

ÉLIMINATION DE L'ENROULEMENT CHEZ LE PINOT NOIR ET LE MERLOT AU MOYEN DES CULTURES D'APEX

NÓRA JÁKÓ

Institut de Recherches Viti-vinicoles
Kecskemét, H 6000, Pf 25 (Hongrie)

INTRODUCTION

L'enroulement est provoqué par l'ensemble de deux clostéro-virus et d'un virus isométrique non identifié (FAORO et *al.*, 1981 ; CASTELLANO et *al.*, 1983 ; GUGERLI et *al.*, 1984). Dans les vignobles de Hongrie on connaît différentes races de virus de l'enroulement (LEHOCZKY et *al.*, 1969). L'un des symptômes caractéristiques est l'enroulement des bords de la feuille vers la face inférieure. Le second symptôme est la coloration rouge précoce des limbes ; la nervure foliaire reste verte au cours de la période de végétation (GOHEEN, 1970).

On sait que l'enroulement diminue significativement le rendement des souches et la qualité de la récolte (WHITING et HARDIE, 1981). La perte de la récolte est la conséquence de la diminution du nombre de grappes par souches et, dans les cas les plus graves, du nombre de baies par grappe (WOODHAM et *al.*, 1984). L'enroulement diminue le rendement des souches indicateurs de Pinot noir et la teneur en sucre des baies (HOFMANN, 1984).

Il est possible d'éliminer l'enroulement par la thermothérapie (MUR, 1979), par la combinaison de la thermothérapie et du micro-greffage (PENAGLESIAS et AYUSO, 1980), et par la culture d'apex (BARLASS et *al.*, 1982). Nous présentons, dans ce travail, les résultats des recherches de cinq ans concernant l'élimination de l'enroulement par culture d'apex chez deux cépages, le Pinot noir et le Merlot.

MODALITÉS DE L'EXPÉRIMENTATION

I. — ORIGINE ET PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS.

Le matériel de départ pour les cultures d'apex provient de souches, atteintes par l'enroulement, cultivées dans le jardin de pathologie de l'Institut des Recherches Viti-vinicoles de Miklóstelep.

TABLEAU I

Composition des milieux de culture.

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
I. Composés minéraux :			
Macroéléments (selon MURASHIGE, 1977)	Solution non diluée	Solution diluée de moitié	Solution diluée de moitié
Microéléments (selon NITSCH et NITSCH 1969)			
II. Composés organiques :			
Benzyladénine (mg/l)	2	1	0,5/0,2
Adénine.HCl (mg/l)	25	20	10 /5
Acide β -indolacétique (mg/l)	0,1	0,2	0,4/0,3
Acide gibbéréllique (mg/l)	néant	0,05	néant
Cystéine.HCl (mg/l)	néant	10	5
Saccharose (g/l)	30	30	20
Agar (g/l)	1,0	4,5	4,5
Acide nicotinique (mg/l)	5,0	1	1
Pyridoxine.HCl (mg/l)	0,5	1	1
Thiamine.HCl (mg/l)	0,5	1	1
Panthoténate de calcium (mg/l)	néant	1	1
Méso-inositol (mg/l)	100	100	100
Acide ascorbique (mg/l)	5	10	10
Glycine (mg/l)	2	2	2
Biotine (μ g/l)	50	10	10
pH	5,5	5,5	5,5

Milieu 1 : Formation *de novo* des bourgeons.

Milieu 2 : Développement des pousses.

Milieu 3 : Formation des racines.

En 1981 et 1982, à la fin de la période de végétation, nous avons prélevé les bourgeons axillaires latents principaux. En 1983, au printemps, nous avons prélevé l'apex des pousses en voie de croissance. Les prélèvements (la partie terminale de cinq centimètres de la pousse, ou la partie du sarment comportant le bourgeon axillaire latent) ont été stockés à + 4°C, pendant une nuit.

II. — DESINFECTION DES ECHANTILLONS ET PREPARATION DES EXPLANTS.

Les échantillons ont été désinfectés au moyen d'une solution d'hypochlorite de calcium à 6 p. 100 pour les bourgeons latents et une solution à 0,5 p. 100 pour les pousses vertes.

Dans chaque cas, nous avons isolé le méristème et la région voisine comprenant 2 à 4 ébauches foliaires. La dimension des explants était de 0,5 à 1,0 mm, selon l'état du développement des bourgeons ou des pousses.

Les chances de survie et de différenciation des explants d'apex augmentent selon leur dimension. En augmentant la dimension, la chance de ne pas avoir de virus diminue. Nous avons donc choisi l'explant, de dimension telle qu'il est indemne très vraisemblablement de virus et qu'il peut encore donner naissance à une pousse.

A partir d'observations histologiques, BARLASS et SKENE (1980, b) constatent que dans les cultures d'apex de la vigne la pousse se reproduit à partir du méristème qui se développe aux aisselles des feuilles et non du méristème original d'apex. Ce fait explique l'importance de la présence des ébauches foliaires dans les cultures d'apex.

III. — MILIEU DE CULTURE D'APEX.

A la suite de travaux réalisés par plusieurs auteurs (NITSCH et NITSCH, 1969 ; GALZY, 1972 a et b ; MURASHIGE, 1977 ; BARLASS et SKENE, 1978 et 1980 a et b ; NOVÁK et JUVOVÁ, 1980 ; ALDWINCKLE et BUTURAC, 1980) et de nos expérimentations préliminaires (JÁKÓ et NITSCH, 1980) nous utilisons trois milieux (tableau I) dont la composition satisfait aux besoins hormonaux dans les trois phases d'évolution : a) formation de *novo* des bourgeons ; b) développement des pousses ; c) formation des racines.

Remarquons que les teneurs en benzyladénine, adénine et acide indolacétique du milieu 3 ont été diminuées dans la période de la croissance des racines formées aux cultures.

IV. — ROLE DE LA PHOTOPERIODE ET DE LA TEMPERATURE AMBIANTE DANS L'EVOLUTION DES CULTURES D'APEX.

Dans les cultures d'apex la photopériode influe sur l'organogénèse. La durée optimale de l'éclairement est de 16 heures et celle de la période

sombre de 8 heures. Les cultures d'apex de la vigne exigent une température de 27°C et une intensité lumineuse de 1000-3000 lux dans la première phase de leur évolution. Dans la deuxième phase, il faut augmenter l'intensité lumineuse et ramener la température ambiante à 25°C.

RÉSULTATS

I. — FORMATION DE *NOVO* DES BOURGEONS DANS LES CULTURES D'APEX DES BOURGEONS AXILLAIRES LATENTS PRINCIPAUX.

Le 14 août 1981, nous avons prélevé l'apex de bourgeons axillaires latents principaux de Pinot noir sur des souches atteintes d'enroulement.

Leurs apex présentent une très faible vigueur dans la culture. Dans la première année, 2 p. 100 des cultures se développent en pousses. Ce cépage réagit sensiblement à la contamination de l'enroulement, comme l'indicateur de cette maladie de virus.

Dans la période du 27 juillet 1982 au 15 septembre 1982, nous avons prélevé les échantillons des bourgeons latents principaux sur des souches de Pinot noir et de Merlot atteint par l'enroulement. Nous avons isolé des explants de 0,5 à 1,0 mm.

Les apex des bourgeons latents principaux sont restés en dormance pendant six mois et ils n'ont proliféré que dans la période de la végétation. Leur prolifération s'est déclenchée en mars 1983. Le nombre des bourgeons qui apparaissent, atteint un maximum en juin 1983 (figure 1).

Dans la période de la diminution graduelle de la teneur des hormones du milieu, la vitesse d'apparition des bourgeons diminue progressivement et la destruction des pousses se produit. Dans le milieu de l'enracinement, le développement du cal et des racines se déroule. En septembre les pousses enracinées se renforcent et elles deviennent aptes à être repiquées.

Les bourgeons formés de *novo* dans les cultures évoluent en pousses enracinées dans la proportion de 13 p. 100 pour le Pinot noir et de 20 p. 100 chez le Merlot (figure 1).

II. — FORMATION *DE NOVO* DE BOURGEONS DANS LES CULTURES D'APEX DES POUSSES EN VOIE DE CROISSANCE.

Entre le 25 mai et le 1er juin 1983, nous avons isolé les apex de pousses en voie de croissance sur des souches de Merlot atteintes d'enroulement.

Selon notre hypothèse, elles sont probablement indemnes de virus et leur vigueur est meilleure que celles des apex des bourgeons latents. Ces qualités favorisent la survie et l'évolution des cultures d'apex.

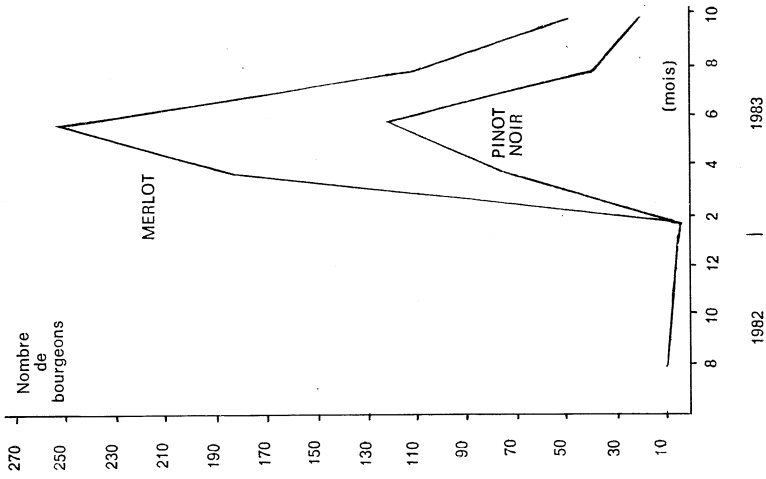


Fig. 1. — Evolution du nombre de bourgeons *de novo* dans les cultures d'apex de Merlot et de Pinot noir.

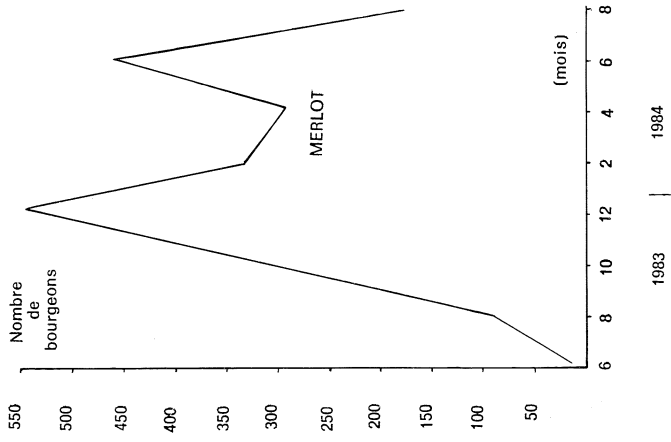


Fig. 2. — Evolution du nombre de bourgeons *de novo* dans les cultures d'apex de Merlot.

Les cultures prolifèrent déjà en juillet sur le premier milieu. Dans les cultures le nombre des bourgeons formés *de novo* atteint un premier maximum en décembre, bien que nous ayons diminué déjà en août la teneur en benzyladénine et en adénine. Durant cette période l'évolution des cultures est assurée par une moindre quantité d'hormones. En janvier, la formation des bourgeons s'est arrêtée dans les cultures et les pousses ont commencé à dépérir. En février, nous avons augmenté la teneur en benzyladénine dans le milieu enrichi par une chlorhydrate de cystéine pour déclencher la formation *de novo* de bourgeons. Le nombre de bourgeons augmente en mai 1984 et atteint un deuxième maximum en juin 1984 (figure 2). Dans la période de juin à septembre, le développement des pousses se poursuit et les bourgeons évoluent dans la proportion de 40 p. 100 et s'enracinent en proportion de 10 p. 100.

En étudiant le graphique à deux points de la figure 2, la question est de savoir si en janvier et février l'interruption de l'évolution des cultures n'est pas en corrélation avec l'état de dormance ? Il est possible que la cassure de l'évolution des cultures n'arrive pas, si nous les maintenons à + 9°C dans l'obscurité, entre le 15 décembre et le 31 janvier. Puis, en février, nous les soumettons à la photopériode de 16 heures et à la température de 25°C.

GALZY (1985) a proposé de maintenir les micro-boutures de la vigne à + 9°C et à l'obscurité. On a effectué de tels traitements pendant plusieurs mois et en plaçant ensuite les micro-boutures à 21°C et à la lumière, elles ont continué leur croissance sans dommage.

III. — DEVELOPPEMENT DES PLANTES REPIQUEES DE LA CULTURE *IN VITRO*.

Les pousses enracinées d'un an de Merlot sont prêtes à repiquer, en renforçant le milieu d'enracinement. Les plants repiqués sont cultivés sur de la perlite, puis dans la tourbe neutre et alimentés avec la solution minérale M-S diluée de moitié. Leur croissance amène les pousses enracinées bien développées.

L'année suivante les pousses issues des bourgeons latents ont des vrilles et la feuille retrouve la forme caractéristique du cépage. Ces plants de Merlot de deux ans sont indemnes des symptômes de l'enroulement.

Nous avons cultivé en pots les plants de Pinot noir provenant des cultures d'apex de 1981 à la période de 1982 à 1983. Les plants se sont bien développés sur de la perlite, puis sur un mélange de perlite et de tourbe neutre. En 1984, les plants de 3 ans, suffisamment vigoureux, sont taillés et cultivés en pleine terre. Les vignes de Pinot noir ainsi traitées en 1981 se sont révélées indemnes des symptômes de l'enroulement et elles ont l'aspect caractéristique du cépage.

CONCLUSION

Nous avons appliqué la culture d'apex à l'élimination de l'enroulement du matériel de micro-multiplication des cépages Pinot noir et Merlot.

Dans la culture *in vitro* les apex provenant des bourgeons latents principaux restaient en dormance pendant six mois. L'évolution *de novo* des bourgeons se déroule dans la période de mars à juin de l'année suivante. Les bourgeons développés *de novo* dans les cultures évoluent en pousses enracinées en proportion de 13 p. 100 chez le Pinot noir et de 20 p. 100 chez le Merlot.

Les apex des pousses en voie de croissance prolifèrent sans délai en culture *in vitro*. L'évolution *de novo* des bourgeons dans les cultures est continue de juillet à décembre. Puis, après une période de latence de quatre mois, leur évolution continue jusqu'en juin de l'année suivante. 40 p. 100 des bourgeons formés *de novo* dans les cultures de Merlot évoluent en pousses et jusqu'en septembre 10 p. 100 s'enracinent.

Au cours d'expérimentations sur une période de cinq ans, nous avons obtenu des plantes de Merlot de deux ans indemnes des symptômes de l'enroulement et des vignes indicatrices de Pinot noir de trois ans indemnes de l'enroulement qui sont cultivés de la culture d'apex.

Manuscrit reçu le 26 janvier 1986 ; accepté pour publication le 30 mai 1986.

RESUME

Dans la culture *in vitro*, les apex provenant des bourgeons latents principaux restent en dormance pendant six mois. L'évolution *de novo* des bourgeons se déroule dans la période de mars à juin de l'année suivante.

Les apex des pousses en voie de croissance prolifèrent sans délai en culture *in vitro*. L'évolution *de novo* des bourgeons dans les cultures est continue de juillet à décembre. Puis après une période de latence de quatre mois, leur évolution continue jusqu'en juin de l'année suivante.

SUMMARY

During *in vitro* culture, the apex of the main sleeping buds remain in dormancy for six months. The *de novo* evolution of the buds takes place between March and June of the following year.

The apex of the growing shoots proliferate immediately during *in vitro* culture. The *de novo* evolution of the buds in situ, is continuous from June to December. After a dormancy of four months, their evolution goes on until June of the following year.

ZUSAMMENFASSUNG

Die spitze der schlafenden Hauptknospen bleiben *in vitro* während sechs Monaten in Winterruhe (Dormanz). Die *de novo*-Sprossentwicklung läuft in der Zeit von März bis Juni des folgenden Jahres ab.

Die Zellen der wachsenden Sprossspitzen vermehren sich *in vitro* unverzüglich. Die *de novo* - Entwicklung der Knospen geht *in situ* kontinuierlich von Juni bis Dezember. Nach einer viermonatigen Ruhe setzt sich diese Entwicklung bis zum folgenden Juni fort.

RESUMEN

En el cultivo *in vitro*, los ápex que vienen de las jemas latentes principales se quedaban durmiendo durante seis meses. La evolución *de novo* de las jemas ocurre durante el periodo desde marzo hasta junio del año siguiente.

Los ápex de los pámpanos en vías de crecimiento proliferan sin demora en cultivo *in vitro*. La evolución *de novo* de las Jemas en los cultivos es continua desde julio hasta diciembre. Y después de cuatro meses de estado latente, siguen desavollando hasta el mes de junio del año siguiente.

RIASSUNTO

Nella coltura *in vitro*, gli apíci che provengono dai germogli latenti principali rimangono dormienti durante sei mesi. L'evoluzione *de novo* dei germogli si sviluppa durante il periodo di marzo a giugno dell'anno seguente.

Gli apici dei germogliamenti in via di crescita proliferano senza termine in coltura *in vitro*. L'evoluzione *de novo* dei germogli nelle colture é continua da luglio a dicembre. Poi dopo un periodo di latenza di quattro mesi, la loro evoluzione continua fino a giugno dell'anno seguente.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALDWINCKLE H.S. et BUTURAC I., 1980. Culture of grape cultivars from apical meristems. Proc. 7th Conf. Int. Count. Viruses Virus-like Dis. of the Grapevins. Niagara Falls, 339-341.
- BARLASS M. et SKENE K.G.M., 1978. In vitro propagation of grapevine *Vitis vinifera* L. from fragmented shoot apices. *Vitis*, **17**, 335-340.
- BARLASS M. et SKENE K.G.M., 1980. a. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf primordial fragments *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, **31**, 483-488.
- BARLASS M. et SKENE K.G.M., 1980. b. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, **31**, 489-495.
- BARLASS M., SKENE K.G.M., WOODHAM R.C. et KRAKE L.R., 1982. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Ann. Appl. Biol.*, **101**, 291-295.
- CASTELLANO M.A., MARTELLI G.P. et SAVINA V., 1983. Viruslike particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines. *Vitis*, **22**, 23-39.

- FAORO F., TORNAGHI R., FORTUSINI A. et BELLI G., 1980. Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy. *Riv. Patol. Veg.*, Ser. 4, **17**, 183-189.
- GALZY R., 1972. a. La culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **274**, 210-213.
- GALZY R., 1972. b. Remarques sur la nutrition minérale des apex de *Vitis rupestris*. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **275**, 561-564.
- GALZY R., 1985. Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vigne. *Bull. de l'O.I.V.*, **58**, 377-390, 650-651.
- GOHEEN A.C., 1970. Grape leafroll in Frazier N.W., Fulton J.P., Thresh J.M., Varney E.H. Virus diseases of smale fruits and grapevines. Univ. California, USA.
- GRENAN S., 1985. Elimination des virus par les techniques de culture *in vitro*. Coll. Amélior. de la vigne et culture *in vitro*. Paris, **43**.
- GUGERLI P., BRUGGER J. et BOVEY R., 1984. L'enroulement de la vigne mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour diagnostic rapide. *Rev. Vit. Arb. Hort.*, Suisse. Nyon, **16**, 299-304.
- HOFMANN E.L., 1984. Untersuchungen über die Blattrollkrankheit und die Frührotverfärbung bei Klonen der Sorte Blauer Spätburgunder. *Wein-Wiss.*, **39**, 16-29.
- JÁKÓ N. et NITSCH C., 1980. Wechselnder Hormonedarf von Gewebekulturen aus Triebspitzenmeristen bei *Vitis vinifera* L. cv. Sultana in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase, *Mitt. Klosterneuburg Rebe und Wein*, **30**, 231-237.
- JÁKÓ N., 1983. Erzeugung symptomfreier Pflanzen aus Triebspitzenmeristem blattrollkranker Stöcke bei *Vitis vinifera* L. cv. Blauer Burgunder, *Mitt. Klosterneuburg Rebe und Wein*, **33**, 15-17.
- JÁKÓ N., 1985. Elimination de l'enroulement par culture d'apex chez la vigne. Coll. Amélior. de la vigne et culture *in vitro*. Paris, **45**.
- LEHOCZKY J., MARTELLI G.P. et SAROSPATAKI Gy., 1969. Leafroll of grapevine in Hungary. *Acta Phytopath.*, **4**, 117-124.
- MUR G., 1979. Thermo-thérapie de variétés de *Vitis vinifera* par la méthode de culture *in vitro*. Quelques observations, quelques résultats. *Prog. Agric. Vitic.*, **96**, 148-151.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.

- MURASHIGE T., 1977. Clonal crops through tissue culture in Barz W., Reinhard R., Zenk M.H. Plant tissue culture and its biotechnological application. Springer V. Berlin, 392-403.
- NITSCH J.P. et NITSCH C., 1969. Haploid plant from pollen grains. *Science*, **163**, 85-87.
- NOVÁK F.J. et JUVOVÁ Z., 1980. Hormonale Regulierung der Entwicklung isolierter Triebspitzen von *Vitis* sp. *in vitro*, Sb. UVTIZ Ochr. Rostl., **16**, 241-252.
- NOVÁK F.J. et JUVOVÁ Z., 1983. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. *Scientia Hort.* Amsterdam, **18**, 231-240.
- PENA-IGLESIAS A. et AYUSO P., 1980. Shoot apex/meristem/micrografting on indexing of infected grapevine varieties at the same time. Proc. 7th Conf. Intern. Coun. Viruses, Viruslike Dis. of the Grapevine. Niagara Falls., 1981, 333-338.
- WHITING J.R. et HARDIE W.J., 1981. Yield and compositional differences between selections of grapevines cv. Cabernet Sauvignon. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **32**, 212-218.
- WOODHAM R.C., ANTCLIFF A.J., KRAKE L.R. et TAYLOR R.H., 1984. Yield differences between Sultana clones related to virus status and genetic factors. *Vitis*, **23**, 73-83.