

NÉOFORMATION *IN VITRO* DE VIGNES CHIMÉRIQUES (*VITIS VINIFERA* L.)

IN VITRO NEOFORMATION OF GRAPE CHIMERAS (*VITIS VINIFERA* L.)

Sandrine VERDISSON*, ** et ¹, F. BAILLIEUL* et J.-C. AUDRAN*

*Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales

**Laboratoire de Zoologie et des Sciences de l'Environnement (EA-2069)

UFR Sciences, Université de Reims Champagne Ardenne, B.P.1039, 51687 Reims-02 (France)

Résumé : Le processus de bourgeonnement adventif a été obtenu chez la vigne (*Vitis vinifera* L.) à partir d'un cal issu d'un assemblage d'entre-nœuds de Chardonnay et de Pinot noir. Celui-ci a été cultivé sur un milieu comprenant de la BAP et du GA3 pendant une période de 4 semaines d'obscurité suivi d'un régime photopériodique de type 16 : 8. L'analyse par RAPD des feuilles des néoformations caulinaires obtenues montre le caractère chimérique des plantes régénérées.

Abstract : Difference in grape sensitivity to *Botrytis cinerea* attacks between cultivars was explained by differences in the epidermic tissue of the fruit. Therefore, this work was conducted to create a grape periclinal chimera, whose fruits would combine the skin of a *Botrytis* tolerant cultivar with a pulp of another cultivar admitted its good organoleptic quality and productivity. In a first time, graftings of two cultivars (Chardonnay and Pinot noir) were conducted *in vitro* on 5 different media supplemented with various plant growth regulators. Adventitious shoots were only observed on medium containing BAP and GA3 from a mixed callus structure after four weeks of darkness followed by a light/dark regime. In a second time, RAPD analysis, conducted on these plants, showed their chimerical characteristics.

Mots-clés : *Botrytis*, *Vitis vinifera* L., chimère, régénération, RAPD

Keywords : *Botrytis*, *Vitis vinifera* L., chimera, regeneration, RAPD

INTRODUCTION

Les plantes chimériques désignent des végétaux dans lesquels se développent conjointement des tissus génétiquement différents (NEILSON-JONES, 1969). Selon l'arrangement spatial des différents tissus au sein de la plante, il est possible de définir plusieurs catégories anatomiques de chimères dont les chimères périclinales où les tissus de l'une des espèces recouvrent entièrement les tissus de l'autre (TYLNEY-BASSETT, 1986). Les chimères périclinales sont susceptibles de présenter un intérêt agronomique non négligeable. En effet, il est possible par cette voie de transférer une résistance à un agent phytopathogène comme l'ont montré CLAYBERG (1975) chez la tomate et OHTSU (1994) chez un *Citrus*.

Chez la vigne, la plus ou moins grande sensibilité des différents cépages champenois vis-à-vis du *Botrytis* trouve en partie son origine dans la cuticule épider-

mique des grains de raisin (COMMENIL *et al.*, 1996). Il est donc envisageable de créer des chimères chez la vigne pour lutter contre le *Botrytis*. Le but est d'obtenir à terme une vigne chimère de type périclinal dont les baies possèderaient l'épiderme d'un cépage tolérant au *Botrytis* et la chair d'un cépage noble utilisé dans le processus de vinification.

La création de plantes chimériques à partir d'individus différents se décompose en trois étapes (NEILSON-JONES, 1969 ; TYLNEY-BASSETT, 1986). La première consiste à trouver un moyen d'assembler les plantes. Il faut ensuite que les deux espèces soient susceptibles de régénérer ensemble au sein d'une seule et même plante. Enfin, chaque espèce se doit de posséder des marqueurs spécifiques évidents pour déterminer par la suite l'éventuel caractère chimérique des plantes régénérées. Le travail présenté ici relate les différentes étapes qui ont été nécessaires à l'obtention de vignes chimériques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le matériel végétal se compose de Pinot noir clone 7613 tolérant aux attaques du *Botrytis* et de Chardonnay clone 7535 sensible (*Vitis vinifera* L.) (GALET, 1977). Ils proviennent de la collection des sociétés Mumm-Perrier-Jouët, Vignoble et Recherches.

Le matériel végétal utilisé dans les expériences a été désinfecté par un passage de 30 min à l'hypochlorite de calcium (70 g/l) suivi de 3 rinçages à l'eau distillée stérile.

II - MILIEUX DE CULTURE

Le milieu de base (MB) utilisé en culture *in vitro* s'inspire de celui de MARTIN *et al.* (1987). Il contient (en l⁻¹) des macro éléments (1,65 g NH₄NO₃, 1,9 g KNO₃, 0,332 g CaCl₂, 0,37 g MgSO₄.7 H₂O, 0,17 g KH₂PO₄, 36,7 mg Fe-EDTA), des micro éléments (6,2 mg H₃BO₃, 16,9 mg MnSO₄.H₂O, 10,6 mg ZnSO₄.7 H₂O, 0,83 mg KI, 25 µg CuSO₄.5 H₂O, 25 µg CoCl₂.6 H₂O, 25 µg Na₂Mo₄.2 H₂O), des vitamines, des acides aminés (0,5 mg acide nicotinique, 0,5 mg pyridoxine-HCl, 0,1 mg thiamine-HCl, 100 mg inositol, 200 mg glutamine, 200 mg glycine), du saccharose (30 g) et de l'Agar (6 g).

Les régulateurs de croissance testés (AIB : acide indole-butérique, ANO : acide naphthoxyacétique, BAP : benzylaminopurine, 2,4-D : acide 2,4-dichloro-phénoxy-acétique et GA3 : acide gibbérellique) sont ajoutés avant prise du pH (5,6) et avant autoclavage (20 min ; 120 °C ; 1,5 bar).

III – RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 2 feuilles de vitroplants d'après la méthode de KIM *et al.* (1997).

La réaction d'amplification est effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 67 mM Tris-HCl pH 8,8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 p. cent Tween 20, 1,5 mM de MgCl₂, 120 µM de chaque dNTP, 0,3 µM de décamère (Bioprobe Systems), 1 ng/µl d'ADN génomique et 0,06 U/ml de Taq polymérase (Eurobio). Le mélange réactionnel est recouvert d'une goutte d'huile minérale, puis il est soumis à une dénaturation pendant 2 min à 94 °C suivie de 45 cycles comportant chacun 1 min à 94 °C, 1 min à 40 °C et 2 min à 72 °C (thermocycleur Crocodile III Appligene Oncor).

Les produits de l'amplification sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 p. cent (p/v) immergé dans du tampon de migration TAE *1 (Tris-acide acétique EDTA) et révélés sous UV (ultra violet) après traitement au BET (bromure d'éthidium) par l'intermédiaire d'une caméra (BioRad, Gel doc 1 000) reliée à un logiciel analyseur d'images (Molecular Analyst de chez BioRad).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I - OBTENTION DE NÉOFORMATIONS CAULINAIRES

Après désinfection du matériel végétal, 3 types d'assemblages mesurant entre 1 et 2 cm de long et mettant en contact du Chardonnay 7535 (clone sensible au *Botrytis*) et du Pinot noir 7613 (clone tolérant au *Botrytis*) ont été réalisés (figure 1) en prenant soin de retirer les bourgeons axillaires des explants afin d'éviter toute confusion avec le bourgeonnement adventif. Le comportement des divers assemblages a été testé sur cinq milieux de culture différents : MB (témoin), MB + 8,9 µM de BAP, MB + 0,5 µM de BAP + 1 µM d'AIB, MB + 1 µM de BAP + 5 µM de 2,4-D + 5 µM d'ANO, MB + 4,45 µM de BAP + 0,25 µM de GA3.

Chaque type de milieu comporte 6 boîtes contenant chacune 5 explants (2 assemblages nœud/nœud, 2 entre-nœud/entre-nœud, 1 greffage). Ces boîtes sont placées en chambre de culture à température constante (26 °C). Une première moitié est soumise à une photopériode de type 16 : 8, l'autre à une obscurité totale de 4 mois. Pendant la phase lumineuse, l'intensité de l'éclairage s'élève à 66 µE.s⁻¹.m⁻² et est fournie par des tubes de lumière blanche (Prestiflux Mazdafluor TF "P" 36 W/BRL 840). Les principaux résultats obtenus sont résumés dans le tableau I.

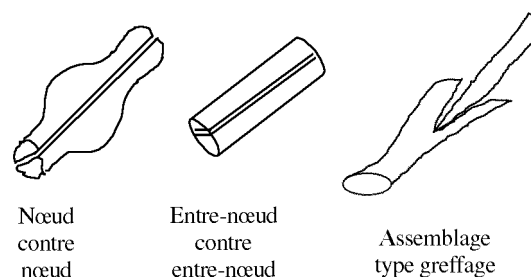


Fig.1 - Types d'assemblages réalisés entre le Chardonnay 7535 et le Pinot noir 7613

Fig.1 - Different types of assemblages performed

TABLEAU I
Principales réactions observées lors des essais de régénération à partir d'assemblages de Chardonnay 7535 et de Pinot noir 7613

Table I - Main reactions observed on regeneration tests from assemblages between Chardonnay 7535 and Pinot noir 7613

	Aspect des explants		Callogenèse	Organogenèse		
				Racines	Tiges feuillées	Feuilles
MB	L	brun	+ beige	—	—	—
	O	brun	—	—	—	—
MB + BAP	L	brun	—	—	—	—
	O	brun	—	—	—	—
MB + BAP + AIB	L	brun	+++ beige, vert, rosé dur, mou	oui	—	—
	O	brun	+++ beige, mou	oui	—	—
MB + BAP + ANO + 2,4-D	L	brun, gonflé, difforme	—	—	—	—
	O	—	—	—	—	—
MB + BAP + GA3	L	brun	—	—	—	oui
	O	—	++ blanc, mou	oui	oui	oui

L : photopériode de type 16 : 8 ; O : obscurité totale pendant 4 semaines

Quantité de cal : +, faible ; ++, moyenne ; +++, abondante ; —, absence de cal ou d'organogenèse

1) Comportement des explants soumis à une photopériode de type 16 : 8

Soumis à une alternance jour/nuit, les explants des différents milieux ont présenté dès les premiers jours de culture un fort brunissement. Cette réaction, fréquente chez les espèces ligneuses, est généralement attribuée à l'oxydation des composés polyphénoliques qui peut conduire à la production de substances toxiques pour les végétaux (KRIKORIAN, 1994). Un mois après la mise en culture, le brunissement des explants du milieu témoin s'est accentué et aux extrémités des explants un peu de cal beige et aqueux est apparu ; en aucun cas, ce cal a recouvert les explants : il est resté localisé à ces endroits. En présence de BAP, les explants ne développent pas de cal ; ils deviennent complètement noirs avec parfois, apparition de petites zones blanches ou rouges. Les explants cultivés sur BAP, ANO et 2,4-D gonflent et deviennent difformes sans former de cal. Le milieu associant de la BAP et de l'AIB provoque un développement important de la callogenèse sur tous les types d'explants. Les cals sont durs, aqueux, beiges, gris, anthocyaniques ou chlorophylliens. De plus, dès la troisième semaine de culture, des néoformations racinaires sont apparues en quantité importante. Ce phénomène n'a pas été suivi dans nos conditions expérimentales par la formation d'axes feuillés. Cette remarque concorde avec les résultats de CHIADMI (1986), MALGARINI-CLOG (1992) et TORREGROSA (1994) qui n'ont jamais réussi à obtenir d'axes feuillés à partir de racines de vigne cultivées *in vitro* sur différents milieux. Il semblerait, que, chez les *Vitis*, cette voie soit pour l'instant encore impossible.

D'une façon plus générale, chez les espèces ligneuses, les bourgeons adventifs sont rarement obtenus à partir d'explants racinaires (HARRY et THORPE, 1994). Il existe vraisemblablement un antagonisme entre rhizogenèse et caulogenèse. Chez la vigne, cet antagonisme pourrait s'expliquer par le fait que les racines ne sont pas neutres d'un point de vue hormonal (TORREGROSA, 1994) et que, par conséquent, elles seraient susceptibles de perturber le processus de caulogenèse. Enfin, sur le milieu avec de la BAP et de la GA3, de petites feuilles sont apparues sur un assemblage nœud/nœud sans former de cal. Après 15 jours supplémentaires de culture, aucun allongement n'a pu être observé. Les petites feuilles ont été séparées les unes des autres puis repiquées individuellement sur le milieu MB. Là encore, aucun allongement n'a pu être observé ; les feuilles ont bruni.

2) Comportement des explants soumis à une période d'obscurité

Les assemblages cultivés sur MB, MB + BAP, MB + BAP + 2,4-D + ANO n'ont pas développé de cal ; ils ont noirci et leur transfert dans des conditions de photopériode de type 16 : 8 n'a pas permis d'obtenir de néoformations caulinaires. Après un mois d'obscurité totale, des racines ont été observées sur les 3/4 des explants cultivés sur le milieu comportant de la BAP et de l'AIB. Comme dans le cas précédent, ces racines n'ont pas donné naissance à des tiges feuillées ; les explants présentaient à leur surface du cal beige ou gris d'aspect aqueux. Après 1 mois d'obscurité, un seul assemblage entre-nœud/entre-nœud cultivé sur BAP et GA3 a

donné naissance à une tige feuillée d'aspect blanchâtre au niveau d'un cal blanc aqueux. La boîte a alors été transférée à la lumière entraînant un jaunissement puis un noircissement de la petite plante. Cependant, une dizaine de petites pousses sont apparues au pied même de la précédente et se sont développées en tiges feuillées en l'espace de 15 à 21 jours. Chez la vigne, la plupart des auteurs parvenus à l'obtention d'axes feuillés par bourgeonnement adventif emploient de la BAP seule (MALGARINI-CLOG, 1992 ; STAMP *et al.*, 1990) ou associée soit à des auxines (CHENG et REISCH, 1989 ; REISCH *et al.*, 1990 ; TORREGROSA, 1994) soit à une gibberelline (CHIADMI, 1986). Dans ce travail, la BAP seule à une concentration de 8,9 μM associée à une période d'obscurité n'a pas été suffisante pour obtenir des axes feuillés. C'est l'ajout de GA3 qui s'est montré favorable à la formation de *novo* d'organes foliaires et caulinaires. Le GA3 est d'ailleurs connu pour débloquent la dormance des bourgeons (CHIADMI, 1986 ; MALGARINI-CLOG, 1992) et stimuler leur développement normal (PALMER et KELLER, 1994).

II - MISE EN ÉVIDENCE DU CARACTÈRE CHIMÉRIQUE DES NÉOFORMATIONS CAULINAIRES PAR RAPD

La RAPD a été employée dans ce travail pour obtenir des marqueurs différenciant le Chardonnay 7535 du Pinot noir 7613, les deux cépages utilisés dans les assemblages cultivés *in vitro*, ainsi que pour détermi-

ner le caractère chimérique des néoformations caulinaires obtenues. Pour rechercher des marqueurs moléculaires du Chardonnay et du Pinot noir, 16 amorces choisies au hasard ont été testées (tableau II). Dans les réactions d'amplification d'ADN génomique, toutes les amorces, exceptée H15, ont permis l'amplification de plusieurs fragments d'ADN de taille et d'intensité différentes. Chaque amorce a conduit à un profil RAPD qui lui est propre ; mais, au cours des répétitions, la présence de certaines bandes s'est avérée être aléatoire. Ce phénomène a déjà été signalé chez la vigne avec la technique RAPD (COLLINS et SYMONS, 1993 ; MORENO *et al.*, 1995 ; GRANDO *et al.*, 1996). Aussi, afin de limiter les risques d'erreur dans la lecture des profils dus à des défauts de reproductibilité, plusieurs répétitions ont été effectuées et seules les bandes reproductibles ont été prises en considération. Une amplification sans ADN génomique a également été réalisée avec chaque amorce testée. Des fragments amplifiés sont parfois visibles chez ces témoins (exemples figure 2 pistes T). Leur présence s'explique soit par la formation de polymères d'amorces (YU *et al.*, 1993), soit par une contamination extérieure. Dans la mesure où les bandes du témoin ne se retrouvent pas systématiquement dans les lots avec ADN, l'hypothèse d'une contamination extérieure est à écarter. Les bandes communes au contrôle et aux échantillons contenant de l'ADN génomique ne sont prises en compte dans l'analyse des profils RAPD (ORTIZ *et al.*, 1997 ; MORENO *et al.*, 1995).

Dans les conditions expérimentales prédéfinies, l'analyse des profils RAPD n'a pas permis de révéler de différence entre les 2 cépages utilisés pour 14 des 16 amorces testées (A01, A02, A11, B01, B02, B11, B12, C01, C02, C07, H04, H15 et H18, résultats non illustrés). Seules les 2 amorces A12 et C06 ont révélé un certain polymorphisme entre le Chardonnay 7535 et le Pinot noir 7613. En effet, parmi les fragments amplifiés, certains se sont avérés stables et spécifiques à l'un ou l'autre cépage. Ils ont donc été considérés comme marqueurs moléculaires de ces 2 cépages (figure 2, bandes indiquées par des flèches blanches sur les pistes C et PN). L'amorce A12 donne naissance à un fragment spécifique du Chardonnay et 2 spécifiques du Pinot (figure 2 A : bandes indiquées par des flèches blanches au niveau des pistes C et PN). Avec l'amorce C06, le Chardonnay possède 2 marqueurs et le Pinot noir 3 (figure 2 B : bandes indiquées par des flèches blanches au niveau des pistes C et PN). Ce sont ces bandes qui ont été sélectionnées pour l'analyse du caractère chimérique des néoformations caulinaires.

La plupart des néoformations caulinaires (5/7) analysées par RAPD avec l'amorce A12 possèdent dans leur profil les marqueurs des 2 parents (figure 2 A,

TABLEAU II
Séquences nucléotidiques
des différentes amorces testées

Table II - Primer sequences used for RAPD analysis

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique 5' → 3'
A01	CAGGCCCTTC
A02	TGCCGAGCTG
A11	CAATCGCCGT
A12	TCGGCGATAG
B01	GTTTCGCTCC
B02	TGATCCCTGG
B11	GTAGACCCGT
B12	CCTTGACGCA
C01	TTCGAGCCAG
C02	GTGAGGCGTC
C06	GAACGACTC
C07	GTCCCGACGA
H04	GGAAGTCGCC
H14	ACCAGGTTGG
H15	AATGGCGCAG
H18	GAATCGGCCA

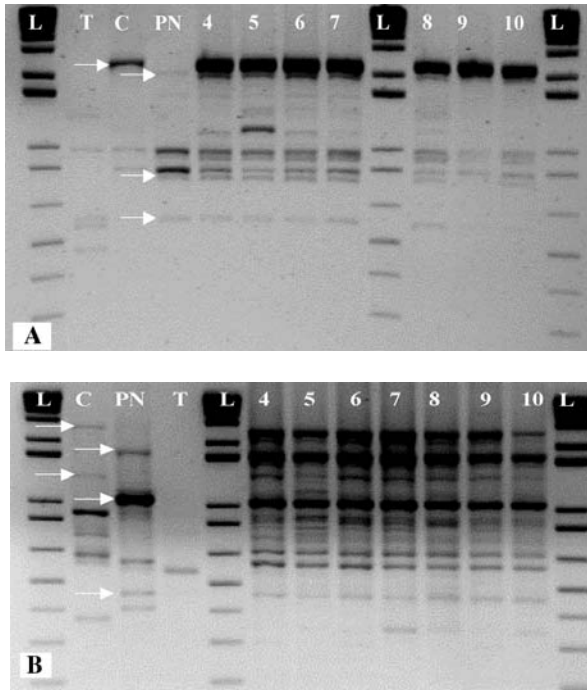


Fig. 2 - Fragments amplifiés d'ADN issu des néoformations caulinaires de vigne (*Vitis vinifera* L.) générés par l'amorce A12 (A) et C06 (B)

Les produits de l'amplification ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 p. cent (p/v) et révélés sous UV après traitement au BET.

C : Chardonnay 7535 ; L : 1 kb plus DNA Ladder ; PN : Pinot noir 7613 ; T : témoin ; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 : pistes des néoformations caulinaires

Fig. 2 - RAPD profiles generated by the primer A12 (A) and C06 (B)

The RAPD products were fractionated on a 1 p. cent agarose gel and stained with BET.

C : Chardonnay 7535 ; L : 1 kb plus DNA Ladder ; PN : Pinot noir 7613 ; T : control ; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 : adventitious shoots

suivre les flèches blanches, pistes 4, 5, 6, 7, 8). En ce qui concerne les plantes analysées sur les pistes 9 et 10, la présence du marqueur de faible poids moléculaire du Pinot noir n'est pas évidente. Une mutation aurait pu se produire au niveau de ce site de fixation de l'amorce A12. Cette hypothèse se justifie par l'analyse des fragments amplifiés avec C06 (figure 2 B). Enfin, dans le même ordre d'idée, les néoformations caulinaires analysées sur les pistes 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 présentent dans leur profil de nouvelles bandes qui peuvent faire penser à des mutations. En effet, en culture *in vitro*, le passage par une phase de callogenèse lors des processus de régénération est connu pour augmenter les risques de variations somaclonales (STAMP *et al.*, 1990 ; MALGARINI-CLOG, 1992). Les processus de dédifférenciation et de redifférenciation sont susceptibles de provoquer des changements qualitatifs et quantitatifs dans le génome : diverses séquences d'ADN peuvent alors être amplifiées ou délétées lors des changements d'état de la cellule (KARP, 1994).

Il n'en reste pas moins que toutes les néoformations caulinaires possèdent les bandes de leurs ascendants (figure 2 suivre les flèches blanches). Les néoformations présentant à la fois les marqueurs des 2 parents sont donc bien des plantes chimériques issues du Chardonnay 7535 et du Pinot noir 7613.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'obtenir artificiellement des néoformations caulinaires chimériques de vigne (*Vitis vinifera* L.). C'est la première fois, à notre connaissance, que ce type de travail est entrepris chez la vigne. Le processus de bourgeonnement adventif a été obtenu à partir d'un cal issu d'un assemblage d'entre-nœuds cultivé sur un milieu supplémenté en BAP et en GA3 après une période de 4 semaines d'obscurité suivi par un passage à un régime photopériodique de type 16 : 8. C'est par RAPD, technique de biologie moléculaire récente, que le caractère chimérique des néoformations caulinaires obtenues a pu être déterminée. Mais, la quantité de chimères obtenues reste faible (7) par rapport au nombre d'assemblages réalisés initialement (50). Ce problème a fréquemment été rencontré chez différents types de plantes (CLAYBERG, 1975 ; MARCOTRIGIANO et GOUIN, 1984 ; HIRATA *et al.*, 1990, 1992 ; KADDOURA et MANTELL, 1991 ; NOGUSHI *et al.*, 1992 ; HIRATA *et al.*, 1992 ; OHTSU, 1994 ; LINDSAY *et al.*, 1995 ; CHEN *et al.*, 1996).

Augmenter les chances d'obtention de plantes chimériques pourrait se faire par accroissement du nombre de plantes régénérées. Chez la vigne, l'amélioration des conditions de culture pour accroître le nombre de néoformations caulinaires reste à faire. Tout d'abord, il est possible que l'étape de désinfection à l'hypochlorite stresse les plantes et puisse de ce fait affecter leur capacité à régénérer (MALGARINI-CLOG, 1992). D'autre part, le taux de régénération est souvent stimulé par l'ajout d'hormones (CLAYBERG, 1975 ; KADDOURA et MANTELL, 1991 ; OHTSU, 1994 ; LINDSAY *et al.*, 1995) ou par modification de la nature ou de la concentration de l'un des constituants du milieu de culture (NOGUSHI *et al.*, 1992). Ainsi, pour pallier le brunissement des explants, l'ajout de charbon actif, de polyvinylpyrrolidone ou de composés antioxydants pourrait être envisagé. Ces substances sont en effet susceptibles de contrer les effets des polyphénols (HARRY et THORPE, 1994 ; KRİKORIAN, 1994). L'ajout d'une auxine exogène peut aussi parfois améliorer le taux de plantes régénérées comme l'ont montré les travaux sur la vigne de CHENG et REISCH (1989), REISCH *et al.* (1990) et de TORREGROSA (1994).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHEN H.J., MUBARACK M.M., NAESS S.K., STOVER E. et SWARTZ H.J., 1996. Technique development towards production of an *in vitro* graft chimera in *Rubus*. *Fruit Var. J.*, **50**, 105-113.
- CHENG Z.M. et REISCH B.I., 1989. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis X labruscana* 'Catawba'. *Plant Cell. Rep.*, **8**, 403-406.
- CHIADMI N., 1986. Culture *in vitro* de la vigne (*Vitis* sp). Régénération de plantes à partir de fragments de limbe foliaire. Mise au point d'un test précoce de résistance à la chlorose calcaire. *Thèse*, Université de Paris-Sud Centre d'Orsay, 121 p.
- CLAYBERG C.D., 1975. Insect resistance in a graft-induced periclinal chimera of tomato. *HortScience*, **10**, 13-15.
- COLLINS G.G. et SYMONS R.H., 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **11**, 105-112.
- COMMENIL P., BELINGHERI L., AUDRAN J.-C., COLLAS A. et DEHORTER B., 1996. Mise en évidence d'une activité anti-*Botrytis* dans les cires épicuticulaires de jeunes baies de *Vitis vinifera*, variété de Pinot noir. *J. Int. Sc. Vigne Vin*, **30**, 7-13.
- GALET P., 1977. *Les maladies et les parasites de la vigne* (tome 1). Imprimerie Paysans du Midi, Montpellier, 871 p.
- GRANDO M.S., De MICHELI L. et SCIENZA A., 1996. Characterization of *Vitis* germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. *Genet. Resour. Crop. Evolution*, **43**, 187-192.
- HARRY I.S. et THORPE T.A., 1994. *In vitro* culture of forest trees. In : *Plant Cell and Tissue Culture*. VASIL K. et THORPE T.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 539-560.
- HIRATA Y., YAGISHITA N., SUGIMOTO M. et YAMAMOTO K., 1990. Intervarietal chimera formation in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. J. Breed.*, **40**, 419-428.
- HIRATA Y., YAGISHITA N., YAMAMOTO K. et SUGIMOTO M., 1992. Interspecific graft chimera between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *J. J. Breed.*, **42**, 203-212.
- KADDOURA R.L. et MANTELL S.H., 1991. Synthesis and characterization of *Nicotiana-Solanum* graft chimeras. *Ann. Bot.*, **68**, 547-556.
- KARP A., 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In : *Plant cell and tissue culture*. VASIL K. et THORPE T.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 139-151.
- KIM C.S., LEE C.H., SHIN J.S., CHUNG Y.S. et HYUNG, N.I., 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucl. Acid. Res.*, **25**, 1085-1086.
- KRIKORIAN A.D., 1994. *In vitro* culture of plantation crops. In : *Plant cell and tissue culture*. VASIL K. et THORPE T.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 497-537.
- LINDSAY G.C., HOPPING M.E., BINDING H. et BURGE G.K., 1995. Graft chimeras and somatic hybrids for new cultivars. *N. Z. J. Bot.*, **33**, 79-92.
- MALGARINI-CLOG E., 1992. Culture *in vitro* de la vigne. Mise au point de techniques nouvelles de régénération. Culture de protoplastes de vigne et contribution à la mise au point d'un protocole d'infection de protoplastes par les ARN viraux du grapevine fanleaf virus, agent du court-noué de la vigne. *Thèse*, Université Louis Pasteur Strasbourg I, 241 p.
- MARCOTRIGIANO M. et GOUIN F.R., 1984. Experimentally synthesized plant chimeras I. *In vitro* recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus cultures. *Ann. Bot.*, **54**, 503-511.
- MARTIN C., VERNROY R., CARRE M., VESSELLE G., COLLAS A. et BOUGEREY C., 1987. Vigne et techniques de cultures *in vitro*. Quelques résultats d'une collaboration entre recherche publique et entreprise privée. *Bull. OIV*, 675-676, 447-458.
- MORENO S., GOGORCENA Y. et ORTIZ J.M., 1995. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.*, **62**, 237-243.
- NEILSON-JONES W., 1969. *Plant Chimeras*. 2nd edition. The Camelot Press Ltd, London and Southampton, 123 p.
- NOGUSHI T., HIRATA Y. et YAGISHITA N., 1992. Intervarietal and interspecific chimera formation by *in vitro* graft-culture method in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.*, **83**, 727-732.
- OHTSU Y., 1994. Efficient production of a synthetic periclinal chimera of *Citrus* "NF-5" for introduction of disease resistance. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **60**, 82-88.
- ORTIZ A., RENAUD R., CALZADA I. et RITTER E., 1997. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *J. Hort. Sci.*, **72**, 1-9.
- PALMER C.E. et KELLER W.A., 1994. *In vitro* culture of oilseeds. In : *Plant cell and tissue culture*. VASIL K. et THORPE T.A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 413-455.
- REISCH B.I., MARTENS M.H. et CHENG Z.M., 1990. High frequency regeneration from grapevine petioles : extension to new genotypes. *Vitis*, special issue, 419-422.
- STAMP J.A., COLBY S.M. et MEREDITH C.P., 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration

from leaves of grape (*Vitis* spp.). *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, **22**, 127-133.

TORREGROSA L., 1994. Culture *in vitro* et transformation génétique de la vigne : mise au point de protocoles de micropropagation et de régénération par organogénèse et embryogénèse chez des hybrides *Vitis* X *Muscadinia*. Obtention de deux porte-greffes de racines et de plantes transgéniques produisant la pro-

téine capsidiale du virus de la mosaïque chromée de la vigne GCMV. *Thèse*, ENSA Montpellier, 140 p.

TYLNEY-BASSETT R.A.E., 1986. *Plant chimeras*. Edward Arnold London, 193 p.

YU K.F., DEYNZE A.V. et PAULS K.P., 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *In* : *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, 287-301.

Reçu le 25 novembre 1998 ; révisé le 8 février 1999 ;
accepté pour publication le 15 février 1999.
