METHODE DE CONTAMINATION DE RACINES DE VIGNE IN VITRO PAR LE PHYLLOXERA RADICICOLE : APPLICATION A LA RECHERCHE DE PORTE-GREFFES RESISTANTS

R. POUGET

Institut National de la Recherche Agronomique
Station de Recherches de Viticulture — Centre de Recherches de Bordeaux
33140 Pont-de-la-Maye (France)

Travail effectué avec la collaboration technique de M. G. PILY

Le Phylloxéra est un parasite permanent dans la plupart des vignobles du monde car les porte-greffes usuels, considérés comme résistants, ne sont en fait que tolérants et hébergent le plus souvent une population plus ou moins importante de radicicoles. La recherche de porte-greffes présentant, vis à vis du Phylloxéra, une immunité analogue à celle de **Vitis rotundifolia** doit donc être entreprise en vue de supprimer la multiplication de ce parasite dans les sols viticoles. Toutefois, cet objectif est considéré comme encore lointain et, dans un avenir immédiat, il faut s'orienter vers l'obtention de nouveaux porte-greffes présentant des caractéristiques culturales supérieures à celles des variétés existantes (résistance à la chlorose calcaire, par exemple) et un niveau de tolérance au Phylloxéra supérieur ou égal à celui des meilleurs porte-greffes actuels.

La détermination de la résistance au Phylloxéra des nouvelles variétés obtenues par semis doit être réalisée à un stade aussi précoce que possible, pour ne pas avoir à conserver et à élever un trop grand nombre d'individus au-delà de la première année après les semis. Les méthodes adoptées par RAVAZ(1897), MILLARDET (1898), BOUBALS (1966) et par de nombreux autres auteurs (HUSFELD, 1963) s'appliquent à un certain nombre de plants racinés d'une même variété, contaminés en pots par des galles phylloxériques. Ces techniques conduisent à d'excellents résultats et sont fiables. Toutefois, étant donné qu'elles nécessitent des répétitions, elles ne peuvent être mises en œuvre que lorsque l'on dispose, pour un individu donné, d'une quantité suffisante de boutures, ce qui n'est réalisable que 2 à 3 ans après le semis.

Nous avons donc été conduit, pour tester la résistance au Phylloxéra, à rechercher une méthode applicable dès la fin de la première année de semis, au cours de laquelle les plants sont cultivés en serre et alimentés avec une solution en hydroponique. A la fin de ce premier cycle végétatif, les plantes ont acquis une très grande vigueur et le système racinaire est particulièrement bien développé. Les jeunes racines d'un an, à épiderme vivant non exfolié, peuvent alors être maintenues **in vitro** et contaminées par des galles phylloxériques. MILLARDET (1897) et BOUBALS (1966) ont ainsi réussi à faire développer des phylloxéras sur des racines en survie.

METHODE EXPERIMENTALE

Les racines d'un diamètre de 1 à 2 mm, soigneusement lavées et rincées, sont coupées à une longueur de 8 cm environ, après suppression des radicelles et des fines racines latérales. Elles sont alors placées par groupe de 10 dans une boîte de PETRI, sur une couche de papier buvard imbibé d'eau, qui maintient une hygrométrie favorable à la survie des racines. On dispose sur les racines de chaque boîte une ou plusieurs feuilles avec des galles phylloxériques renfermant des œufs ou de jeunes gallicoles. Les galles sont récoltées sur des plantes contaminées en serre.

Les boîtes sont maintenues en étuve à une température de 25 °C. Après une période de 3 à 4 semaines, au cours de laquelle les phylloxéras causent des lésions plus ou moins importantes sur les racines et les jeunes radicelles qu'elles émettent, une notation est réalisée.

Pour chaque variété, deux boîtes de PETRI contenant chacune 10 racines sont ainsi préparées.

1) EVOLUTION DES POPULATIONS DE PHYLLOXERA SUR LES RACINES IN VITRO.

Les jeunes gallicoles présents dans les galles au moment de la contamination, ou issus des œufs quelques jours après, sont actifs et se déplacent rapidement sur les racines en cherchant à se fixer. Leur comportement diffère selon le degré de sensibilité de la variété ou de l'espèce considérée.

a) variétés sensibles

Sur les racines des variétés sensibles **(Vitis vinifera)**, les jeunes phylloxéras se fixent immédiatement en un point quelconque, de préférence

en se groupant par plages sur l'ensemble de la surface. Ils deviennent alors des néogallicoles-radicicoles. Dès leur fixation sur la racine ils commencent à se nourrir et ils grossissent très rapidement. Les 4 mues successives, qui conduisent l'insecte du premier au cinquième stade (adulte), s'échelonnent sur une durée de 10 à 15 jours. Les nouveaux adultes commencent alors à pondre des œufs en nombre variable (de 10 à 50 environ). Après quelques jours, ces œufs éclosent et donnent naissance à une nouvelle génération de radicicoles qui se fixent à côté des adultes.

Parallèlement, un certain nombre de phylloxéras du troisième stade se transforment après la troisième mue en nymphes (quatrième stade), facilement reconnaissables par la présence de fourreaux alaires. Après quelques jours, ces nymphes donnent naissance à des adultes ailés qui meurent après une courte vie de deux ou trois jours.

Au bout d'une période de trois à quatre semaines, la population phylloxérique vivant sur les racines est composée par des individus de tous les stades, à l'exception des formes sexuées.

Dès leur apparition sur la partie basale des racines d'un an, les jeunes radicelles sont envahies par des radicicoles qui y provoquent la formation de nodosités. Ainsi piquées, les radicelles se nécrosent rapidement et au bout de 10 à 15 jours elles sont le plus souvent complètement détruites. Les phylloxéras se replient alors sur la racine-mère ou périssent en même temps que la radicelle.

b) **variétés résistantes**

Sur les racines des variétés résistantes, une partie des jeunes gallicoles, après avoir erré pendant deux ou trois jours, meurt sur place. Quelques-uns d'entre eux se fixent à certains endroits, mais sans chercher à se grouper. Malgré cette fixation par leur rostre enfoncé dans les tissus de la racine, les phylloxéras ne semblent pas pouvoir s'alimenter normalement puisqu'ils ne grossissent pas, à la différence de ceux qui attaquent les variétés sensibles. Ces néogallicoles-radicicoles restent ainsi aplatis sur la racine pendant quelques jours. Au bout de ce laps de temps, de jeunes radicelles apparaissent sur les extrémités basales des racines et sont immédiatement recouvertes par les phylloxéras en attente sur les racines-mères. Il se produit alors une migration de toute la population phylloxérique vers ces jeunes radicelles, sur lesquelles les néogallicoles-radicicoles se nourrissent, muent et pondent. Des nymphes et des ailés apparaissent en proportion plus grande que chez les variétés sensibles.



Fig. 1. — Radicelle de **Vitis rotundifolia** présentant des nécroses aux points de piqûre des phylloxéras radicicoles. Il ne se forme pas de nodosités et la croissance des radicelles n'est pas modifiée. (Classe immune).

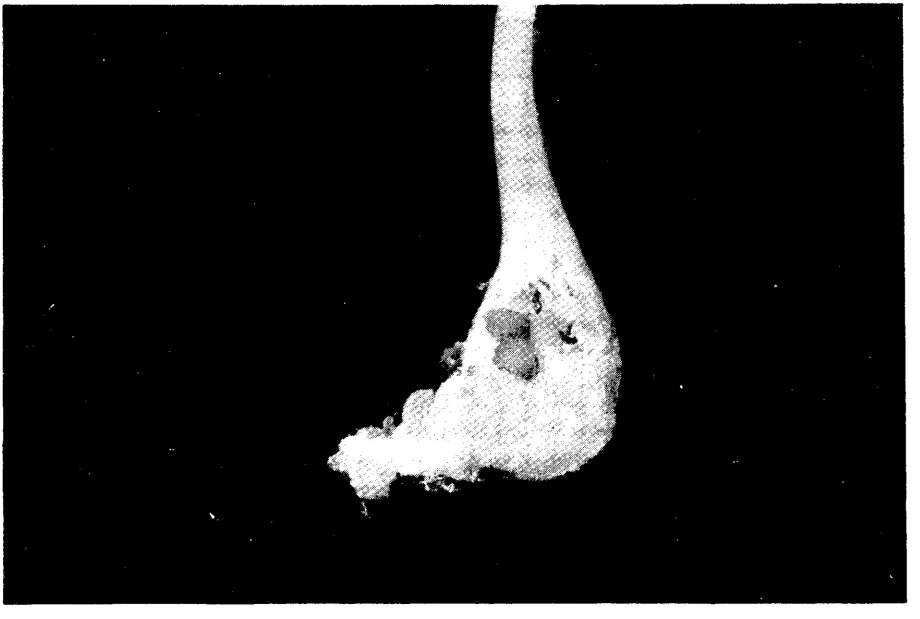


Fig. 2. — Nodosité sur radicelle développée à l'extrémité basale d'une racine d'un an en boîte de PETRI. Plusieurs phylloxéras sont fixés sur la nodosité.

De même, les cals formés au niveau des sections de la racine sont souvent envahis par les phylloxéras qui s'y alimentent normalement et pondent.

La durée de vie des radicelles formées **in vitro** et piquées par les néo-gallicoles-radicicoles ne dépasse généralement pas deux semaines. Au bout de cette période, elles sont nécrosées et les phylloxéras sont chassés vers les racines-mères où ils ne tardent pas à mourir, quel que soit leur stade. La population phylloxérique de la boîte de PETRI diminue alors très fortement et ne comprend plus que les radicicoles présents sur les cals des extrémités de la racine-mère.

2) DESCRIPTION DES LESIONS SUR RACINES IN VITRO - CLASSES DE RESISTANCE.

Les dégâts des phylloxéras radicicoles sont connus depuis fort longtemps et ont été décrits avec précision par de nombreux auteurs (CORNU, 1878 ; RAVAZ, 1897 ; MILLARDET, 1898 ; BOUBALS, 1966, etc). Ces descriptions portent sur les lésions occasionnées par le Phylloxéra sur des racines développées au vignoble ou en pots. Toutefois, si plusieurs travaux ont été consacrés à l'élevage du Phylloxéra sur des racines isolées, l'étude systématique des dégâts provoqués par les piqûres de cet insecte sur des racines de résistance différente n'a pas été entreprise.

Grâce à l'observation d'un très grand nombre de racines appartenant à des espèces et des variétés de niveau de résistance variable, nous avons pu définir plusieurs classes correspondant à une échelle de résistance. Ces classes se caractérisent par des symptômes sur racines et radicelles facilement identifiables. Il est ainsi possible de distinguer cinq classes de résistance variable, analogues à celles qu'a décrites BOUBALS (1966).

1. - **Classe immune.**

Ce groupe comprend les variétés de l'espèce **Vitis rotundifolia.** Les phylloxéras ne se fixent jamais sur les racines d'un an placées en boîte de PETRI. Toutefois, certains piquent les jeunes radicelles mais, ne pouvant probablement pas se nourrir, ils les abandonnent très rapidement et meurent dans un bref délai. Une nécrose brunâtre se développe au niveau du point de la piqûre, sans qu'il apparaisse de déformation sur la radicelle qui continue à croître normalement (fig. 1). Il ne se forme pas de nodosités.

Sur ces racines, qu'on peut qualifier d'immunes, les phylloxéras sont dans l'impossibilité de se nourrir et donc de se multiplier. Au bout de huit

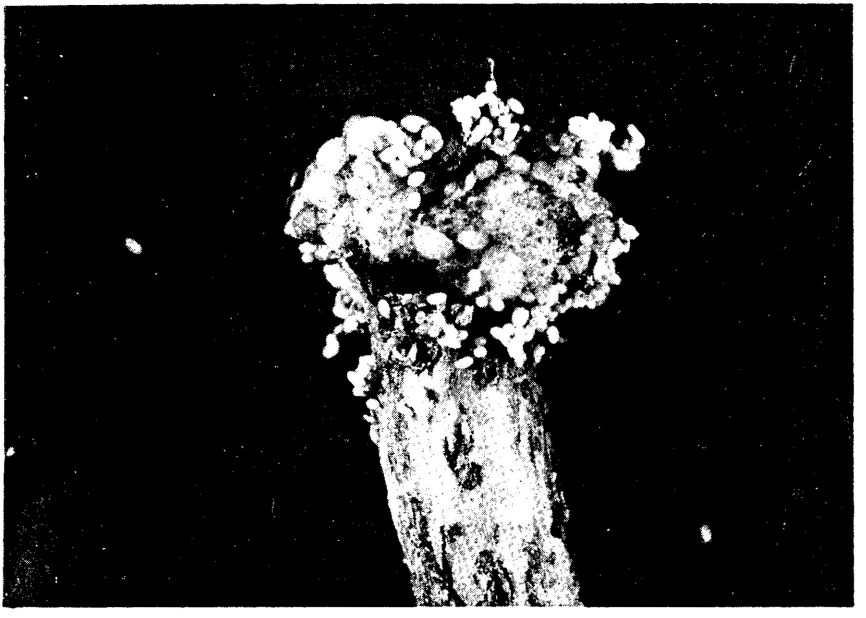


Fig. 3. — Population de phylloxéras fixés sur cal développé à l'extrémité d'une racine d'un an. On remarque un très grand nombre d'œufs. Il n'y a aucun insecte sur la racine-mère. (Classe très résistante).



Fig. 4. — Petites tubérosités portant un ou deux radicicoles. Le nombre d'insectes et d'œufs est toujours très réduit. (Classe résistante).

à dix jours, toute la population d'insectes issue de la galle phylloxérique a péri.

2. - **Classe très résistante.**

Sur des racines d'un an appartenant aux espèces ou variétés de cette classe, on n'observe jamais de phylloxéras fixés. Ceux qui enfoncent leur rostre dans la racine-mère ne provoquent aucune réaction de prolifération des tissus et, ne pouvant pas s'alimenter, ils se retirent en direction des jeunes radicelles en croissance ou des cals formés sur les extrémités basales. Sur les radicelles, les néogallicolles-radicicoles s'établissent en grand nombre et leurs piqûres entraînent rapidement la formation de nodosités classiques en forme de bec d'oiseau (fig. 2). Les phylloxéras peuvent se développer normalement sur ces radicelles, pondre des œufs ou se transformer en nymphes et en ailés. Il en est de même sur les cals (fig. 3).

Dès que les radicelles sont nécrosées sous l'action des piqûres multiples et des nodosités, la population phylloxérique diminue très rapidement et seuls subsistent les insectes présents sur les cals dont la durée de vie est plus longue que celle des radicelles.

Chez les variétés de cette classe, il y a donc une inaptitude des phylloxéras à se fixer et à se développer sur les racines d'un an. On peut classer dans cette catégorie les porte-greffes suivants : **Riparia Gloire de Montpellier, Rupestris du Lot, 140 Ruggeri,** etc.

3 - **Classe résistante.**

Les radicelles formées sur les racines des espèces et variétés de cette classe présentent les mêmes symptômes que celles de la précédente. On observe en plus, sur les racines d'un an, la présence de petites tubérosités en nombre toujours réduit (environ 3 ou 4 sur une longueur de racine de 8 cm). Ces tubérosités sont des renflements de 1 à 2 mm de diamètre sur lesquels sont fixés quelques phylloxéras (de 1 à 4). Les insectes s'alimentent, muent et se transforment en adultes ou en ailés. Cependant, les femelles ne pondent qu'un très petit nombre d'œufs (de 2 à 10 en moyenne) dont certains n'éclosent jamais (fig. 4).

La population phylloxérique développée sur ces tubérosités est toujours très peu nombreuse et, après 2 semaines environ, les insectes fixés abandonnent leurs tubérosités et se dirigent vers les radicelles et vers les cals. On observe alors, à la surface de la tubérosité, la formation d'un épiderme liégeux de couleur brune qui s'exfolie rapidement (fig. 5).

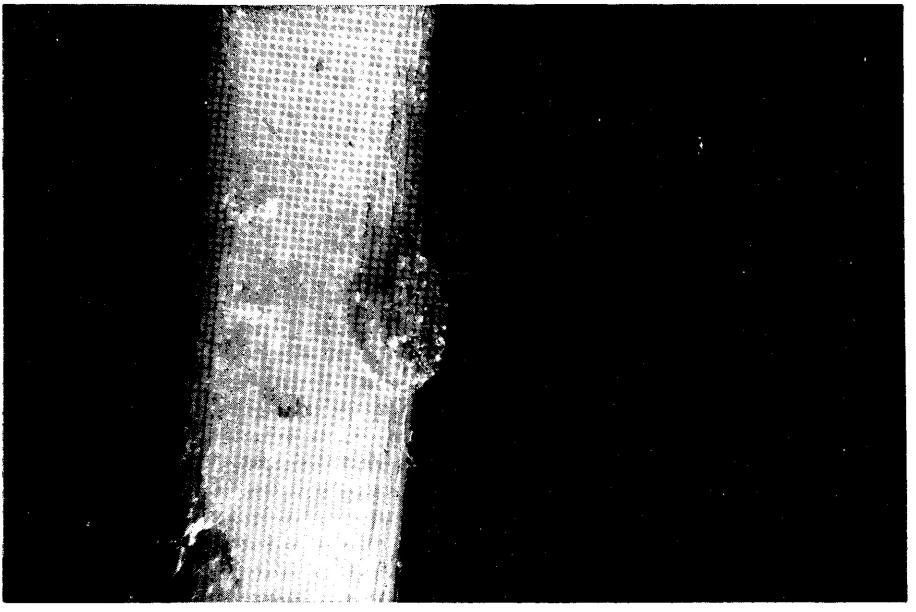


Fig. 5. — Petite tubérosité abandonnée par les phylloxéros. Une couche liégeuse brune commence à se former en surface.

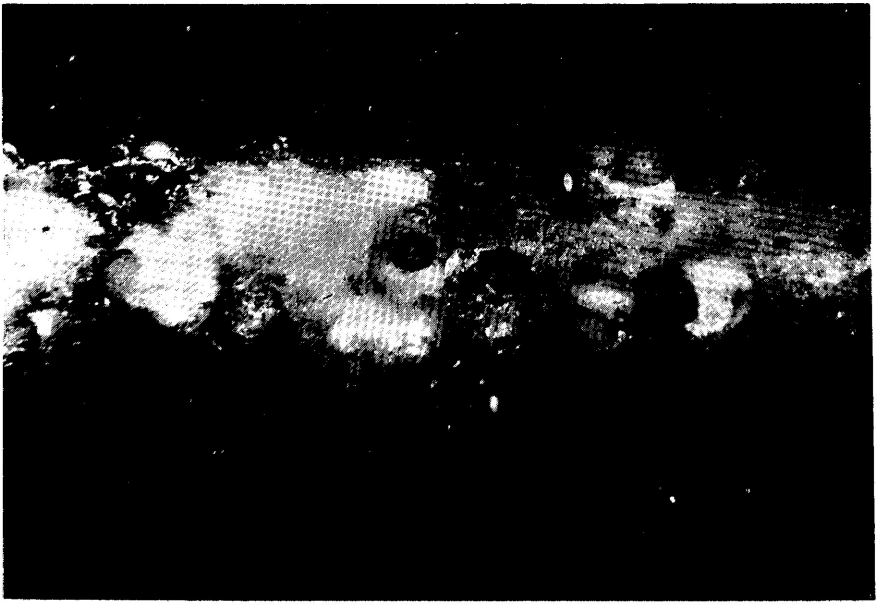


Fig. 6. — Tubérosités portant un ou plusieurs radicicoles. Ces tubérosités sont plus nombreuses et un peu plus volumineuses que celles de la classe résistante. (Classe sensible).

Des coupes tranversales de racines, réalisées au niveau d'une tubérosité, nous ont montré que la formation du périderme primaire (couche liégeuse) n'a pas lieu pendant que des phylloxéras sont fixés et s'alimentent dans les tissus de la tubérosité. Ce n'est qu'après leur départ, au bout de 2 semaines environ, que le périderme commence à se former et à isoler la tubérosité du reste de la racine. Cette observation, qui a été renouvelée de nombreuses fois, semble en accord avec les remarques de MILLARDET (1898). S'il en est ainsi, l'apparition du périderme primaire ne serait pas la cause du départ des phylloxéras et par suite de la résistance de la variété, mais plutôt la conséquence. Il faut donc essayer d'expliquer la résistance variétale en recherchant les causes du départ précoce des phylloxéras plutôt qu'en considérant l'aptitude à former rapidement une couche de périderme primaire qui isole la tubérosité du reste des tissus sains. Cette importante question mériterait d'être approfondie.

Dans cette classe, qui doit être considérée comme résistante, on rencontre la majeure partie des porte-greffes cultivés : **3.309, 101-14, SO_4, 41 B, 333 EM,** etc.

4 - **Classe sensible.**

Les racines d'un an des espèces et variétés de cette classe sont très rapidement recouvertes par un nombre assez élevé de tubérosités (fig. 6). On peut en compter de 5 à 25 par racine de 8 cm de long. Elles sont occupées par un nombre variable de phylloxéras (de 1 à 10) et leurs dimensions sont légèrement supérieures à celles de la classe résistante. Cependant, elles sont rarement confluentes.

La population phylloxérique de ces tubérosités croît assez vite par suite d'une plus grande fécondité des adultes (de 10 à 30 œufs par femelle). Toutefois, au bout de 4 semaines, elle commence à décroître en même temps que de nombreux radicicoles abandonnent les tubérosités qui se comportent alors comme celles de la classe précédente. Il est rarement observé des nécroses de la racine-mère dues à un développement excessif des tubérosités.

Les radicelles sont attaquées dès leur apparition et montrent de nombreuses nodosités qui se nécrosent très rapidement. Les cals sont également envahis par une abondante population phylloxérique.

Cette classe, au sein de laquelle on ne trouve pas de porte-greffes cultivés, mais beaucoup de descendants de croisements entre **Vitis vini-**

fera et diverses espèces de **Vitis** d'origine américaine, doit être considérée comme sensible car les phylloxéras s'établissent avec facilité sur les racines d'un an et s'y multiplient rapidement. Ce groupe est voisin de la classe 2 de BOUBALS (1966).

5 - **Classe très sensible.**

Les néogallicoles-radicicoles se fixent immédiatement sur les racines d'un an, aussitôt après leur sortie des galles foliaires. Ils se groupent par plages et recouvrent complètement de grandes surfaces de chaque racine (fig. 7). Dès leur fixation dans les tissus, ils se nourrissent et muent. Après une dizaine de jours, les premiers adultes commencent à pondre un nombre élevés d'œufs qui éclosent rapidement, augmentant ainsi la population phylloxérique dans de grandes proportions. Le nombre de nymphes est proportionnellement plus faible que dans le cas des classes précédentes.

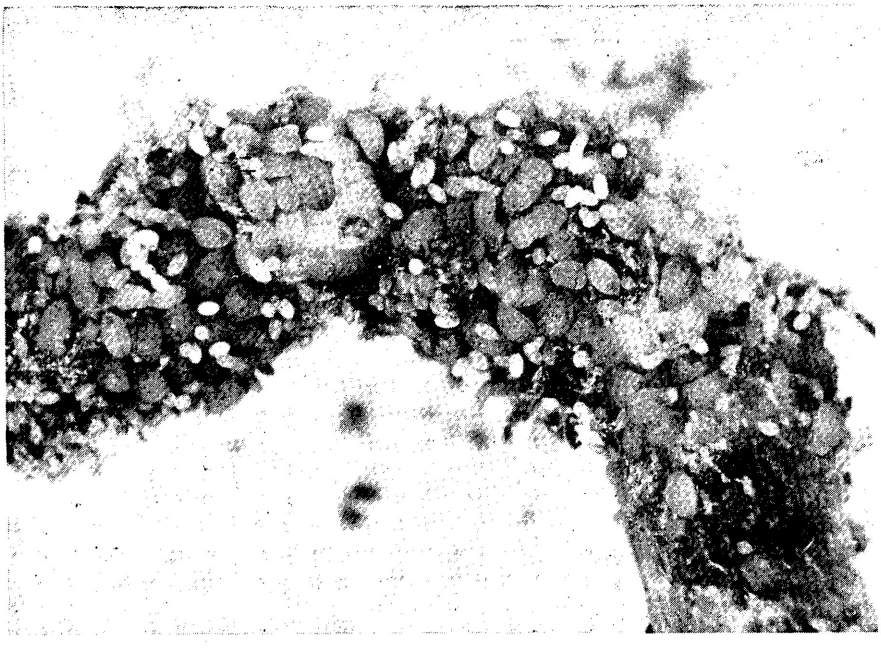


Fig. 7. — Très importante population phylloxérique fixée sur une racine d'un an de **Vitis vinifera.** Tous les stades de développement peuvent être observés. Les tubérosités sont confluentes et constituent un manchon autour de la racine, augmentant ainsi son diamètre. La nécrose de l'ensemble des tissus de la racine survient très rapidement. (Classe très sensible).

Les tubérosités sont plus volumineuses que dans la classe sensible et sont le plus souvent confluentes. Elles constituent un manchon qui entoure plus ou moins complètement la racine (fig. 7).

Des coupes transversales montrent que l'hypertrophie et la prolifération des cellules atteignent le cambium. Il en résulte une nécrose très rapide et généralisée des tissus de la racine qui meurt au bout de 3 semaines environ.

Les radicelles portent des nodosités qui, elles aussi, sont atteintes par la nécrose dans un délai très court.

Les variétés de **Vitis vinifera** appartiennent à cette classe, qui est considérée comme très sensible.

3) UTILISATION DE LA METHODE COMME TEST DE RESISTANCE AU PHYLLOXERA.

Les cinq classes, définies en fonction de l'importance des lésions observées sur racines **in vitro** sont analogues à celles de BOUBALS (1966), qui ont été établies d'après les dégâts notés sur le sytème racinaire des plantes cultivées en pots. Nous avons observé que les variétés de porte-greffes et les espèces de **Vitis** se retrouvent classées de la même façon dans les deux systèmes de notation. On peut donc penser que la méthode de contamination des racines **in vitro** est suffisamment précise et fidèle pour être utilisée comme test de résistance au Phylloxéra.

Ainsi, dès la fin de la première année après le semis, les plantes issues de croisements peuvent être soumises au test de résistance au Phylloxéra. La contamination des racines **in vitro** et les observations des symptômes exigent seulement une période de deux mois, au terme de laquelle une première sélection peut être faite. On élimine alors toutes les variétés qui se retrouvent dans les classes sensibles et très sensibles. Les autres, appartenant aux classes résistantes et très résistantes, sont conservées et plantées au champ d'étude. Dès qu'il est possible d'obtenir des boutures et de préparer des racines, chaque nouveau génotype est testé une nouvelle fois par la méthode classique de contamination en pots. On a ainsi un deuxième contrôle de la résistance au Phylloxéra.

Cette méthode, rapide et sûre, permet donc une sélection précoce des nouvelles variétés de porte-greffes et évite de conserver au-delà d'un an celles qui ne présentent pas un niveau de résistance au Phylloxéra suffisant. Le gain de temps et de surface de plantation est considérable pour le sélectionneur.

CONCLUSION

La méthode de contamination des racines **in vitro** a conduit à des observations intéressantes sur le cycle du Phylloxéra dans ces conditions de milieu et sur l'évolution des diverses lésions provoquées. En plus de l'intérêt qu'elle présente comme test pour les nouveaux porte-greffes, elle peut être employée pour une étude des causes de résistance. En effet, l'observation détaillée de la fixation des phylloxéras sur les racines adultes et de la croissance des tubérosités constitue un moyen intéressant d'apprécier les différences de comportement des variétés et peut contribuer à approfondir la connaissance des causes intrinsèques de la résistance.

Manuscrit reçu le 29 Juillet 1975.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUBALS D., 1966. Etude de la distribution et des causes de la résistance au Phylloxéra radicicole chez les Vitacées. **Ann. Amélior. Plantes., 16,** 145-184.

BOUBALS D., 1966. Hérédité de la résistance au Phylloxéra radicicole chez la Vigne. **Ann. Amélior. Plantes., 16,** 327-347.

CORNU M., 1878. Etudes sur le **PHYLLOXERA VASTATRIX.** Imprimerie Nationale. Paris.

HUSFELD B., 1963. Méthodes de détermination de la résistance de la Vigne au Phylloxéra. **Bull. O.I.V., 36,** 1164-1173.

MAILLET P., 1957. Contribution à l'étude de la biologie du Phylloxéra de la Vigne. **Ann. Sc. Nat. Zool.,** 11ème série, 283-410.

MILLARDET A., 1898. Altérations phylloxériques sur les racines. **Rev. Vitic., 10,** 692-698, 717-722, 753-758.

RAVAZ L., 1897. Contribution à l'étude de la résistance phylloxérique. **Rev. Vitic., 7,** 109-114, 137-142, 193-199.