



# MICROGREFFAGE *IN VITRO* DU CERISIER

## MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE SPÉCIFIQUE À L'ESPÈCE

### RÉSUMÉ

Un diagnostic précoce des incompatibilités variété/porte-greffe est nécessaire pour lancer sur le marché un nouveau matériel végétal. Une technique *in vitro* de microgreffage en fente de la variété Regina (*Prunus avium* L.) sur le porte-greffe Piku® 1 [*P. avium* x (*P. canescens* x *P. tomentosa*)] est présentée comme modèle pour l'espèce cerisier. Des bourgeons issus de culture *in vitro*, taillés en V, ont été utilisés comme source de greffon. Des pousses induites *in vitro* pour l'enracinement ont été, quant à elles, utilisées comme porte-greffe. Différents paramètres ont été évalués. Des pourcentages de réussite au greffage de 80 %, 4 semaines après greffage et de 58 %, 3 mois après acclimatation ont été obtenus avec le protocole le plus efficient.

### **IN VITRO MICROGRAFTING OF CHERRY TITLE : DEVELOPMENT OF A PROTOCOL SPECIFIC TO CHERRY**

Early identification of compatibility between cherry varieties and rootstocks is required to launch new plant material on the market. An *in vitro*, slit-micrografting technique of *Prunus avium* L. 'Regina' onto 'Piku® 1' rootstock [*P. avium* x (*P. canescens* x *P. tomentosa*)] is presented as a model for cherry. *In vitro* shoot tips, cut in a V-shape, were used as scions, while shoots induced for *in vitro* rooting were used as rootstocks. The success of various parameters was examined. The highest percentage of successful grafts (80 % 4 weeks after grafting and 58 % 3 months after acclimatisation) was obtained with the most efficient protocol.

*Cet article est une reprise en version française d'un article original paru en anglais dans la revue Journal of Horticultural Science & Biotechnology (www.jhortscib.com). Bourrain, L. and Charlot, G. (2014). In vitro micrografting of cherry (Prunus avium L. 'Regina') onto 'Piku® 1' rootstock [P. avium x (P. canescens x P. tomentosa)]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 89(1), p. 47-52.*



> PLANT MICROGREFFÉ DEUX MOIS APRÈS ACCLIMATATION



## CONTEXTE EXPÉRIMENTAL

La majorité des arbres fruitiers cultivés aujourd'hui est multipliée par greffage. Le microgreffage *in vitro*, développé dès 1972 sur *Citrus* par Murashige *et al.* (1972), est désormais utilisé communément en recherche et production (Monteuuis, 2012). Le microgreffage *in vitro* est une méthode efficace pour produire des plants sains à partir de plants virosés, sur *Citrus* (Abbas *et al.*, 2008), pêcher (Navarro *et al.*, 1982), cerisier (Deogratias *et al.*, 1985), amandier (Ghorbel *et al.*, 1998), abricotier (Deogratias *et al.*, 1991), et pommier (Huang and Millikan, 1980).

Les techniques développées dans les années 70 sont toujours utilisées pour l'introduction de nouveaux matériels dans les procédures de quarantaine. Elles sont également utiles pour rajeunir des arbres adultes (Ponsonby and Mantell, 1993). Elles permettent aussi les études physiologiques et histologiques des points de greffe (D'Khili *et al.*, 1996).

Le lancement sur le marché d'une nouvelle variété, ainsi que le renouvellement des vergers, peuvent être accélérés par microgreffage (Yildirim *et al.*, 2010). Il est considéré comme un outil utile pour la multiplication précoce et rapide de lignées dans le cadre de programmes d'amélioration variétale. Un autre atout du microgreffage *in vitro* est la capacité à s'affranchir des contraintes saisonnières, puisqu'il est possible d'obtenir des greffons et des porte-greffe d'âges physiologiques identiques, quelle que soit la période de l'année. Enfin, les incompatibilités variétés/porte-greffe peuvent être étudiées au moyen du microgreffage (Lê and Abdelhamid, 2004). Néanmoins, ceci n'a jamais été développé en routine pour le diagnostic précoce d'incompatibilité.

Plusieurs études ont été publiées sur le microgreffage du cerisier (Gebhardt and Goldbach, 1988 ; Ozzambak and Schmidt, 1991 ; Dziejczak and Malodobry, 2006 ; Amiri, 2007 ; Exadaktylou *et al.*, 2007), mais, jusqu'à présent, ces résultats sont restés limités, en raison de faibles taux de réussite au greffage. Les protocoles ont besoin d'être améliorés pour des applications plus larges, notamment lorsque des porte-greffe *in vitro* sont utilisés à la place de semis.

Le but de cette étude est de fournir un protocole fiable, reproductible et efficace qui pourrait être utilisé pour le diagnostic précoce des incompatibilités des nouvelles variétés avec les porte-greffe récemment sélectionnés et en cours de développement.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### ÉTABLISSEMENT DES CULTURES *IN VITRO*, SOURCES DES GREFFONS ET PORTE-GREFFE

La variété Regina (*Prunus avium* L.) et le porte-greffe Piku<sup>®</sup> 1 [*P. avium* x (*P. canescens* x *P. tomentosa*)] ont été utilisés comme modèle pour l'étude du microgreffage *in vitro* du cerisier. Regina est une variété tardive largement cultivée en France. C'est une variété libre, intéressante pour sa facilité de conduite, sa rapidité de mise à fruit, sa tolérance à *Monilia fructigena* et à l'éclatement, la fermeté de ses fruits et ses bonnes qualités post-récolte. Piku<sup>®</sup> 1 est un porte-greffe protégé de la station expérimentale de Dresden-Pillnitz (Allemagne). Piku<sup>®</sup> 1, porte-greffe nanisant, est excellent pour sa rapidité de mise à fruit, sa productivité, l'absence de drageon et ses tolérances à la chlorose, au stress hydrique et à l'asphyxie racinaire. Des scions de deux ans de Regina et des boutures d'un an de Piku<sup>®</sup> 1 ont été utilisés comme pieds mères. Les nouvelles pousses (1 à 2 cm de long) développées sous serre ont été désinfectées sous hotte à flux laminaire pendant 20 minutes dans une solution commerciale de javel [sodium dichloroisocyanurate, 0,6 % (w/v) chlore actif]. Après trois rinçages à l'eau stérile, les bourgeons excisés ont été repiqués individuellement en tube contenant 20 ml de milieu LP (Quoirin and Lepoivre, 1977) additionné de 0,4 – 0,6 mg l<sup>-1</sup> 6-benzyladenine (BAP), 0,2 mg l<sup>-1</sup> acide indole-3-butryrique (AIB), 0,2 mg l<sup>-1</sup> acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>), et 30 g l<sup>-1</sup> glucose. Le milieu est solidifié avec 0,8 % (w/v) d'agar (HP696; Kalys, Bernin, France). Le pH du milieu est ajusté à 5,6 avec 0,1 M NaOH avant autoclavage à 118 °C pendant 25 minutes. Les pousses régénérées sont ensuite micro-propagées et multipliées toutes les trois semaines dans des pots « Le Parfait » de 500 ml contenant 135 ml de milieu LP. Les couvercles en verre sont maintenus

par un film de 9 µm en polyvinyle de chlorure (Pro'Jet, Argenteuil, France).

À la fin d'un cycle de culture, les bourgeons de Regina sont utilisés comme microscions. Les pousses (3 à 4 cm de long) de Piku<sup>®</sup> 1 sont induites sur un milieu d'enracinement BdR (Bourrain and Navatel, 2002) additionné de 1,0 mg l<sup>-1</sup> AIB et de 30 g l<sup>-1</sup> de saccharose. Après 7 jours à l'obscurité à 23 °C ± 2 °C, les pousses de Piku<sup>®</sup> 1 sont utilisées comme porte-greffe pour le microgreffage.

### CONDITIONS DE CULTURE

Toutes les cultures sont maintenues en chambre de culture avec une photopériode de 16 heures, à l'aide de tubes fluorescents de type « cool-white » (TL-D 58W840) à 40 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> à 23 °C ± 2 °C.

### MICROGREFFAGE *IN VITRO*

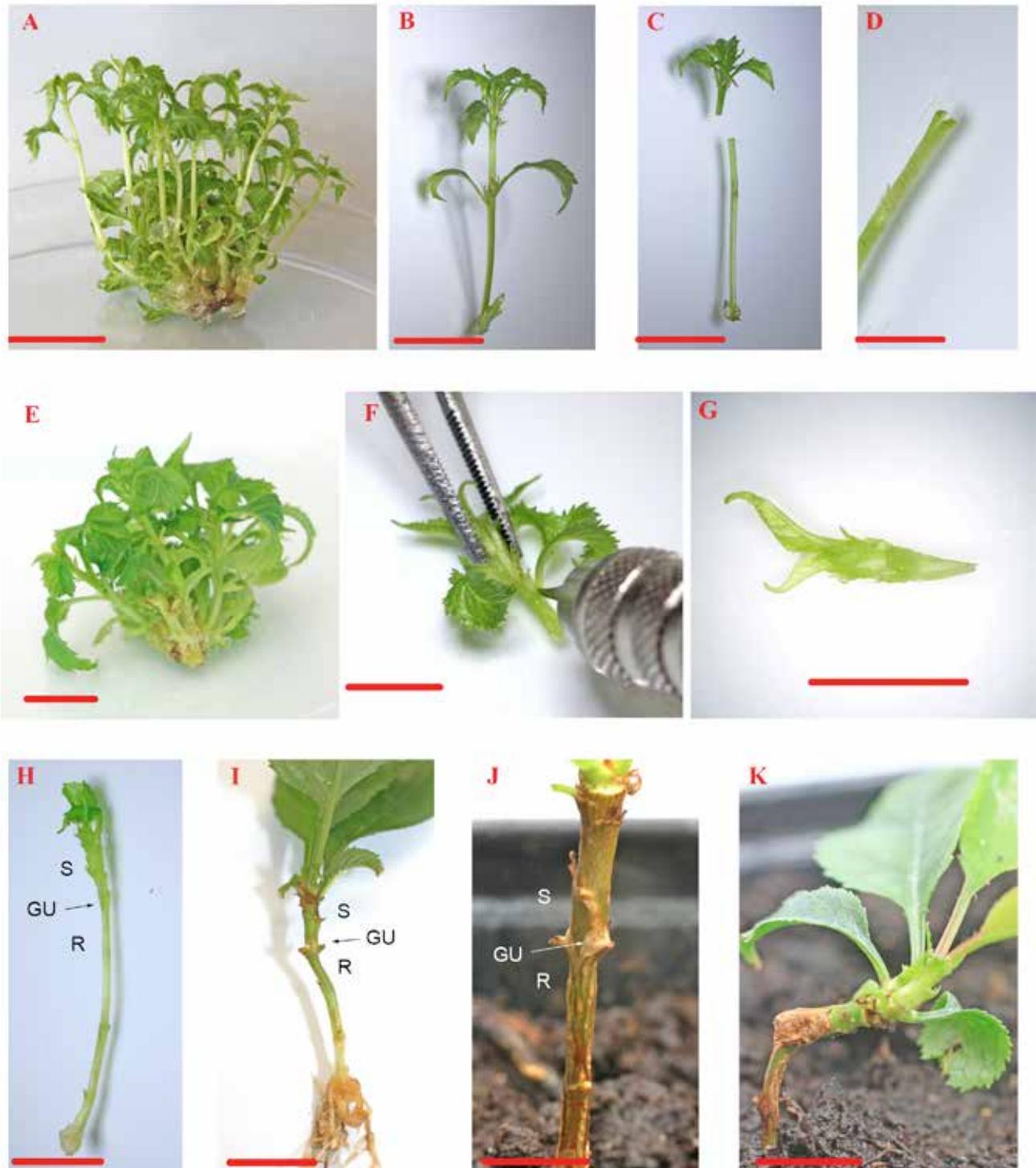
Des pousses de Piku<sup>®</sup> 1 et Regina de longueur et diamètre homogènes, sélectionnées en conditions aseptiques, ont été utilisées comme porte-greffe et greffons. Des fragments de lames de rasoir en acier inoxydable (0,15 mm d'épaisseur) montés sur des mandrins stériles sont utilisés pour préparer le matériel végétal sous loupe binoculaire. Un microgreffage en fente est réalisé. Après avoir ôté les feuilles et les bourgeons axillaires, le porte-greffe induit est décapité, une incision verticale de 1 à 2 mm est pratiquée au sommet. Une découpe en forme de V est réalisée sur le greffon qui est ensuite inséré rapidement dans la fente du porte-greffe afin d'éviter la déshydratation (Figure 1). Aucun clip ni scellement n'est utilisé pour maintenir le contact entre le porte-greffe et le greffon. La seule pression des parois du porte-greffe de part et d'autre du greffon est jugée suffisante pour le maintenir en place. Toute la procédure est réalisée rapidement sous hotte à flux laminaire stérile. Un maximum de 90 à 120 secondes est nécessaire de l'ouverture du pot contenant le porte-greffe à la transplantation de la microgreffe réalisée dans le milieu d'expression racinaire (Murashige and Skoog, 1962) sans régulateur de croissance. Les macroéléments sont dilués au quart et 30 g l<sup>-1</sup> de glucose sont ajoutés. Les conditions de culture sont identiques à celles de la phase de préparation du matériel végétal. Le milieu de culture est solidifié avec

0,8 % (w/v) d'agar additionné de vermiculite (Vermex M ; Efsol, Strasbourg, France) dans une proportion de 135:170 (v/v) milieu de culture/vermiculite. Le pH est ajusté à 5,6.

#### ACCLIMATATION DES MICROGREFFES

Les microgreffes réussies sont retirées des conditions *in vitro* au bout de quatre semaines. Elles sont rincées sous un fi-

let d'eau pour éliminer les restes de milieu de culture du système racinaire. Les plants greffés sont repiqués individuellement dans des pots plastiques (9 cm × 9 cm × 9,5 cm) contenant un mélange



> FIGURE 1 : PROCESSUS DE MICROGREFFAGE. A À D, PRÉPARATION DU PORTE-GREFFE. E À G, PRODUCTION DU GREFFON TAILLÉ EN BISEAU. H À J, DÉVELOPPEMENT DE LA MICROGREFFE. K, PROBLÈME DE SOUDURE AU POINT DE GREFFE PAR DÉPLACEMENT DU GREFFON EN RAISON DE L'APPLICATION DE BAP. (S) GREFFON, (R) PORTE-GREFFE, (GU) POINT DE GREFFE. ÉCHELLE = 10 MM (A À D ET H À K); 5 MM (E À G).



**TABLEAU 1 : EFFET DES TRAITEMENTS SUR LA RÉUSSITE AU MICROGREFFAGE**

Traitement		Réussite au greffage (%) 4 semaines après greffage			Réussite au greffage (%) 3 mois après acclimatation		
Structure du milieu de culture	Milieu gélosé	12	(-)	***	8	(-)	***
	Milieu gélosé + vermiculite	54	(+)	***	46	(+)	***
Source de carbone	30 g l <sup>-1</sup> glucose	79	(+)	ns	58	(+)	*
	75 g l <sup>-1</sup> glucose	67	(+)	ns	50	(+)	ns
	30 g l <sup>-1</sup> saccharose	58	(-)	ns	29	(-)	ns
	75 g l <sup>-1</sup> saccharose	58	(-)	ns	29	(-)	ns
Nombre de subculture	9 subcultures	67	(+)	ns	33	(=)	ns
	34 subcultures	50	(-)	ns	33	(=)	ns
Taille du greffon	3 mm	42	(+)	ns	42	(+)	ns
	5 mm	46	(+)	ns	33	(=)	ns
	10 mm	29	(-)	ns	25	(-)	ns
Traitement des tissus	100 mg l <sup>-1</sup> PVP	33	(+)	ns	29	(+)	ns
	1,0 mg l <sup>-1</sup> kinétine	21	(-)	ns	13	(-)	ns
	0,5 mg l <sup>-1</sup> BAP	42	(+)	ns	36	(+)	ns
	100 mg l <sup>-1</sup> acide ascorbique	12,5	(-)	**	8	(-)	*
	150 mg l <sup>-1</sup> acide citrique	29	(-)	ns	21	(-)	ns
	Pas de traitement	54	(+)	**	50	(+)	***

(-) : Effectif observé inférieur à l'effectif théorique ; (+) : Effectif observé supérieur à l'effectif théorique ; (=) : Effectif observé égal à l'effectif théorique.  
ns : Test du khi2 par case non significatif au seuil  $\alpha = 0,10$  ; \* : Test du khi2 par case significatif au seuil  $\alpha = 0,10$  ; \*\* : Test du khi2 par case significatif au seuil  $\alpha = 0,05$   
\*\*\* : Test du khi2 par case significatif au seuil  $\alpha = 0,01$ .

tourbe blonde/tourbe brune 70:30 (v/v) additionné de 30 kg m<sup>-3</sup> d'argile et de 1 kg m<sup>-3</sup> de fertilisant équilibré (AP10 ; Dumona, L'Isle d'Abeau, France). Les plants sont placés en serre en condition de lumière naturelle sous tunnel plastique à presque 100 % d'hygrométrie. L'humidité relative est obtenue à l'aide d'un humidificateur d'air adiabatique par atomisation (Defensor® ABS3 ; Walter Meier, Pfäffikon, Suisse). Pour acclimater les microgreffes aux conditions environnementales extérieures, l'humidité relative est diminuée sur une période de 15 jours par ouverture progressive du tunnel plastique. Les plants greffés sont irrigués selon besoins et fertilisés une fois par semaine par un engrais commercial liquide équilibré (Liquoplant 2,5-2,5-7 + 1,4 MgO + oligo-éléments ; Plantin, Courthézon, France).

#### PARAMÈTRES ÉTUDIÉS

Différents essais ont été mis en œuvre afin de déterminer quels facteurs influençaient le taux de réussite au greffage. La taille du greffon a été évaluée avec des greffons de 3, 5 et 10 mm de long. Face à la difficulté d'enraciner

des plants sur milieu gélosé seul, de la vermiculite a été ajoutée au milieu de culture. Les effets de plusieurs prétraitements, appliqués sous forme de goutte au point de greffe, lors du greffage, ont été testés [100 mg l<sup>-1</sup> polyvinylpyrrolidone (PVP), 1,0 mg l<sup>-1</sup> kinétine, 0,5 mg l<sup>-1</sup> BAP, 100 mg l<sup>-1</sup> acide ascorbique, 150 mg l<sup>-1</sup> acide citrique] afin d'améliorer la soudure de la greffe. La source de carbone dans le milieu de culture (30 g l<sup>-1</sup> ou 75 g l<sup>-1</sup> saccharose ou glucose) a été également évaluée. Afin d'examiner si l'âge de la souche *in vitro*, origine des greffons, a une influence sur la réussite au microgreffage, le nombre de cycles de multiplication a été testé (9 ou supérieur à 30 cycles).

Chaque traitement comporte 24 greffes. Le nombre de greffes réussies est enregistré 4 semaines après greffage (fin des conditions *in vitro*) et 3 mois après acclimatation. La preuve de succès d'une greffe est établie par la capacité du greffon à s'allonger et à former de nouvelles feuilles.

Les données collectées ont été analysées statistiquement par utilisation du test du Khi2 par case dans Statbox 7.1 (FBC

Software, Issy-Les-Moulineaux, France) for Windows (Tableau 1).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### EFFET POSITIF DE LA VERMICULITE

Une augmentation significative du pourcentage de réussite au greffage (54 %) a été observée en présence de vermiculite par rapport aux 12 % de réussite avec un milieu gélosé seul. Trois mois après acclimatation, le taux de réussite est de 46 % avec vermiculite, contre 8 % en milieu gélosé seul. Les milieux liquides ou solides seuls sont connus pour favoriser des conditions anoxiques qui entraînent un manque de formation de racines latérales, vitales en phase d'acclimatation (Mosella-Chancel, 1979). En utilisant des semis germés *in vitro* de *Prunus dulcis* Mill., Yildirim *et al.* (2010) constatent un faible développement de la greffe sur milieu gélosé sans régulateur de croissance. Dans nos essais, le milieu gélosé est additionné de vermiculite, permettant ainsi le redémarrage rapide du bourgeon. Le système racinaire plus développé et la



présence de racines secondaires sont dus à une structure plus aérée du milieu. Les plants microgreffés sont plus développés sur milieu contenant de la vermiculite. Les nouvelles racines se développent simultanément avec le bourgeon.

#### SOURCE DE CARBONE

Les résultats n'ont pas montré de différence significative 4 semaines après greffage, quand les microgreffes sont cultivées sur 30 ou 75 g l<sup>-1</sup> de glucose ou saccharose. Cependant, une différence significative avec 30 g l<sup>-1</sup> de glucose a été observée 3 mois après acclimatation. Une différence significative est également observée quand les deux concentrations de sucre sont regroupées. Un taux de réussite supérieur est obtenu avec le glucose (54 %) contre 29 % avec le saccharose. Naz *et al.* (2007) ont observé une augmentation du taux de greffe sur *Citrus* spp. quand les niveaux de sucre augmentent dans le milieu. Un total de 21 % de réussite est obtenu avec 3 % de saccharose quand 33 % sont atteints avec un taux de sucre de 5 %. Navarro *et al.* (1975) ont rapporté des taux supérieurs en présence de 7,5 % de saccharose. Ces conclusions avec du saccharose sur *Citrus* n'ont pas été vérifiées dans nos expérimentations sur cerisier. Le glucose n'a pas été testé dans les études précédentes.

#### LE NOMBRE DE SUBCULTURES

Deogratias *et al.* (1985) ont mentionné qu'une augmentation du nombre de subcultures améliorerait le redémarrage du bourgeon après greffage, mais leurs essais sur *Prunus avium* n'ont porté que sur 3, 5 et 7 subcultures. Les microgreffes dont les greffons étaient issus de 3<sup>e</sup> subculture ont montré un retard dans le débourrement (48 jours après greffage), alors qu'en 5<sup>e</sup> subculture, les greffons démarraient seulement 8 jours après. La micropropagation entraîne un rajeunissement du matériel végétal. Nos résultats ne montrent aucune différence significative entre 9 et 34 subcultures. Ceci semble indiquer que seul un faible nombre de subcultures (5 ou plus) est suffisant pour maximiser la stimulation du bourgeon après greffage et qu'un plateau est ensuite atteint.

#### TAILLE DU GREFFON

Avec un taux compris entre 25 et 42 % 3 mois après acclimatation, la taille du

greffon n'affecte pas significativement la réussite au greffage dans la gamme de taille testée. Néanmoins, un gradient positif est observé quand la taille du greffon diminue de 10 mm à 3 mm. Ceci a également été rapporté par différents auteurs sur *Prunus*, *Pistacia* et *Anacardium* (Ghorbel *et al.*, 1998 ; Thimmappaiah *et al.*, 2002 ; Onay *et al.*, 2004 ; Keshavachandran and Riji, 2007).

#### TRAITEMENT DES TISSUS LORS DE LA GREFFE

Il a été souvent démontré, dans des précédentes publications, que le nombre de greffes réussies pouvait être augmenté en utilisant des régulateurs de croissance ou des antioxydants. Quand le greffon et/ou le porte-greffe sont trempés dans une solution de 0,5 mg l<sup>-1</sup> BAP ou 0,5 mg l<sup>-1</sup> kinétine, Starrantino and Caruso (1988) mentionnent une amélioration du débourrement du plant greffé. Jonard (1990) confirme l'intérêt des cytokinines et antioxydants, appliqués en solution liquide, pour faciliter la prise de la greffe. Au contraire, Thimmappaiah *et al.* (2002) indiquent que, dans leurs essais, aucun prétraitement, à l'exception d'un trempage dans de l'eau stérile, n'est nécessaire. Le taux de réussite ne varie pas significativement avec l'utilisation de solutions d'antioxydant. Ponsonby and Mantell (1993), quant à eux, indiquent que l'application d'antioxydants réduit de manière significative le taux de greffage. Sur *Protea cynaroides*, les meilleurs résultats sont obtenus sans aucun prétraitement (Wu *et al.*, 2007).

Il n'y a aucun avantage à appliquer de tels traitements pour le microgreffage *in vitro* du cerisier. Nos résultats montrent que les tissus non traités ont un taux de réussite au greffage significativement supérieur (50 %, 3 mois après acclimatation) que les tissus traités. De plus, les prétraitements ont eu des conséquences indésirables, comme le déplacement du greffon dans la fente du porte-greffe (figure 1K). La réussite au greffage dépend principalement du contact étroit entre les tissus cambiaux du greffon et du porte-greffe, condition qui n'est pas toujours remplie quand des gouttes de solutions de prétraitement déplacent le greffon dans la fente pratiquée dans le porte-greffe, entraî-

nant une disconnexion des vaisseaux. Une réalisation rapide des opérations de microgreffage apparaît comme être plus efficace que les prétraitements, afin d'éviter l'oxydation des tissus. Aucun matériel spécial (tube silicone, aluminium) n'est nécessaire pour maintenir la greffe en place.

#### CONDITIONS ASEPTIQUES

Lorsque le porte-greffe est issu de semis et les greffons d'arbres adultes, des contaminations sont fréquentes. Par l'utilisation de greffons et porte-greffe produits *in vitro*, aucune contamination n'a été observée parmi les 384 microgreffes réalisées dans le cadre des essais. Les conditions aseptiques sont maintenues tout au long du processus. Le microgreffage *in vitro* d'espèces ligneuses est une technique chère qui prend du temps, en raison de protocoles longs et difficiles. Les résultats des essais montrent que le microgreffage du cerisier est possible avec un protocole simple, sans traitement particulier. Le protocole le plus efficient met en œuvre un greffon de 3 à 5 mm, un porte-greffe induit pour l'enracinement 7 jours, 30 g l<sup>-1</sup> de glucose pendant le développement de la microgreffe et un milieu contenant de la vermiculite. Aucun artefact spécifique n'est nécessaire pour tenir attachés ensemble le porte-greffe et le greffon, un travail effectué rapidement pour éviter le dessèchement est plus important. Il existe cependant des améliorations possibles afin d'obtenir un pourcentage de réussite supérieur au greffage. Ces travaux se poursuivent au laboratoire. Une technique de microgreffage *in vitro* qui combine les avantages du greffage et ceux de la micropropagation a le potentiel pour devenir un outil de diagnostic rapide et précoce de l'incompatibilité. ■

#### Remerciements

Ce travail a été partiellement financé par FranceAgriMer (Montreuil-sous-Bois, France). Les auteurs remercient Frédéric Bakry et Jean-Luc Poëssel pour leur relecture critique du manuscrit ainsi que Margot Jacquy pour sa contribution technique et Sylvie Parkinson pour son aide dans la rédaction anglaise de cet article.



## BIBLIOGRAPHIE

- Abbas M., Khan M. M., Fatima B., Iftikhar Y., Mughal S. M., Jaskani M. J., Khan I. A. and Abbas H. (2008). Elimination of Citrus tristeza closterovirus (CTV) and production of certified citrus plants through shoot-tip micrografting. *Pakistan Journal of Botany*, 40, p. 1301-1312.
- Amiri M. E. (2007). Special micrografting technique for cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Horticulturae*, 764, p. 151-154.
- Bourrain L. and Navatel J. C. (2002). Production de plants de châtaignier de la variété Mari-goule, *Castanea crenata* × *Castanea sativa*, par multiplication in vitro. In : *Multiplication Végétative des Ligneux Forestiers, Fruitières et Ornementaux, Troisième Rencontre de la Sainte Catherine*, (Verger, M., Ed.). CIRAD-INRA, Orléans, France, p. 38-47.
- Deogratias J. M., Lutz A. and Dosba F. (1985). 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). In : 5<sup>e</sup> Colloque sur les Recherches Fruitières, INRA/CTIFL, Paris, France, p. 85-96.
- Deogratias J. M., Castellani V., Dosba F., Juarez J., Arregui J. M., 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, p. 363-371.
- D'khili B., Boubals D. and Grenan S. (1996). Étude de l'incompatibilité au greffage chez la vigne. *Bulletin de l'OIV*, 69, p. 757-780.
- Dziedzic E. and Malodobry M. (2006). Vegetative cherry rootstocks in tissue culture. *Sodininkyste Ir Darzininkyste*, 25, p. 77-84.
- Exadaktylou E., Thomidis T., Grout B. and Tspouridis C. (2007). Methods to propagate the cherry rootstock Gisela 5 by using root cuttings and application of micrografting. *Advances in Horticultural Science*, 21, p. 51-54.
- Gebhardt K. and Goldbach H. (1988). Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiologia Plantarum*, 72, p. 153-159.
- Ghorbel A., Chatibi A., Thaminv S. and Kchouk M. L. (1998). Micrografting of almond (*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb) cv. Achak. *Acta Horticulturae*, 470, p. 429-433.
- Huang S. C. and Millikan D. F. (1980). In vitro micrografting of apple shoot-tips. *HortScience*, 15, p. 741-743.
- Jonard R., Lukman D., Schall F. and Villemur P. (1990). Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. *Scientia Horticulturae*, 43, p. 117-128.
- Keshavachandran R. and Riji V. S. (2007). Standardization of in vitro micrografting techniques in cashew. In : *Recent Trends in Horticultural Biotechnology*. (Keshavachandran R., Nazeem P. A., Girija D., John P. S., Peter K. V., Eds.). New India Publishing Agency, New Delhi, India, p. 447-449.
- Lê C. L. and Abdelhamid S. (2004). Microgreffage in vitro du châtaignier. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture*, 36, p. 87-92.
- Monteuuis O. (2012). In vitro grafting of woody species. *Propagation of Ornamental Plants*, 12, p. 11-24.
- Mosella-Chancel L. (1979). L'Utilisation de l'Apex Caulinaire comme Moyen d'Élimination de deux Types de Virions chez le Pêcher (*Prunus persica* L. Batsch). Ph.D. Thesis. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 202 pp.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, p. 473-497.
- Murashige T., Bitters W. P., Rangan 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. *HortScience*, 7, p. 118-119.
- Navarro L., Roistacher C. N. and Murashige T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100, p. 471-479.
- Navarro L., Llacer G., Cambra M., Arregui J. M. and Juarez J. (1982). Shoot-tip grafting in vitro for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch). *Acta Horticulturae*, 130, p. 185-192.
- Naz A. A., Jaskani M. J., Abbas H. and Qasim M. (2007). In vitro studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. *Pakistan Journal of Botany*, 39, p. 1773-1778.
- Onay A., Pirinc V., Yildirim H. and Basaran D. (2004). In vitro micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 215-219.
- Ozzambak E. and Schmidt H. (1991). In vitro and in vivo micrografting of cherry (*Prunus avium* L.). *Gartenbauwissenschaft*, 56, p. 221-223.
- Ponsonby D. J. and Mantell S. H. (1993). In vitro establishment of *Picea pungens* f. *glauca* and *P. sitchensis* seedling rootstocks with an assessment of their suitability for micrografting with scions of various *Picea* species. *Journal of Horticultural Science*, 68, p. 463-475.
- Quoirin M. and Lepoivre P. (1977). Improved media for in vitro culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78, p. 437-442.
- Starrantino A. and Caruso A. (1988). The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. *Acta Horticulturae*, 227, p. 101-103.
- Thimmappaiah G. T., Puthra G. T. and Anil S. R. (2002). In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae*, 92, p. 177-182.
- Wu H. C., du Toit E. S. and Reinhardt C. F. (2007). Micrografting of *Protea cynaroides*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89, p. 23-28.
- Yildirim H., Onay A., Süzerer V., Tilkat E., Ozden-Tokatli Y. and Akdemir H. (2010). Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel". *Scientia Horticulturae*, 125, p. 361-367.