorphic bands that are shared by samples a and b, Na represents the number of bands present in a and absent in b and Nb represents the number of bands present in b and absent in a.

The correlation between RAPD, AFLP, ISSR and SSR techniques of genetic distance matrices was investigated by the Mantel test of matrix correspondence (Mantel, 1967), based

on Jaccard's similarity coefficient. Similarity matrices produced by RAPD, AFLP, ISSR, SSR and combined data techniques were compared pairwise.

Mantel's tests were performed with the R4 (Beta version) package (Philippe Casgrain & Pierre Legendre, Dép. Des sciences biologiques, Université de Montréal) and statistical significance was determined by random permutation (999 permutations).

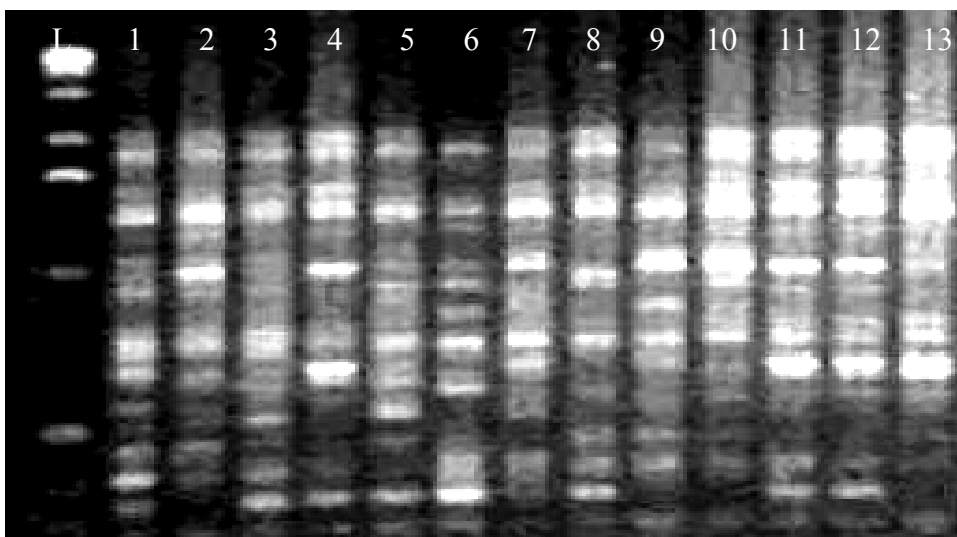
## 6.4 Results

### Molecular markers

All the molecular techniques used in this study were able to uniquely fingerprint each of the 52 cultivated chestnut accessions.

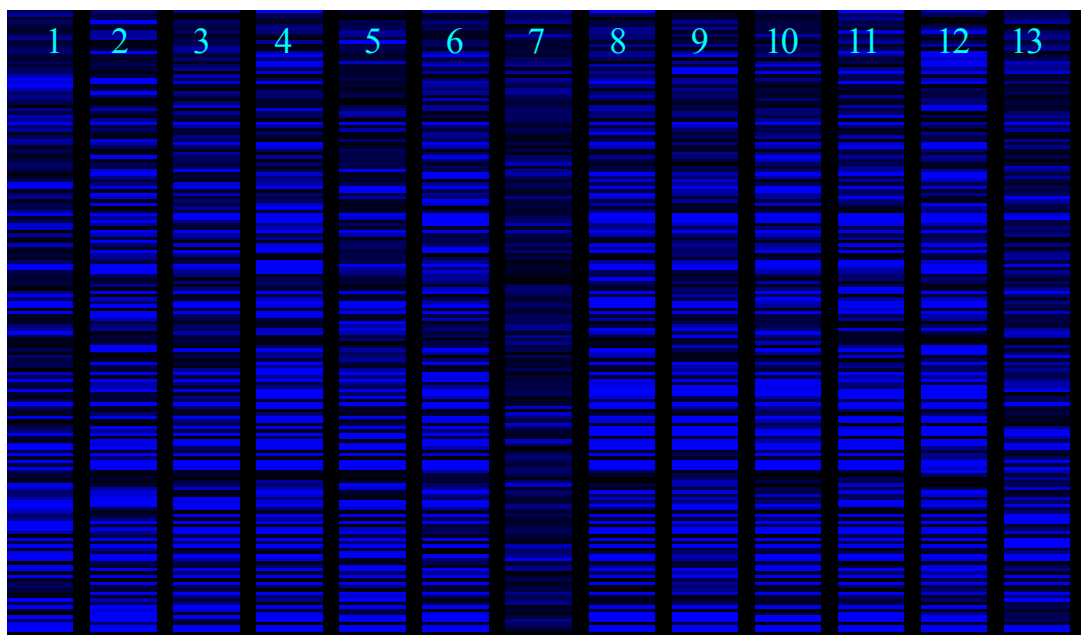
The 12 RAPD primers used on the whole set of plants produced a total of 98 polymorphic bands. For all the genotypes, the highest number of polymorphic and scorable bands was obtained by primer OPE-01 (10 fragments). An average of 8.0 bands per primer ranging from about 1000 bp to 5 000 bp were produced (Figure 7).

Scoring of AFLP bands was difficult but polymorphism among cultivars was readily scored. The four primer combinations (E-AGG/M-CTT, E-AAC/M-CTT, E-AGT/M-CAT (Figure 8) and E-AAC/M-CAT) yielded 222 polymorphic fragments with an average of 55 polymorphic bands per reaction, which ranged from 50 to 350 bp.



L: 1000 bp DNA Ladder (Gibco ®, Life Technologies); 1– 13: *Castanea sativa* (Swiss): Verdanesa

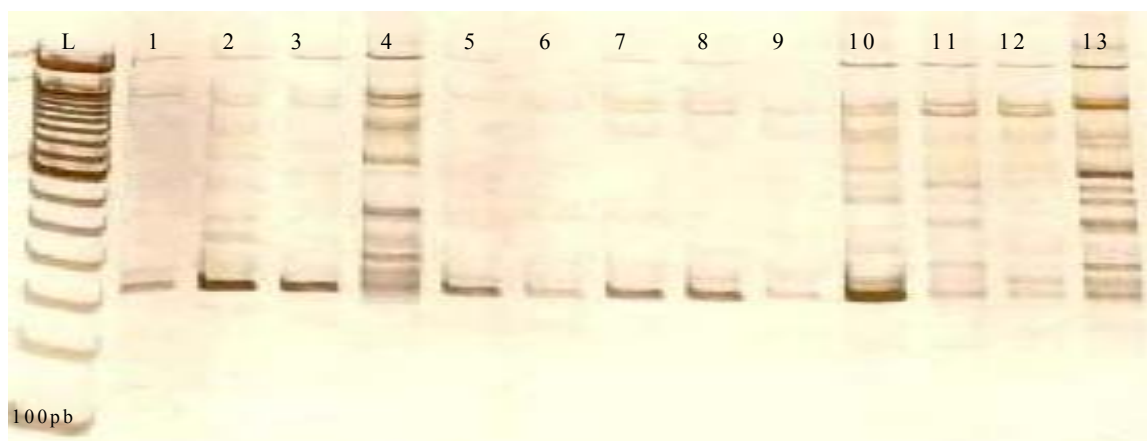
Figure 7. Example of Genetic polymorphism among Verdanesa as revealed by RAPD primer OPD 20.



*Castanea sativa* (Swiss): 1 - 13: Verdanesa

Figure 8. Example of genetic polymorphism among Verdanesa cultivars as revealed by AFLP primer E-AGT/M-CAT in the genotyper software.

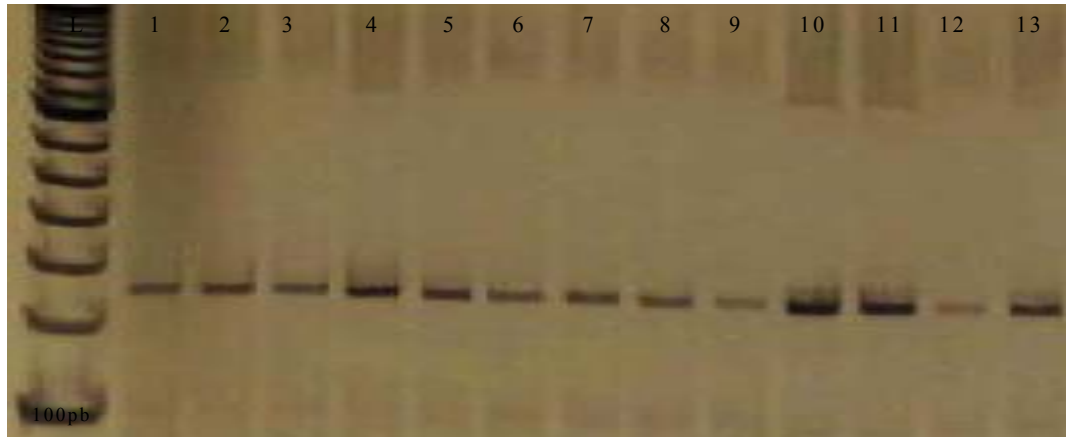
Five primers amplified bands, which are visible in polyacrylamide gels (Figure 9). The 5 ISSR primers detected a total of 35 polymorphic fragments with an average of 7 polymorphic bands per reaction.



L: Ladder 100 bp DNA (Gibco BRL®, Life Technologies); 1 – 13: *Castanea sativa* (Swiss): Verdanesa

Figure 9. Example of Genetic polymorphism among Verdanesa cultivars as revealed by ISSR primer UBC 834.

Thirty polymorphic fragments were amplified using the five *oak* microsatellites (SSR) primers pairs. Figure 10 shows an example of genetic polymorphism among Verdanesa cultivars as revealed by SSR primer Qr Zag 121.



L: Ladder 100 bp DNA (Gibco BRL®, Life Technologies); 1 – 13: *Castanea sativa* (Swiss): Verdanesa

Figure 10. Example of Genetic polymorphism among Verdanesa cultivars as revealed by SSR primer QrZag 121.

### **Intercultivar polymorphism**

In all dendrograms generated by the four methods, the species of *C. sativa* was clustered into two groups: the first cluster is composed of Swiss cultivars and the second is composed of coppice shoots Figures (11-15).

RAPDs and combined data ordered Pinca and Berögna, as expected, according to the supposed affiliation to a variety. Also, ISSRs cluster Pinca in a clear distinct group.

Discrepancies in forming clear groups within Lüina, Verdanesa and Boné negro varieties were observed in dendrograms produced by all the kind of markers.

Furthermore, RAPD, AFLP and combined data clustered clearly Lüina, Verdanesa and Boné negro, though with exceptions, into separate groups. ISSR and SSR did not separate accessions of cultivars clearly. It seems interesting to mention that several small groups of accessions have been formed that made identification very difficult. This was the case for the three cultivars: Verdanesa, Lüina and Boné negro.

Principal Coordinates Analyses using the four molecular markers data separates clearly *C. sativa* cultivars (Fig 16-20) into two groups: coppice shoots and Swiss cultivars; while the combined data separates Swiss *C. sativa* in four separate groups: 1 group of coppice shoots and 3 groups of Swiss cultivars.

The four molecular markers did not discriminate clearly Swiss cultivars, while combined data show a clear discrimination of cultivars that appear to be more clearly clustered in a separated groups in the plot.

### **Intracultivar polymorphism**

The phenetic classification obtained using UPGMA as a clustering method using the four data sets provided informations as to intra Swiss cultivars variability (Table 9).

RAPDs, AFLPs and combined data provided fairly a clear separation of cultivars with some extreme value of other cultivars, which were positioned within varieties. Boné negro 07 and Verdanesa 12 were closely related to Lüina, Lüina 05 was closely related to Verdanesa and Lüina 09 was related to Boné negro as shown by RAPD. For AFLP, Lüina 08, Boné negro 08 were clustered with Verdanesa and Boné negro 07 was related to Lüina cultivars.

RAPD and combined data methods could separated two cultivars (Pinca and Berögnä) in a clear distinct group showing some similarity in clustering cultivars. Also, ISSR cluster accessions of Pinca in one distinct group.

Considering the Verdanesa related accessions, the topology of each tree revealed with RAPD, AFLP and combined data sets is unique with some similarity. There was not very good discrimination of Verdanesa cultivars by ISSR and SSR.

On the Lüina cultivars, the group was mainly constituted by Lüina 01, 02, 03, 04, 07, 10, 11, 12, 13, 14 accessions and was consistently reported by RAPD, AFLP and combined data, with some exceptions. A not clear discrimination among accessions showed by ISSR and SSR dendrograms.

Four accessions of Boné negro cultivars (Boné negro 01, 02, 05 and 06) were clustered together by RAPD, AFLP and combined data and formed a clear group. Dendrograms generated by ISSR and SSR could not clearly distinguish accessions of Boné negro.

The PCoA analysis performed with RAPDs grouped closely 2 individuals of Verdanesa positioned far from the group while *C. sativa* coppice shoots were loosely grouped, furthermore, the same method discriminates clearly accessions of Swiss cultivars in one close group except for 2 individuals of Verdanesa that are positioned in the center of the plot.

The PCoA scatter plot generated by AFLPs data clustered *C. sativa* cultivars in one clear group with 2 extreme values: 1 individual of Verdanesa and 1 individual of Boné negro and grouped closely *C. sativa* coppice shoots in one distinct group.

The PCoA with ISSR and SSR data clearly separate the *C. sativa* cultivars from the *C. sativa* coppice shoots, which were grouped in one loosely group.

The PCoA with the combined data performs a clear discrimination of the *C. sativa* cultivars from the *C. sativa* coppice shoots, which were grouped closely in one distinct group.

### Comparison between marker systems

Mantel test indicated a high correlation between matrices based on AFLPs and RAPDs ( $r = 0.78$ ) confirmed the similarity of clustering cultivars by these types of markers. Also, a high Mantel's test correlation was found between RAPDs and ISSRs data ( $r = 0.75$ ). Correlation coefficients based on SSRs matrix and the three others matrices were low ( $r = 0.32$ ,  $r = 0.39$ , and  $r = 0.41$  with AFLPs, ISSRs and RAPDs, respectively) (Table 8).

**Table 8.** (Mantel's  $r$ ) Correlation coefficients of a distance matrix created by RAPDs, AFLPs, ISSRs and microsatellites markers. Correlations were highly significant (\*\*:  $P < 0.01$ ).

<b>SSR</b>				
<b>AFLP</b>	0.32			
<b>ISSR</b>	0.39	0.50**		
<b>RAPD</b>	0.41	0.78**	0.75**	
<b>Combined data</b>	0.23	0.48*	0.26	0.36
	<b>SSR</b>	<b>AFLP</b>	<b>ISSR</b>	<b>RAPD</b>

**Table 9.** Inter and intraspecific polymorphism as detected by the 4 molecular markers used in this study.

Polymorphism	Comparison	Molecular marker				
		RAPD	AFLP	ISSR	SSR	Combined data
Intercultivar level	<b>Swiss <i>C. sativa</i> Clustering</b>	Swiss <i>C. sativa</i> divided in two groups: coppice shoots and swiss cultivars	Swiss <i>C. sativa</i> divided in two groups: coppice shoots and swiss cultivars	Swiss <i>C. sativa</i> divided in two groups: coppice shoots and swiss cultivars	Swiss <i>C. sativa</i> divided in two groups: coppice shoots and swiss cultivars	Swiss <i>C. sativa</i> divided in four groups: 1 group of coppice shoots and 3 groups of swiss cultivars
	<b>Swiss <i>C. sativa</i> discrimination</b>	Poor, coppice shoots could be discriminated	Poor, coppice shoots could be discriminated	Poor, coppice shoots could be discriminated	Poor, coppice shoots could be discriminated	Good, coppice shoots and swiss cultivars could be discriminated
Intracultivar level	<b>Swiss <i>C. sativa</i> cultivars</b>	close grouped with 2 extreme values of Verdanesa	close grouped with 2 extreme values of (1 Verdanesa, 1 Bonè negro)	loose for all cultivars	loose for all cultivars	Good discrimination for Verdanesa, Pinca, Berögna and Bonè negro
	<b>Berögna</b>	closely grouped	dispersed	dispersed	dispersed	grouped
	<b>Bonè negro</b>	closely grouped	Grouped with 1 extreme value	dispersed	dispersed	Closely grouped with 1 extreme value
	<b>Lüna</b>	closely grouped	Grouped with 1 extreme value	dispersed	dispersed	close grouped
	<b>Pinca</b>	closely grouped	Close grouped	dispersed	dispersed	Grouped in two clusters
	<b>Verdanesa</b>	closely grouped with 2 extreme values	dispersed	dispersed	dispersed	Closely grouped
	<b><i>C. sativa</i> coppice shoots</b>	loosely grouped	Closely grouped	loosely grouped	loosely grouped	Closely grouped

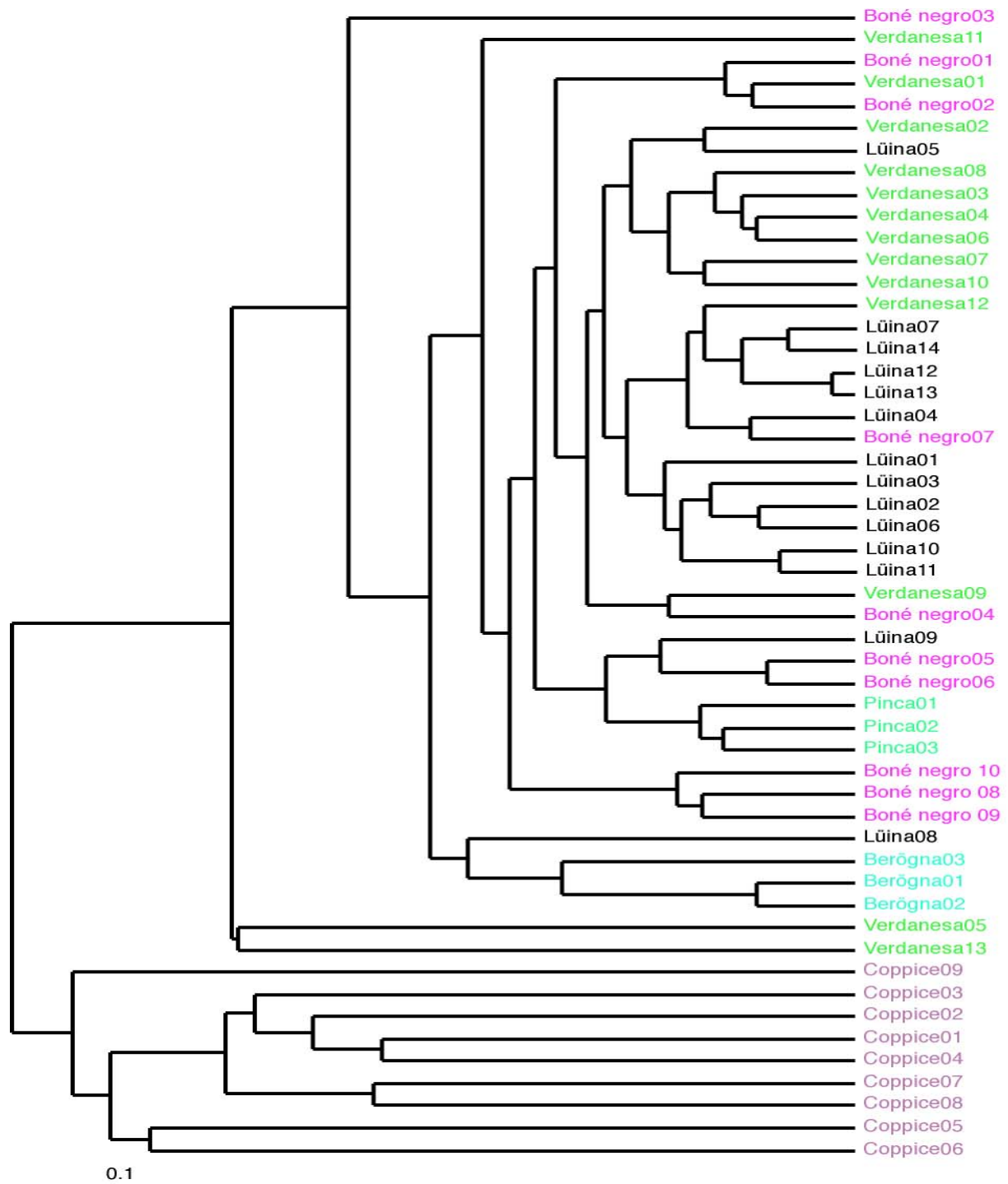


Figure 11. UPGMA dendrogram obtained using RAPD analysis (based on Jaccard's similarity coefficient).

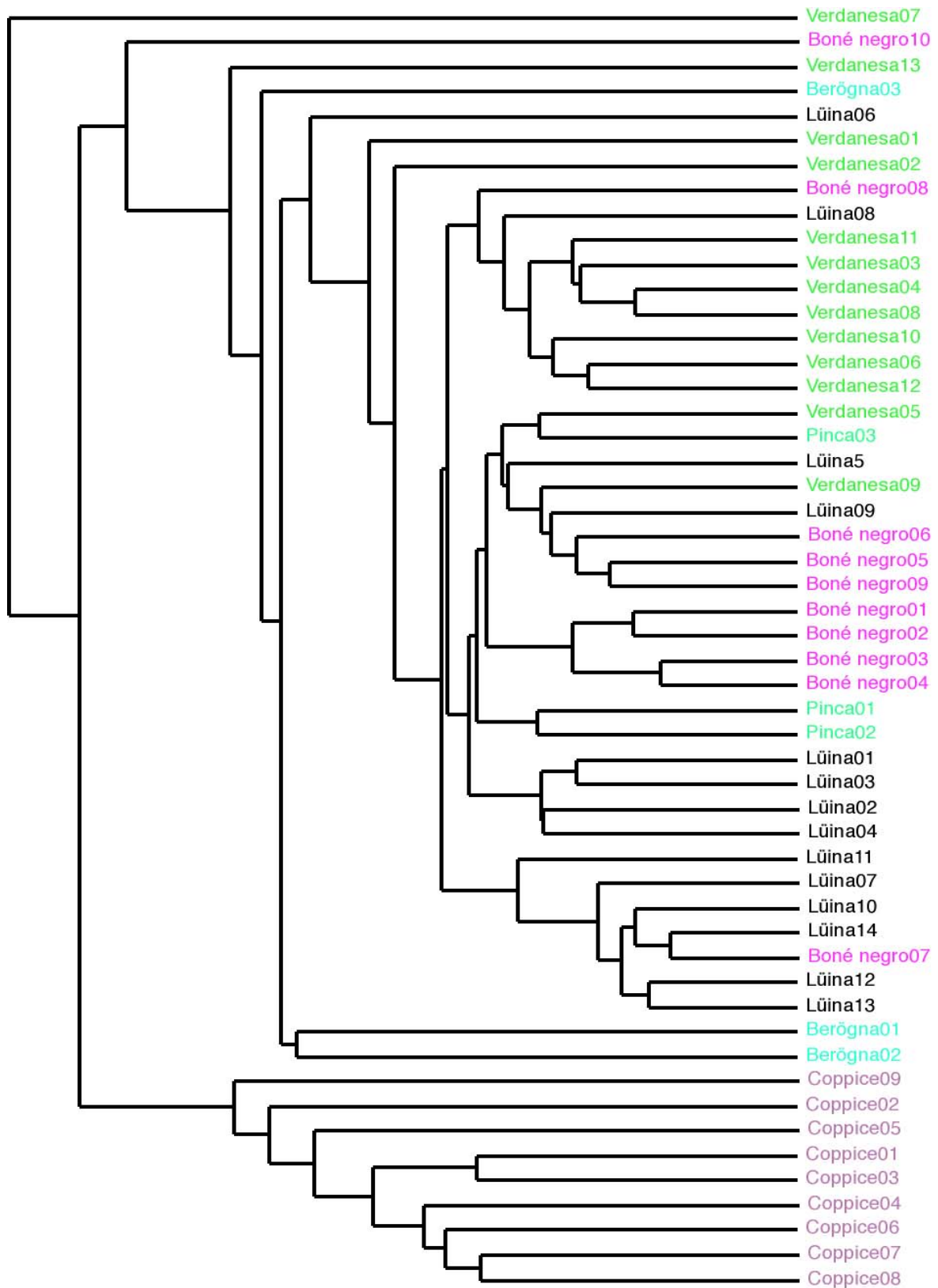


Figure 12. UPGMA dendrogram obtained using AFLP analysis (based on Jaccard's similarity coefficient).

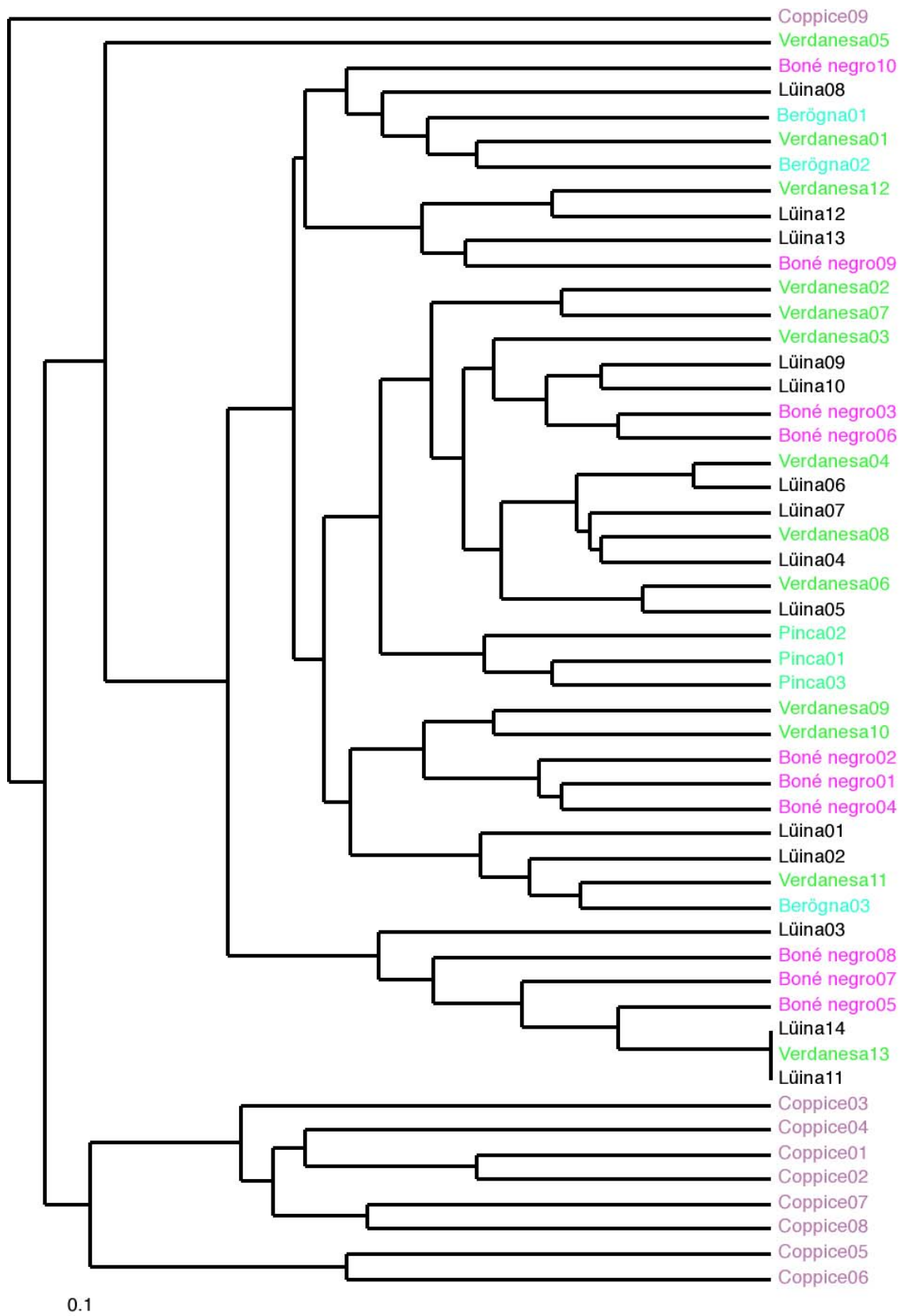


Figure 13. UPGMA dendrogram obtained using ISSR analysis (based on Jaccard's similarity coefficient).

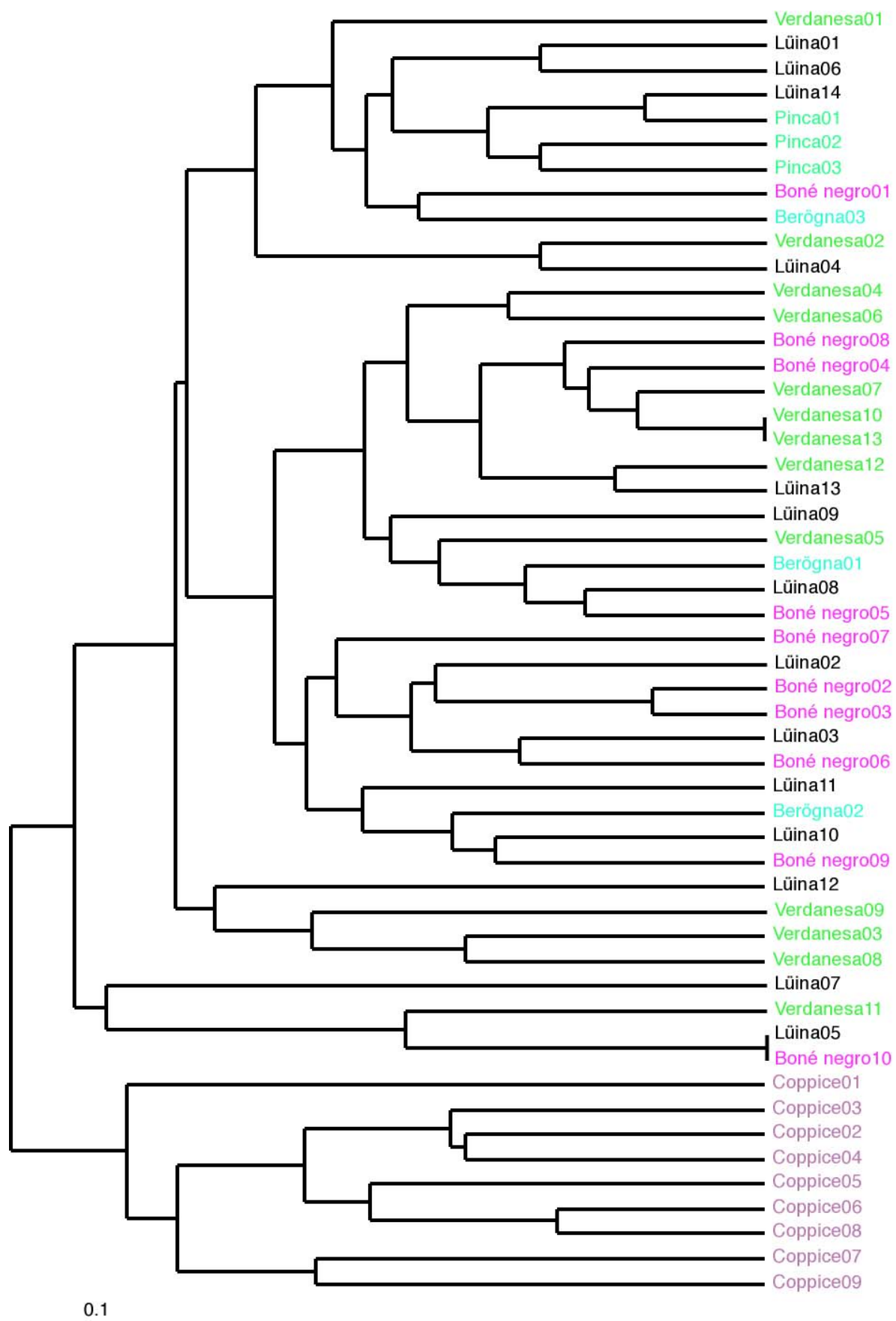


Figure 14. UPGMA dendrogram obtained using SSR analysis (based on Jaccard's similarity coefficient).

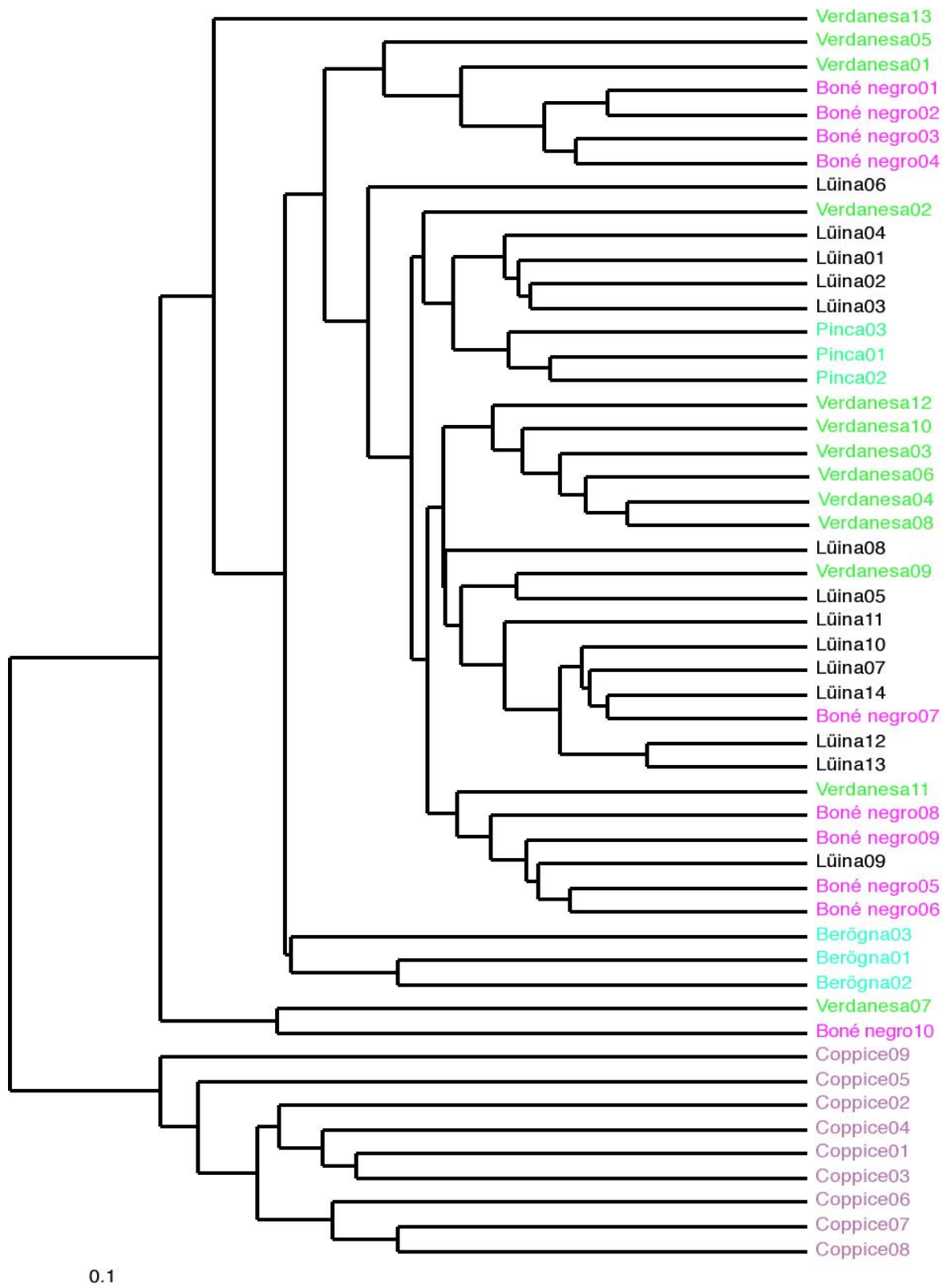


Figure 15. UPGMA dendrogram obtained using combined data analysis (based on Jaccard's similarity coefficient).

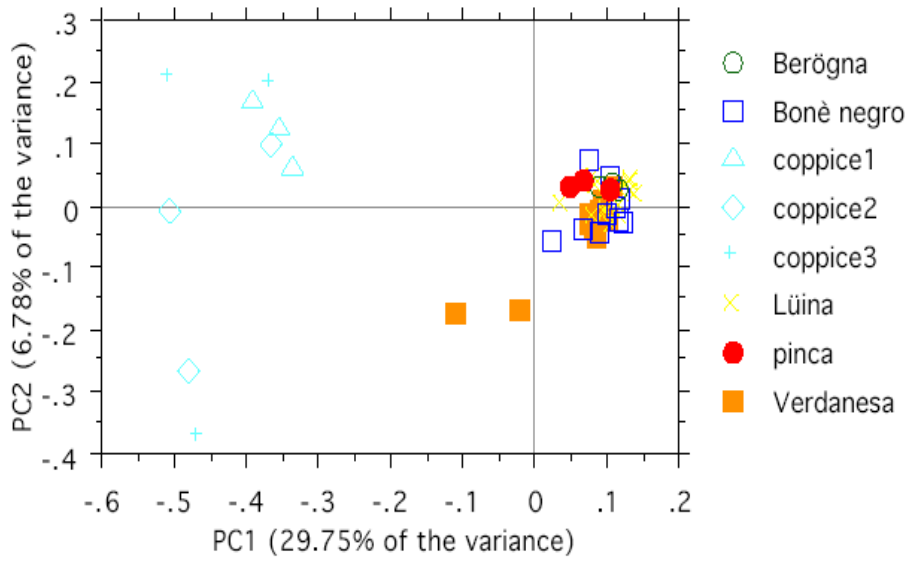


Figure 16. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on RAPD data based on Jaccard's similarity coefficient.

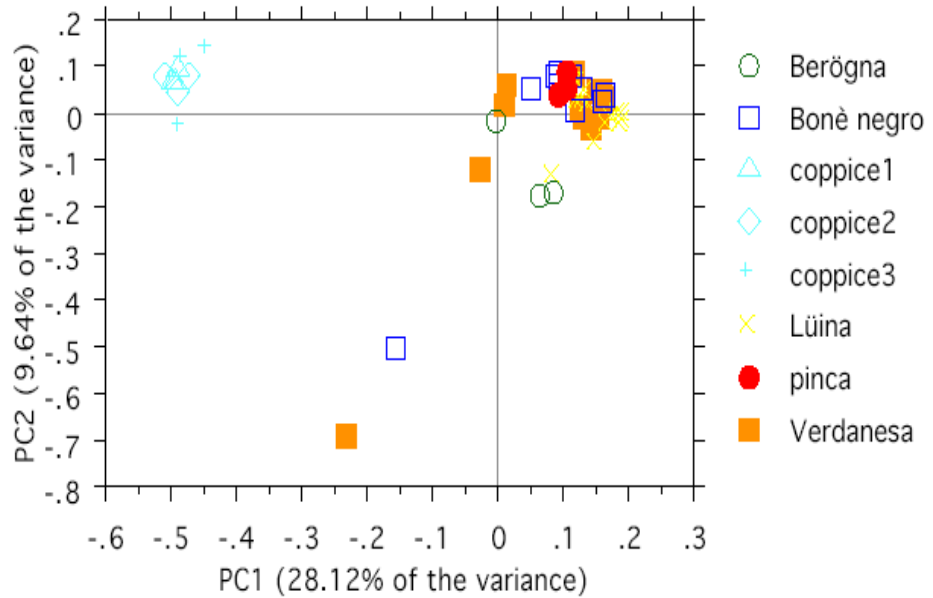


Figure 17. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on AFLP data based on Jaccard's similarity coefficient.

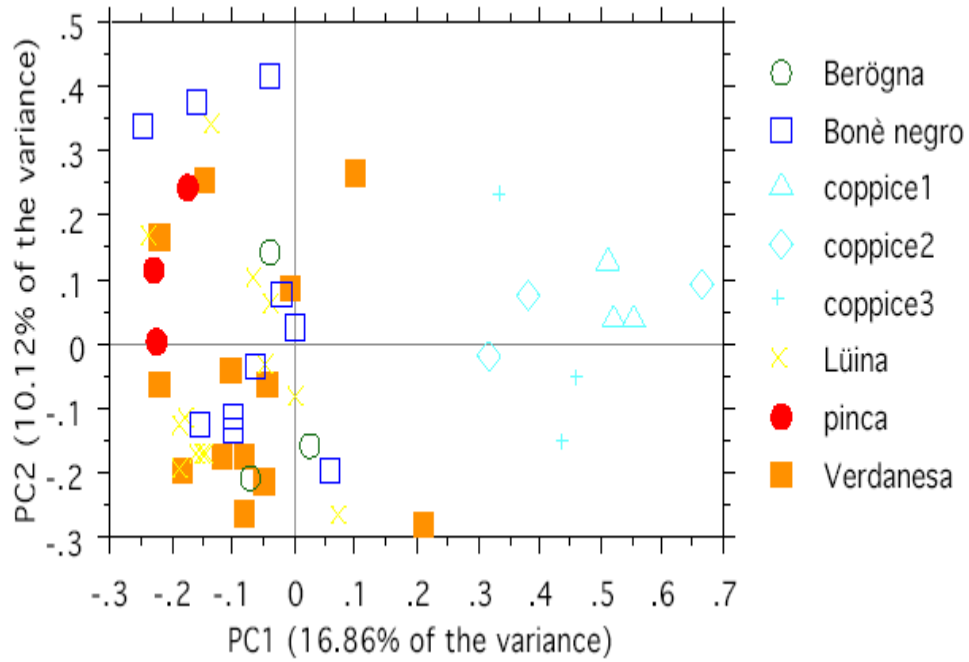


Figure 18. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on ISSR data based on Jaccard's similarity coefficient.

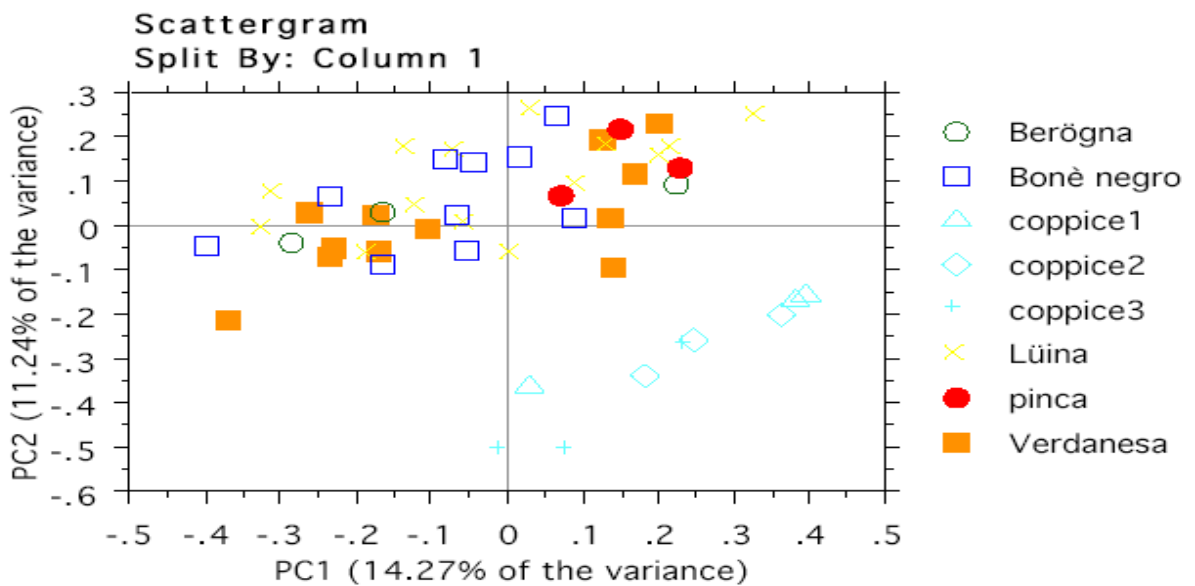


Figure 19. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on SSR data based on Jaccard's similarity coefficient.

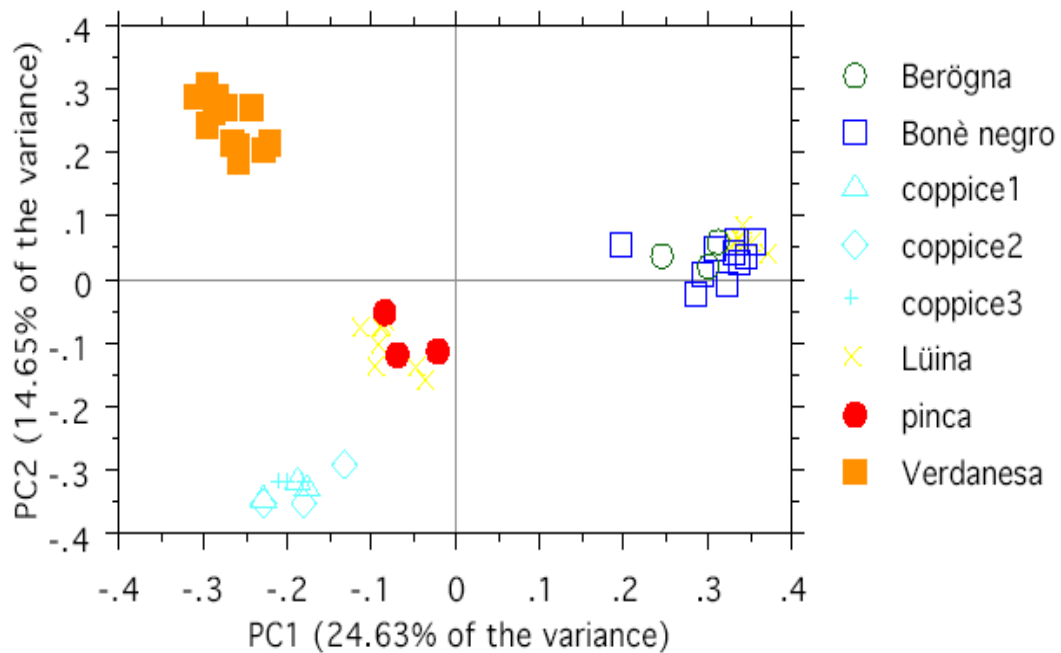


Figure 20. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on combined data based on Jaccard's similarity coefficient.

## 6.5 Discussion

The four methods used in this experiment identified genetic variation in Swiss *C. sativa* cultivars with different grades of success. For the four methods used in this study, 98, 222, 35 and 30 polymorphic bands for (RAPD, AFLP, ISSR and SSR respectively), being efficient in the characterization of chestnut cultivars. Our results divide all genotypes into two different groups: Swiss cultivars and coppice shoots. Swiss cultivars are used for nut production, whereas coppice shoots are basically used for wood production. The different uses for special ends relating to such group explain in a way the division formerly showed by dendrograms. The grouping of Swiss cultivars and coppice shoots into two different cluster by all the dendrograms and PCoA analysis plots may suggest that grafting methods, generally practised by farmers, for chestnut propagation, could have transformed natural forests into clonal or polyclonal fruit orchard (Fineschi, 1988).

The four methods mentioned above show that Swiss cultivars are genetically closely related, our results agreed with the results based on morphological traits (Conedera et al. 1993), this may be explained by the fact that southern Switzerland is a rich assortment of polyclonal varieties, which are the results of a clonal selection process, generally done by farmers in terms of their needs or in terms of their aspiration to superior quality of chestnut fruit

(Conedera, 1998). The agro-ecological adaptation area of cultivars (not wide geographical distribution), a possible exchange of plant material and seed among the different regions of southern Switzerland and the old cultural traditions may explain the homogeneity among cultivars.

The results obtained with the four methods indicate that Verdanesa, Lüina, pinca, Berögna and verdanesa are genetically related. This result could be explained by the common origin of European chestnut trees. As reported by some previous studies (Fineshi et al. 2000), shown that European chestnuts were coming from the East and were widely diffused in Europe by human activities. Other data related to Italian (Pigliucci et al. 1990; Villani et al. 1991; Mancuso et al. 1999), Portuguese (Seabra et al. 2001) and on Spanish chestnut (Pereira-Lorenzo et al. 1996; Pereira-Lorenzo and Fernandez-Lopez, 1997) (studies based on isozyme traits) showed a close relationship among varieties as well.

High genetic similarities between and within Swiss cultivars were shown by the four used markers analysis. Similar results are found by (Müller-starcket al. 1993) and show that Swiss varieties appear morphologically more uniform. The same authors confirm this genetic uniformity among cultivars by isozymes traits. The same findings were confirmed by Conedera et al. (1993), who showed that those varieties are morphologically homogenous and have a similar architecture of the crown. Also, the asexual propagation through grafting and crossing between trees affects the closeness of the genetic relationships among cultivars.

As for the intracultivar polymorphism, dendrograms obtained from RAPD, ISSR and combined data cluster accessions of Pinca in separate group and Berögna in distinct group by RAPD and combined data (Figures 11 and 15). This clustering may be explained by the low number of accessions per variety (3 individuals), moreover, those varieties are regionally distributed: individuals from the former have the same centre of origin (Lodrino), so as individuals from the later have been sampled from the same area of origin (Vezio).

The 12 primers of RAPD and the 4 primer combinations of AFLP employed allowed the distinction of several accessions as cultivars for all the studied varieties. RAPD and AFLP sufficiently characterized the genetic diversity among chestnut accessions, although, some differences were observed between dendrograms generated from each data set.

The complementarity between the two methods in the identification of cultivars was confirmed by a high correlation between the two types of markers ( $r = 0.78$ ). RAPD and AFLP markers also allowed us to solve problems generated by synonyms and homonyms in

different accessions. Those methods allowed us to prove that some accessions with different names, which could have been considered as different cultivars, were actually closely related, showing a very similar or identical genotype, such as for example, in the case of Boné négro 07 that was suspected to be similar to Lüina cultivars. This result was confirmed by the dendrogram revealed by combined data. ISSR and SSR were not very reliable for the characterization of chestnut cultivars. These results may be explained by the fact that AFLP and RAPD yielded a large number of polymorphic bands (222 and 98 respectively), while a low number of markers were produced by ISSR and SSR (35 and 30 respectively). Moreover, the use of additional primers of those two kinds of markers may contribute to better distinction among accessions (Cervera et al. 1998).

Our results suggest that RAPDs are more informative and more reliable than AFLP markers in clustering accessions belonging to the same cultivars. Also, RAPD technique has some advantages compared with the other techniques used, such as their ease of use and their cost in time and money. It is interesting to note that errors can occur while scoring AFLP bands because of the high number of bands in a single line, and the large number of fragments differing only by 1 bp make this method less reproducible (Sudupak et al. 2002).

The high correlation between RAPD and AFLP data has already been reported in several genetic diversity studies (Powell et al. 1996; Renganayaki et al. 2001). Both are dominant markers but AFLP can generate a larger number of polymorphic bands per primer combination (222 vs 98) in our study.

Values of the Mantel test correlation showed a lower coefficient using SSRs marker method with other molecular data. This indicates discordance among SSR markers and the other methods (Milbourne et al. 1997; Van den Berg et al. 2002). The discordance may be explained by the low number of markers revealed by SSRs in comparison with the other markers (30 characters vs 98 for RAPDs, 35 for ISSRs and 222 for AFLPs). It may be explained as well by the suitability of SSRs to study inbreeding effects in small and isolated populations (Huang et al. 2000) and by studies of accessions that are derived from outcrossing heterozygous individuals (Russel et al. 1997).

## **6.6 Conclusion**

It may be concluded from this study that RAPD and AFLP markers provide consistent information for cultivars identification and are valuable tools for studying the genetic relationships between Swiss chestnut cultivars. On the other hand ISSR and SSR failed to characterise chestnut cultivars.

However, this surprising result can be explained by the higher number of markers produced by AFLPs and RAPDs compared to the two other kinds of markers.

## **Chapter II**

Molecular techniques as tools for studying genetic variation and relationship in chestnut species (*Castanea sativa*, *Castanea mollissima* and *Castanea crenata*).

## Abstract

Seventy-three accessions, belonging to 3 species (*Castanea sativa*, *Castanea mollissima* and *Castanea crenata*), were studied using four molecular markers (RAPD, AFLP, ISSR and SSR). This is in order to detect genetic variability among and within *Castanea* species and to compare the effectiveness of these methods in estimating genetic variation among chestnut cultivars. 106 RAPD, 228 AFLP, 42 ISSR and 36 SSR polymorphic markers were amplified using 12, 5, 4 and 5 primer combinations respectively.

The phenetic classification obtained with all data analysis using UPGMA as a clustering method discriminated not clearly the three chestnut species according to their taxonomic sections. French and Italian *C. sativa* cultivars were not grouped into two clear clusters neither according to their geographic origin nor according to their affiliation to “marroni” or chestnut cultivars. RAPD was the best method because of its capability to cluster moderately species and cultivars. Swiss *C. sativa* cultivars were fairly compared by all data analysis.

The correlation coefficients of a distance matrix created using RAPD, AFLP, ISSR, SSR and combined data analysis were significant. Correlation coefficients comparing RAPD marker data and the other markers showed a higher correlation ( $r = 0.69$ ,  $r = 0.77$  and  $r = 0.47$  with AFLP, ISSR and SSR, respectively), Whereas Mantel test correlation comparing SSRs with those obtained with the three different sets of data showed a lower coefficient ( $r = 0.38$ ,  $r = 0.47$  and  $r = 0.44$  with AFLP, RAPD and ISSR).

## 7. 1 Introduction

(Dode, 1906) divided the genus *Castanea* in three sections. The section *Eucastanon*, regroups the so called true chestnuts, i.e. the species with three nuts per bur, including all the four economically relevant species: *Castanea mollissima* Blume. (Chinese chestnut), *Castanea crenata* Sieb. and Zucc. (Japanese chestnut), *Castanea sativa* Mill. (European chestnut), and *Castanea dentata* Borkh. (American chestnut). Huang et al. (1994 b) hypothesize on the basis of a study on the allozyme genetic variation, that the *Castanea mollissima* of the Changjiang river region in South-central China may be considered the pro-genitor of all other *Castanea* species. According to this hypothesis, these progenitors gave rise to the American chestnut by eastward migration and to the European by westward extension. Historically, all economic relevant chestnut species were cultivated by man and rely on very different and totally separated chestnut cultures.

During the past century, American and European chestnuts have been affected by fungal diseases (*Phytophthora cinnamomi* and *Cryphonectria parasitica*) causing the ink and blight disease respectively (Crandall et al. 1945; Anagnostakis, 1987). To bypass economic and botanical consequences of the diseases, several breeding programs were conducted. The aim of these programs is to introduce resistance characteristics from the Asiatic into the American and European chestnut by the creation of “interspecific hybrid” as rootstocks or as forest trees (Gomes-Pereira et al. 1993; Salesses et al. 1993 and Xing et al. 1997). Henceforth, the knowledge of genetic background among species and the possibility of discriminating Asiatic components become very important in the frame of breeding projects.

In Europe, during the Middle Age and in many mountainous regions of Europe, *C. sativa* assumed a role of staple food. This resulted in an extreme differentiation of the product and of the cultivated varieties. Cultivars of chestnut fruits were already known and described at the end of the pre-Christian era by Pliny the Elder (Pitte, 1986). Later, in particular regions of the Italian Peninsula and of France a particular good-quality group of varieties called Marroni were selected and cultivated for commercial purposes. This, together with the fragmentary nature of the chestnut distribution in the European continent, gave rise to a very complex and highly articulated structure of chestnut culture, marked by the existence of a considerable number of different chestnut cultivars (Pitte, 1986; Conedera, 1996). Various authors described different varieties in Europe : more than 300 different varieties in Italy (i.e. Pitte, 1986; Piccioli, 1922), more than 250 in France (Camus, 1929), more than 200 in Spain (Perreira-Lorenzo et al. 2001) and more than 100 in southern Switzerland (Conedera, 1994).

Because of the great number of existing varieties, a powerful determination method is necessary for both the development and the conservation of management strategies for the genetic resources and the protection of the commercial varieties quality label (i.e. marroni vs. chestnut varieties).

Former attempts have been done to study the genetic variation in chestnut varieties and species. They were based on morphological traits such as fruit and cupula characteristics (i.e. Lavialle, 1906; Vigiani, 1919). Later single morphological traits were studied in details, such as annual shoots (Valle, 1959), flower phenology and morphology (Breviglieri, 1951; Bergamini, 1975; Rudow and Conedera, 2001), foliar morphology (Luraschi et al. 1994). Other researchers tried to use combined morphological traits (Ricci, 1916; Fenaroli, 1945).

Starting in the late 1980s, the use of molecular markers become a tool not only for the characterization and the identification of cultivated varieties but also for the studying on a large scale of genetic diversity of chestnut population, for example (Pigliucci et al. 1990; Villani et al. 1991; Villani et al. 1999; Fineschi et al. 2000; Aravanopoulos et al. 2001; Seabra et al. 2001; Pereira-Lorenzo et al. 2001). For this purpose, two main types of markers were used: isozyme (i.e. Sawano et al. 1984; Müller-Starck et al. 1993; Giannini et al. 1993; Fineschi et al. 1994; Pereira-Lorenzo et al. 1996) and random amplified polymorphic DNA (RAPDs, i.e. Fineschi et al. 1993; Galderisi et al. 1998; Huang et al. 1998 a).

Some more recent studies extended the methods to other markers such as Microsatellites or simple sequence repeats (SSR) (Botta et al. 1999; 2001), inter simple sequence repeats (ISSR) (Goulão et al. 2001) and amplified fragment length polymorph (AFLP) (Yamamoto et al. 1998). Molecular tools have been used to assess the genetic variation also for other genus of the Fagaceae family such as *Fagus* (Gallois et al. 1998; Tanaka et al. 1999) and *Quercus* (Matyas et al. 2001; Coart et al. 2002) and for species belonging to other fruit trees such as peach and sweet cherry (Dirlewanger et al. 2002), Valencia orange (Cheng et al. 2003), apple (Mulcahy et al. 1993), banana (Pillay et al. 2001), grapevine (Franks et al. 2002) and gooseberry (Lanham and Brennan, 1999).

As stated by Goulão et al. (2001) comparison between different molecular techniques is important because they are informative at different taxonomic levels and their suitability may therefore change according to the question being addressed. Several studies exist comparing

the suitability of different genetic analysis methods (Powell et al. 1996; Russell et al. 1997; Pejic et al. 1998; Guadagnuolo et al. 2001; Uptmoor et al. 2003).

The efficiency of genetic markers such as RAPD, AFLP, ISSR, SSR and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) have been compared and discussed in different studies concerning population genetic variability (Gaiotto et al. 1997; Chan and Sun, 1997; Wolfe et al. 1998; Garcia-Mas et al. 2000), phylogeny (Hess et al. 2000; Kiyoto et al. 2001; Sun et al. 2002), linkage maps construction (Kojima et al. 1998; Arcade et al. 2000; Casasoli et al. 2001), genetic relationships among and within closely related taxa (Esselman et al. 1999; Van de Wouw et al. 2001; Kölliker et al. 2001), assessment of the genetic variation generated by *in vitro* techniques (Hashmi et al. 1997; Shoyama et al. 1997) and many other aspects of plant breeding programs (Ni et al. 2001).

The purpose of the present study is (i) to detect the genetic variability among and within *Castanea* species (ii) to compare the utility of different molecular (RAPD, AFLP, ISSR and SSR) markers for genetic diversity analysis.

## **7. 2 Materials and methods**

### **7. 2. 1 Plant material**

In the present study, the following genetically diverse plant material was considered: 5 Swiss *C. sativa* varieties (3 to 14 individuals per variety), 9 Swiss coppice shoots (1 individual per shoot) (the 52 accessions of Swiss *C. sativa* varieties are showed in Table 3, Chapter1), 5 Italian *C. sativa* varieties (1 individual per variety), 5 French *C. sativa* varieties (1 individual per variety) and, for the Asiatic species, 5 *C. mollissima* varieties (1 individual per variety) and 6 *C. crenata* varieties (1 individual per variety). A total of 73 accessions were investigated using molecular markers for genetic analysis (Table 10). The French, Italian and Asiatic varieties were provided by the germplasm collection of the National Institute of Agronomic Research of Bordeaux (INRA, France). The Swiss varieties were collected *in situ* in Southern Switzerland (Table 3, chapter I).

**Table 10.** Studied species and their origin

Accession order	Accession N°.	Accession name	Genotype	Origin
1	1	<i>C. sativa</i>	CA 105. Sardonne	Ardèche.(FR)
2	2	<i>C. sativa</i>	CA 106. Marron Comballe	Ardèche, Lozère.(FR)
3	3	<i>C. sativa</i>	CA 107. Marron du Var	Gard.(FR)
4	4	<i>C. sativa</i>	CA 109. Marron de laguépie	Dordogne.(FR)
5	5	<i>C. sativa</i>	CA 135. Précoce de Vans	Ardèche.(FR)
6	1	<i>C. sativa</i>	CA 511. Marrone di Chiusa Pesio CN2	Piedmont (I)
7	2	<i>C. sativa</i>	CA 512. Garrone rosso CN7	Piedmont (I)
8	3	<i>C. sativa</i>	CA 513. Marrubia di Bermezzo	Italy
9	4	<i>C. sativa</i>	CA 570. Pelosa grossa	Piedmont (I)
10	5	<i>C. sativa</i>	CA 653. Castel del Rio	Italy
11	1	<i>C. mollissima</i>	CA 75	China
12	2	<i>C. mollissima</i>	CA 578	China
13	3	<i>C. mollissima</i>	CA 737	China
14	4	<i>C. mollissima</i>	CA 744. Ching-za	China
15	5	<i>C. mollissima</i>	CA 797. Mossbarger	China
16	1	<i>C. crenata</i>	CA 03	Japan
17	2	<i>C. crenata</i>	CA 04	Japan
18	3	<i>C. crenata</i>	CA 564. Iphara	Japan
19	4	<i>C. crenata</i>	CA 598. Rihei	Japan
20	5	<i>C. crenata</i>	CA 599. Ibuki	Japan
21	6	<i>C. crenata</i>	CA 600. Ishizuchi	Japan

## 7. 2. 2 DNA amplification

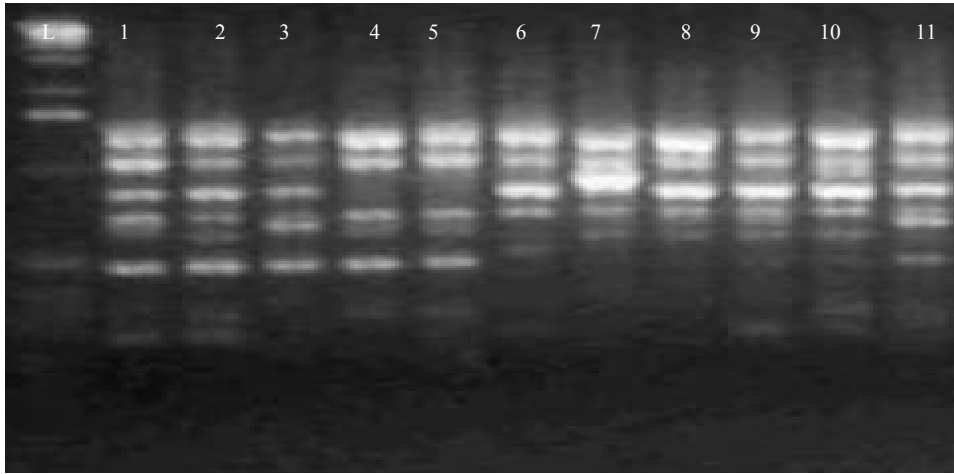
Molecular analysis and data scoring were carried out as described in chapter I of this manuscript.

## 7. 3 Results

### 7. 3. 1 Molecular markers

#### RAPD

The 12 RAPD primers produced a total of 106 polymorphic bands. The highest number of polymorphic and scorable bands was obtained by primer OPE-01 (14 fragments), the lowest by primers OPA-15 and OPA-2 (4 and 6 fragments respectively). An average of 8.83 bands per primer ranging from about 1000 bp to 5 000 bp were produced (Figure 21).

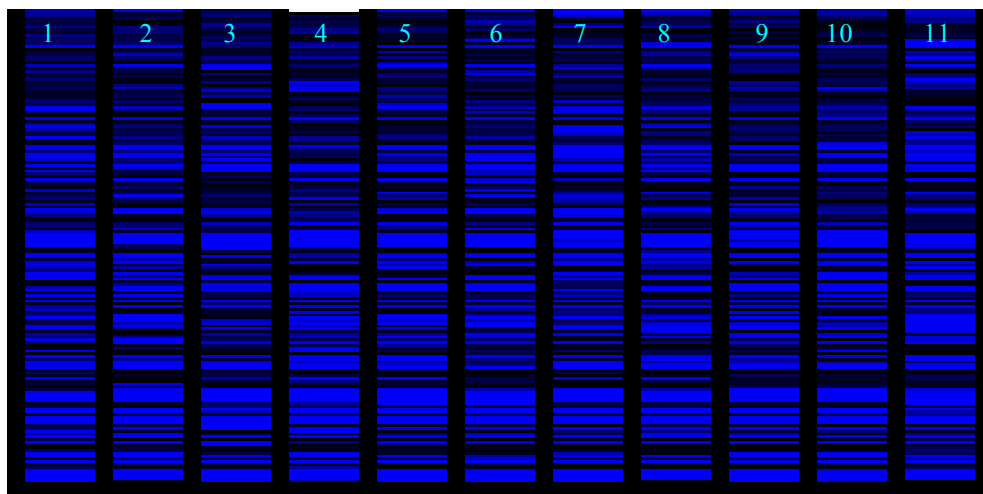


OPE01: L: 1000 bp DNA Ladder (Gibco BRL®, Life technologie  
*Castanea mollissima*: 1 - 5: *Castanea crenata*: 6 - 11

Figure 21 Example of Genetic polymorphism between *C. mollissima* and *C. crenata* as revealed by RAPD primer OPE01.

### AFLP

Using AFLP, a large number of bands was produced that made the count almost impossible. The four primer combinations yielded 228 polymorphic fragments which size ranged between 50 and 350 bp. The number of scored fragments amplified by each pair of primers set varied from 51 to 68 with an average of 57 polymorphic bands per reaction (51 from E-AGG/M-CTT, 53 from E-AAC/M-CTT, 57 from E-AGT/M-CAT and 68 from E-AAC/M-CAT) (Figure 22).

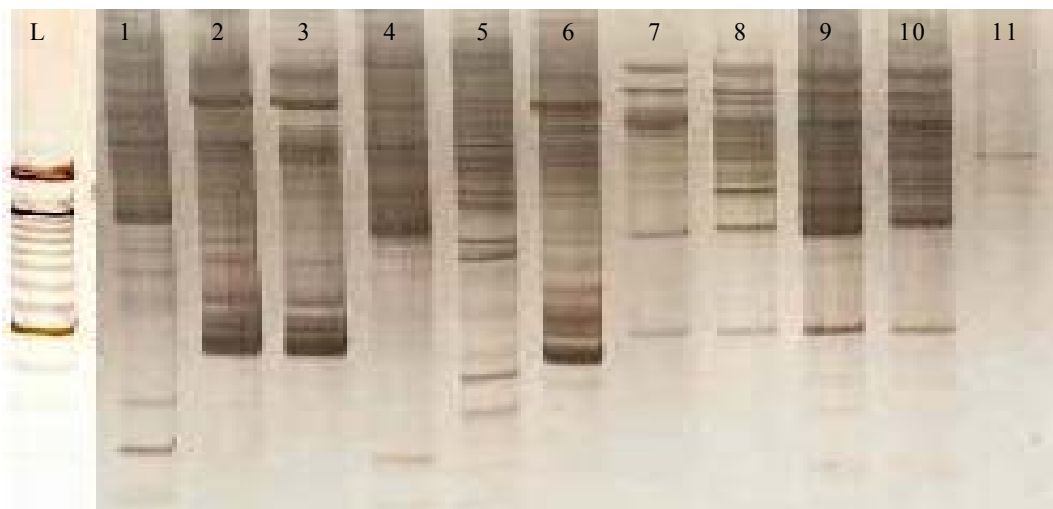


*Castanea mollissima*: 1 - 5: *Castanea crenata*: 6 - 11

Figure 22. Example of Genetic polymorphism between *C. mollissima* and *C. crenata* as revealed by AFLP primer E-AAC/M-CAT.

## ISSR

Five primers failed to amplify fragments that can be visible in polyacrylamide gels (Figure 23). The 5 primers detected 42 polymorphic ISSR fragments. The average number of scored bands per primer was 8.5 ranging from 4 to 12. The primers UBC 841 and UBC 834 produced the highest number of polymorphism bands (12 bands), while primer UBC 890 produced only 4 bands.

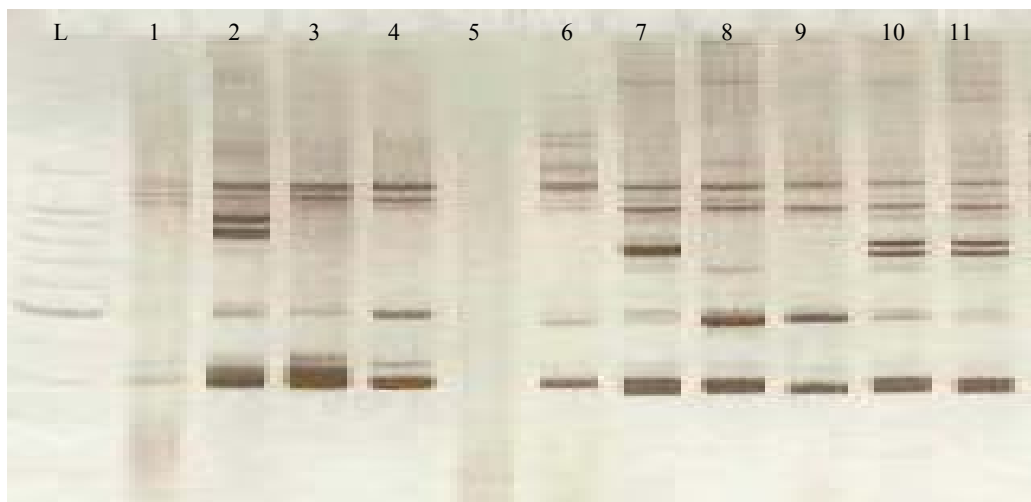


UBC 841: L: 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL®, Life Technologies); *C. crenata* 1-6; French *C. sativa*: 7-11

Figure 23. Example of Genetic polymorphism between *C. mollissima* and *C. crenata* as revealed by ISSR primer UBC 841.

## SSR

Thirty-six polymorphic fragments were amplified using five *oak* microsatellites (SSR) primers pairs. The most polymorph primers pair was Qp Zag 9 (Figure 24), which produced 12 polymorphic bands.



Qp Zag 9: L: 100 bp DNA Ladder (GibcoBRL®, Life Technologie) ;  
*Castanea mollissima*: 1 - 5: *Castanea crenata*: 6 - 11

Figure 24. Example of Genetic polymorphism between *C. mollissima* and *C. crenata* as revealed by SSR primer QpZag 9.

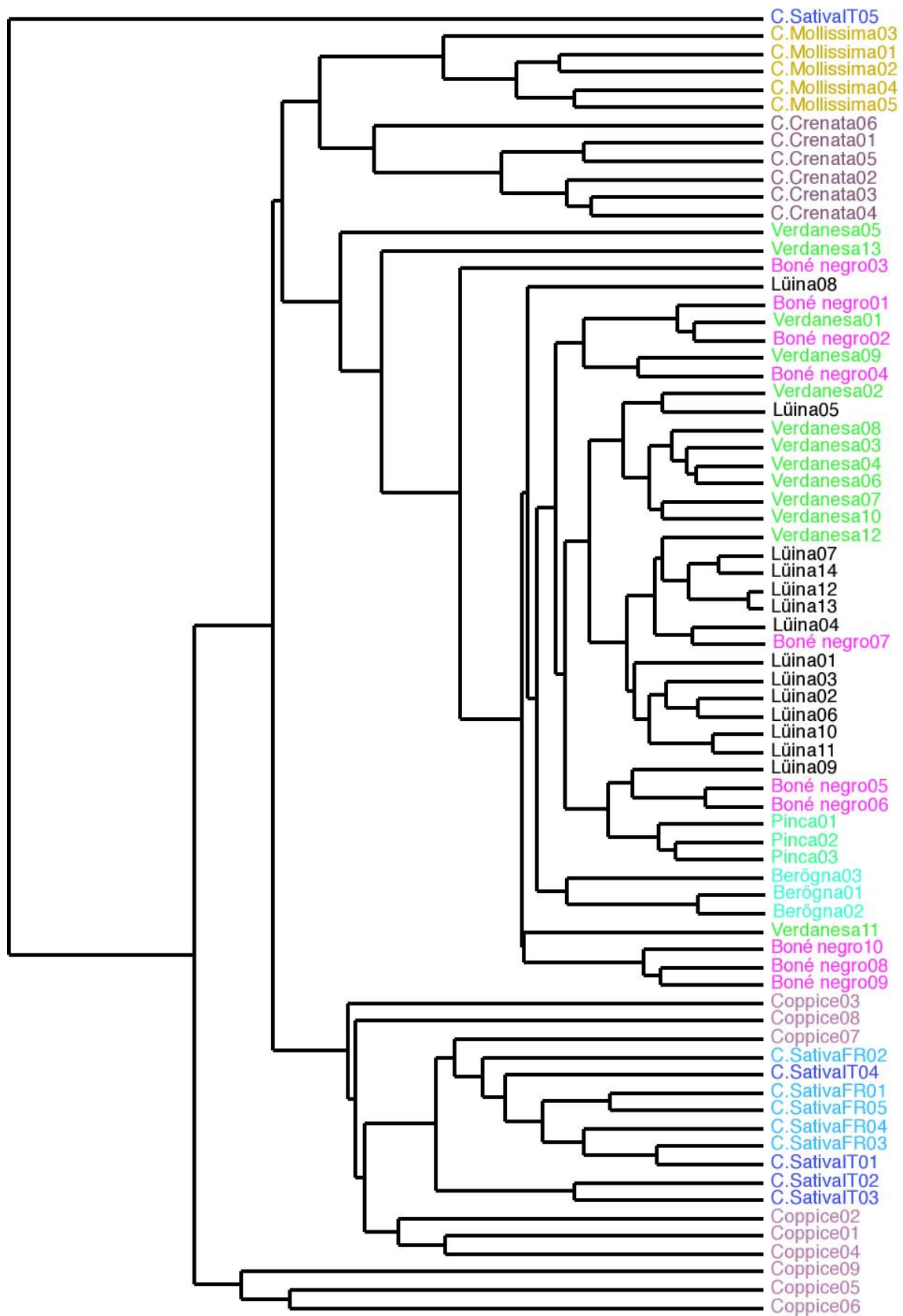


Figure 25. RAPD dendrogram based on Jaccard's genetic distance.

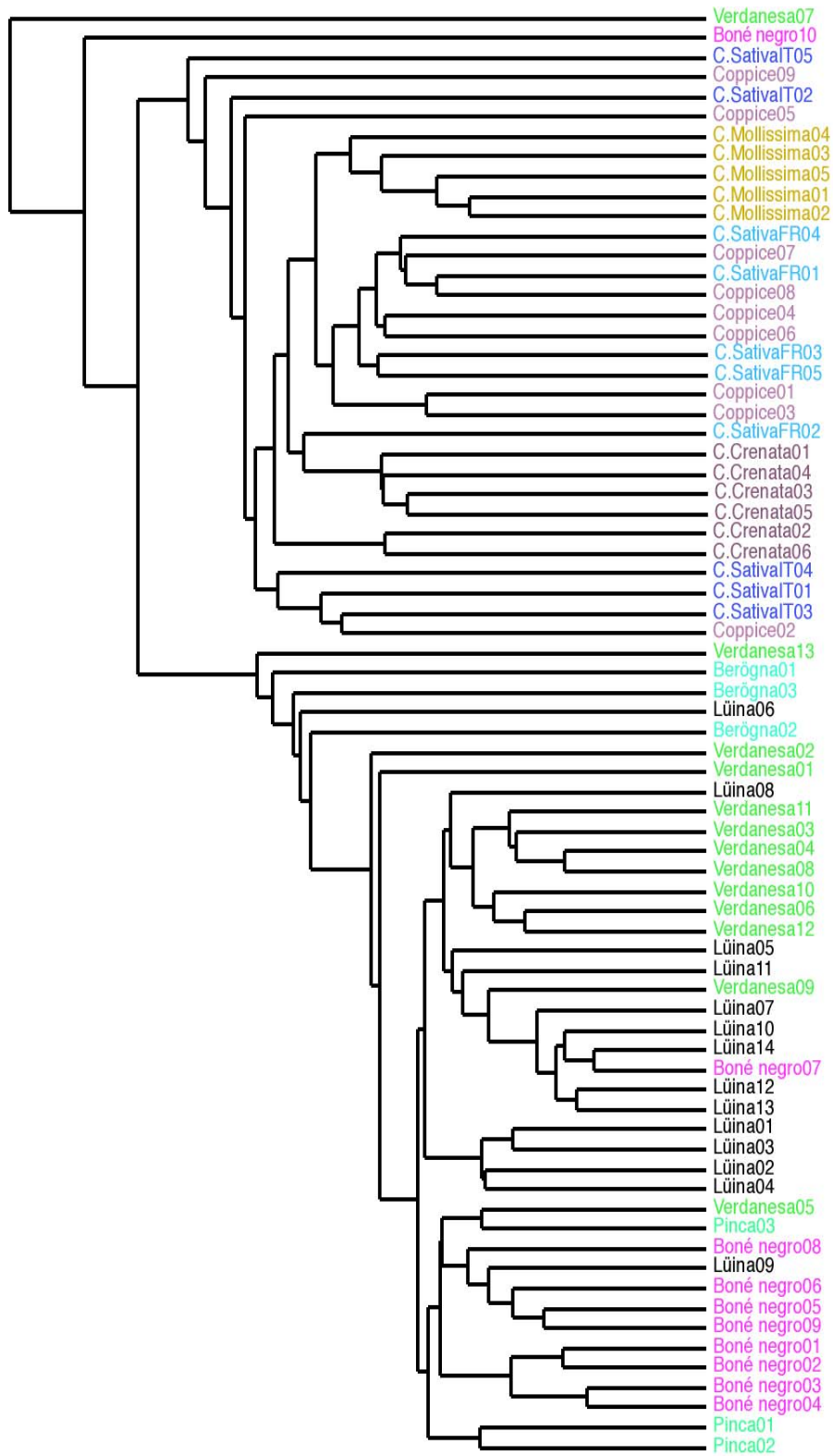


Figure 26. AFLP dendrogram based on Jaccard's genetic distance.

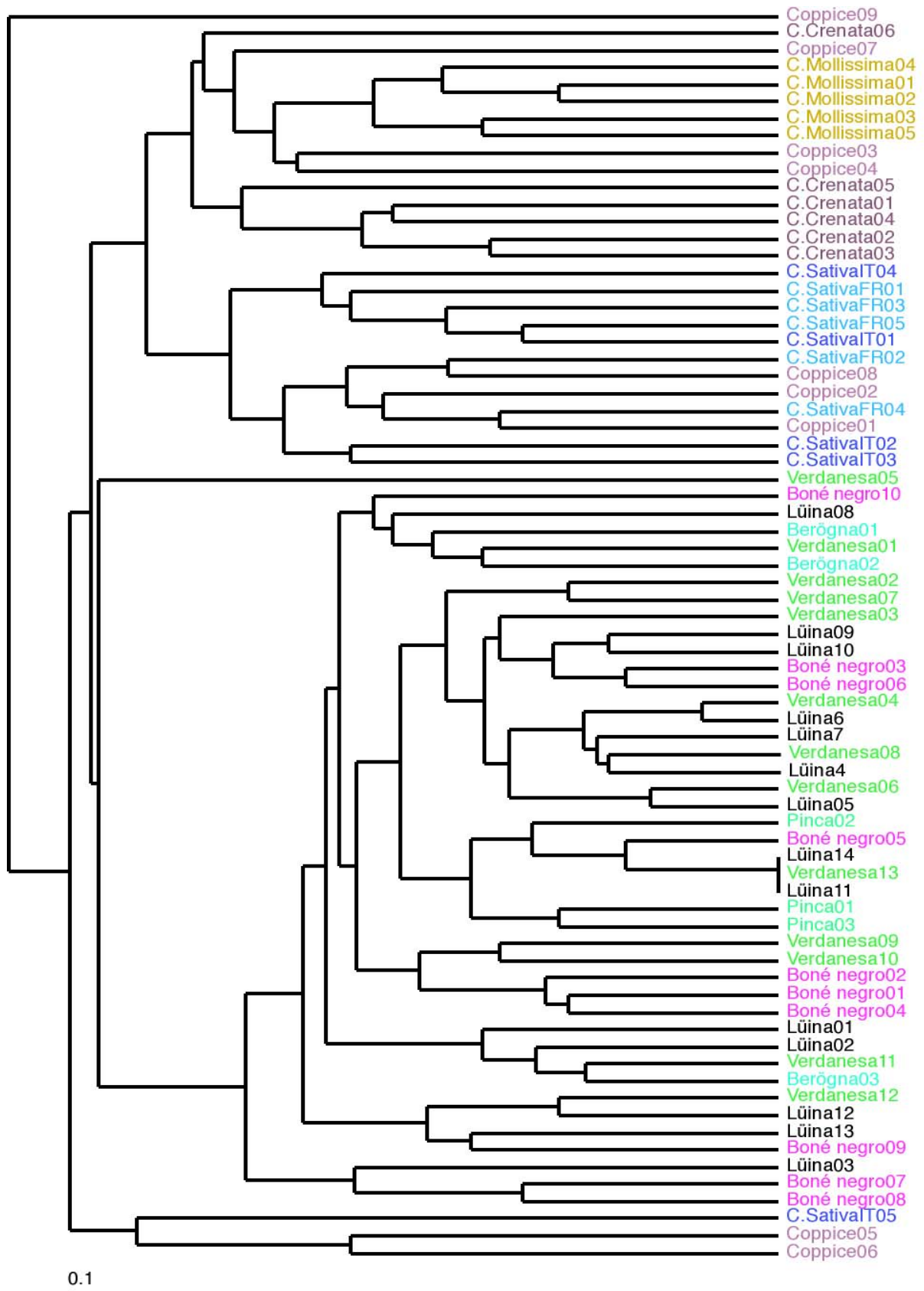


Figure 27. ISSR dendrogram based on Jaccard's genetic distance.

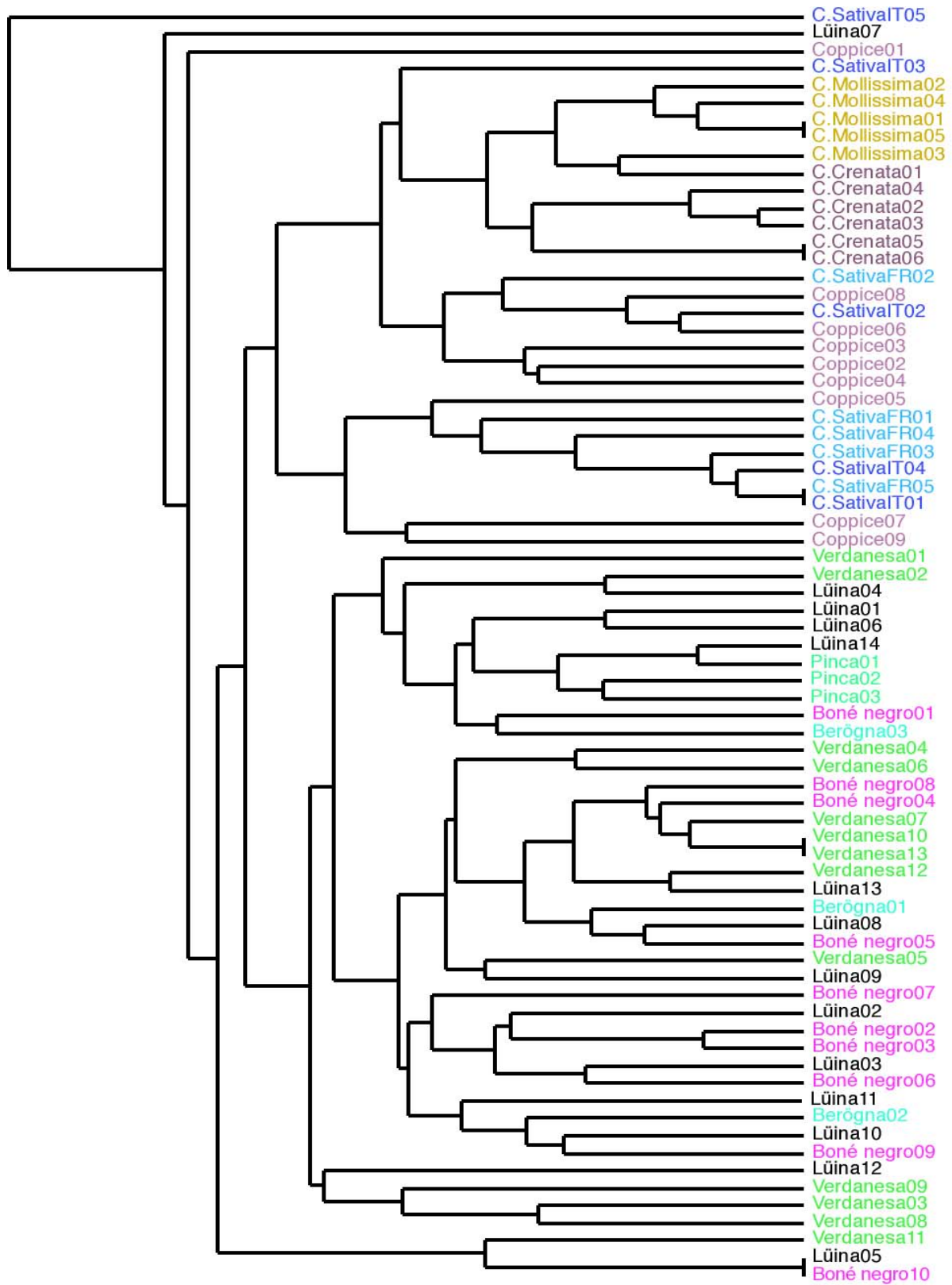


Figure 28. SSR dendrogram based on Jaccard's genetic distance.

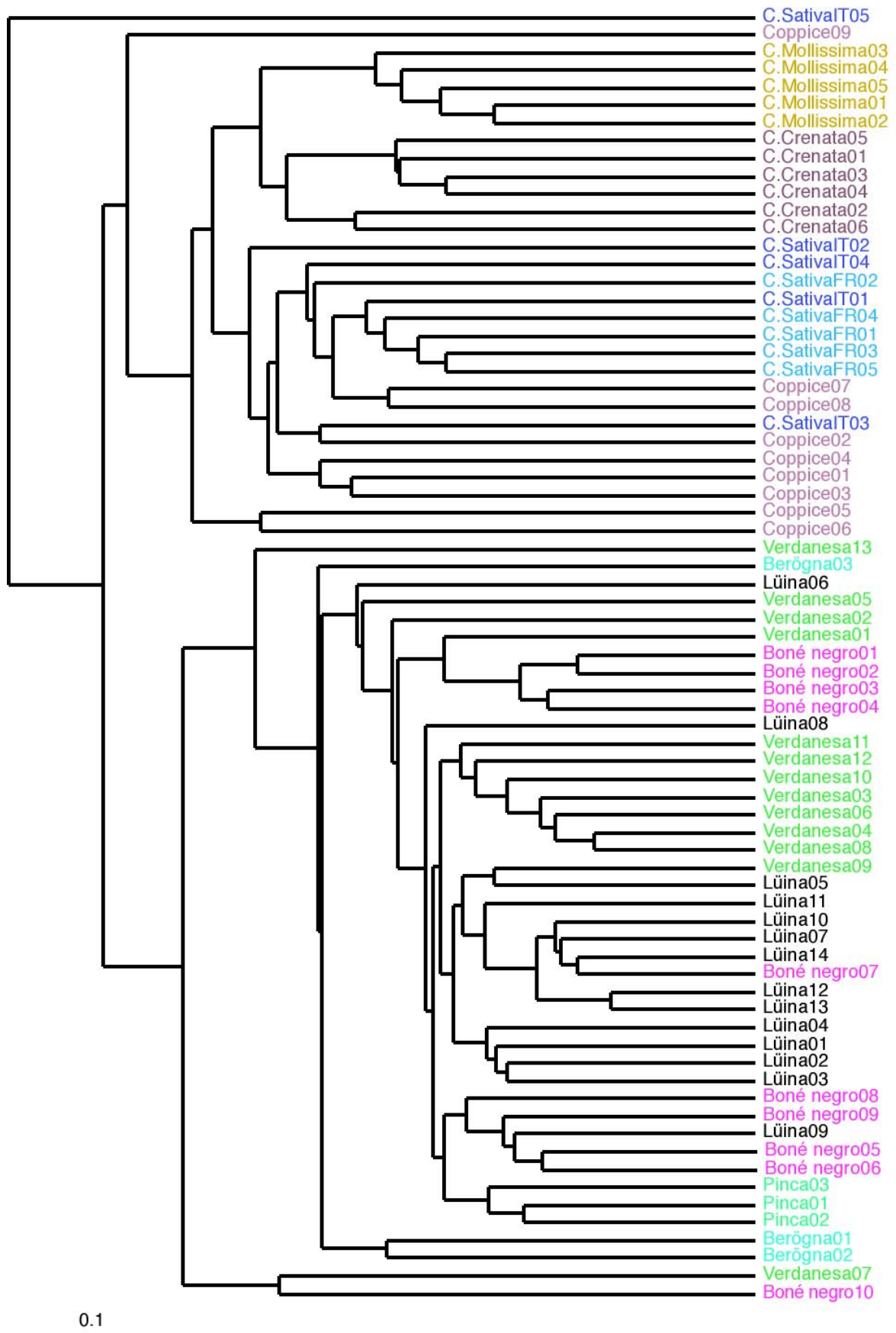


Figure 29. Combined data dendrogram based on Jaccard's genetic distance.

### 7. 3. 2 Genetic diversity

For the four data sets, the phenetic classification obtained using UPGMA as a clustering method is presented in the dendrograms (Figures 25 - 29). Our results did not cluster the three studied species according to the taxonomic sections of Dode. None of the used methods separated each species and all methods not cluster species in a clear separate cluster. RAPD, SSR and combined data clustered closely the species of *C. mollissima* and *C. crenata*. The accession of *C. crenata* 01 was positioned within the group of *C. mollissima* by SSR markers. The *C. crenata* 06 line was positioned outside the group of *C. crenata* species as revealed by ISSR dendrogram. SSR grouped *C. crenata* 01 and *C. mollissima* 03 into one pair group. Accessions of *C. mollissima* and *C. crenata*. were clustered into two pairs by the four used methods and not in clearly distinct groups. Swiss *C. sativa* cultivars were clustered into one close group from the rest by the four molecular markers dendrograms. None of the methods regrouped the individuals of Swiss varieties according to the supposed affiliation to a cultivars: especially in the case of ISSR and SSR markers.

In all dendrograms, French and Italian *C. sativa* cultivars were not grouped into two clear clusters; neither according to their geographic origin, nor according to their affiliation to marroni or chestnut cultivars. Generally, they were clustered with the coppice shoots. However, these latters were well discriminated by RAPDs and combined data analysis.

Figures 34-38 report the results of PCoA analysis and Table 11 summarize the main derivate statements for each used marker.

Results of the principal coordinate analysis (PCoA) of pairwise genetic distances may be summarized as follow:

The PCoA analysis using RAPD data separates clearly Asiatic from European species (Figure 30). The two plotted axes accounted for respectively 25.71% and 8.89% of the variation present at molecular level. The first principal coordinate clearly separates the *C. sativa* Swiss cultivars from the other accessions (*C. crenata*, *C. mollissima*, and the French, Italian and coppice individuals of *C. sativa*). The second principal coordinate separates accessions at the species level, with the Asiatic chestnuts (*C. crenata*, *C. mollissima*) concentrated and isolated from the *C. sativa* individuals. In the Swiss varieties no further discrimination among different cultivars is visible. Inversely, the two Asiatic chestnut species are well separated within their group.

The PCoA based on AFLP data separates clearly *C. sativa* Swiss cultivars from the rest (Fig. 31). The two plotted axes accounted for respectively 33.69% and 8.84%. The discrimination of the two groups is performed by the first principal coordinate. Two individuals representing Swiss cultivars “Verdanesa” and “Bonè negro” are the only extreme values located in the middle of the axis.

The PCoA with ISSR data separates clearly *C. sativa* Swiss cultivars from the rest (Fig. 32) similar to what happen using AFLP data. The two plotted axes accounted for respectively 21.52% and 8.04%. Once again, discrimination of the two groups is mostly performed by the first principal coordinate.

In the PCoA with SSR *C. sativa* Swiss cultivars were separated from the rest on the diagonal of the plot (Fig. 33). The two plotted axes accounted for respectively 17.41% and 9.80%. The Asiatic species are clustered together.

The PCoA using combined set of data show a clear separation of Swiss cultivars of *C. sativa* from the others species and cultivars. Swiss varieties, however are separated into two clearly distinct groups (Figure 34). All accessions of *C. crenata*, *C.mollissima*, as well as *C. sativa* coppice shoots, French and Italian varieties are grouped into one group.

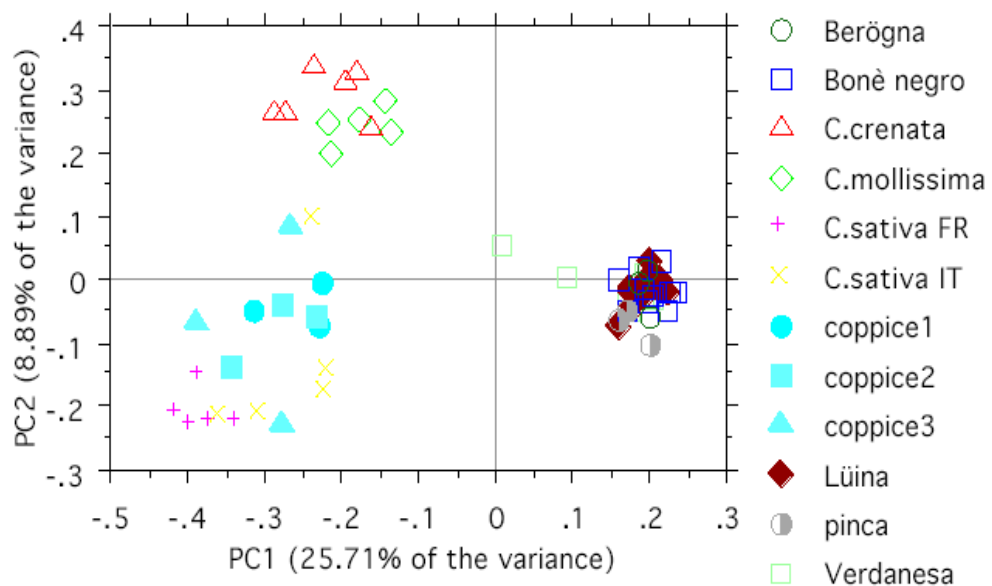


Figure 30. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on RAPD genetic similarity matrix

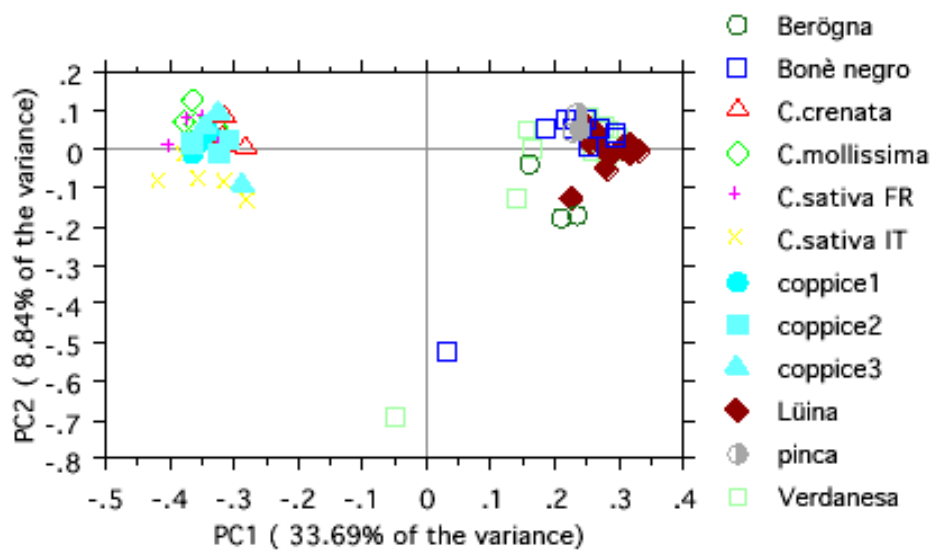


Figure 31. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on AFLP genetic similarity matrix.

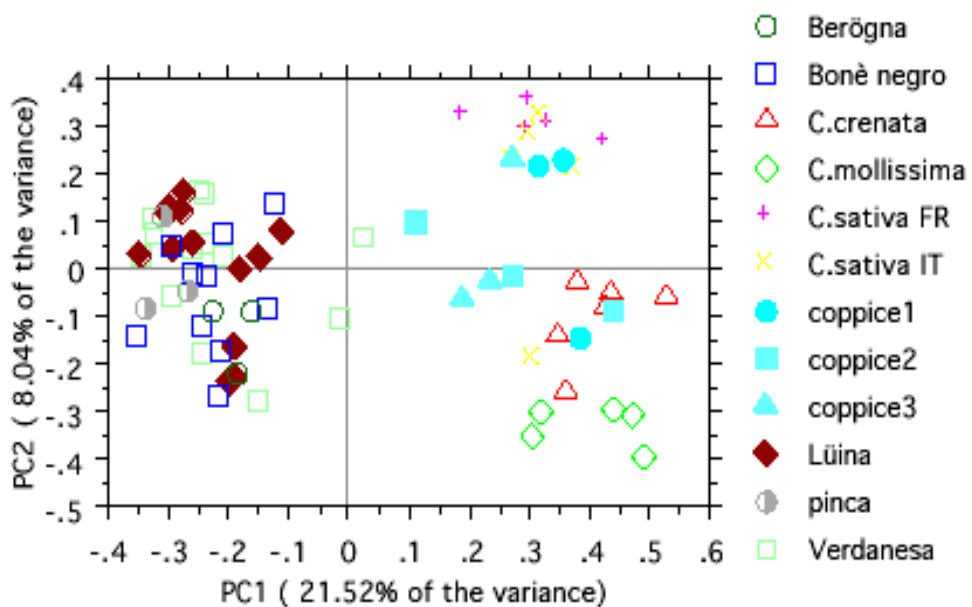


Figure 32. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on ISSR genetic similarity matrix.

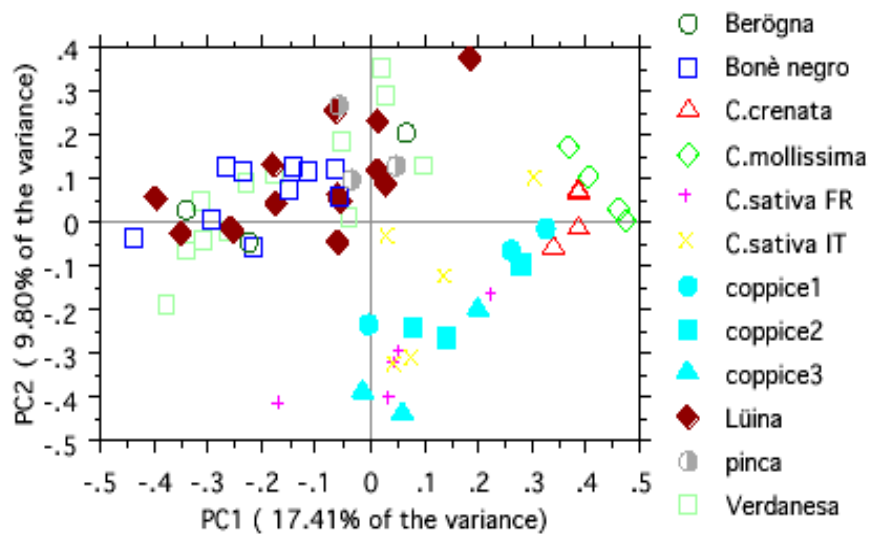


Figure 33. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on SSR genetic similarity matrix.

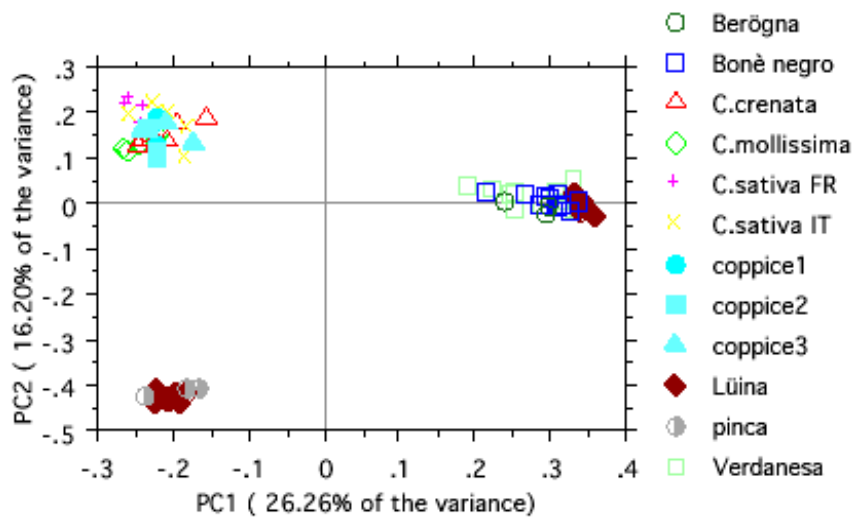


Figure 34. Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on combined data genetic similarity matrix.

**Table 11.** Inter and intraspecific polymorphism as detected by different molecular markers used with PCOA analysis.

		<b>Molecular marker</b>				
		<b>RAPD</b>	<b>AFLP</b>	<b>ISSR</b>	<b>SSR</b>	<b>Combined data</b>
<b>polymorphism</b>	<b>Comparison</b>					
<b>Interspecific level</b>	<b>species clustering</b>	good for Asiatic species, <i>C. sativa</i> divided in two groups	good for Asiatic species, <i>C. sativa</i> divided in two groups	loose but consistent for Asiatic species, loose and dispersed in several subgroups for <i>C. sativa</i>	good for Asiatic species, very dispersed for <i>C. sativa</i>	good for Asiatic species, very dispersed for <i>C. sativa</i>
	<b>species discrimination</b>	good between Asiatic species and <i>C. sativa</i>	poor	poor ( <i>C. mollissima</i> could be discriminated)	poor ( <i>C. mollissima</i> could be discriminated)	poor
	<b>Interactions</b>	-	<i>C. sativa</i> (Fr, It, coppice), <i>C. Mollissima</i> , <i>C. crenata</i>	1 Italian individual and 2 coppice shoots of <i>C. sativa</i> with <i>C. crenata</i>	-	<i>C. sativa</i> (Fr, It, coppice), <i>C. Mollissima</i> , <i>C. crenata</i>
	<b>orientation of the plot</b>	+	+	-	-	+
<b>intraspecific level</b>	<b>all <i>C. sativa</i></b>	three groups: 1) Swiss, 2) French and coppice shoots, 3) Italian	two groups: 1) Swiss, 2) French, Italian, coppice shoots	loose for French, Italian cultivars and coppice shoots but Swiss cultivars could be discriminated	two groups: 1) Swiss cultivars; 2) Italian, French cultivars, coppice shoots	poor discrimination and Swiss cultivars
	<b>Swiss <i>C. sativa</i> cultivars</b>	close grouped, with 2 extreme values of Verdanesa	close grouped with extreme values (1 Verdanesa, 1 Boné negro)	dispersed with 2 extreme values of Verdanesa	dispersed with 1 extreme values of Lüina	very close grouped, but divided in two clusters
	<b><i>C. sativa</i> subgroup (coppice, Fr, It)</b>	loosely grouped	grouped	poor	very loosely grouped	grouped
	<b>French <i>C. sativa</i> cultivars</b>	close grouped	close grouped	loosely grouped	dispersed	close grouped
	<b>Italian <i>C. sativa</i> cultivars</b>	dispersed	grouped	1 individual dispersed	dispersed	grouped
	<b><i>C. sativa</i> coppice shoots</b>	loosely grouped	grouped	dispersed	dispersed	grouped

### 7. 3. 4 Comparison among markers

A high correlation coefficient between matrices based on AFLPs and RAPDs ( $r = 0.69$ ) was observed. Equally, Mantel test show a high correlation between RAPDs and ISSR's ( $r = 0.77$ ). A low correlation coefficients among molecular based on SSRs distance matrix and the three different sets of data ( $r = 0.38$ ,  $r = 0.47$  and  $r = 0.44$  with AFLP, RAPD and ISSR, respectively) (Table 12) were revealed.

**Table 12.** Mantel tests correlation coefficients of a distance matrix created by AFLP, RAPD, ISSR, SSR and combined data analysis. The difference was significant (\*\*:  $P < 0.01$ ).

AFLP				
RAPD	0.69**			
ISSR	0.62**	0.77**		
SSR	0.38	0.47	0.44	
Combined data	0.68**	0.57*	0.50*	0.42
	AFLP	RAPD	ISSR	SSR

### 7. 4 Discussion

In our study, each molecular marker used provided interesting information about the variation among different chestnut species and cultivars.

For the detection of specific markers, AFLPs reveal a higher number of polymorphic markers compared to other methods (228 vs 106, 36 and 42 for RAPD, SSR and ISSR respectively). The efficiency of AFLP markers and their capacity to reveal a high number of polymorphic bands and a large number of PCR products analyzed per amplification and per primer (a mean of 58 informative bands per primer) has been already reported in several studies (Russel et al. 1997; Coart et al. 2002; Fernandez et al. 2002). However, in our study, AFLPs did not group *Castanea* species into clear 3 separated clusters. The same finding was reported by Russel et al. (1997) when they studied the genetic variation among barley accessions and showed that AFLPs fail to cluster individuals in clear group. This may be due to the efficiency of AFLPs to provide a large number of bands while detecting a low level of polymorphism.

RAPDs separated better species and cultivars than ISSRs and SSRs; this is mainly due to the small number of ISSR and SSR markers produced. The choice of an appropriate method of genetic analysis depends generally on the study that will be used; because each method offers the possibility and different ways of sampling different genome parts.

The four molecular markers used did not cluster the three studied species into three separated groups according to the taxonomic sections of Dode. Principal Coordinates Analyses as well as cluster analysis performed on the distance matrices showed a close similarity between Asian species: *C. mollissima* and *C. crenata*. This result is in agreement with previous works (Huang et al. 1994 b; Morimoto et al. 1997 and Yamamoto et al. 1998). These authors suggested that *Castanea mollissima* might be considered as the pro-genitor of all other *Castanea* species and demonstrated that genetic relationships of Korean *C. crenata* varieties and Chinese chestnuts were rather complicated.

In some cases, the four molecular markers used clustered European and Asiatic species in the same group. The existence of unexpected genetic relations among species was already reported by (Sawano et al. 1984; Malvolti and Fineschi, 1987) who tried unsuccessfully to find species-specific markers among Japanese, Chinese, Japanese-Chinese hybrid and European chestnut species in three enzyme systems.

The presence of accessions from different countries of origin in the group that contain coppice shoots, French and Italian, is probably due to their common origin and of their diffusion by human activity through Europe (Villani et al. 1991; Fineschi et al. 1994; Villani et al. 1999 and Pereira-Lorenzo et al. 2001).

European cultivars did not separate according to their geographic origin. It is important to note that geographical effect was less important than variety effect. The genetic relatedness among European chestnut is mainly explained by the old cultural tradition in Europe. Also, this genetic relationship among European cultivars reflects a possible introduction of superior materials from different regions and by many flow exchanges of seeds among European countries in the past.

Surprisingly, the four molecular markers clustered Swiss *C. sativa* into one close group showing considerable differences among European *C. sativa* cultivars. These differences are probably due to the selection pressure made by local breeder in southern Switzerland long time ago or by the adaptation of cultivars to appropriate soil and microclimate conditions.

It is important to note that the four molecular markers used discriminate well Swiss cultivars but there is extreme values found. This result indicates a close relatedness among individuals of “Verdanesa”, “Boné negro”, “lüina”, “Berögna” and “Pinca”. A relation that can be explained by the existence of polyclonal varieties, in addition, the possibility of agamic

propagation by seeds of “Verdanesa” variety and their compatibility of single trees (Conedera et al. 1994), and by a closer gene pool, leading to the emergence of the same mutational event as is shown by Gallois et al. (1998) when he studied the genetic relationship among the genus *Fagus* .

The comparison of data obtained with SSRs and the three types of markers show low correlation coefficients. In previous several works in which SSRs was used as a tool to study the genetic variation, microsatellites results are frequently very discordant with other molecular data (Russell et al.1997; Pejic et al. 1998; Bohn et al. 1999 and Fisher et al. 2000). Despite the small number of SSRs bands found in this study (36 bands), their extraction from *Quercus* (same family: but not specific for chestnut) and the higher specificity of amplifications with SSRs primers (microsatellites amplify DNA repetitive regions and these regions are hypervariable due to the slippage mechanism) explain the discordance among the other molecular data sets (Schloss et al. 2002).

Microsatellites loci may be particularly sensitive to inbreeding effects (Huang et al. 2000) and are suitable to investigate mating-system analyses in small and isolated populations, where dominant AFLP, ISSR and RAPD molecular markers are less appropriated, and are able to discriminate between very closely related genotypes as shown by (Russel et al. 1997; Maguire et al. 2002).

The highest correlation was observed between RAPD and ISSR marker types (Mantel’s  $r = 0.77$ ). These results can be explained by the fact that both molecular types are dominant markers (Fahima et al. 1999). On the contrary, RAPDs, triple the amount of polymorphic bands compared to ISSRs (in the case of this study, 106 for RAPDs vs 42 for ISSRs). This might affect the good discrimination of chestnut species and cultivars by RAPDs, while ISSRs dendrogram and PCoA analysis could separate neither species nor *C. sativa* cultivars into a clear cluster.

Our results are in contrast with previous study showing that ISSRs are more informative than RAPDs as demonstrated by (Casasoli et al. 2001) when he constructed the map of Portuguese chestnut. This contradiction may be explained by the number of primers used in the experiment that is considered as source of variation from the molecular data (Lefebvre et al. 2001).

## **7.5 Conclusion**

It may be concluded that the use of four types of molecular markers to study the genetic variation of three species of chestnut was possible and the results found were comparable. DNA analysis provided consistent information about chestnut genetic species variability, which might allow us to make future germplasm collections.

RAPD was the best method because of its capability to cluster moderately species and cultivars. AFLP was the best method to generate the highest number of polymorphic bands.

It will be necessary to investigate the genetic diversity of much more European chestnut by including for example Spanish, Portuguese or Turkish chestnut for future researches and to sample a large number of Asian varieties in order to identify their genetic background in relation to European cultivars.

For better discrimination among the three studied species of chestnut, it's required to test much more primers for ISSR and SSR methods and to attempt other methods of molecular analysis to detect polymorphism; such as the use of chloroplast DNA or sequencing methods.

## Chapitre III

Apport de techniques de greffage d'apex *in vitro* pour la micropropagation du châtaignier (*Castanea sativa* Mill.)

## Résumé

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

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

Afin de s'assurer de la compatibilité entre partenaires, des coupes histologiques ont été élaborées sur des plantes greffées pour visualiser au niveau cellulaire le degré de compatibilité entre partenaires.

## 8. 1 Introduction

La propagation et la domestication des arbres fruitiers et forestiers sont assurées par la multiplication sexuée qui fait intervenir des structures reproductrices particulières, il s'agit des fleurs. Ces dernières, après fécondation des ovules, forment des graines. Le semis de graines donne des arbres différents de la variété mère et différente entre eux. Par contre, les plantes fruitières ont été multipliées par la voie asexuée, par laquelle un organisme est capable d'en générer un autre sans intervention de structures reproductrices spécifiques. Ce mode de reproduction est largement pratiqué par les arboriculteurs et comprend plusieurs méthodes notamment: le marcottage, le bouturage et le greffage, ce dernier était appliqué chez la majorité des arbres fruitiers (Pereira-Lorenzo and Fernandez-Lopez,1997).

Parmi les méthodes de propagation asexuée, on trouve aussi la culture *in vitro* qui a été retenue par plusieurs cultivateurs et sélectionneurs afin de propager intensivement et conformément leur matériel végétal de base. L'utilisation de cette biotechnologie est satisfaisante par rapport aux méthodes traditionnelles, elle offre plusieurs avantages pour l'obtention du matériel sain et dans une période de temps relativement courte. Pour cet égard, plusieurs études ont montré l'utilité de greffage d'apex *in vitro* pour la multiplication et l'assainissement des arbres fruitiers. Cette technique est utilisée et été mise au point par (Murashige et al. 1972; Navarro et al. 1975) au départ sur les agrumes et était améliorée par (Roistacher et al. 1986).

Plusieurs programmes d'amélioration génétique chez les arbres fruitiers ont été mis en place. Ils ont utilisé le greffage *in vitro* comme solution supplémentaire aux problèmes de la reproduction végétative, et comme un moyen pour résoudre des problèmes agronomiques majeurs tel que l'enracinement, le contrôle de la vigueur, l'assainissement 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 a été appliquée chez plusieurs espèces ligneuses (Navarro, 1988), notamment chez les cerisiers (Deogratias et Dosba, 1986), les pommiers (Huang and Millikan, 1980), les pêchers (Barba et al. 1995), les agrumes (Guo and Deng, 1998) et les châtaigniers (Giovannelli and Giannini, 2000).

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 l'agent pathogène *Phytophthora* spp. causant la maladie fongique de l'encre.

Récemment, l'intérêt porté à la culture du châtaignier a augmenté pour répondre à la demande du marché en fruit et en bois en Suisse. Ceci a entraîné la recherche de nouveaux cultivars producteurs ayant une architecture de la couronne adaptable à la récolte et la sélection de nouveaux-porte greffes permettant une meilleure adaptation de l'arbre greffé au milieu et en lui offrant une meilleure résistance à l'encre (Gomes Pereira et al. 1993).

En Suisse, des programmes de sélection et de croisement ont été introduits dès les années cinquante pour améliorer la résistance de l'espèce européenne indigène (*Castanea sativa*) (Bazzigher et Miller, 1987). Pour cela des espèces asiatiques ont été introduites en Europe et surtout l'espèce japonaise (*Castanea crenata*) qui est relativement résistante aux maladies de l'encre et 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, ces croisements ont abouti à la création des hybrides interspécifiques qui, par la suite, ont été utilisé comme porte-greffe afin d'apporter aux variétés à greffer des avantages agronomiques (Breisch, 1995).

Dans notre étude, l'hybride interspécifique utilisé comme porte greffe est le clone multiplié in vitro Maraval CA- 74 qui présente des caractères génétiques intéressants. Il offre aux variétés à greffer (Lüina et Verdanesa: cultivars Suisse) 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).

Le greffage du châtaignier est cependant limité par des phénomènes fréquents comme l'incompatibilité, qui se manifeste même aux champs après plusieurs années de croissance normale comme le montre (Oragusie et al. 1999) chez le châtaignier néo-zélandais, (Pereira-Lorenzo and Fernandez-Lopez, 1997) chez le châtaignier espagnol et (Ufuk and Soyly, 1999) chez le châtaignier turc.

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

la compatibilité ou incompatibilité entre partenaire, des coupes histologiques ont été effectuées sur des sujets greffés *in vitro*.

Ce travail a été entrepris dans le cadre d'une collaboration entre le service de biologie végétale (culture *in-vitro*) de la Station fédérale de recherches en production végétale, la sous-station du sud des Alpes de l'Institut fédérale de recherches sur la forêt, la neige et le paysage et le laboratoire de botanique évolutive de l'Université de Neuchâtel.

## **8. 2 Matériel et méthodes :**

### **Matériel végétal**

- Le porte-greffe: Le porte-greffe est constitué par le clone Maraval CA-74 qui est un hybride interspécifique naturel issu d'une pollinisation naturelle de *Castanea crenata* par *Castanea sativa*. Le matériel végétal nous a été fourni par Ctifel, centre de Balandran (France)
- Les greffons: Les greffons sont constitués par deux variétés suisses. Ces variétés sont établies et multipliées *in vitro* dans le laboratoire de culture *in vitro* de la Station de Changins (Lê, 1992): Lüina et Verdanesa qui sont bien répandues au sud des Alpes.

### **Multiplication in vitro**

Comme pour la plupart des plantes ligneuses, la micropropagation rapide et continue *in vitro* de ces trois clones est réalisée par la multiplication des bourgeons axillaires (Snir, 1982) (Deogratias et Dosba, 1986)

Quand les bourgeons sont bien développés, environ 2 - 4 mm de longueur, des segments de bourgeons sont placés sur le milieu de culture. Les nouveaux bourgeons obtenus *in-vitro* sont coupés et multipliés toutes les 4 semaines afin de produire du matériel expérimental.

Les explants initiaux sont cultivés dans des conteneurs en plastique contenant 60 ml d'un milieu de base DKW (Driver and Kuniyuki, 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 sont respectivement de (147, 950 et 40 mg/l), ce milieu contient 0.2 mg/l de 6-benzylaminopurine et 0.02 mg/l d'acide-3-indolylbutyrique (IBA). A ce milieu, un mélange vitaminique est ajouté: thiamine HCL (4 mg/l), l'acide nicotinique (2 mg/l) et du myo-inositol (100 mg/l) et 4 mg/l de glycine. Ensuite, 0.9% du Bacto<sup>®</sup> Agar et 3% de Fructose sont ajoutés au milieu.

Le pH de milieu nutritif est ajusté à 6.2 avec de NaOH ou de l'HCL à 0.1 N avant l'autoclavage à 121°C (1.1 Kg/cm<sup>2</sup> de pression) pendant 15 minutes.

Les cultures sont maintenues dans un environnement climatique avec une lumière de (50  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ ), une photopériode de 16 heures par jour fournie par des tubes fluorescentes de type Philips TLD 58 W/89 et à une température alternée ( $25 \pm 1$  °C le jour,  $18 \pm 1$  °C la nuit). L'humidité relative est de 60 % dans la chambre de culture.

### **Enracinement :**

De jeunes pousses axillaires de 4 à 5 semaines de développement sur le milieu de multiplication sont excisées (2-3 cm de longueur) à leur base, ensuite sont repiquées sur un milieu d'enracinement selon la technique BdR/Ctifl-Balandran, France (Bourrain and Navatel, 2000) contenant 2 mg/l d'acide-3-indolylbutyrique (IBA). Les pousses sont maintenues pendant 7 jours à l'obscurité, ensuite elles sont transférées sur un milieu de base sans hormone de (Murashige and Skoog, 1962) contenant de la vermiculite pour permettre l'émergence des racines pendant deux semaines.

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

### **Technique de greffage *in vitro***

Pour le greffage *in vitro*, on a choisi la greffe en fente simple qui est la plus adaptée à notre matériel. L'apex greffon de deux variétés Lüina et Verdanesa de deux semaines de culture *in vitro* sont coupés de 0.8 à 1 cm de longueur et placés dans une solution de Diéthylthiocarbamate de Sodium (DIECA) pendant 5 minutes afin d'inhiber l'oxydation des composés phénoliques. Ensuite, dans des conditions d'asepsie rigoureuses, les deux greffons sont taillés en biseau de manière à éviter une ouverture trop large et trop profonde du porte-greffé. Parallèlement, on procède à la préparation du porte-greffé enraciné de Maraval CA-74 en créant une fente simple pour recevoir le greffon. Tous les bourgeons axillaires du porte-greffé sont excisés. Sous une loupe binoculaire, avec deux pinces, on procède à assembler les deux partenaires. Les plants greffés sont alors cultivés sur le milieu d'enracinement et exposés à une lumière (50  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ ), une photopériode de 16 heures par jour), une température alternée ( $25 \pm 1$  °C le jour,  $18 \pm 1$  °C la nuit) et avec une humidité relative de 60 % dans la chambre de culture.

## **Examen histologique**

L'incompatibilité au greffage est un phénomène très fréquent chez le châtaignier, aussi bien intra et inter-clonale (Oragusi et al. 1999). Des examens histologiques ont été adoptés aussi, afin de s'assurer de l'affinité entre les deux variétés et le porte-greffe. L'examen histologique consiste à fixer des plants de deux semaines greffés dans une solution de forinaldéhyde-acide acétique-alcool (FAA). Ensuite, les échantillons sont soumis à une déshydratation graduelle dans l'éthanol allant de 20 % à 100 %. Pour enrober les échantillons, les tissus déshydratés sont infiltrés dans une solution de 50% d'Historessin® et 50% d'éthanol absolu et par la suite infiltrés dans une solution pure d'Historessin®. Finalement, les échantillons des plants greffés sont découpés au microtome à une épaisseur de 5 µm, colorés par la réaction de l'acide périodique avec le réactif de Schiff (PAS) et le réactif de Fast Green. Quelques gouttes d'Eukitt® sont ajoutées sur les lames qui par la suite sont visualisées au microscope.

## **8. 3 Résultat et discussion**

### **9. 3. 1 Multiplication *in vitro***

La multiplication *in-vitro* des 3 clones selon la méthode mentionnée ci-dessus, a permis d'obtenir sans difficulté plus de 98% d'explants qui par la suite ont repris leur croissance et leur développement normal sans la présence de nécrose apicale ou de chlorose (figures 35 et 36). Le choix du milieu de culture solide et la présence des régulateurs de croissance comme l'auxine et le cytokinine aux concentrations respectives (IBA = 0.02mg/l et BAP = 0.2 mg/l) dans le milieu a permis d'obtenir un nombre élevé de bourgeons utilisables par explant pour le porte-greffe Maraval CA-74 (Figure 37). La multiplication *in vitro* du châtaignier par le biais des bourgeons axillaires est couramment pratiquée en comparaison avec celle de la multiplication d'apex en raison d'un pourcentage élevé des bourgeons utilisables. Cette méthode de multiplication était recommandée par plusieurs auteurs pour la famille des fagacées difficile à reproduire, comme le chêne et le hêtre (San-Jose et al. 1988). Chez le châtaignier, la différence entre les deux méthodes peut être expliquée par l'effet de dominance apicale produite par l'apex et le développement maximal et l'orientation morphogénétique des bourgeons axillaires qui sont utilisées pour les subcultures (Sanchez et al. 1997).

On remarque aussi la présence de cals à la base des bourgeons issus de cette phase de multiplication et, dans certains cas, de la présence de miniboutures à feuilles vitreuses. Les mêmes résultats ont été confirmés par (Miranda-Fontaina and Fernandez-Lopez, 2001) qui ont

observé également le même phénomène après avoir étudié la micropropagation *in vitro* du châtaignier espagnol.



Figures 35 et 36. Multiplication *in vitro* du clone Maraval CA-74 après 4 semaines de culture.

Le nombre de bourgeons utilisables par explant et l'évolution de l'état physiologique des microboutures en rapport avec la saison est illustré dans la (Figure 37). Le nombre total de bourgeons (NBT) ainsi que le nombre de bourgeons utilisables (NBU) varient avec la saison qui pouvait influencer la production des bourgeons par bouture. Dans le cas présent, le nombre de bourgeons utilisables est plus élevé en juillet que pour le mois de décembre. Cette variation dans le nombre de bourgeons peut être expliquée selon (Gonçalves et al. 1998) par l'activité spécifique de peroxydase qui varie en fonction des conditions environnementales.

Le problème majeur survenant lors de la multiplication est le brunissement du milieu de culture par l'oxydation des composés phénoliques libérés par le tissu végétal rendant toxique le milieu de culture. Afin de parer à cette difficulté, les explants sont maintenus pendant 4 à 5 jours à l'obscurité lors de chaque remise en culture. A cet égard, (Sanchez et al.1997) et (Mato and Vieitez, 1986) ont montré que pour plusieurs plantes ligneuses l'obscurité peut diminuer l'activité de peroxydase.

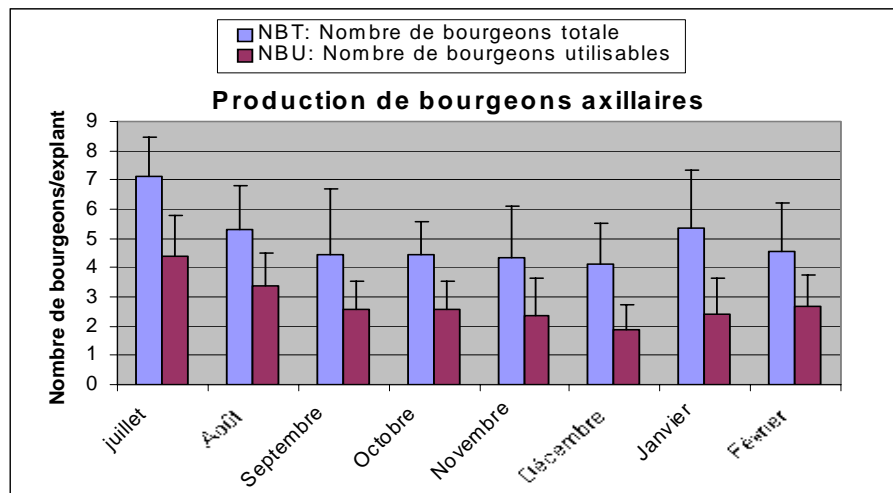


Figure 37. Nombre de bourgeons produits par explant en fonction de subcultures.

### 8. 3. 2 Enracinement

Au cours de multiples repiquages sur le milieu de multiplication contenant 0.2 mg/l de (BAP), nous avons isolé ces pousses néoformées et les avons repiquées sur un milieu d'enracinement approprié (réf. Matériel et méthodes) pour former des nouvelles racines adventives afin de reconstituer des plantes entières capables de subir des expériences de greffage *in vitro* (Figure 38). L'examen des résultats après deux semaines montre que le milieu d'enracinement induisant un grand pourcentage d'enracinement (de l'ordre de 98 %) à une concentration de 2 mg/l d'IBA, (en moyenne de 4 racines/explant de 12 à 15 mm de long, vigoureuses avec des racines secondaire). La nécessité d'utiliser une forte concentration d'auxine allant de 1 à 5 mg/l pour l'induction de la rhizogénèse du porte-greffe du châtaignier est nécessaire (Xing et al.1997).

Dans cette étude, nous avons utilisé des plantes dont l'apex présente une croissance normale pour l'opération de greffage ultérieurement. Des études antérieures montrent que l'enracinement du châtaignier est induit soit par l'utilisation de bourgeons axillaires destinés à l'enracinement dans un milieu de culture contenant 1 à 5 mg/l d'IBA, soit par le trempage des bases des bourgeons excisés dans 0.5 à 1.0 g/l d'IBA pendant 30 à 120 secondes (Sanchez et al. 1997) ; (Chauvin and Salesses 1988)

L'inconvénient majeur qui apparaît au stade de l'enracinement est la présence de nécroses apicales de (l'ordre de 25 %), des résultats similaires ont été trouvés par (Xing et al.1997) en multipliant le châtaignier américain *in vitro*. (Vieitez et al. 1989) expliquent ce phénomène

physiologique chez le châtaignier par une déficience de 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*, c'est ce qui empêcherait l'absorption des vitamines et de l'eau.



Figure 38. Clone de Maraval CA-74 enraciné sur un milieu d'enracinement selon la technique BdR

### 8. 3. 3 Greffage *in vitro* et étude histologique

La technique de greffage *in vitro* décrite plus haut (cf. matériel et méthodes) permet d'obtenir la production de plantes greffées, avec les cultivars Verdanesa et Lüina (Figures 39 et 40) nécessaires aux études histologiques. Elle sera utilisée dans l'avenir pour produire par greffage *in vitro* certaines des variétés les plus prometteuses provenant du sud des Alpes. 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 acquérir un certain équilibre entre le greffon et le porte-greffé pour la réussite ultérieure du greffage. Dans notre expérience, l'assemblage du greffon, âgé de deux semaines, sur le porte-greffé raciné semble être favorable pour réussir le greffage *in vitro* chez le châtaignier. En ce qui concerne les ligneux, (Franclet, 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.



Figure 39. Plante greffée du clone Verdanesa sur Maraval CA-74



Figure 40. Plante greffée du clone Lüina sur Maraval CA-74

De même que pour l'opération d'enracinement, nous avons constaté que le problème majeur du greffage in vitro, est la présence de nécroses apicales sur les apex des greffons de la variété Lüina. Ceci induit la mort des plantes au cours de l'acclimatation. Ce phénomène de nécrose apicale peut être expliqué par la manifestation des symptômes d'incompatibilité dite localisée entre porte-greffe et greffon. Les coupes histologiques (Figures 41 et 42) montrent bien un développement des tissus calleux qu'il n'y a pas de connexion entre les deux partenaires et retarde la mise en place des cellules organogènes responsables de la prolifération des tissus combliaux nécessaires à la croissance. Des résultats similaires ont été

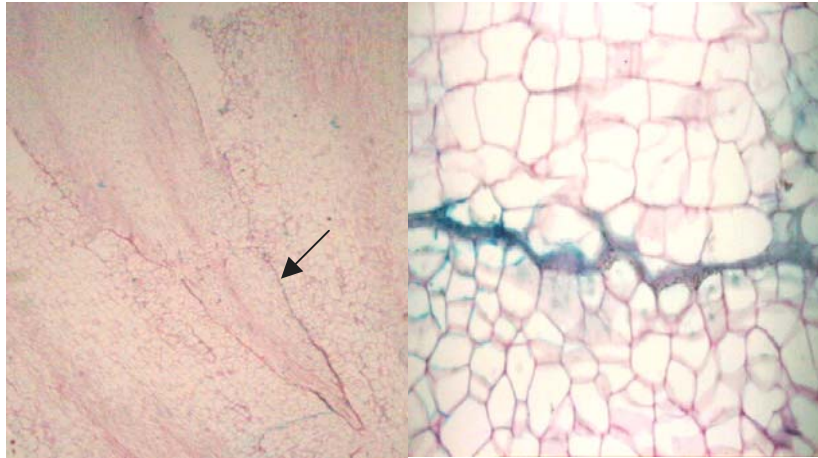
trouvés par (Huang et al. 1994) qui montrent le même phénomène d'incompatibilité de greffage chez le châtaignier asiatique. Ces auteurs notent qu'effectivement deux semaines après le greffage *in vitro*, les tissus méristématiques entrent en division active de part et d'autre des deux partenaires montrant que le stade physiologique de deux partenaires est adéquat qui se manifeste par une nutrition minérale et hormonale normale.

Cette incompatibilité localisée semble être due par la diffusion des substances inhibitrices provenant des cellules du greffon qui bloquent le développement des cellules du porte-greffe comme le montre (Moore, 1986). Le stade physiologique de la plante et les enzymes de polyphénols produits par la plante joue un rôle significatif dans la réussite de greffage comme le suggère (Deogratias et al. 1991) chez l'abricotier. Les mêmes auteurs montrent qu'il y a une corrélation inverse entre l'activité de peroxydase dans l'apex et son développement après le greffage.

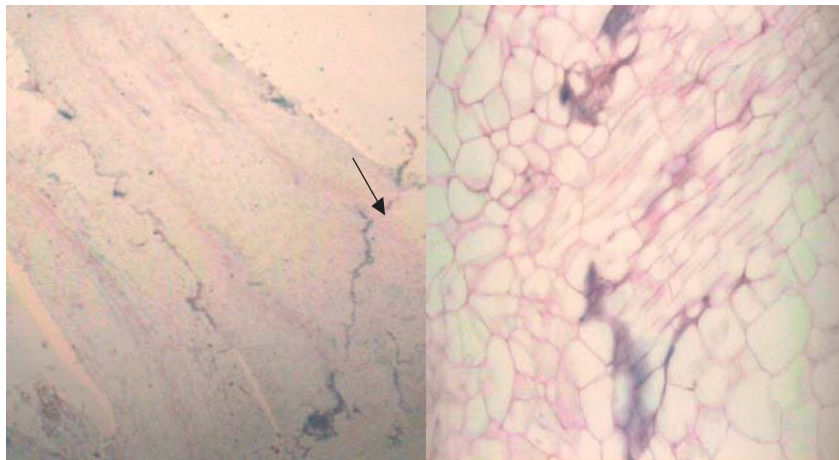
Contrairement à la variété Lüina, après deux semaines de greffage *in vitro* entre Verdanesa et Maraval CA-74, les tissus vasculaires entrent en division et en multiplication cellulaire active de part et d'autre (greffon et porte-greffe). Ce qui confirme les observations histologiques (Figures 43 et 44) qui mettent en évidence des zones de prolifération plus larges et plus nombreuses, alors que ces zones sont en petit nombre et peu développées chez Lüina. Les tissus vasculaires entrent en contact avec les tissus cambiaux, ainsi que les tissus épidermiques et les tissus vasculaires qui dévoilent la possibilité d'une connexion vasculaire: c'est un cas de compatibilité entre le porte-greffe et le greffon.

Pour le greffage au champ, le choix des porte-greffes totalement compatibles avec la majorité des variétés par les producteurs et les sélectionneurs de plants du châtaignier est difficile. Pour améliorer la situation et offrir des portes-greffes plus certains, le recours à des plants de *C. sativa* sélectionnés issus de semis peuvent être retenus comme porte-greffes pour leur bon comportement agronomique. D'autre part, la plantation directe des hybrides interspécifiques sélectionnés et compatibles avec plusieurs variétés et une susceptibilité de donner satisfaction comme porte-greffe résistant.

Ainsi, le greffage *in vitro* nous permet d'obtenir des plantes greffées et de détecter les incompatibilités précoces lesquelles se manifestent au champ parfois très tardivement après plusieurs années, entraînant par conséquent des pertes considérables pour les producteurs (Jonard et al. 1983).



Figures (41 et 42): Coupe longitudinale d'un plant greffé (Maraval CA-74: porte-greffe; Lüina: greffon) après deux semaines de culture (→ = incompatibilité entre partenaire)



Figures (43 et 44): Coupe longitudinale d'un plant greffé (Maraval CA-74: porte-greffe; Verdanesa: greffon) après deux semaines de culture (→ = émergence de connexion)

#### **8. 4 Conclusion**

En conclusion, l'ensemble des résultats expérimentaux concernant les conditions optimales de multiplication, de l'enracinement et de greffage *in vitro* réalisé dans ce travail, nous permet de confirmer:

- Grâce à l'action de la benzyladenine (0.2 mg/l) et (0.02 mg/l) d'auxine (IBA) introduit dans le milieu de multiplication, on peut obtenir un grand nombre de pousses utilisables à partir des bourgeons axillaires de trois clones (Maraval CA-74, Verdanesa et Lüina) pour le prochain stade d'enracinement et de greffage.
- Les pousses ainsi obtenues peuvent être enracinées moyennant un traitement à l'IBA 2 mg/l sur un milieu d'enracinement.
- Nos conditions d'expérimentation de greffage *in vitro* ainsi que le stade physiologique approprié du porte-greffe et du greffon ont permis la réussite du greffage.
- Les coupes histologiques effectuées sur des sujets greffés ont permis de visualiser, au niveau cellulaire, le degré de compatibilité entre partenaires.

## 9. Conclusions générales

À travers nos expériences effectuées au cours de ce travail, la conclusion générale concernera certains aspects principaux relevant de l'application des marqueurs moléculaires pour identifier et caractériser des espèces et des variétés du châtaignier, ainsi, que l'application de la culture *in vitro* pour multiplier intensivement et végétativement des clones intéressants.

La recherche des marqueurs moléculaires spécifiques par l'utilisation de quatre méthodes moléculaires (RAPD, AFLP, ISSR et SSR), nous a permis de détecter le polymorphisme entre les cultivars de chaque espèce et de produire des bandes polymorphes capables de différencier les cultivars. La méthode basée sur l'AFLP nous a permis de générer un grand nombre de bandes polymorphes par rapport aux autres méthodes utilisées dans ce travail.

L'étude de la variabilité génétique inter et intra clonale des variétés du châtaignier du sud des Alpes sur une base statistique solide, nous a permis de conclure que les variétés du châtaignier en Suisse italienne sont génétiquement très proches à cause de l'origine de l'espèce, des conditions et des techniques de culture. La méthode basée sur la RAPD, nous semble être la plus appropriée puisqu'elle regroupe mieux les variétés que les autres méthodes. Ces quatre marqueurs génétiques utilisés, nous apparaissent comme un outil très utile à l'étude génétique de l'espèce indigène. Ils enrichissent nos moyens d'actions pour d'autres volets, comme la sélection classique et peuvent être considérés comme une alternative aux méthodes actuelles basées sur les informations phénotypiques et généalogiques.

Pour mieux comprendre la diversité génétique de l'espèce indigène européenne (*Castanea sativa*), l'espèce japonaise (*Castanea crenata*) et l'espèce chinoise (*Castanea mollissima*), ces quatre méthodes ont été utilisées afin de créer des programmes d'amélioration variétale. D'après nos résultats préalables, on peut en déduire que les méthodes basées sur la RAPD et la SSR sont peut être les plus appropriées pour bien étudier la variabilité interspécifique, par contre, seule la RAPD peut bien séparer les espèces pour étudier la variabilité intraspécifique. L'analyse en coordonnées principales et le dendrogramme basés sur les données de RAPD permet bien de différencier les espèces et d'expliquer la variabilité génétique interspécifique. L'utilité de ces marqueurs génétiques nous apparaîtra primordiale puisqu'ils produisent une grande source d'informations sur la structure génétique des espèces et dans le calcul des distances génétiques entre espèces et variétés. Ils nous sont apparus comme réalistes pour l'amélioration et la gestion des forêts.

Concernant l'apport des techniques de greffage *in vitro* pour la micropropagation de quelques clones intéressants pour leur valeur agronomique, nos résultats montrent que la multiplication, l'enracinement et le greffage *in vitro*, nous a permis d'obtenir non seulement des plantes entières greffées mais aussi, sur le plan pratique, capables d'être cultivées, justifiant ainsi l'adoption de nos conditions et nos méthodes pour produire des plants greffés.

Comme l'incompatibilité est un phénomène fréquent chez le châtaignier, par des examens histologiques, nous avons pu montrer un cas de compatibilité et un autre cas d'incompatibilité qui se manifeste par une discontinuité des vaisseaux vasculaires entre partenaires. Cette nouvelle technique nous permet d'éviter de longues années d'observation (rejet de greffe qui se manifeste à peu près après huit ans de greffage) au champ.

Afin de vérifier l'efficacité et l'utilité de cette technique, des travaux ultérieurs peuvent être réalisés tout en élargissant le spectre des variétés autochtones étudiées, voire l'introduction des variétés étrangères économiquement valorisantes. Pour étudier la compatibilité (ou incompatibilité) entre les partenaires, sur le plan pratique, le recours à des nouvelles méthodes fiables autre que l'étude histologique comme la recherche d'un marqueur biochimique (une protéine spécifique, des anticorps spécifiques, etc.) peuvent être une alternative intéressante pour déceler la compatibilité ou l'incompatibilité entre porte greffe et greffon.

# **Bibliographie**

Anagnostakis SL (1987) Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* **79**:23-27

Aranzana MJ, Carbo J and Arus P (2003) Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theor Appl Genet* **106**:1341-1352

Aravanopoulos FA, Drouzas DA and Alizoti PG (2001) Electrophoretic and quantitative variation in chestnut (*Castanea sativa* MILL.) in Hellenic populations in old-growth natural and coppice stands. *For Snow Landsc Res* **76**:429-434

Arcade A, Anselin F, Faivre Rampant P, Lesage MC, Pâques LE and Prat D (2000) Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor Appl Genet* **100**:299-307

Barba M, Cupidi A, Loreti S, Faggioli F and Martino L (1995) In vitro micrografting: a technique to eliminate peach latent mosaic viroid from peach. *Acta Horticulturae* **386**:531-535

Bazzigher G und Miller G (1987) Selektion Endothia-Widerstandsfähiger kastanien in der Schweiz, eine quelle wertvollen Erbgutes. *Schweiz Z Fortstwes* **138**:799-813

Beaumont VH, Mantet J, Rocheford TR and Widholm JM (1996) Comparison of RAPD and RFLP markers for mapping F<sub>2</sub> generations in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* **93**:606-612

Bergamini A (1975) Osservazioni sulla morfologia florale di alcune cultivar di castagno. *Riv Ortofloro frut It* **59**:103-108

Bohn M, Utz HF and Melchinger AE (1999) Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci* **39**:228-237

Botta R, Akkak A, Marinoni D, Bounous G, Kampfer S and Steinkellner H (1999) Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. *Acta Horticulturae* **494**:277-280

Botta R, Marinoni D, Beccaro G, Akkak A and Bounous G (2001) Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. *For Snow Landsc Res* **76**:425-428

Bounous G et Paglietta R (1982) Castanéiculture fruitière = Situation et possibilités de relance, *Fruiticoltura* **44**:15-24

Bourrain L and Navatel JC (2000) Chestnut micropropagation – Influence of riboflavine on rooting technique. In: COST G4 Extended Abstracts – Multidisciplinary Chestnut Research, WG1, Physiology, Thessaloniki, Greece, 61-62.

Breisch H (1995) Châtaignes et marrons. Ed. Ctifl Paris, 239 p.

- Breviglieri N (1951) Ricerche sulla biologia fiorale e di fruttificazione della *Castanea sativa* e *Castanea crenata* nel territorio Vallombroso. Centro Studi sul Castagno **1**:15-50
- Bruneton-Governatori Ariane (1984) Le pain de bois, ethnohistoire de la châtaigne et du châtaignier. Ed. Eché, 533p.
- Camus A (1929) Les châtaigniers. Monographie des genres *Castanea* et *castanopsis*. Encycl Econ Sylvic **3**:1-604
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M and Villani F (2001) A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. Theor Appl Genet **102**:1190-1199
- Cervera MT, Gusmao J, Steenackers M and Van Gysel A (1996) Application of AFLP™ – based molecular markers to breeding of *Populus* spp. Plant growth Regulation **20**:47-52
- Chan KF and Sun M (1997) Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus* Theor Appl Genet **95**:865-873
- Chauvin JE and Salesses G (1988) Advances in chestnut micropropagation (*Castanea* sp). Acta Horticulturae **227**:340-345
- Cheng YJ, Guo WW and Deng XX (2003) Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. Plant Cell Reports **21**:445-451
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. Theor Appl Genet **99**:65-72
- Coart E, Lamote V, De Loose M, Van Bockstaele E, Lootens P and Roldan-Ruiz I (2002) AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species [*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in Flemish populations. Theor Appl Genet **105**:431-439
- Conedera M, Müller-Starck G and Fineschi S (1993) Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. (I) Inventory of chestnut varieties: History and perspectives. Proceeding of the international congress on chestnut. Spoleto, Italy, 299-302
- Conedera M (1994) Inventario e caratterizzazione genetica delle varietà nostrane di castagno da frutto. Boll Soc Tic Scie Nat **94**:212-228
- Conedera M (1996) Die Kastanie: der Brotbaum. Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft der Waldfrucht par excellence. Bündnerwald **49**:28-46
- Conedera M, Jermini M et Sassella A (1997) Nouvelles perspectives pour la culture du châtaignier au sud des Alpes. Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture. **29**:01-07

- Conedera M (1997) Les variétés de châtaignes du sud des alpes en suisse. Fruits oubliés **97**:1–2
- Crandall BS, Gravatt GF and Ryan MM (1945) Root disease of *castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *phytophthora cinnamomi*. Phytopathology **35**:162-180
- Deogratias J M et Dosba F (1986) Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés in vitro en vue de l'élimination de trois types de particules virales (CLSV, PDV et NRSV). Fruits **41**:675-680
- Deogratias JM, Castellani V, Dosba F, Juarez J, Arregui JM, Ortega C, Ortega V, Llacer G and Navarro L (1991) Study of growth parameters on apricot shoot-tip grafting in vitro (STG). Acta Horticulturae **293**:363-371
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arus P and Laigret F (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). Theor Appl Genet **105**:127-138
- Driver AJ and Kuniyuki AH (1984) In vitro propagation of paradox Walnut rootstock. HortScience **19**:507-509
- Dode LA (1908) "Sur les châtaigniers." Bull. Soc. Dendr. France. 140-159
- Dodeman VL, Ducreux G and Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. J Experiment Botany **48**:1493-509
- Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, Windus JL and Wolfe AD (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* spp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Mol Ecol **8**:443-451
- Evans KM., Ladiges PY, Newbigin E and Ades PK (2001) Genetic variation in *Banksia saxicola* (Proteaceae), a rare Australian plant with a markedly disjunct distribution. Plant Systematics and Evolution. **227**:105-115
- Fahima T, Sun GL, Beharav A, Krugman T, Beiles A and Nevo E (1999) RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. Theor Appl Genet **98**:434-447
- Fenaroli L (1945) Il Castagno. Roma
- Fernandez ME, Figueiras AM and Benito C (2002) The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor Appl Genet **104**:845-851
- Fineschi S (1988) Short note: Genetics of chestnut (*Castanea sativa* Mill.)II. Uniformity of Isozyme phenotypes in grafted orchards. Silvae Genetica **37**:82-83

- Fineschi S, Turchini D, Müller-starck G and Conedera M (1993) Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. III. Analysis of RAPDs molecular markers. Proceeding of the International Congress on Chestnut. Spoleto,309-313
- Fineschi S, Malvolti ME, Morgante M, Vendramin GG (1994) Allozyme variation within and among cultivated varieties of sweet chestnut (*Castanea sativa*). Can J For Res **24**:1160-1165
- Fineschi S, Turchini D, Villani F and Vendramin GG (2000) Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. Molecular Ecology **10**:1495-1504
- Fisher MC, Koenig G, White TJ, and Taylor JW (2000) A Test for Concordance Between the Multilocus Genealogies of Genes and Microsatellites in the Pathogenic Fungus *Coccidioides immitis*. Mol Biol Evol **17**:1164-1174
- Fossati T, Labra M, Castiglione S, Failla O, Scienza A and Sala F (2001) The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". Theor Appl Genet **102**:200-205
- Francllet A (1981) Rajeunissement et micropropagation des ligneux. Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, AFOCEL, 55-64
- Franks T, Botta R, Thomas MR and Franks J (2002) Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. Theor Appl Genet **104**:192-199
- Fracaria N and Lefranc M (1992) Le commerce de la châtaigne: un nouvel aspect dans l'étude de la différenciation génétique de populations de châtaigniers (*Castanea sativa* Mill.) en France. Ann Sci For **49**:75-79
- Gaiotto FA, Bramucci M and Grattapaglia D (1997) Estimation of outcrossing rate in a breeding population of Eucalyptus urophylla with dominant RAPD and AFLP markers. Theor Appl Genet **95**:842-849
- Galderisi U, Cipollaro M, Di Bernardo G, De Masi L, Galano G and Cascino A (1998) Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis. J Horticult Sci Biotech.**73**:259-263
- Gallois A, Audran JC and Burrus M (1998) Assessment of genetic relationships and population discrimination among *Fagus sylvatica* L. by RAPD. Theor Appl Genet **97**:211-219
- Garcia-Mas J, Oliver M, Gomez-Paniagua H and de Vicente MC (2000) Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. Theor Appl Genet **101**:860-864
- Gianfranceschi L, Seglias N, Turchini R, Komjanc M and Gessler C (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor Appl Genet **96**:1069-1076
- Giannini R, Rossi P and Vendramin GG (1993) Allozyme variation within and among "Marrone fiorentino" cultivated varieties.

Proceeding of the International Congress on Chestnut. Spoleto, 327-330

Giovannelli A and Giannini R (2000) Reinvigoration of mature chestnut (*Castanea stiva*) by repeated graftings and micropropagation. *Tree Physiology* **20**:1243-1248

Godwin ID, Aitken EAB and Smith LW (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* **18**:1524-1528

Gonçalves JC, Diogo G and Amâncio S (1998) In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* **72**:265-275

Gomes-Pereira J, Pinto de Abreu C and Gonçalves JC (1993) Selection of *castanea* interspecific hybrids resistant to *Phytophthora* sp. for use as European chestnut rootstocks. Proceeding of the International Congress on Chestnut, Spoleto, 361-363

Goulão L, Valdivieso T, Santana C and Moniz Oliveira C (2001) Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *Genetic Resources and Crop Evolution* **48**:329-338

Guadagnuolo R, Savova-Bianchi D, Keller-Senften J and Felber F (2001) Search for evidence of introgression of wheat (*Triticum aestivum* L.) traits into sea barley (*Hordeum marinum* s.str. Huds.) and bearded wheatgrass (*Elymus caninus* L.) in central and northern Europe, using isozymes, RAPD and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* **103**:191-196

Guo WW and Deng XX (1998) Somatic hybrid plantlets regeneration between Citrus and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. *Plant Cell Reports* **18**:297-300

Gupto M, Chyi YS, Romero-severson J and Owen JL (1989) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using simple primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* **89**:998-1006

Hashmi G, Huettel R, Meyer R, Krusberg L and Hammerschlag F (1997) RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Rep* **16**:624-627

Hess J, Kadereit JW and Vargas P (2000) The colonization history of *Olea europea* L. In Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mol Ecol* **9**:857-868

Hiromori Akagi, Ymi YokoZeki, Akiko Inagaki, Atsushi Nakamura and Tatsuhito Fujimura (1998) A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, RF-1, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome* **39**:1205-1209

Huang Shu-Ching and Millikan DF (1980) In vitro micrografting of Apple shoot tips. *HortScience* **15**:741-743

Huang H, Norton JD, Boyhan GE and Abrahams BR (1994) Graft compatibility among Chestnut (*Castanea*) species. *J Amer Soc Hort Sci* **119**:1127-1132

- Huang H, Dane F and Norton JD (1994) Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.). *Theor Appl Genet* **88**:981-985
- Huang H, Dane F and Norton JD (1994) Genetic analysis of 11 polymorphic Isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes. *J Amer Soc hort Sci* **119**:840-849
- Huang H, Dane F and Kubisiak T L (1998) Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut (Fagaceae). *Amer J Bot* **85**:1013-1021
- Huang W-G, Cipriani G, Morgante M and Testolin R (1998) Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species. *Theor Appl Genet* **97**:1269-1278
- Huang BX, Peakall R, and Hanna P J (2000) Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Marine Biology* **136**:207-216
- Jonard R, Hugard J, Macheix JJ, Martinez J, Mosella-Chancel L, Poessel JL and Villemur P (1983) In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae* **20**:147-159
- Jonard R, Luckman D, Schall F et Villemur P (1988) Essai de contrôle précoce des incompatibilités au greffage chez deux espèces fruitières: abricotier et citronnier, à l'aide de plusieurs techniques de culture in vitro: microgreffage, associations d'entre-nœuds, fusion de cals, suspension cellulaires.  
8<sup>e</sup> Colloque sur les Recherches Fruitières- Bordeaux, 239-253
- Kantety RV, Zeng X, Bennetzen JL and Zehr BE (1995) Assessment of genetic diversity in dent and poPCoArn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* **1**:365-373
- Kiyoto M, Masahiro K, Kunio A and Tadao M (2001) Phylogeny and Biogeography of Wood-Feeding Cockroaches, Genus *Salganea* Stal (Blaberidae: Panesthiinae), in Southeast Asia Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Journal of Molecular Evolution* **53**:651-659
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K and Ogihara Y (1998) Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor Appl Genet* **96**:37-45
- Kölliker R, Jones ES, Drayton MC, Dupal MP and Forster JW (2001) Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). *Theor Appl Genet* **102**:416-424
- Lanham PG and Brennan RM (1999) Genetic characterisation of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR, and AFLP markers. *J Hort Sci Biotech* **74**:361-366

- Lavialle GB (1906) Le châtaignier. Vigot Frères éditeurs, Paris, 286.
- Lê C L (1985) La micropropagation Revue suisse Vitic Arbori Hortic **17**:347-349
- Lê C L (1992) Multiplication in vitro du châtaignier (*Castanea sativa* Mill.)1. Etablissement et multiplication in vitro. Recherche agronomique en Suisse **31**:129-142
- Lefebvre V, Goffinet B, Chauvet JC, Caromel B, Signoret P, Brand R and Palloix A (2001) Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. Theor Appl Genet **102**:741-750
- Lieutaghi P (1969) Le livre des arbres, arbustes et arbrisseaux. Robert Morel editeur. Vol.A. p 370-390
- Lin JJ, Kuo J and Ma J (1996) A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. Nucleic Acids research **24**:3649-3650
- Loudyi Walali (1993) La multiplication in vitro des espèces ligneuses : état actuel et perspectives de développement. In. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes. Ed. Aupelf-Uref. John libbey Eurotext, Paris, pp. 399-409
- Luraschi P, Mottis P and Plozza L (1994) Differenziazione di varietà di castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) in base alla morfologia fogliare. Unveröffentlicht. Diplomarbeit an der Professur für Forstschutz und Dendrologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, 162.
- Maguire TL, Peakall R and Saenger P (2002) Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. Theor Appl Genet **104**:388-398
- Mato MC and Vieitez AM (1986) Changes in auxin protectors and IAA oxidases during the rooting of chestnut shoots in vitro. Physiologia Plantarum **66**:491-504
- Malvolti ME and Fineschi S (1987) Analysis of enzyme systems in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Genet Agr **41**:243-256
- Mancuso S, Ferrini F and Nicese FP (1999) Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) genotype identification: An artificial neural network approach. Journal of Horticultural Science & Biotechnology **74**:777-784
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res **27**:209-220
- Matyas G and Sperisen C (2001) Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial re-colonisation of oaks (*Quercus* spp.) across the Swiss Alps. Theor Appl Genet **102**:12-20
- Maughan PJ, Saghai Maroof MA, Buss GR and Huestis GM (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor Appl Genet **93**:392-401

- Meerow Alan W, Wisser Randall J, Brown Steven J, Kuhn David N, Schnell Raymond J and Broschat Timothy K (2003) Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theor Appl Genet* **106**:715-726
- Meerow Alan W, Wisser Randall J, Brown Steven J, Kuhn David N, Schnell Raymond J and Broschat Timothy K (2003) Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theor Appl Genet* **106**:715-726
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W and Waugh R (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed* **3**:127-136
- Miranda-Fontañá ME and Fernández-López J (2001) Genotypic and environmental variation of *Castanea crenata* x *C. sativa* and *Castanea sativa* clones in aptitude to micropropagation. *Silvae Genetica* **50**:3-4
- Moore A (1986) Graft compatibility between pear and quince : the influence of metabolites of *Cydonia oblonga* on suspension cultures of *Pyrus communis*. *Amer J Bot* **73**:01-04
- Morimoto Y, Shimada T, Ozaki T, Nomura K, Araki H. and Yoshida M (1997) Identification and relationship of Japanese chestnut varieties by RAPD and southern blot analysis. *Sci rep fac Agr Kobe Univ* **22**:63-69.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Murashige T, Bitters W P, Rangant T S, Nauer E M, Roistacher C N and Holliday P B (1972) A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *Hort Science* **7**:118-119
- Mulcahy DL, Cresti M, Sansavini S, Douglas GC, Linskens HF, Bergamini Mulcahy G, Vignani R and Pancaldi M (1993) The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae* **54**:89-96
- Müller-Starck G, Conedera M, and Fineschi S (1993) Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. (II) Genetic inventory based on enzyme gene markers. *Proceeding of the International Congress on Chestnut. Spoleto*, 303-307
- Nagaoka T and Ogihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* **94**:597-602
- Navarro L, Roistacher C N and Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. *J Amer Soc Hort Sci* **100**:471-479

- Navarro L (1988) Application of shoot-tip grafting in vitro to woody species. *Acta Horticulturae* **227**:43-55
- Ni J, Colowit PM, Oster JJ, Xu K and Mackill DJ (2001) Molecular markers linked to stem rot resistance in rice. *Theor Appl Genet* **102**:511-516
- Oraguzie NC, Paterson AM and McNeil DL (1999) Origin and relationships of New Zealand chestnut (*Castanea sp. Fagaceae*) selections reflect patterns of graft failure. *Plant Syst Evol* **218**:193-204
- Panda S, Martin JP and Aguinagalde I (2003) Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the Brassica oleracea L. group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis. *Theor Appl Genet* **106**:1122-1128
- Pasqualone A, Caponio F and Blanco A (2001) Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *European Food Research and Technology* **213**:240-243
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G and Motto M (1998) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet* **97**:1248-1255
- Pereira MJ, Castro LF, Torrea-Pereira JM and Lorenzo SP (1999) Isozyme polymorphisms in Portuguese chestnut cultivars. *Acta Horticulturae* **494**:283-286
- Pereira- Lorenzo S, Fernandez- Lopez J and Moreno-Gonzalez. (1996) Variability and grouping of Northwestern Spanish Chestnut cultivars.II. Isoenzyme traits. *J Amer Soc Hort Science* **121**:190-197
- Pereira-Lorenzo S. and Fernandez-Lopez J (1997) Propagation of chestnut cultivars by grafting: Methods, rootstocks and plant quality. *Journal of Horticultural Science* **72**:731-739
- Pereira-Lorenzo S and Fernandez-Lopez J (1997) Description of 80 cultivars and 36 clonal selections of chestnut (*Castanea sativa* MILL.) from Northwestern Spain. *Fruit Varieties Journal* **51**:13-27
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Díaz-Hernández B, Ascasíbar-Errasti J, Sau F and Ciordia-Ara M (2001) Spanish chestnut cultivars. *HortScience* **36**:344-347
- Perry MD, Davey MR, Power JB, Lowe KC, Bligh HFJ, Roach PS and Jones C (1998) DNA Isolation and AFLP<sup>TM</sup> Genetic Fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.) *Plant Molecular Biology Reporter* **16**:49-59
- Piccioli L (1922) Monografia del castagno. Suoi caratteri morfologici, varietà, coltivazione, prodotti e nemici. Stabilimento Tipo-Litografico G. Spinelli, Firenze, 400
- Pigliucci M, Benedetelli S and Villani F (1990) Spatial patterns of genetic variability in Italian chestnut (*Castanea sativa*). *Can J Bot* **68**:1962-1967

- Pillay M, Ogundiwin E, Nwakanma DC, Ude G and Tenkouano A (2001) Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germplasm. *Theor Appl Genet* **102**:965-970
- Pittet Jean-Robert (1986) *Terres de Castanide. Hommes et paysages du châtaignier de l'Antiquité à nos jours.*, librairie Arthème Fayard, 479p
- Porebski S, Bailey G and Baum RB (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* **15**:08-15
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding* **2**:225-238
- Renganayaki K, Read JC. and Fritz AK (2001) Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* **102**:1037-1045
- Reyne Jack (1984) Marrons et châtaignes d'Ardèche, Aubenas, Syndicat des producteurs de châtaignes et marrons de l'Ardèche, 190 p In: Jean-Robert Pitte (1986) *Terres de Castanide. Hommes et paysages du châtaignier de l'Antiquité à nos jours.* Librairie Arthème Fayard, 479 p
- Ricci R (1916) Le castagne del circondario di Mondovì; possibile raggruppamento delle varietà. *It Agr* **53**:546-560
- Roistacher CN, Navarro L and Murashige T (1976) Recovery of Citrus selections free of several viruses : Exorcortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot tip grafting in vitro. Proc. 7 th Conf. Inter. Organization Citrus virology reverside –University of California (USA), 186-193
- Rousseaux L (1987) Des châtaigniers pour le 23<sup>e</sup> siècle. *La France agricole* **2216**:30-31
- Rudow A and Conedera M (2001) Blüte und Sortenerkennung bei der Edelkastanie (*Castanea sativa* Mill.) auf der Alpensüdseite der Schweiz. *Bot Helv* **111**:1-23
- Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A, Powell W and Waugh R (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* **95**:714-722
- Salesses G, Chapa J and Chazerans P (1993) The chestnut in France -Cultivars- Breeding programs. Proceeding of the International Congress on Chestnut, Spoleto, 331-337
- Sanchez MC and Vieitez AM (1991) In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiology* **8**:59-70
- San-Jose M C, Ballester A and Vieitiz A M (1988) factors affecting in vitro propagation of *Quercus robur* L. *Tree Physiology* **4**:281-290

- Sawano M, Ichii T, Nakanishi T, and Kotera Z (1984) Studies of the identification of chestnut species and varieties by isozyme analysis. Scientific report of the Faculty of Agriculture, Kobe University **16**:67-71
- Schloss SJ, Mitchell SE, White GM, Kukatla R, Bowers JE, Paterson AH and Kresovich S (2002) Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor Appl Genet* **105**:912-920
- Seabra CR, Simões AM, Baeta J, Pais MS (2001) Evaluation of Portuguese chestnut stands by RAPDs. *For Snow Landsc Res* **76**:435-438
- Semal J, Lepoivre P, Meulemans M and Viseur J (1989) Culture de tissus et nouvelles techniques d'amélioration des végétaux. *Parasitica* **40**:77-88.
- Shoyama Y, Xuan Xuan Zhu, Nakai R, Shiraishi S and Kohda H (1997) Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Cell Rep* **16**:450-453
- Sneath PHA and Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co, San Francisco.
- Snir I (1982) In vitro propagation of sweet cherry cultivars. *HortScience* **17**:192-193
- Solignat G (1973) Un renouveau de la châtaigneraie fruitière. INRA. Centre de Recherches Agronomiques de Bordeaux. Extrait du « Bulletin Technique d'Information » **280**:1-25
- Solignat G et Chapa J (1975) Principales espèces de châtaignier. Brochure INVUFLEC (Institut National de Vulgarisation pour les Fruits, Légumes et Champignons), INRA, Bordeaux.15-28
- Solignat G et Chapa J (1975) Biologie florale. Brochure INVUFLEC (Institut National de Vulgarisation pour les Fruits, Légumes et Champignons), INRA, Bordeaux.29-35
- Steinkellner H, Fluch S, Turetschek E, Lexer C, Streiff R, Kremer A, Burg K and Glössl J (1997) Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub>- microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant molecular Biology* **33**:1093-1096
- Storchova H, Chrtek Jr. J, Bartish IV, Tetera M, Kirschner J and Stepanek J (2002) Genetic variation in agamosperous taxa of *Hieracium* sect. *Alpina* (Compositae) in the Tatry Mts. (Slovakia). *Plant Systematics and Evolution* **235**:1-17
- Sudupak MA, Akkaya MS and Kence A (2002) Analysis of genetic relationships among perennial and annual *Cicer* species growing in Turkey using RAPD markers. *Theor Appl Genet* **105**:1220-1228
- Suh Y, Lee J, Lee S, Lee C, Yeau S-H. and Lee NS (2002) Molecular evidence for the taxonomic identity of Korean *Adonis* (Ranunculaceae). *Journal of Plant Research* **115**:217-223

Tanaka K, Tsumura Y and Nakamura T (1999) Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. japonica*.

Thomas MR, Matsumoto S, Cain P and Scott NS (1993) Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor Appl Genet* **86**:173-180

Ufuk S and Soylu A (1999) Researches on stock-scion compatibility between some important chestnut cultivars and hybrid rootstocks. *Acta Hort* **494**:223-229

Uptmoor R, Wenzel W, Friedt W, Donaldson G, Ayisi K and Ordon F (2003) Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet* **106**:1316-1325

Valle G (1959) Osservazioni sulla morfologia dei rami di un anno in abito invernale in alcune cultivar di *Castanea sativa* Mill. Centro di studio sul castagno, pubblicazione N° **5**:5-94

Van de Wouw M, Maxted N, Chabane K and Ford-Lloyd BV (2001) Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Plant Systematics and Evolution* **229**:91-105

Van den Berg RG, Bryan GJ, del Rio A and Spooner DM (2002) Reduction of species in the wild potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR data. *Theor Appl Genet* **105**:1109-1114

Vieitez AM, Sanchez C and San-Jose C (1989) Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak *Acta Hort* **41**:101-109

Vigiani D (1919) Le varietà di castagno ed i criteri da seguirsi per classificarle. *Atti. R. Acc. georgofili XV*:38-73

Villani F, Pigliucci M., Benedettelli S and Cherubini M (1991) Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity* **66**:131-136

Villani F, Cherubini M, Parducci L, Pigliucci M and Sun O (1993) Genetic diversity of *Castanea sativa* Mill. in Europe: Theoretical aspects and applied perspectives. *Proceedings of the International Congress on Chestnut*. Spoleto, 281-284

Villani F, Sansotta A, Cherubini M, Cesaroni D and Sbordoni V (1999) Genetic structure of natural populations of *Castanea sativa* in Turkey: evidence of a hybrid zone. *J Evol Biol* **12**:233-244

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kniper M and Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407- 4414

Wang G, Mahalingaur R and Knap HT (1999) (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in Soybean, *Glycine max* (L) Merr. *Theor appl genet* **96**: 1086-1096

- Waugh R, Bonar N, Baird E, Thomas B, Graner A, Hayes P and Powell W (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley MGG. *Molecular & General Genetics* **255**:311-321
- Welsh JM and McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**:6531-6535
- White PR (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Pl Physiol, Lancaster* **9**:585-600
- Williams JGK, Kubelik AR, Livek KJ, Rafalski JA and Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids Res* **18**:6531-6535
- Wolfe AD, Xiang QY and Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol Eco* **17**:1107-1125
- Xing Z, Satchwell F M, Powell AW and Maynard C A (1997) Micropropagation of American chestnut: Increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis. *In Vitro Dev Biol Plant* **33**:43-48
- Yamamoto T, Shimada T, Kotobuki K, Morimoto Y and Yoshida M (1998) Genetic characterization of Asian chestnut varieties assessed by AFLP. *Breeding Science* **48**:359-363
- Zietkiewicz EW, Rafalski A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**:176-183
- Zrýd JP (1988) Cultures de cellules, tissus et organes végétaux, fondements théoriques et utilisations pratiques. Presses Polytechniques Romandes, 305 P

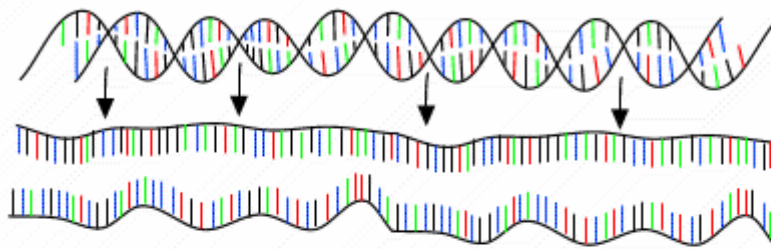
## **Annexes**

**Tableau 11.** Milieux de culture de base utilisés pour la multiplication et l'enracinement du châtaignier

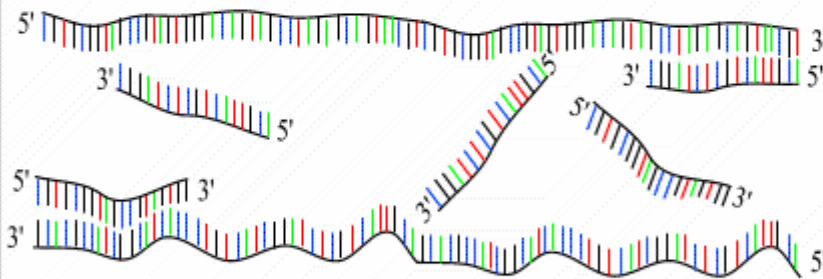
<b>Constituants</b>	<b>Milieu de multiplication</b> (Driver and Kuniyuki, 1984)	<b>Milieu d'enracinement</b> (Bourrain and Navatel, 2000)
<b>Macro-éléments (mg/l)</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.54	1.40
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	440
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	500
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.69	184
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29	270
KNO <sub>3</sub>	-	360
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	256
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.8	-
<b>Micro-éléments (mg/l)</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24	12.4
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169	0.758
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	82.5	8.6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1	0.25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0.025
Nafe EDTA	40	40
KI	-	0.08
<b>Vitamines (mg/l)</b>		
Thiamine-HCl	4	0.2
Acide nicotinique	2	1
Myo-Inositol	100	100
Glycine	4	4
Pyrodixine	-	1
<b>Substances de croissance g/l</b>		
Saccharose	-	30
Fructose	30	-
Ac.β-indolylbutyrique (AIB)	0.02	0.002
Benzyladénine (BA)	0.2	-
Agar	9	7

# PCR : Polymerase Chain Reaction

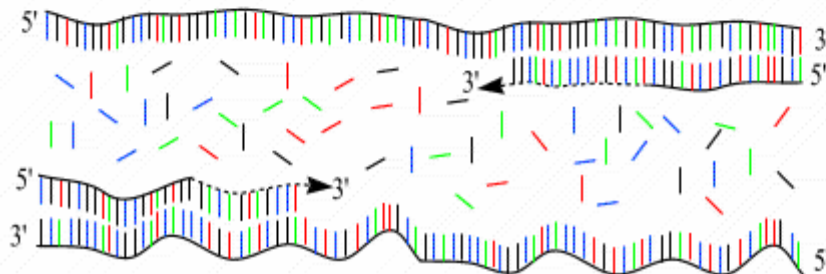
30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation



Step 2 : annealing



Step 3 : extension

Figure 45. Principales étapes de la PCR.