# RECHERCHES SUR LA CROISSANCE DE LA VIGNE SAINE ET COURT-NOUÉE CULTIVÉE «IN VITRO»

## I. — PREMIERE PARTIE

Mme R. GALZY
Chaire de Génétique
Ecole Nationale Supérieure Agronomique
Montpellier (France)

Ce travail constitue la première partie d'une thèse de doctorat d'Etat consacrée à l'étude de la croissance de la vigne saine et court-nouée cultivée « in vitro », dont quelques résultats ont été déjà publiés ; nous présentons ici une étude complète de ce problème dans laquelle nous incluons les derniers résultats inédits.

Ces recherches sur le court-noué de la vigne ont été entreprises dans le but de mettre au point une méthode de guérison des cépages virosés. Cet objectif a été atteint. Il est possible en effet de guérir par thermothérapie les clones de vigne cultivés « in vitro ». Des plantes saines ont également été obtenues par culture « in vitro » de bourgeons isolés, prélevés sur des plantes malades.

Par ailleurs, la culture des organes de la vigne (bourgeons, méristèmes, embryons) en conditions contrôlées a permis d'aborder des études plus théoriques sur la nutrition minérale, l'induction de la rhizogénèse, les relations hôte-virus à différentes températures.

### INTRODUCTION

Le court-noué, maladie à virus de la vigne, est connu depuis très longtemps dans la plupart des pays viticoles. Il a fait l'objet d'un grand nombre de descriptions et de travaux scientifiques. On a pu, en effet, rassembler sur ce sujet une bibliographie comportant plus de mille titres (CAUDWELL, 1965). Nous ne rappellerons ici que quelques-unes des grandes étapes qui ont marqué l'évolution des connaissances sur le court-noué de la vigne. D'après des références anciennes, citées par RAVAZ, on peut penser que les viticulteurs français connaissaient le court-noué depuis le milieu du XIX$^{e}$ siècle au moins. Dans le même mémoire, RAVAZ décrit de façon détaillée les caractères des vignes court-nouées (RAVAZ, 1900). A cette époque, on savait déjà que la maladie pouvait se transmettre par le sol (RATHAY 1882). Un peu plus tard, un auteur italien, étudiant les caractères anatomiques du court-noué, a mis en évidence l'existence de cordons endocellulaires chez les vignes malades (PETRI, 1911).

Le court-noué a d'abord été attribué aux causes les plus diverses. Cependant, aux environs de 1930, plusieurs auteurs formulaient déjà l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'une virose (PETRI, 1931 - ARNAUD, 1931). La transmission de la maladie par le greffage venait à l'appui de cette hypothèse. Ce caractère essentiel de la maladie, signalé très tôt (PANTANELLI, 1911 - RAVAZ, 1928) a été ensuite confirmé par de nombreux auteurs entre 1945 et 1955 (BRANAS, 1948 - COSMO, 1953 - HEWITT, 1945 - VUITTENEZ, 1952). Ces travaux ont permis d'établir de façon pratiquement irréfutable la nature virale du court-noué de la vigne.

A partir de 1960 environ, les méthodes de la virologie ont pu être appliquées à l'étude du court-noué. Deux découvertes importantes datent en effet de cette époque. D'une part, le vecteur de la maladie a pu être identifié. Il s'agit de **Xiphinema index** THORNE et ALLEN, un nématode ectoparasite des racines de la vigne (HEWITT, RASKI et GOHEEN, 1958). D'autre part, le virus du court-noué a été transmis pour la première fois à des plantes herbacées, isolé et observé au microscope électronique (CADMAN, DIAS et HARRISSON, 1960).

Il devenait donc possible d'étudier les diverses souches du virus par des méthodes sérologiques (HEWITT et TAYLOR, 1963 - VUITTENEZ, 1963). Ces études ont d'abord porté sur des extraits de plantes herbacées préalablement contaminées par voie mécanique. Plus récemment, enfin, le virus a pu être isolé à partir de tissus de vigne (VUITTENEZ et KUSZALA, 1968). A côté du court-noué (ou fanleaf) les auteurs distinguent actuellement plusieurs virus susceptibles d'être hébergés par la vigne (HEWITT, 1968).

Les progrès réalisés depuis dix ans dans la connaissance des viroses de la vigne ont naturellement permis d'améliorer beaucoup les méthodes de lutte contre le court-noué. Les efforts pour limiter l'extension de cette maladie se sont développés simultanément dans plusieurs domaines. La recherche de plantes indemnes de virus par sélection visuelle a été poursuivie. Mais on a pu également créer du matériel sain par de nouvelles méthodes telles que la thermothérapie (GIFFORD et HEWITT, 1961 - GALZY, 1961). Enfin, la connaissance du vecteur de la maladie a permis d'établir le matériel sélectionné, dans des sols non contaminants.

Parmi les différents problèmes posés par la lutte contre les viroses de la vigne, c'est la production de matériel végétal non virosé, qui a retenue toute mon attention. Il m'a semblé qu'en plus de leurs applications pratiques, ces recherches présentaient un intérêt du point de vue fondamental. Elles se rapportent, en effet, à des phénomènes biologiques

importants, notamment dans le domaine des relations hôte-virus. On sait que, chez une plante virosée, certaines cellules échappent parfois à l'invasion virale. Ainsi, au cours de la multiplication cellulaire, un organe sans virus peut se former : méristème, embryon, bourgeon, etc. On a démontré par exemple la répartition hétérogène du virus de la mosaïque du tabac dans des colonies tissulaires de tabac cultivées **in vitro** : 38 p. 100 seulement des cellules provenant de cals infectés hébergeaient le virus (SAMPATH, LUTZ et HIRTH, 1966). Des phénomènes analogues se traduisant par une invasion virale incomplète ont également été signalés chez des plantes entières (KUNKEL, 1939 - MARAMOROSCH, 1949) et pour des virus d'insectes (L'HERITIER, 1958). Ils peuvent conduire à la création d'individus sains à partir d'organismes virosés. Cette possibilité a été exploitée par les phytopathologistes. Ainsi, la culture des méristèmes mise en pratique, d'abord par MOREL (MOREL et MARTIN, 1952) est actuellement utilisée à l'échelle industrielle pour la création de plantes indemnes de virus.

Plusieurs sortes de facteurs peuvent favoriser l'élimination du virus d'une partie ou de l'ensemble de son hôte. Il peut s'agir de facteurs physiques. Dans d'autres cas, ce sont les caractéristiques biologiques de certaines cellules qui paraissent s'opposer à l'expansion du virus (cas de méristèmes, d'embryons ou de cellules réfractaires à l'infection virale telles que celles isolées par SAMPATH et **al.** à partir de tissus de tabac). On sait, d'autre part, que certaines plantes sont capables de répondre à la contamination par la formation d'une substance antivirus (KASSANIS, 1963 - SELA, 1964). Parmi les facteurs physiques défavorables à la multiplication des virus on peut citer les températures élevées. Leur action a été souvent démontrée, aussi bien dans le cas des virus animaux (LWOFF, 1958 - BRUN, 1963), que chez les plantes où cette propriété a fait l'objet d'un grand nombre d'applications. La thermothérapie a permis d'obtenir la guérison de nombreuses viroses. Dans certains cas cependant, seules les extrémités des axes développés à température élevée se trouvent indemnes de virus. On peut alors prélever ces extrémités et les bouturer (QUAK, 1957). Ces différentes techniques font l'objet de revues générales assez fréquentes (HOLLINGS, 1965 - NYLAND et GOHEEN, 1969).

Compte tenu de ces éléments, j'ai fixé comme but à mon travail l'étude, chez la vigne court-nouée, des relations hôte-virus dans différentes conditions de température et de milieu nutritif. Ces recherches ont présenté deux aspects principaux.

Il était tout d'abord indispensable de disposer d'une méthode permettant de cultiver la vigne en conditions entièrement contrôlées. J'ai donc été amenée dans un premier temps, à mettre au point la culture **in vitro** de différents organes : les embryons, les bourgeons axillaires et les apex. Une méthode permettant de chiffrer le développement d'un lot de plantes cultivées **in vitro** à été adoptée et appliquée tout au long de ce travail. Ainsi, au cours de la mise au point des méthodes de culture, on a pu étudier systématiquement l'action de certains éléments du milieu nutritif (substances de croissance, saccharose, vitamines, éléments minéraux) sur l'enracinement et la croissance des boutures de vigne.

Par la suite, grâce à ces méthodes expérimentales, il a été possible d'aborder l'étude des plantes virosées dans le but de préciser certains aspects des relations hôte-virus. La culture **in vitro** de bourgeons isolés prélevés sur des vignes malades a permis d'étudier d'abord la répartition du virus à l'intérieur de la plante. Des zones sans virus ont pu être mises en évidence. D'autre part, il était important d'étudier l'action de la température sur la virose. On a donc comparé systématiquement la croissance des boutures saines et court-nouées à différentes températures. Ce travail a permis de préciser, pour chaque température, l'action de la virose sur le développement de l'hôte. Il a été possible de définir des conditions précises de culture assurant l'élimination du virus chez les plantes cultivées **in vitro.**

Tout au long de ce travail se sont dégagées diverses possibilités d'applications agronomiques. On peut, par exemple, créer des plantes saines par thermothérapie, par culture de bourgeons sans virus isolé **in vitro,** ou, éventuellement, par culture de méristèmes. De même, le bouturage en conditions stériles peut aider à résoudre les problèmes posés par la conservation et la multiplication des plantes indemnes de virus.

## LA CULTURE IN VITRO DES ORGANES DE LA VIGNE

La réalisation d'un travail sur le court-noué de la vigne présentait des difficultés liées à la nature arbustive de la plante hôte. Son grand développement et son rythme végétatif annuel se prêtent mal à la culture dans des conditions parfaitement contrôlées. Pour la plupart des expériences, il a été possible d'éviter cet inconvénient en faisant appel à la culture **in vitro.** Des plantes ont pu être obtenues en culture stérile à partir d'un bourgeon latent, d'un embryon, ou d'un sommet végétatif en cours de croissance.

### I. - Méthodes utilisées pour l'obtention et l'étude des cultures « in vitro ».

A. - MISE EN CULTURE ET MULTIPLICATION PAR BOUTURAGE.

La préparation des milieux nutritifs et la mise en culture du matériel végétal se font selon les techniques habituelles des cultures de tissus (MOREL, 1948). Les détails de la méthode peuvent cependant varier selon la nature de l'organe prélevé : embryon, bourgeon latent provenant d'un rameau herbacé ou aouté, bouture terminale... Des descriptions détaillées ont été fournies pour chacun de ces cas (GALZY et GALZY, 1964 - GALZY, 1964 et 1969).

L'organe mis en culture se développe généralement pour donner une plante entière qui pourra, par la suite, être multipliée par voie végétative **in vitro.** Il suffit pour cela de prélever stérilement la tige, de la découper en boutures portant chacune une feuille à leur sommet et de planter chaque bouture dans un nouveau tube de milieu nutritif (fig. 1).

Cette méthode permet de conserver des clones de vigne **in vitro** de façon apparemment indéfinie. Certains sont maintenus dans ces conditions depuis plus de dix ans.

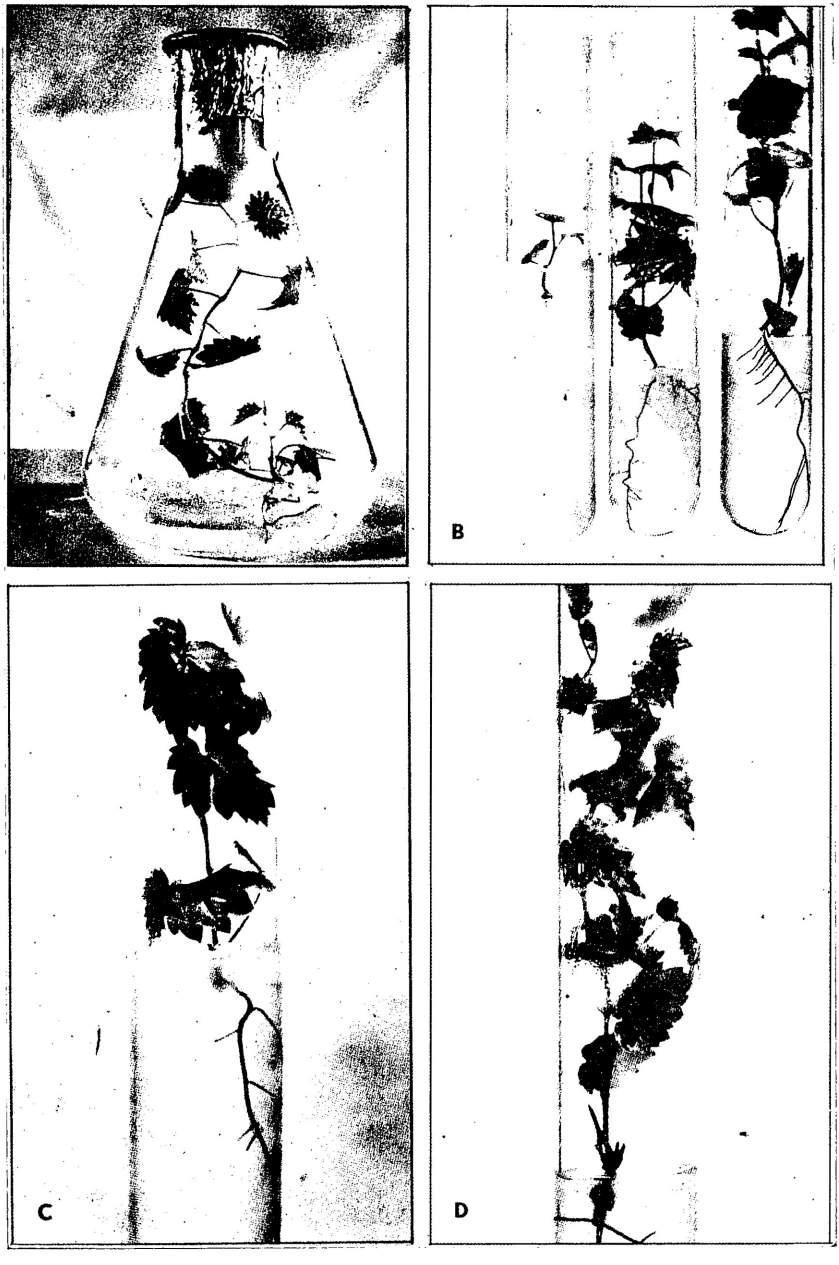



*Fig. 1 - Exemples de cultures de vigne obtenues in vitro à partir de différents organes.*
*A - Vitis vinifera var. Chasselas. Plante obtenue à partir d'une culture de bourgeon.*
*B - Plantes obtenues à partir de cultures de bourgeons. De gauche à droite : 110 Richter, hybride V. berlandieri x V. rupestris, Vitis rotundifolia et 44-53 Malègue, hybride V. riparia x (V. cordifolia x V. rupestris).*
*C - Vitis vinifera var. Carignan, plante obtenue à partir d'une culture de bourgeon.*
*D - Vitis vinifera var. Aramon. Plante issue d'un embryon obtenu par autofécondation et présentant une panachure d'origine génétique.*

Les plantes sont entreposées dans des enceintes climatisées dont la température est réglable avec une erreur maximum de ± 0,5 °C. Plusieurs de ces enceintes ont été décrites (GALZY, 1964 - GALZY et NIGOND, 1968). La température la plus utilisée est celle de 20 °C obtenue dans une pièce de culture climatisée. Les diverses enceintes réglables entre + 15 °C et + 40 °C sont munies d'un éclairage d'environ 2 500 lux, fonctionnant pendant 12 heures par jour. Par contre, les expériences à basse température (entre + 2 °C et + 10 °C) ont été réalisées dans des pièces obscures.

Notons enfin que l'atmosphère à l'intérieur des tubes de culture est généralement saturée d'humidité.

B. - METHODE D'ETUDE DE LA CROISSANCE **IN VITRO.**

Une méthode permettant d'étudier la croissance d'un lot de boutures a été adoptée et utilisée dans la plupart des expériences. Chaque condition expérimentale était appliquée à un lot de 30 à 50 boutures. L'enracinement et la croissance de ces boutures étaient suivis avec soin. La longueur des racines était notée, d'abord chaque jour pendant la période d'émission des racines, puis une fois par semaine jusqu'au quarantième ou au quatre-vingt dixième jour, selon que la croissance était plus ou moins rapide. L'allongement des tiges était suivi, de la même façon, pendant 100 à 130 jours. Ces notations permettent d'établir la courbe représentant les fréquences cumulées de boutures enracinées en fonction du temps ainsi que les courbes de croissance moyennes des tiges et des racines. On a parfois noté également le nombre total de racines apparues sur chaque bouture. Pour la présentation des résultats on a généralement retenu cinq critères qui permettent de rendre compte du développement d'un lot de boutures :

**a)** Le pourcentage final de boutures enracinées, c'est-à-dire le pourcentage observé après 30 jours de culture dans le cas le plus général.

**b)** La vitesse moyenne d'émission des racines établie selon une méthode mise au point pour l'étude de la vitesse de débourrement des bourgeons de la vigne (NIGOND, 1967). L'inverse du temps (exprimé en jours) nécessaire à l'enracinement de chaque bouture représente la vitesse d'enracinement de cette bouture. Une vitesse nulle est affectée aux boutures non enracinées après 35 jours. La moyenne de ces valeurs représente la vitesse d'enracinement du lot de boutures. Cette vitesse est multipliée par cent pour faciliter les calculs et l'établissement des graphiques. Le temps moyen d'émission des racines exprimé en jours sera

égal à l'inverse de la vitesse moyenne. Les boutures cultivées sur le milieu nutritif habituel présentent en général une seule racine. Dans les cas où deux racines sont apparues il n'est tenu compte que de la première pour le calcul de la vitesse d'enracinement.

**c)** La vitesse maximale moyenne de croissance des racines exprimée en millimètres par jour. La courbe de croissance moyenne d'un lot de boutures est établie et la pente est calculée pour la partie rectiligne de la courbe. Seules les plantes présentant une racine sont prises en considération pour ce calcul.

**d)** La vitesse maximale moyenne de croissance des tiges calculee de la même façon, pour les plantes enracinées.

**e)** Enfin, dans le cas des boutures terminales, il a paru utile de tenir compte également du temps de latence qui s'écoule entre la mise en culture et le début de la croissance linéaire des tiges. Cette valeur est déterminée à partir de la courbe de croissance moyenne des tiges d'un lot.

C. - REMARQUES GENERALES.

La multiplication de la vigne par bouturage stérile **in vitro** permet de disposer à tout instant de matériel végétal produit dans des conditions de milieu bien définies et reproductibles. Ainsi les clones constituant notre matériel expérimental étaient toujours cultivés sur le milieu de référence contenant les solutions de KNOP et de BERTHELOT, du saccharose et six vitamines. Ils étaient conservés à 20 °C et éclairés pendant douze heures par jour. Des boutures prélevées sur ces stocks pouvaient, selon les besoins de l'expérimentation, être plantées sur des milieux nutritifs divers et placées à la température voulue.

Il est important de souligner que les plantes ainsi cultivées **in vitro** et soumises à des températures et des durées d'éclairement constantes, ne manifestent aucun rythme endogène apparent. On n'observe pas d'arrêt de croissance, et l'aptitude à l'enracinement des boutures paraît demeurer constante en fonction du temps. La multiplication végétative peut donc être réalisée tout au long de l'année. Ainsi la culture **in vitro** permet-elle de résoudre au moins en partie les difficultés expérimentales liées à la nature arbustive de la plante étudiée. Elle permet d'étudier l'action de certains facteurs (température, éléments nutritifs, virus) sur la rhizogenèse et la croissance.

Le bouturage **in vitro** peut également présenter un intérêt dans le domaine de la technique viticole. D'une part, il constitue un moyen commode pour conserver des clones de vigne à l'abri des contaminations virales pendant de longues périodes. D'autre part, il peut permettre la multiplication rapide du matériel végétal. Si la température de culture est bien choisie, le nombre de plantes peut en effet être multiplié par dix tous les trois mois, et cela en toutes saisons. Il est ensuite facile de transférer les plantes, d'abord en serre, puis en plein champ. Cette technique peut donc permettre la création rapide, à partir de quelques tubes, d'un grand nombre de plantes destinées, soit à l'expérimentation en plein champ, soit à la production.

## II. - CULTURE DES EMBRYONS DE VIGNE.

Quelques expériences réalisées au début de ces recherches ont permis de mettre au point la culture des embryons de vigne. Leur développement a pu être obtenu sur le milieu de référence additionné de 10 p. 100 de lait de coco. Après deux mois de culture sur ce premier milieu, les plantules peuvent poursuivre leur croissance en l'absence de lait de coco. Il est possible par la suite de les multiplier par bouturage. De façon générale, elles présentent les mêmes possibilités expérimentales que les cultures de bourgeons de vigne.

Cette méthode de culture a permis de faire quelques observations relatives à l'action des températures élevées sur le caractère « panachure blanche » d'origine monogénique que l'on rencontre chez certaines vignes obtenues par autofécondation. L'expression de ce caractère est sous la dépendance étroite des conditions de milieu. En effet, cultivés à 20 °C, les mutants homozygotes présentent des feuilles panachées vertes et blanches. Mais, cultivés à 35 °C, ils ne forment que des organes verts. Cependant, l'action de la température 35 °C, est parfaitement réversible. Après un séjour, même prolongé, à 35 °C, les plantes conservent la possibilité de former des feuilles panachées dès leur retour à 20 °C.

La culture **in vitro** des embryons de vigne pourrait se prêter à d'autres expérimentations. Il serait possible, par exemple, d'étudier par ce moyen, la transmission par la graine des viroses de la vigne.

## III. - CULTURE DES BOURGEONS DE VIGNE.

Un milieu nutritif mis au point en 1960 a permis la culture et la multiplication prolongée **in vitro** de quarante variétés de vigne environ. Il

s'agit d'espèces américaines (**Vitis rupestris** et **V. riparia**), d'hybrides inter spécifiques et de plusieurs variétés de **Vitis vinifera.** Ce milieu nutritif à base de solution de KNOP (milieu de référence) a donné des résultats satisfaisants dans la plupart des cas étudiés. Il était néanmoins nécessaire de préciser certains aspects de la nutrition des boutures de vigne ainsi maintenues en culture sur milieu synthétique. Notons dès maintenant que le comportement des bourgeons de vigne est différent selon qu'ils proviennent de plantes établies en plein champ ou de plantes cultivées **in vitro** à température constante. Dans le premier cas, l'enracinement et la croissance peuvent varier de façon considérable avec la date du prélèvement. Dans le second cas, au contraire, les résultats obtenus sont très constants. C'est pourquoi les recherches relatives à l'action du milieu sur le développement des boutures de vigne ont toujours porté sur des plantes ayant déjà subi au moins un bouturage **in vitro.**

## A. - CULTURE DE BOURGEONS PRELEVES SUR UNE SOUCHE DE VIGNE ETABLIE EN PLEIN CHAMP.

La culture **in vitro** se prête assez mal à l'étude du développement des bourgeons prélevés sur la souche de vigne cultivée en conditions normales. Les difficultés rencontrées dans la stérilisation du matériel végétal gênent considérablement l'expérimentation. Néanmoins, un certain nombre d'observations ont été faites. Elles ont permis de déterminer les conditions les plus favorables à la mise en culture du matériel destiné à être conservé et étudié **in vitro.** La première culture **in vitro** d'un clone de vigne est faite à partir de fragments de mérithalles portant un bourgeon latent à leur sommet. Placés sur le milieu de référence et maintenus à 20 °C, ces bourgeons peuvent présenter une rhizogenèse et une croissance très variable selon leur état physiologique au moment du prélèvement. D'une façon générale, on assiste d'abord à un début de croissance du bourgeon, puis à l'émission des racines. Chez **Vitis rupestris** le développement le plus rapide est obtenu pour des bourgeons prélevés, avant l'établissement de la dormance, sur les parties herbacées des rameaux. Dans ces conditions on peut observer la croissance des tiges à partir du dixième jour de culture et l'émission des racines à partir du dix septième jour environ. La vitesse d'émission des racines est alors maximale (de l'ordre de 5). On doit souligner que cette vitesse est toujours inférieure à celle observée lorsque les boutures sont prélevées sur une plante cultivée **in vitro** (elle est alors comprise entre 8 et 9). Plusieurs facteurs sont susceptibles de modifier la vitesse d'émission des racines chez les boutures prélevées en plein champ, notamment l'époque du prélèvement et le niveau

du bourgeon sur le rameau en cours de croissance. On remarque, en particulier, que dans nos conditions de culture, il est très rare d'obtenir l'enracinement des bourgeons prélevés pendant la période de dormance maximale.

Les clones de vigne destinés à être étudiés en culture **in vitro** ont donc été mis en culture de préférence en mai ou juin. Les bourgeons étaient prélevés sur les parties jeunes des rameaux, à l'exclusion toutefois de la zone terminale correspondant aux deux premières feuilles étalées. Cependant, des prélèvements systématiques sur toute la longueur des rameaux et à différentes époques ont dû être effectués pour étudier la répartition du virus du court-noué à l'intérieur de la plante hôte.

## B. - CULTURE PROLONGEE **IN VITRO** DE CLONES DE **VITIS RUPESTRIS** MULTIPLIES PAR BOUTURAGE. ETUDE DES BESOINS NUTRITIFS.

Le bouturage sur le milieu de référence permet de disposer de lots de plantes importants. Ce matériel a été utilisé pour étudier certains aspects des besoins nutritifs de la vigne cultivée **in vitro** (GALZY, 1969 **b**). D'une part, il a paru intéressant de préciser dans quelle mesure ces boutures se comportaient comme des plantes autotrophes. D'autre part, il était important de distinguer, dans la mesure du possible, les besoins nutritifs correspondant à chaque stade du développement des boutures : émission des racines, croissance des racines, croissance des tiges. Il était, en effet, nécessaire de pouvoir agir sur ces différents phénomènes en modifiant la composition du milieu de culture. Il est parfois difficile, par exemple, d'obtenir l'enracinement de toutes les boutures mises en culture. Certaines variétés, ainsi que les clones atteints d'une forme grave de court-noué, présentent en effet une mauvaise rhizogenèse. Pour cette raison, l'étude du milieu nutritif a porté essentiellement sur les facteurs susceptibles d'exercer une action favorable sur la différenciation ou la croissance des racines (certains éléments minéraux et des vitamines). Ce travail avait également pour but de préparer une recherche ultérieure sur la culture des méristèmes de vigne, technique pour laquelle l'enracinement est aussi un facteur essentiel de réussite.

### 1° Rôle du saccharose et des vitamines.

Des expériences ont été réalisées afin de préciser les conséquences de la suppression des vitamines ou du saccharose dans le milieu de référence, les plantes étant maintenues soit à 20 °C, soit à 35 °C. Ce travail a porté sur un clone non virosé de **Vitis rupestris** var. du Lot. Il a permis de constater que, dans nos conditions de culture, les boutures comportant une feuille étalée, ne sont pas entièrement autotrophes (fig. 2).

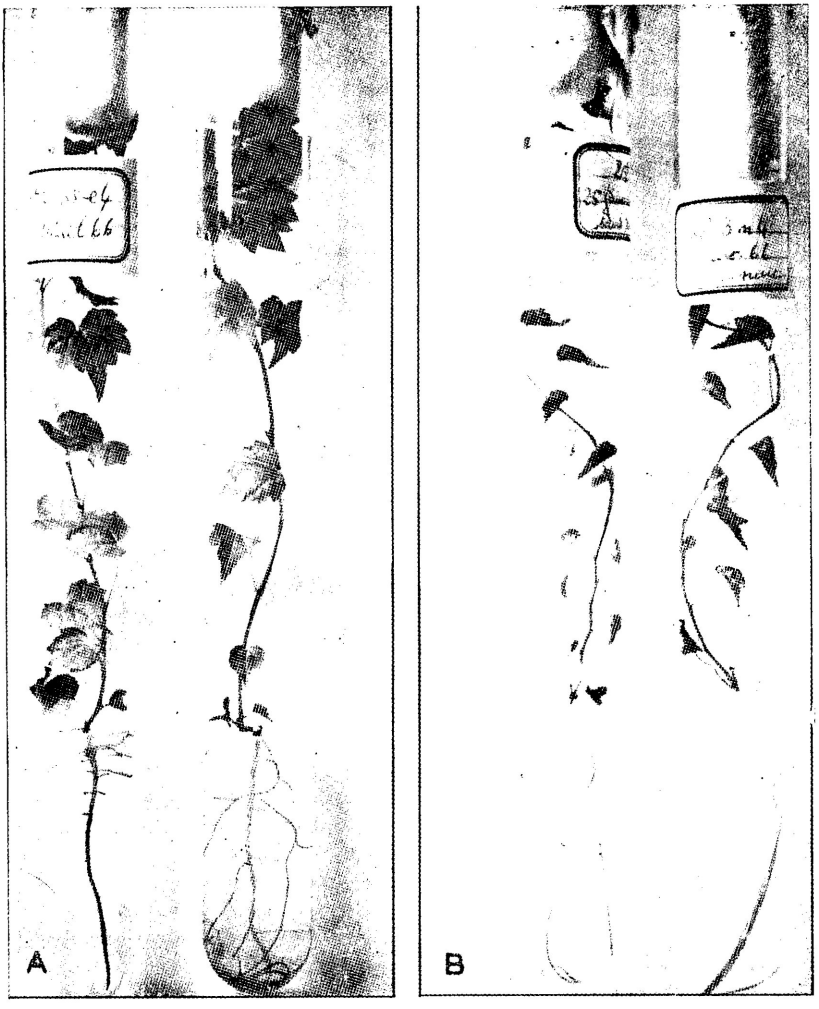



*Fig.2 - A - Plantes de Vitis rupestris cultivées in vitro à 20° C depuis quatre mois sur des milieux nutritifs contenant des sels minéraux et du saccharose.*
*A droite, milieu avec vitamines. A gauche, milieu sans vitamine.*
*B - Plantes de Vitis rupestris cultivées in vitro à 20° C depuis sept mois sur des milieux nutritifs contenant des sels minéraux mais privés de saccharose.*
*A droite, milieu avec vitamines, A gauche, milieu sans vitamine.*

En l'absence de sucre, en effet, la vitesse de croissance des tiges est réduite de moitié dès la première culture. Les vitesses d'émission et de croissance des racines diminuent à partir de la deuxième culture sur un milieu sans sucre.

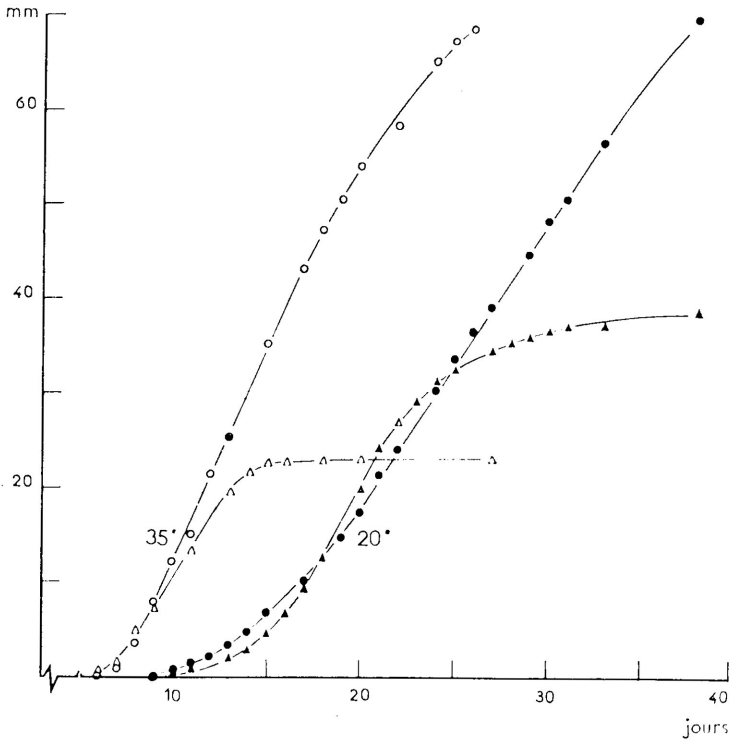



Fig. 3 Comparaison de la croissance des racines de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro* à 20° et à 35° C.

o Milieu avec sucre et vitamines à 35° C. ● Milieu avec sucre et vitamines à 20° C. △ Milieu avec sucre, sans vitamine, à 35° C. ▲ Milieu avec sucre, sans vitamine, à 20° C.

L'absence de vitamines se traduit par l'apparition de nécroses à l'extrémité des racines lorsque le milieu de culture contient du saccharose. A 20 °C, la plante parvient à surmonter cette crise. Vers le vingtième jour on assiste, en effet, à un arrêt de la croissance des racines, mais la croissance des tiges se poursuit et, vers le quatre-vingtième jour, lorsque celles-ci portent plusieurs feuilles, de nouvelles racines apparaissent. La plante se rétablit alors totalement. A 35 °C, au contraire, les nécroses apparaissent de façon plus précoce et la croissance de la plante est très réduite sur les milieux sans vitamines. Il serait intéressant d'expliquer cette différence de métabolisme entre les cultures maintenues à 20 et à 35 °C (fig. 3). On sait que les vitamines du groupe B, nécessaires à la croissance des racines, interviennent dans le fonctionnement de certains enzymes. La thiamine, sous forme de pyrophosphate fait partie du groupement prosthétique de carboxylases. Elle joue un rôle dans la respiration des racines et son absence peut entraîner l'arrêt des divisions cellulaires

dans le méristème radiculaire (BONNER et GALSTON, 1952). La pyridoxine, nécessaire au fonctionnement des transaminases intervient dans la synthèse des acides aminés. Enfin, l'acide nicotinique, en tant que précurseur du D.P.N., joue un rôle dans le fonctionnement des déshydrogénases.

On considère généralement qu'aux températures élevées la vitesse de la photosynthèse diminue plus vite que celle de la respiration. Une partie importante des produits de la phostosynthèse serait alors immédiatement catabolysée (LANGRIDGE et Mc WILLIAM, 1967). Néanmoins, les mêmes auteurs signalent que la respiration elle-même est très perturbée aux températures voisines de 35 °C. Les membranes mitochondriales seraient endommagées ; le fonctionnement du transport des électrons (cytochromes) serait très affecté ; enfin, les phosphorylations oxydatives pourraient être totalement inhibées. Ainsi, les températures élevées, provoquant une diminution de la respiration terminale et un découplage entre les oxydations et les phosphorylations, il est possible que le DPNH s'accumule dans les cellules entraînant des besoins supplémentaires en DPN oxydé et par conséquent en acide nicotinique. Il est probable que bien d'autres mécanismes peuvent intervenir pour augmenter les besoins en vitamines des racines aux températures élevées. En effet, un grand nombre de protéines enzymatiques se trouvent plus ou moins inhibées à ces températures.

Par ailleurs, il semble que l'absence simultanée du saccharose et des vitamines soit moins défavorable à la croissance des racines que l'absence des seules vitamines. En effet, on n'observe dans ce cas, aucune nécrose des racines. On peut se demander si la présence de saccharose, assurant un métabolisme plus actif ne provoque pas la consommation plus rapide et plus complète des vitamines préexistant dans la bouture au moment de la mise en culture. Cette observation démontre bien que certains équilibres entre les éléments du milieu nutritif doivent être respectés.

2° **Rôles des ions potassium et ammonium.**

Les cations monovalents $K^+$ et $NH_4^+$ jouent un rôle important dans la croissance et la différenciation de nombreux organes végétaux. Ils favorisent notamment la croissance des méristèmes isolés en culture **in vitro** (MOREL et MULLER, 1964). On sait également que le potassium augmente la vitesse de croissance des tiges chez de nombreuses espèces. Il nous a donc paru important de comparer la croissance des boutures de vigne sur le milieu minéral de KNOP et sur des milieux plus riches en potassium et

en ammonium (tableau I). Ces expériences ont porté sur deux clones de **Vitis rupestris,** l'un sain, l autre présentant une forme grave de court-noué.

On constate qu'à chaque phase de développement des boutures (différenciation des racines, croissance des racines et croissance des tiges) correspond un optimum différent de teneur du milieu en ions K et $NH_4$. La différenciation des racines se fait dans les meilleures conditions en présence de fortes doses de cations monovalents (environ $15 \times 10^{-3}$ ions-grammes par litre de potassium et d'ammonium). L'action favorable des milieux riches en K et $NH_4$ est particulièrement nette dans le cas des boutures atteintes de court-noué dont la rhizogenèse est faible à 20 °C sur le milieu à base de solution de KNOP. Ainsi, dans une expérience où le clone malade ne donnait que 10 p. 100 de boutures capables de s'enraciner sur le milieu de référence, ce même clone s'enracinait dans 40 p. 100 des cas lors du premier bouturage en présence de la solution minérale K—$NH_4$—1 000, et dans 80 p. 100 des cas lors du deuxième bouturage consécutif sur ce milieu. Il semble donc que l'action de ces cations soit de plus en plus nette au fur et à mesure des repiquages successifs. On peut se demander s'il n'existe pas des interactions complexes entre le phénomène de différenciation des racines, la virose et la présence dans les cellules de quantités importantes d'ions $K^+$ et $NH_4^+$. Rappelons à cet égard qu'une action du potassium sur le fonctionnement du matériel génétique a été signalée (KROEGER, 1963). Cet élément serait responsable, chez certains insectes, d'une activité très intense des gènes conduisant à la mue. La même hypothèse a été reprise pour expliquer des phénomènes particuliers de croissance et de différenciation observés chez les plantules de blé (CHAUSSAT, 1968). La même propriété des ions $K^+$ ne pourrait-elle pas expliquer leur action, d'une part, sur la différenciation des racines, d'autre part, sur le développement de la virose, celui-ci pouvant être soumis à une régulation de la part d'inhibiteurs d'origine génétique ?

Les fortes teneurs en potassium et en ammonium ont, au contraire, inhibé la croissance des racines. Les doses les plus favorables à cette croissance sont de l'ordre de 1 à $2 \times 10^{-3}$ ions-grammes par litre. Enfin, la croissance des tiges se fait dans les meilleures conditions en présence de $7{,}5 \times 10^{-3}$ ions-grammes par litre de $K^+$ et $NH_4^+$. On peut se demander s'il ne serait pas utile d'adopter un milieu nutritif particulier pour chacun des stades de la culture **in vitro** des boutures de vigne. Le milieu KNOP, bien que peu favorable à la différenciation des racines, convient pour la culture des clones ayant une bonne rhizogenèse. Mais pour d'autres clones, comme ceux qui sont atteints de court-noué, il pourrait être intéressant de provoquer l'émission des racines en présence d'un milieu

## TABLEAU I

**Composition de quelques solutions nutritives utilisées pour la culture** in vitro **de la vigne.**

| | |
|---|---|
| 1. - **Composition du milieu de référence** | |
| Solution de KNOP à la dilution 1/2 | 1000 ml |
| Solution de BERTHELOT | 0,5 ml |
| Saccharose | 15 g |
| Gélose | 8 g |
| Thiamine (Concentration poids/volume) | $10^{-6}$ |
| Pyridoxine » | $10^{-6}$ |
| Acide nicotinique » | $10^{-6}$ |
| Panthoténate de calcium » | $10^{-6}$ |
| Inositol » | $10^{-5}$ |
| Biotine » | $10^{-8}$ |
| pH ajusté à 6,5 | |
| 2. - **Solution de KNOP modifiée par MOREL** (K-$NH_4$-1000) | |
| Eau | 1000 ml |
| $(NO_3)_2Ca$, 4 $H_2O$ | 500 mg |
| $SO_4Mg$, 7 $H_2O$ | 125 mg |
| $PO_4H_2K$ | 125 mg |
| Cl K | 1000 mg |
| $SO_4(NH_4)_2$ | 1000 mg |

Les solutions minérales K—$NH_4$ 500, 250, 125 et 62 ne diffèrent de la solution K—$NH_4$—1000 que par leur teneur en Cl K et $SO_4(NH_4)_2$ qui est égale à 500 mg, 250 mg, etc.

3. - **Composition des solutions minérales exprimée en millièmes d'ions grammes/l.**

| | $Cl^-$ | $NO_3^-$ | $SO_4^{--}$ | $PO_4^{---}$ | $K^+$ | $NH_4^+$ | $Ca^{++}$ | $Mg^{++}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| KNOP | 0 | 5,4 | 0,5 | 0,91 | 2,2 | 0 | 2,1 | 0,5 |
| K—$NH_4$ 62 | 0,84 | 4,2 | 0,97 | 0,91 | 1,7 | 0,94 | 2,1 | 0,5 |
| K—$NH_4$ 125 | 1,6 | 4,2 | 1,4 | 0,91 | 2,6 | 1,9 | 2,1 | 0,5 |
| K—$NH_4$ 250 | 3,3 | 4,2 | 2,4 | 0,91 | 4,2 | 3,8 | 2,1 | 0,5 |
| K—$NH_4$ 500 | 6,7 | 4,2 | 4,3 | 0,91 | 7,6 | 7,5 | 2,1 | 0,5 |
| K—$NH_4$ 1000 | 13,4 | 4,2 | 8,1 | 0,91 | 14,3 | 15,1 | 2,1 | 0,5 |
| KNOP+$SO_4(NH_4)_2$—1000 | 0 | 5,4 | 8,1 | 0,91 | 2,2 | 15,1 | 2,1 | 0,5 |
| KNOP+$SO_4(NH_4)_2$—500 | 0 | 5,4 | 4,3 | 0,91 | 2,2 | 7,5 | 2,1 | 0,5 |
| KNOP+$SO_4(NH_4)_2$—125 | 0 | 5,4 | 1,4 | 0,91 | 2,2 | 1,9 | 2,1 | 0,5 |
| KNOP+$SO_4K_2$—1000 | 0 | 5,4 | 6,2 | 0,91 | 13,6 | 0 | 2,1 | 0,5 |
| KNOP+$SO_4K_2$—500 | 0 | 5,4 | 3,4 | 0,91 | 7,9 | 0 | 2,1 | 0,5 |
| KNOP+$SO_4K_2$—125 | 0 | 5,4 | 1,2 | 0,91 | 3,6 | 0 | 2,1 | 0,5 |

comme K—$NH_4$—1 000, puis de transférer les plantes, vers le vingt-cinquième jour de culture, sur un milieu plus favorable à la croissance (KNOP ou K—$NH_4$ dilué par exemple). On doit noter que, si la culture sur un milieu riche en potassium et en ammonium permet d'obtenir l'enracinement de boutures court-nouées de **Vitis rupestris,** il n'en est pas toujours de même lorsque la mauvaise aptitude au bouturage est un caractère lié à la variété.

On doit souligner, enfin, que la composition minérale du milieu nutritif n'a pas une action identique vis-à-vis de la différenciation des racines et de leur croissance. Rappelons que d'autres facteurs ont également des actions différentes à l'égard de ces deux phénomènes (GALZY, 1969 **a**). Ainsi, le virus du court-noué est capable de bloquer la rhizogenèse des boutures de **Vitis rupestris** cultivées sur une solution de KNOP à 20 °C alors qu'il ne réduit pas de façon très sensible la croissance des racines déjà formées.

En résumé, aux différents stades de la culture **in vitro** de **Vitis rupestris** correspondent souvent des besoins nutritifs particuliers, tant au point de vue des glucides et des vitamines qu'à celui des sels minéraux.

## IV. - CULTURE DES BOUTURES TERMINALES ET DES MERISTEMES DE VITIS RUPESTRIS

La mise au point d'une technique permettant la culture de boutures terminales de **Vitis rupestris** comportant un petit nombre d'ébauches foliaires, présente un intérêt en phytopathologie aussi bien qu'en physiologie végétale.

D'une part, cette technique devrait permettre d'étudier la répartition du virus du court-noué au voisinage du sommet végétatif. La culture sur le milieu de référence permet d'obtenir le développement des bourgeons latents de **Vitis rupestris** prélevés depuis le niveau de la deuxième feuille étalée jusqu'à la base du rameau. Mais, il était nécessaire de rechercher de nouveaux milieux nutritifs de culture qui permettraient d'obtenir la croissance des organes les plus jeunes. Il serait, en effet, nécessaire de pouvoir vérifier si, chez la vigne, comme chez d'autres végétaux, la teneur en virus diminue dans la région terminale du rameau et s'annule au niveau du méristème. S'il en était ainsi, la culture des apex de vigne permettrait d'obtenir des plantes saines à partir de clones virosés, avec un rendement meilleur que la culture de bourgeons isolés. Elle présenterait donc un intérêt agronomique.

D'autre part, les essais systématiques de culture de boutures terminales permettent de comparer les besoins nutritifs d'organes de plus en plus jeunes. C'est pourquoi on a cultivé des boutures terminales comportant une feuille étalée, puis des boutures sans feuille étalée ne comportant que 4, puis 3 ébauches foliaires. Les méthodes de culture adaptées à chaque cas étaient ainsi mises au point par approches successives. Des besoins différents correspondant à un gradient de différenciation, ont pu être mis en évidence.

La mise au point de ces méthodes de culture a été réalisée à partir de plantes cultivées elles-mêmes **in vitro** car leurs organes se bouturent plus facilement que les organes homologues prélevés en plein champ. Les difficultés rencontrées pour cultiver des boutures terminales prélevées en plein champ pourraient être liées à leur plus grande richesse en produits phénoliques qui diffusent dans le milieu et brunissent au contact de l'air. On peut également se demander s'il n'existe pas une différence de teneur en auxine dans la partie subterminale des deux types de plantes, différence liée par exemple aux conditions d'éclairement. En effet, la lumière pourrait être un facteur défavorable à la synthèse de l'auxine (WRIGHT, 1968). Cet auteur admet que les radiations bleues ou rouges stimuleraient la synthèse de l'inhibiteur β (à la base d'acide abscissique) qui, lui-même, limiterait la formation de l'auxine. WRIGHT attribue à ces interférences la présence d'une quantité d'auxine plus importante au niveau de l'apex, que dans la partie subterminale de la tige : l'apex recouvert par les jeunes feuilles serait moins éclairé et par conséquent moins riche en inhibiteur β et plus en auxine. On peut se demander si, de la même façon, les plantes cultivées **in vitro,** peu éclairées par rapport aux plantes cultivées en plein champ, ne pourraient pas être plus riches en auxine, notamment dans la région subterminale de leur tige. Ceci pourrait expliquer le meilleur enracinement des boutures prélevées à ce niveau.

## A. - COMPARAISON DU DEVELOPPEMENT, SUR LE MILIEU DE REFERENCE, DE BOUTURES COMPORTANT OU NON UNE FEUILLE ETALEE.

L'aspect du bourgeon terminal de **Vitis rupestris** est très différent selon que la plante a été cultivée en plein champ ou **in vitro.** En plein champ, pendant la période de croissance active, les 8 ou 9 premières feuilles sont très imbriquées les unes sur les autres. La première feuille étalée se trouve au rang 9 ou 10. Chez les plantes obtenues **in vitro,** dans nos conditions de culture, seules les quatre premières feuilles sont repliées sur l'apex, la feuille de rang 5 étant étalée. Les boutures de **Vitis rupestris** comportant une feuille étalée et prélevées sur une plante

cultivée **in vitro** se développent de la même façon sur le milieu de référence, qu'elles proviennent de la partie terminale de la tige ou d'un autre niveau. Les valeurs moyennes caractéristiques du développement de ces boutures à 20 °C sont les suivantes :

— Pourcentage de boutures enracinées = 97 ;

— Vitesse d'émission des racines = 8,4 ;

— Vitesse maximale de croissance des racines en mm/j = 3,1 ;

— Vitesse maximale de croissance des tiges en mm/j = 1,6 ;

— Début de la croissance linéaire des tiges = 20 jours.

Ces résultats sont satisfaisants et reproductibles. Les boutures terminales ne comportant pas de feuille étalée (boutures à 4 ébauches foliaires) présentent un développement moins bon et plus irrégulier sur le milieu de référence :

— Pourcentage de boutures enracinées = 25 à 70, moyenne : 33 ;

— Vitesse d'émission des racines = 1,4 à 6,5, moyenne : 3,6 ;

— Vitesse maximale de croissance des racines en mm/j = 0,3 à 1,5, moyenne : 1,1 ;

— Vitesse maximale des croissances des tiges en mm/j = 0,1 à 1,5, moyenne : 0,8 ;

— Début de la croissance linéaire des tiges = 40 à 50 jours.

Les résultats obtenus sur le même milieu nutritif avec les boutures à 3 ébauches sont encore un peu inférieurs :

— Pourcentage de boutures enracinées = 5 à 40, moyenne : 23 ;

— Vitesse d'émission des racines = 0,4 à 2, moyenne : 1,1 ;

— Vitesse maximale de croissance des racines en mm/j = 0,7 à 1,7, moyenne : 1,1 ;

— Vitesse maximale de croissance des tiges en mm/j = 0,1 à 1,5, moyenne : 0,6 ;

— Début de la croissance linéaire des tiges = 50 à 70 jours.

La suppression de la feuille étalée est défavorable à la différenciation des racines et réduit la vitesse de croissance de la bouture pendant une

longue période. La suppression de la quatrième ébauche provoque une réduction supplémentaire du nombre de boutures capables de s'enraciner, et de la vitesse d'émission des racines. Elle prolonge également la durée de la période précédant la croissance rapide des tiges. Par contre, les vitesses de croissance des tiges et des racines ne sont pas modifiées. Pour les boutures à 3 et 4 ébauches, il était nécessaire de rechercher un milieu de culture capable de stimuler la différenciation des racines et le début de la croissance des tiges.

B. - CULTURE DE BOUTURES TERMINALES COMPORTANT 3 OU 4 EBAUCHES FOLIAIRES.

Chez les plantes cultivées **in vitro,** la quatrième feuille est insérée à 1,5 ou 2 mm du sommet végétatif. Les boutures à 4 ébauches foliaires présentent donc une longueur d'axe de 3 à 4 mm au moment de la mise en culture. La troisième ébauche est insérée à 0,5 ou 0,8 mm du sommet végétatif et les boutures à 3 ébauches foliaires correspondent à une longueur d'axe d'environ 1 mm.

Dans un premier temps on a cherché à analyser l'action de plusieurs éléments du milieu nutritif sur la croissance des boutures (ANA, Gibbérelline, kinétine, éléments minéraux). Des doses variables de l'élément étudié étaient incorporées aux milieux de culture. La croissance des boutures était suivie pendant 100 jours environ sans qu'il soit procédé à aucun changement de milieu.

Dans un second temps, on a cherché à mettre au point des milieux particulièrement adaptés à chacune des phases de croissance des boutures.

1° **Culture prolongée en présence d'un même milieu nutritif.**

**a)** Influence de l'acide naphtalène acétique (fig. 4) :

En présence de la solution minérale de KNOP, l'acide naphtalène acétique, utilisé à des concentrations comprises entre $10^{-8}$ et $10^{-7}$, favorise la rhizogénèse des boutures à 3 et 4 ébauches foliaires. Il est par contre défavorable à la croissance des racines (dès la concentration $10^{-8}$) et à celle des tiges (à partir de $5 \times 10^{-8}$).

En associant l'acide naphtalène acétique à la solution minérale K—$NH_4$—1 000 on obtient également des milieux très favorables à la différenciation des racines. Mais ces milieux ne permettent pas une croissance normale des boutures. Il semble que la toxicité des ions $K^+$ et $NH_4^+$, utilisés à

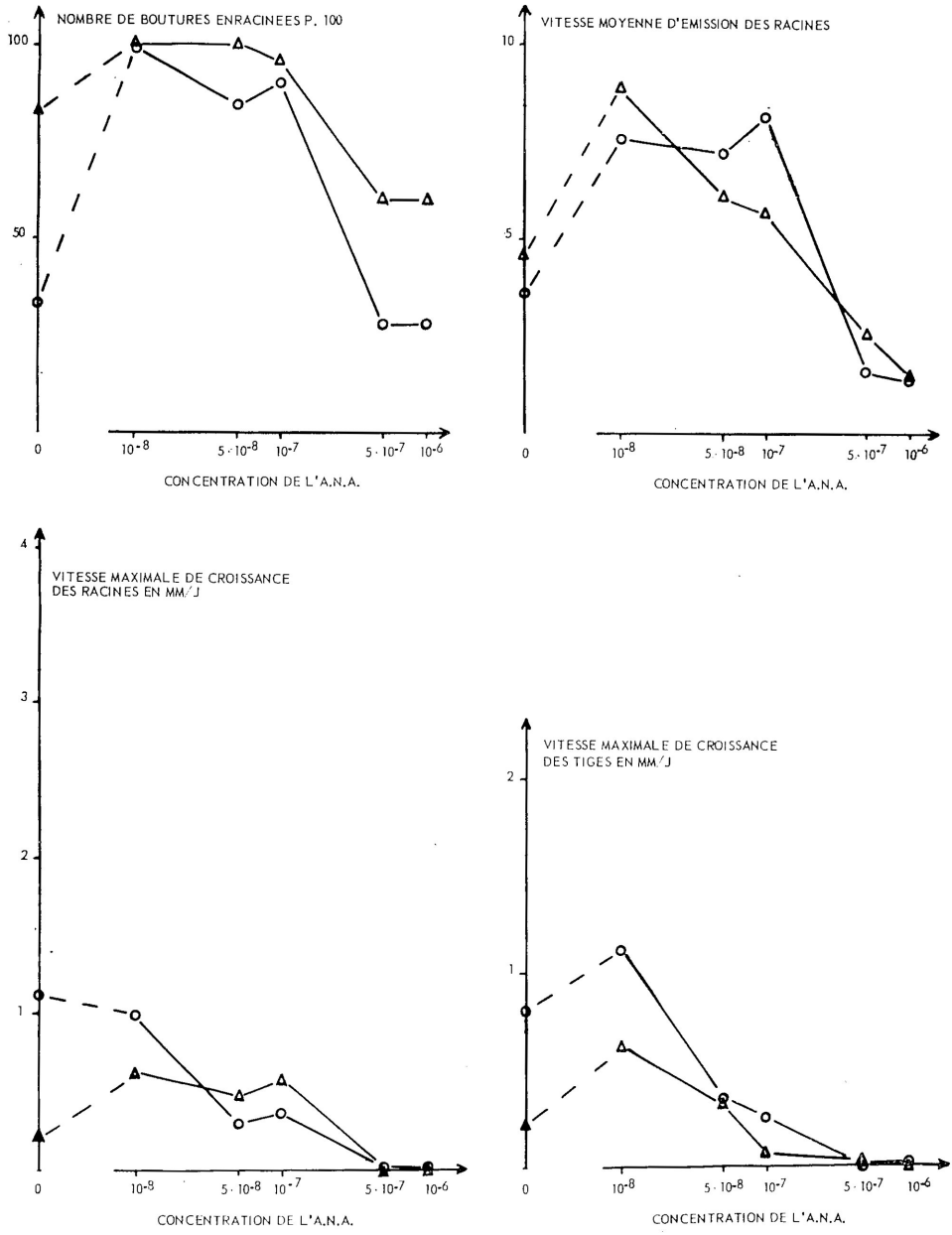



*Fig. 4 - Développement de boutures terminales de Vitis rupestris comportant 4 ébauches foliaires en présence de différentes doses d'ANA . L'expérience a été réalisée avec deux solutions minérales différentes · O Solution de KNOP . △ Solution K - $NH_4$ - 1000.*

forte dose, se trouve renforcée par l'adjonction d'ANA. En effet, une dose d'ANA aussi faible que $10^{-8}$ g/ml, non toxique en présence de KNOP, provoque, en présence de K—$NH_4$—1 000 un développement très anormal des boutures. Il se forme un grand nombre de racines qui ne peuvent pas se développer à l'intérieur du milieu de culture mais qui se ramifient abondamment au-dessus de la gélose. La tige est grêle et les feuilles étroites et enroulées. On sait que l'acide naphtalène acétique favorise l'entrée de l'eau et des substances dissoutes à l'intérieur des cellules (HACKETT et THIMANN, 1952). Cette propriété pourrait expliquer les effets apparemment additifs de l'ANA et du milieu K—$NH_4$—1 000 riche en certains éléments minéraux.

**b)** Influence de la gibbérelline (fig. 5) :

La gibbérelline inhibe la formation des racines chez **Vitis rupestris** comme chez beaucoup d'autres espèces végétales (STOWE et YAMAKI, 1957). L'effet inhibiteur augmente régulièrement avec la dose de gibbérelline. Pourtant, la solution minérale K—$NH_4$—1 000, plus favorable à la rhizogénèse, permet d'obtenir la formation des racines en présence de doses faibles de gibbérelline.

On observe, par contre, sous l'effet de la gibbérelline, une nette réduction de la période de latence qui précède la croissance linéaire des tiges. Sur le milieu de référence à base de solution de KNOP cette période dure 40 jours au moins. Elle a été ramenée à 20 jours en ajoutant de la gibbérelline. En présence de la solution K—$NH_4$—1 000, ce délai n'est que de 28 jours et il peut être réduit à 5 jours grâce à la gibbérelline. La réaction de la plante à un apport de gibbérelline semble donc différer selon la solution minérale présente dans le milieu de culture. Plusieurs auteurs ont déjà signalé l'action de la gibbérelline et celle des ions $K^+$ et $NH_4^+$ sur le fonctionnement du méristème apical (MOREL 1964, CHAUSSAT 1968). Mais remarquons que, dans le cas des boutures terminales de **Vitis rupestris,** si les effets de la gibbérelline et de la solution riche en $K^+$ et $NH_4^+$ semblent bien s'ajouter vis-à-vis du méristème apical, ils sont, par contre, opposés vis-à-vis de la différenciation des racines.

Dans les conditions de culture utilisées ici, l'action favorable de la gibbérelline sur la croissance des tiges ne se prolonge pas au-delà de quelques jours. Pour obtenir une augmentation de la vitesse maximale de croissance, il est nécessaire d'appliquer la gibbérelline après l'émission des racines. Dans ce cas, la gibbérelline utilisée à la concentration $5 \times 10^{-8}$ peut permettre d'obtenir une croissance maximale deux fois plus rapide que celle du témoin.

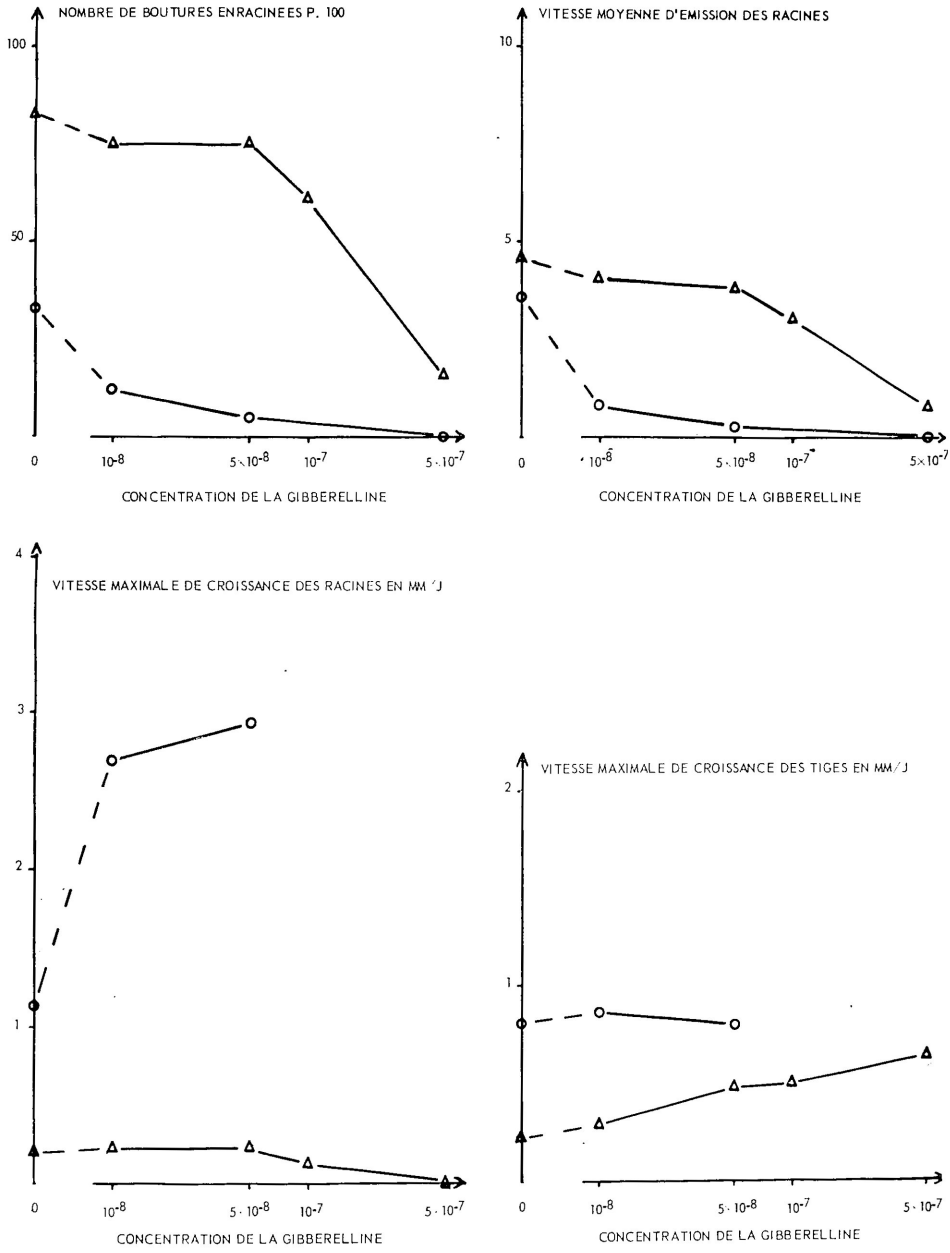



*Fig. 5 - Développement de boutures terminales de Vitis rupestris comportant 4 ébauches foliaires en présence de différentes doses de gibbérélline. O Milieu minéral de KNOP. △ Milieu minéral K - $NH_4$ - 1000.*

**c)** Influence de la kinétine :

La kinétine incorporée au milieu de référence s'est montrée défavorable à la différenciation des racines chez les boutures terminales à 4 ébauches foliaires. Par contre, elle n'a pas modifié du tout la vitesse maximale de croissance des racines. La croissance des tiges, inchangée en présence des faibles concentrations de kinétine, a été très réduite en présence des fortes concentrations ($5 \times 10^{-7}$ et $10^{-6}$). Enfin, le début de la croissance linéaire des tiges s'est trouvé retardé, quelle que soit la dose utilisée. En résumé, les essais de culture en présence de kinétine n'ont pas permis de mettre en évidence un effet favorable de cette substance sur la croissance des boutures terminales, du moins, lorsqu'elle est apportée dès la mise en culture.

**d)** Influence des ions $K^+$ et $NH_4^+$ :

On sait que des doses importantes de cations monovalents $K^+$ et $NH_4^+$ sont nécessaires à la croissance des méristèmes de pomme de terre isolés en culture **in vitro** (MOREL, 1964). D'autre part, on a pu constater que, chez les boutures de **Vitis rupestris** comportant une feuille étalée, les doses de potassium et d'ammonium favorables à la différenciation des racines et celles qui permettent une croissance normale des plantes, sont très différentes. Une expérimentation était donc nécessaire pour déterminer les teneurs en cations les plus favorables à l'enracinement et à la croissance dans le cas de boutures terminales à 3 et 4 ébauches foliaires. Enfin, il a paru souhaitable de distinguer, dans la mesure du possible, le rôle propre joué par chacun des deux ions $K^+$ et $NH_4^+$ dans le développement de ces boutures.

Dans un premier temps, nous avons donc comparé le développement des boutures comportant 3 ébauches, 4 ébauches ou une feuille étalée sur des milieux de culture plus ou moins riches en potassium et en ammonium. Il s'agissait des milieux de type K—$NH_4$ contenant de 62 à 1 000 mg de Cl K et de $SO_4(NH_4)_2$ (fig. 6).

On constate que des doses de plus en plus fortes de potassium et d'ammonium sont nécessaires pour obtenir la formation des racines sur les organes les plus jeunes. Dans le cas des boutures à 3 ébauches, le meilleur résultat est obtenu avec 1 g/litre de sulfate d'ammonium et de chlorure de potassium. Au contraire, pour les boutures comportant des organes plus différenciés, la concentration optimale des deux sels est comprise entre 125 et 500 mg/litre. Soulignons que, d'une façon générale, les vitesses d'émission des racines diminuent régulièrement lorsque les

organes mis en culture sont moins différenciés. Afin de préciser ce décalage dans l'émission des racines (c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la moitié des boutures capables de s'enraciner aient émis une racine). Dans le cas du milieu K—$NH_4$—500, on trouve les valeurs suivantes : boutures à une feuille étalée, 9 jours - boutures à 4 ébauches, 12 jours - boutures à 3 ébauches, 22 jours. Il n'est pas impossible que ces différences résultent, en partie, de la nécessité pour les organes les plus jeunes, de subir certaines transformations, dans les jours qui suivent la mise en culture, avant que la différenciation des racines soit possible.

La croissance des racines a toujours été maximale en présence des doses les plus faibles de sulfate d'ammonium et de chlorure de potassium (62 ou 125 mg/litre). Pour la croissance des tiges, au contraire, les teneurs optimales semblent diminuer quand les organes mis en culture sont plus jeunes : 500 mg/litre pour les boutures portant une feuille étalée ; 125 ou 250 mg/l pour les boutures à 4 ébauches foliaires, 62 mg/l pour les boutures à 3 ébauches. On remarque qu'en présence de 62 mg/l de $SO_4(NH_4)_2$ et de Cl K la croissance des boutures à 3 et à 4 ébauches est identique. Lorsque le milieu contient 125 ou 250 mg/l de ces deux sels, les boutures à 4 ébauches poussent comme les boutures portant une feuille étalée, c'est-à-dire que, dans ces conditions de nutrition, l'absence de feuille étalée ne semble pas modifier la croissance des boutures terminales. Enfin, sur les milieux K—$NH_4$—500 et 1 000 la croissance des boutures à une feuille étalée est meilleure que celle des boutures à 4 ébauches. On peut se demander si la présence d'une feuille bien développée n'est pas susceptible de régulariser l'afflux des éléments minéraux vers l'apex. Chez les boutures à 4 ébauches foliaires et surtout à 3 ébauches, le sommet végétatif paraît exposé plus directement à un excès d'éléments minéraux. De plus, la dose toxique de potassium pourrait être atteinte très vite dans le cas des boutures à 3 ébauches. On admet, en effet, que les tissus les plus jeunes sont les plus riches en potassium et en ammonium (MOREL, 1964). Il faut néanmoins souligner que les milieux riches en potassium et en ammonium provoquent chez les boutures terminales de vigne une réduction du temps de latence précédant la croissance linéaire des tiges.

En résumé, des doses de $K^+$ et $NH_4^+$ de plus en plus fortes sont nécessaires pour obtenir la différenciation de racines chez des organes de plus en plus jeunes. Par contre, la croissance des boutures nécessite des milieux de plus en plus dilués. Cette observation paraît, à première vue, contradictoire avec celles de MOREL qui utilise des teneurs élevées en $K^+$ et $NH_4^+$ pour obtenir la croissance des méristèmes de pomme de terre. Cette différence s'explique probablement par la présence précoce de racines sur les explantats de vigne.

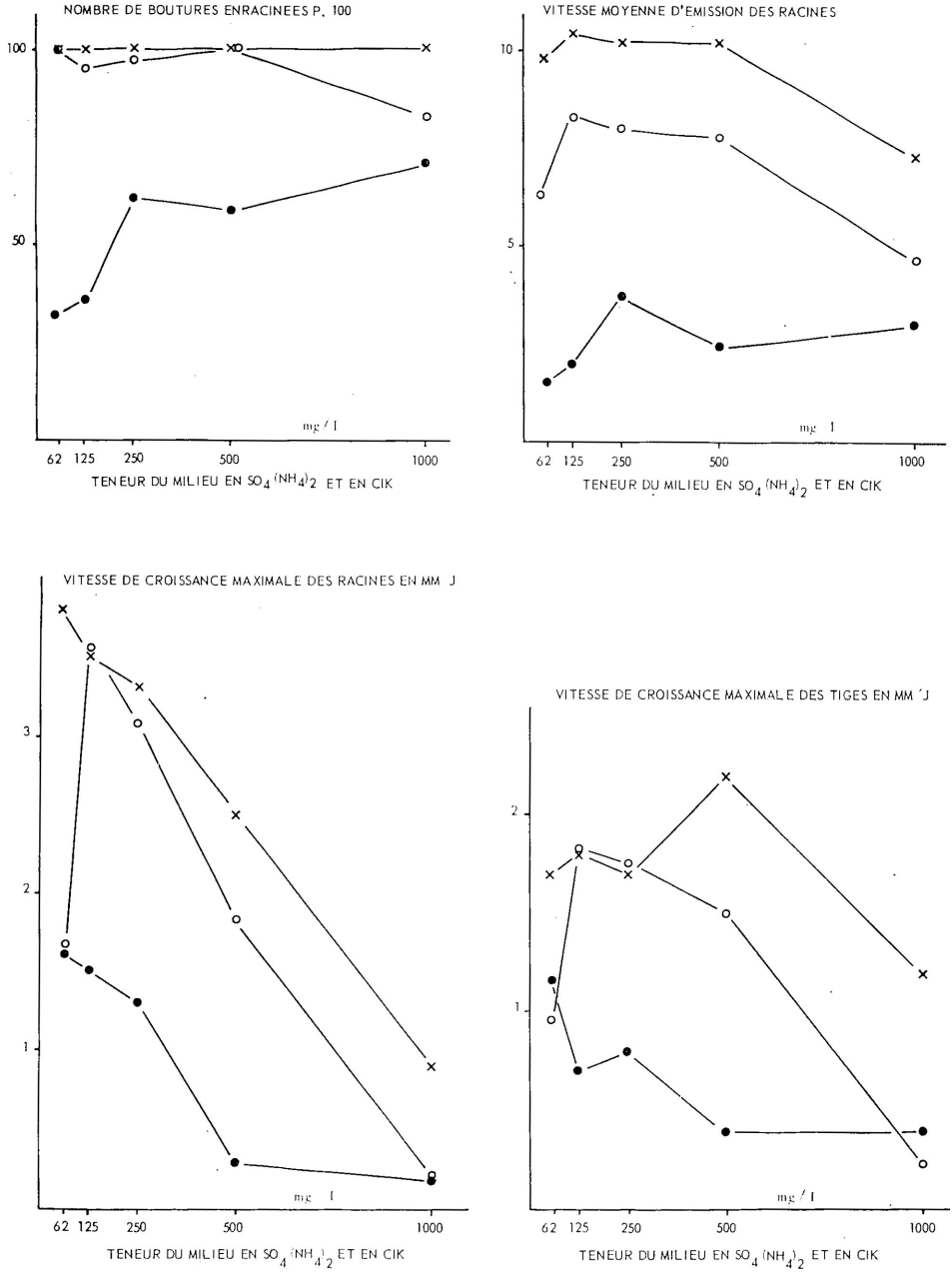



*Fig. 6 - Comparaison du développement , sur des milieux minéraux de type K - $NH_4$ plus ou moins riches en potassium et en ammonium , de différents types de boutures :*

× *Boutures comportant une feuille étalée*

O *Boutures comportant 4 ébauches foliaires*

● *Boutures comportant 3 ébauches foliaires*

Par la suite nous avons cherché à comparer le rôle des ions $K^+$ et celui des ions $NH_4^+$ dans le développement des boutures terminales de **Vitis rupestris.** Des boutures terminales à 4 ébauches ont été cultivées sur des milieux complets comportant les solutions minérales suivantes : KNOP seul, KNOP + $SO_4(NH_4)_2$ aux doses 125, 500 et 1 000 mg/l et KNOP + $SO_4K_2$ aux doses 125, 500 et 1 000 mg/l (fig. 7). Les deux ions $K^+$ et $NH_4^+$ se sont montrés favorables à l'émission des racines, mais l'ion $NH_4^+$ paraît être actif dans une gamme de concentrations un peu plus large. Fournis à faible dose, ils augmentent la vitesse de croissance des racines. Aux fortes doses, l'ammonium paraît plus toxique pour les racines que le potassium. Enfin, vis-à-vis de la croissance des tiges les deux ions ont un effet très différent. L'ammonium n'est favorable qu'à la dose la plus faible. Le potassium, au contraire, a toujours augmenté la vitesse de croissance des tiges. Il a été bien toléré, même à la concentration la plus élevée ($13{,}4 \times 10^{-3}$ ion-gramme par litre). De plus, les plantes cultivées sur les milieux riches en potassium ont présenté des feuilles plus larges et plus vertes. Enfin, les deux ions permettent d'obtenir un début plus précoce de la croissance linéaire des tiges. Cette expérience semble bien indiquer une action spécifique de l'ion $K^+$ sur la vitesse de croissance des tiges de **Vitis rupestris** alors que l'ion $NH_4^+$ agirait plus nettement sur la différenciation des racines. Pour tenter de confirmer ces observations nous avons recherché les corrélations pouvant exister entre les vitesses de développement (enracinement, croissance, etc.) et la composition minérale des milieux. La vitesse maximale de croissance des racines, la vitesse maximale de croissance des tiges et la vitesse moyenne d'émission des racines, paraissaient être liées à la teneur totale du milieu en ions $K^+$ et $NH_4^+$. Dans ces calculs on a distingué les cas où les ions $K^+$ et $NH_4^+$ étaient associés, et les cas où le potassium était le seul cation monovalent présent dans le milieu (fig. 8). Il semble bien que l'ion $K^+$ seul, d'une part, et les ions $K^+$ et $NH_4^+$ ensemble, d'autre part, aient une action identique sur la croissance des racines. Dans les deux cas, la teneur totale optimale en cations monovalents est de l'ordre de 5 millièmes d'ion-gramme par litre. Au contraire, lorsqu'il s'agit de la croissance des tiges, l'ion $K^+$ seul est plus favorable que des doses équivalentes d'ions $K^+$ et $NH_4^+$ associés. Enfin, pour l'émission des racines, on observe une situation inverse : l'ensemble $K^+$ + $NH_4^+$ paraissant plus favorable que $K^+$ seul. Mais dans ce cas, les résultats sont un peu moins nets.

De la même façon, des relations ont été recherchées entre les vitesses de développement et les autres constituants du milieu minéral qui ont varié dans nos expériences. Aucune autre corrélation n'a pu être mise en évidence.

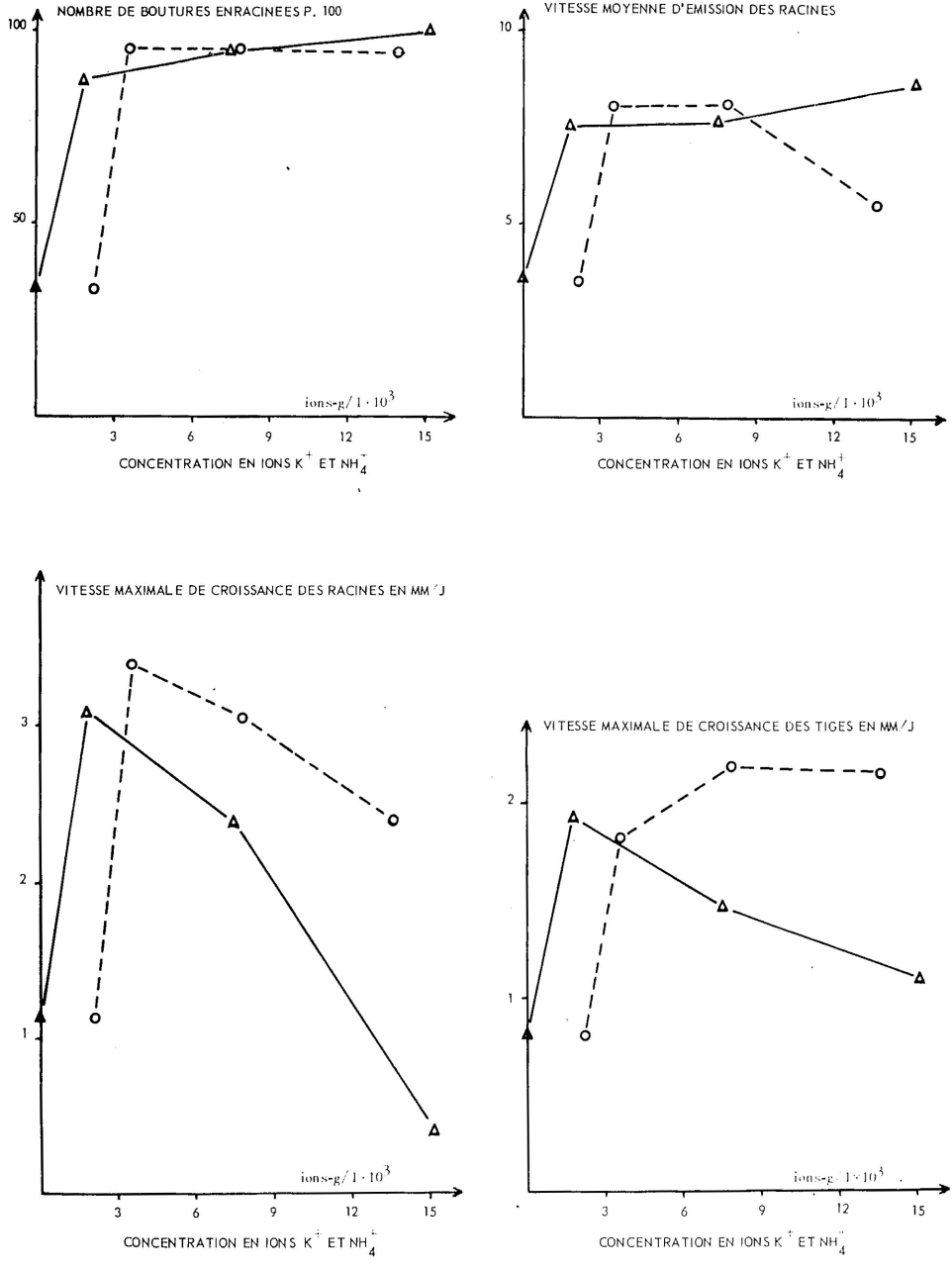



*Fig. 7 - Action comparée des ions $K^+$ et $NH_4^+$ sur le développement de lots de boutures terminales à 4 ébauches foliaires. Le milieu minéral de base était la solution de KNOP à laquelle on a ajouté soit du sulfate de potassium, soit du sulfate d'ammonium. La teneur du milieu en $K^+$ et $NH_4^+$ est exprimée en milliémes d'ion gramme par litre.*

*O KNOP + $SO_4 K_2$ ( 0 - 125 - 500 - 1000 mg 1 )*

*Δ KNOP + $SO_4 (NH_4)_2$ ( 0 - 125 - 500 - 1000 mg 1 )*

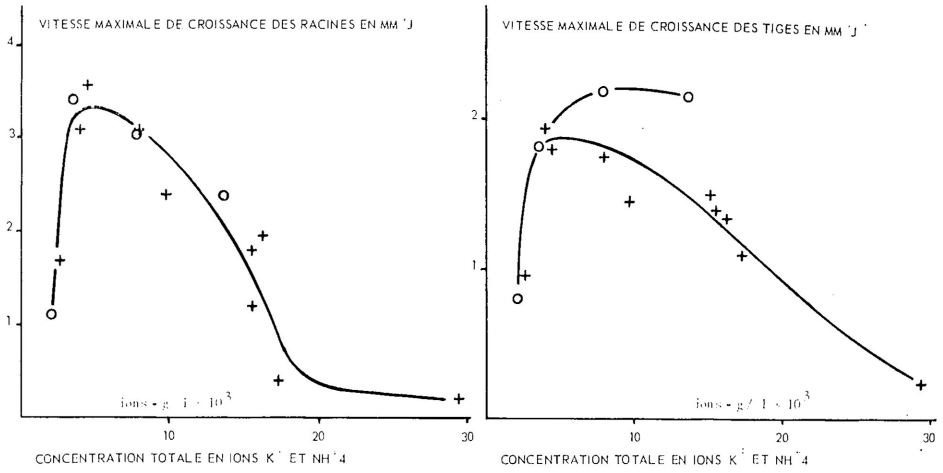



*Fig. 8 - Essai de comparaison de la croissance de boutures terminales comportant 4 ébauches foliaires sur des milieux contenant :*
*- soit $K^+$ comme seul cation monovalent O*
*- soit $K^+$ et $NH_4$ ensemble +*

**e)** Conclusion :

Il a été possible d'obtenir, sur un même milieu nutritif, l'enracinement et la croissance de boutures terminales comportant 3 ou 4 ébauches foliaires. Ce résultat est obtenu en enrichissant le milieu minéral de KNOP en K et $NH_4$ ou en incorporant de l'acide naphtalène acétique au milieu de référence. On remarque cependant qu'aucun des milieux utilisés n'a permis d'obtenir à la fois l'enracinement rapide des boutures et une croissance maximale des tiges et des racines. Ainsi, les milieux très riches en potassium ont été les plus favorables à la croissance des tiges alors qu'ils ne permettaient qu'une croissance moyenne des racines. D'autre part, les milieux les plus capables d'induire la différenciation des racines se sont montrés très toxiques à longue échéance et incapables d'assurer une croissance normale des plantes (milieux à base d'ANA ou très riches en ammonium). On constate donc, de nouveau, qu'aux différentes phases du développement **in vitro** des boutures de **Vitis rupestris** peuvent correspondre des besoins nutritifs très différents. On pourrait, par conséquent, envisager de fournir aux boutures au moins deux milieux successifs : l'un provoquant la formation des racines et l'autre permettant la croissance rapide des boutures enracinées.

### 2° **Culture successive sur deux milieux nutritifs différents.**

Cette technique a été expérimentée sur des boutures terminales à 3 ébauches foliaires. Celles-ci ont été placées, d'abord sur des milieux nutritifs susceptibles d'induire la rhizogénèse. Après 25 à 30 jours, la moitié d'entre elles ont été transférées sur un milieu favorable à la croissance. Ce second milieu était, dans tous les cas, le milieu de référence (fig. 9). L'expérimentation a donc porté essentiellement sur la mise au point d'un milieu favorable à la différenciation des racines. L'ANA a été associé, soit au milieu de référence à base de solution de KNOP, soit à un milieu contenant la solution K—$NH_4$—1 000. On obtient, dans ce deuxième cas, des milieux très favorables à la rhizogénèse et dont l'effet toxique est totalement évité à condition de limiter leur temps d'action à 30 jours (fig. 10). Ce passage de quelques semaines sur un milieu contenant de l'ANA a un effet favorable sur la croissance ultérieure des tiges. La culture sur des milieux complets contenant les solutions minérales K—$NH_4$ 250, 500 ou 1 000, suivie d'un transfert, après 25 jours, sur le milieu de référence, a également donné de bons résultats (fig. 11). La croissance a été comparable à celle des boutures portant une feuille étalée et cultivées sur le milieu de référence. Le pourcentage de boutures enracinées était compris entre 80 et 90, la vitesse de croissance des racines était de l'ordre de 3 mm/jour et l'allongement des tiges atteignait 2 mm/jour. Cependant, certaines phases du développement de ces boutures sont restées lentes : la vitesse d'émission des racines n'a pas dépassé la valeur 5 alors qu'elle est comprise entre 8 et 9 dans le cas de boutures à une feuille étalée. De même, la croissance rapide des tiges n'a débuté qu'après 35 ou 40 jours au lieu de 20. On peut penser que, chez les boutures à 3 ébauches, une certaine évolution des organes mis en culture doit se produire avant que la formation des racines ne soit possible. Les conditions de culture adoptées ici n'ont pas permis de supprimer complètement cette phase de latence. Néanmoins, l'absence de la quatrième et de la cinquième feuille a pu être en grande partie compensée en plaçant les cultures pendant les premières semaines sur des milieux nutritifs capables de stimuler à la fois la rhizogénèse et le fonctionnement du méristème.

## C. - CULTURE DE BOUTURES TERMINALES COMPORTANT DEUX EBAUCHES FOLIAIRES.

La culture des apex comportant deux ébauches foliaires et mesurant 200 µ environ présente de grandes difficultés. Pour obtenir leur développement il a été nécessaire de les cultiver successivement, comme les boutures à 3 ébauches sur plusieurs milieux nutritifs.

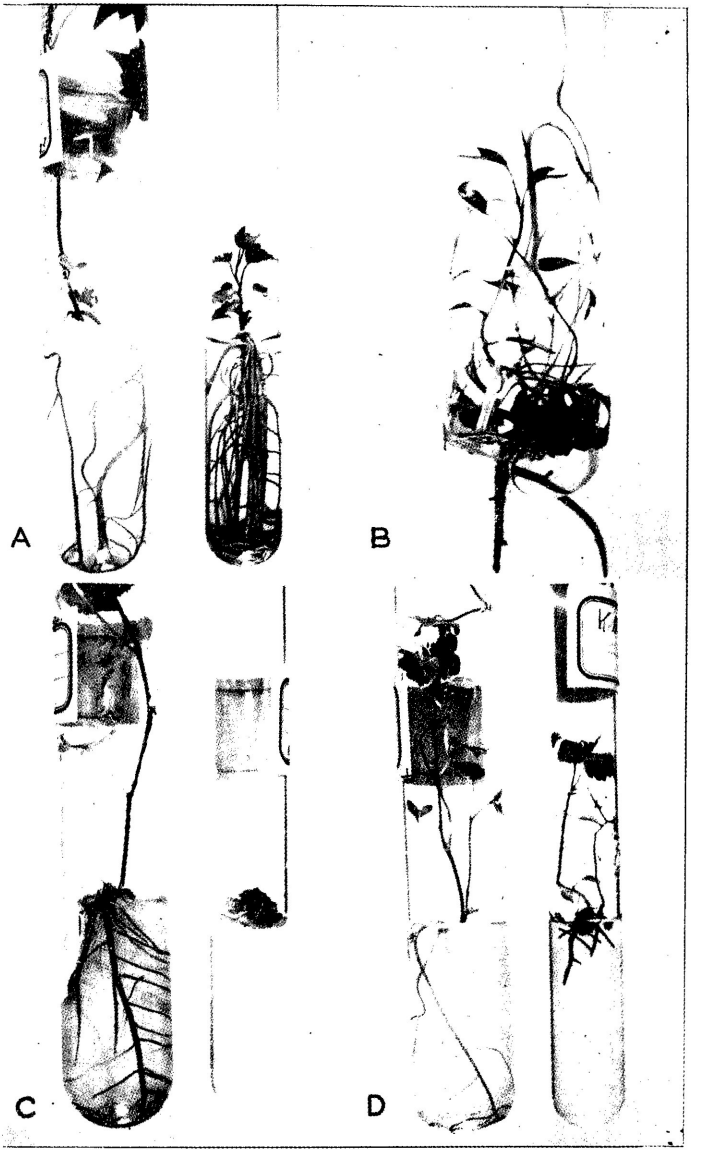



*Fig. 9 - Développement de boutures terminales, comportant 3 ébauches foliaires et cultivées sur différents milieux nutritifs.*

*A - A droite, plante cultivée depuis 90 jours sur un milieu contenant la solution minérale de KNOP et de l'ANA à la concentration 5 × $10^{-8}$. A gauche, culture identique transférée après 25 jours, sur le milieu de référence, sans ANA.*

*B - Plante cultivée depuis 200 jours sur un milieu contenant la solution K - $NH_4$ - 1000 et de l'ANA à la concentration $10^{-8}$.*

*C - A droite, bouture envahie par un cal après 110 jours sur un milieu contenant la solution K - $NH_4$ - 1000 et de l'ANA à la concentration $10^{-7}$. A gauche, culture de la même série transférée, après 25 jours, sur le milieu de référence, sans ANA.*

*D - A droite, plante cultivée depuis 130 jours sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution K - $NH_4$ - 1000. A gauche, plante de la même série transférée après 26 jours sur le milieu de référence à la base de solution de KNOP.*

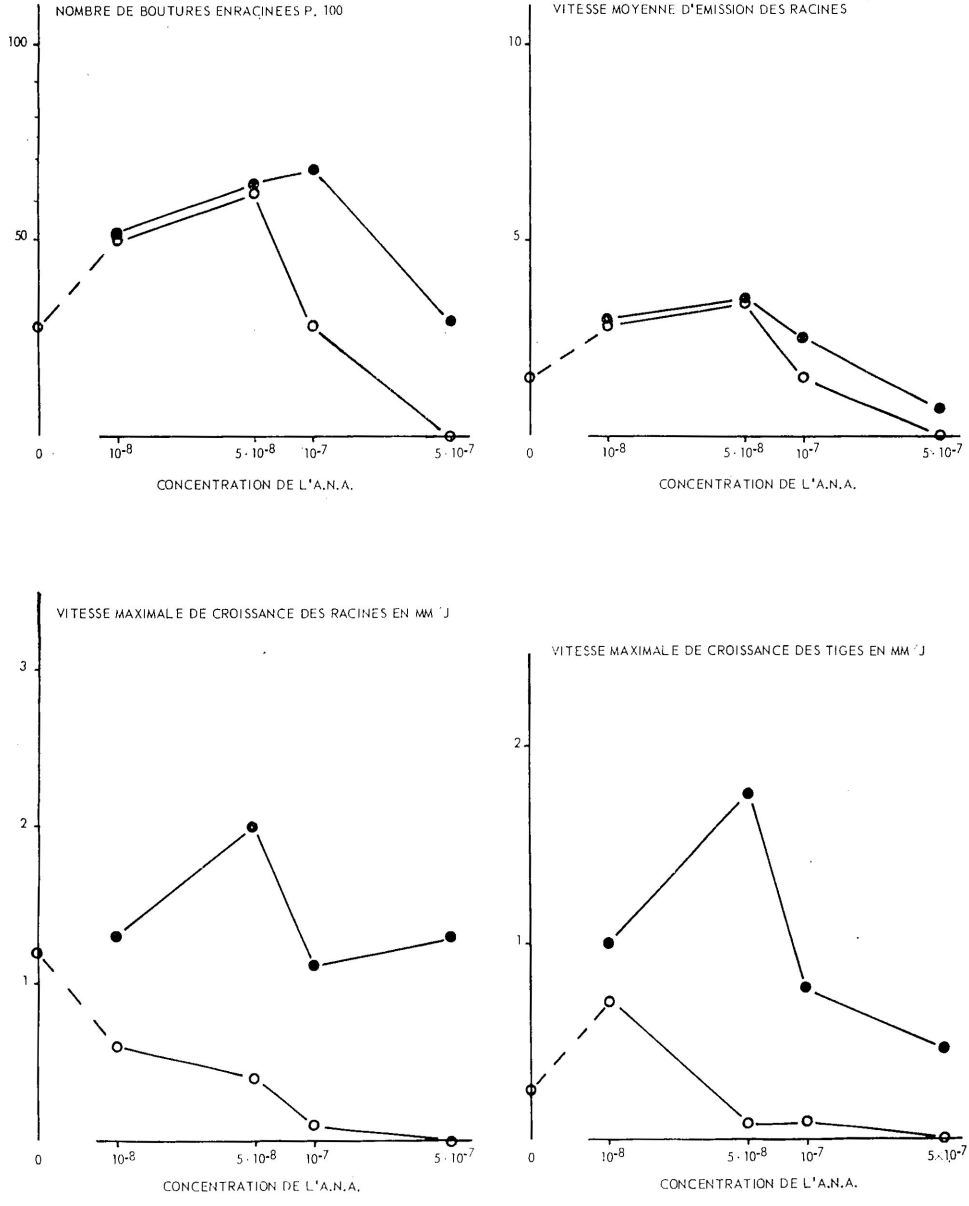



*Fig. 10 - Développement de boutures terminales comportant 3 ébauches foliaires sur le milieu de référence additionné de différentes doses d'ANA . Les plantes ont été :*
*- soit conservées sur le milieu d'origine : O*
*- soit transférées après 30 jours sur le milieu de référence sans ANA : ●*

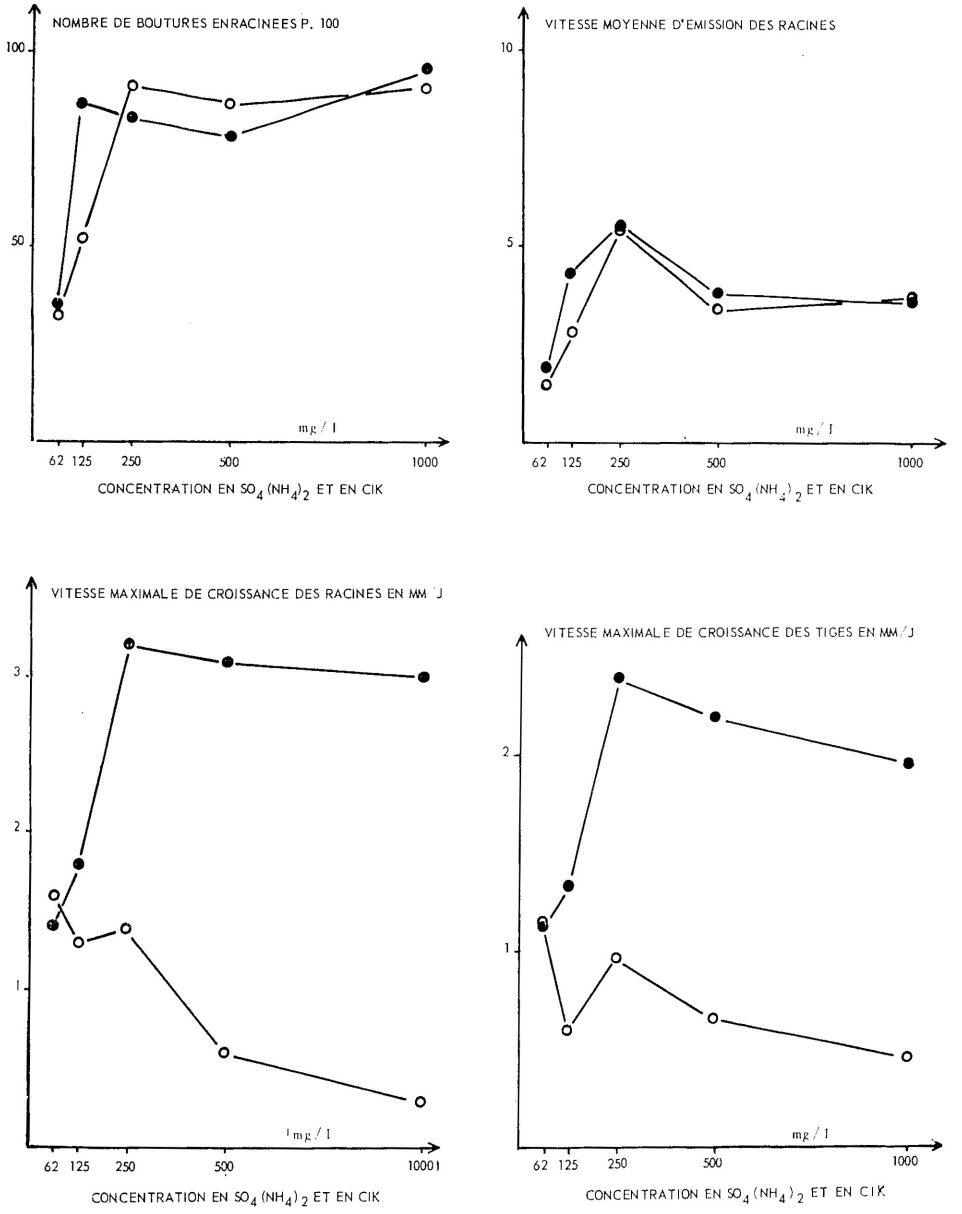



*Fig. 11 - Développement de boutures terminales comportant 3 ébauches foliaires sur des milieux minéraux de type K - $NH_4$ plus ou moins riches en sulfate d'ammonium et en chlorure de potassium. Les plantes ont été :*

- *soit conservées sur le milieu d'origine : O*
- *soit transférées sur le milieu de référence après 25 jours : ●*

La différenciation des racines n'a été obtenue qu'en présence d'ANA. En effet, en l'absence d'ANA, la survie des méristèmes est pratiquement nulle, quel que soit le milieu minéral utilisé (KNOP ou K—$NH_4$—1 000). L'addition d'ANA au milieu de référence a permis d'obtenir l'enracinement d'une partie des explantats : 12 p. 100 à la concentration $10^{-8}$, 31 p. 100 à la concentration $5 \times 10^{-8}$ et 40 p. 100 à la concentration $10^{-7}$. La vitesse d'émission des racines est cependant très faible (0,4, environ). L'utilisation de la solution K—$NH_4$—1 000 n'a pas permis d'améliorer, dans ce cas, la rhizogénèse. Les résultats obtenus ont, au contraire, été inférieurs aux précédents : 29 p. 100 d'explantats enracinés en présence d'ANA à la concentration $10^{-7}$.

Cette observation peut paraître en contradiction avec les résultats obtenus pour les boutures à 3 et 4 ébauches foliaires chez lesquelles les

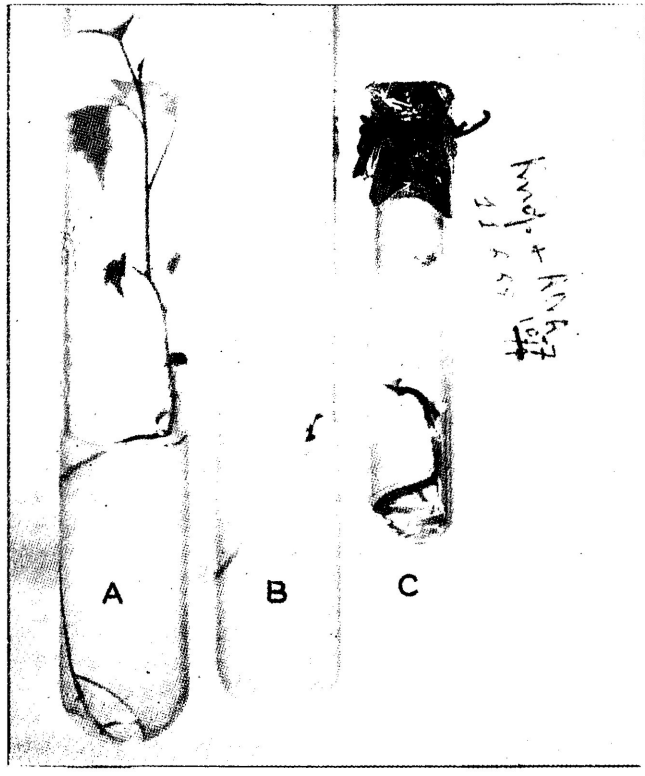



*Fig. 12 - Plantes obtenues après 4 mois de culture in vitro, à partir de méristèmes à deux ébauches foliaires. La première culture a été faite en présence d'ANA à la concentration $10^{-7}$.*

*A - Plante transférée sur le milieu de référence après 30 jours.*

*B - Plante transférée après 100 jours.*

*C - Plante non transférée.*

ions $K^+$ et $NH_4^+$ d'une part et l'ANA d'autre part, présentaient une action conjuguée favorable à la rhizogénèse. Cependant, il faut rappeler que les ions $K^+$ et $NH_4^+$ paraissent être de plus en plus toxiques au fur et à mesure que les organes étudiés sont plus proches de l'apex. Or, les pourcentages indiqués ici tiennent compte, non seulement des possibilités de rhizogénèse, mais également de la proportion d'apex capable de survivre en culture **in vitro.** Cette proportion est probablement plus faible en présence de la solution K—$NH_4$.

Pour obtenir la croissance des explantats enracinés, il est nécessaire de les transférer sur le milieu de référence. La date de ce transfert conditionne la réussite de la culture. Il doit se faire de façon d'autant plus précoce que la teneur en ANA du premier milieu est plus élevée. En effet, les plantes maintenues trop longtemps en présence d'ANA présentent par la suite une croissance de la tige anormalement lente (fig. 12). Le temps

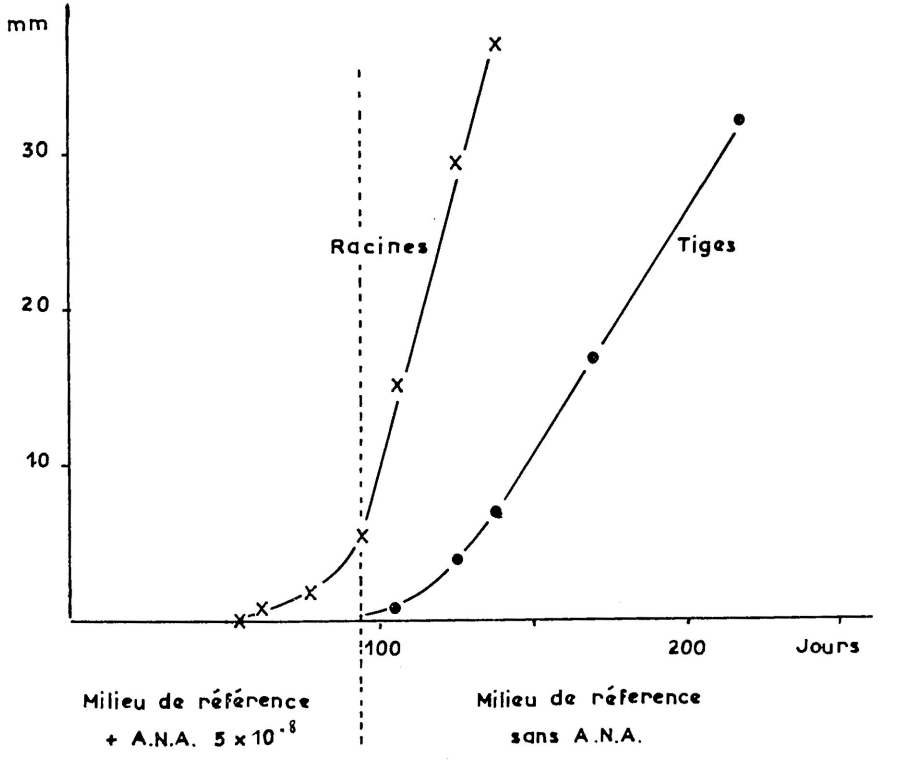



*Fig. 13 - Courbes de croissance des racines et des tiges obtenues pour des méristèmes à deux ébauches foliaires cultivés pendant 94 jours sur le milieu de référence additionné d'A.N.A. à la concentration 5 × 10-8, puis transférés sur un milieu sans A.N.A.*

de séjour optimum sur le premier milieu paraît être de l'ordre de 80 jours lorsque la concentration de l'ANA est de $5 \times 10^{-8}$, 30 jours pour $10^{-7}$ et de 15 à 20 jours pour $5 \times 10^{-7}$. La figure 13 représente les courbes de croissance obtenues pour un lot de méristèmes placé dans des conditions favorables. On remarque cependant que les vitesses de croissance restent faibles (0,3 mm/jour pour les tiges). Des expériences en cours suggèrent qu'il pourrait être utile, après avoir obtenu la formation des racines, de placer pendant quelques semaines, les explantats sur un milieu très favorable à la croissance des tiges (milieu à base de gibbérelline par exemple). Cette méthode consiste, en quelque sorte, à induire successivement les différenciations utiles par des transferts sur des milieux de culture différents.

Les sommets végétatifs à 2 ébauches foliaires ont les dimensions habituelles (200 µ) des méristèmes cultivés en vue de l'obtention de plantes indemnes de virus. Des sommets ont donc été prélevés aussi sur des plantes court-nouées cultivées **in vitro.** La proportion de méristèmes enracinés a été un peu plus faible que pour des explantats provenant d'un clone sain. Les plantes obtenues ne présentaient, au début, aucun symptôme de court-noué. Elles ont pu être multipliées par bouturage et leur rhizogénèse était normale. Mais, après 8 mois de culture **in vitro,** ces plantes ont présenté des déformations foliaires caractéristiques du court-noué. Le nombre de méristèmes prélevés sur des plantes malades est cependant encore trop faible pour que l'on puisse affirmer qu'il est impossible d'obtenir, par cette méthode, des plantes totalement indemnes de virus.

## D. - CONCLUSION.

Au cours de ce travail, des milieux nutritifs et des méthodes de culture ont été mis au point dans le but d'obtenir le développement **in vitro** de boutures terminales de **Vitis rupestris.** On a pu ainsi cultiver avec succès des boutures ne comportant que 2 ébauches foliaires et mesurant 100 à 200 µ environ. Pour parvenir à ce résultat, il a été nécessaire d'étudier les besoins nutritifs de boutures composées d'organes de plus en plus jeunes. Il a été possible de définir, pour chaque cas étudié, des conditions de culture permettant d'obtenir d'abord la différenciation des racines et ensuite la croissance des tiges et des racines. On doit souligner que les divers facteurs étudiés agissent le plus souvent de façon spécifique sur l'une ou l'autre des phases de développement des boutures. Certains facteurs induisent la rhizogénèse et d'autres favorisent la croissance des tiges et des racines. Mais on a constaté que la culture des boutures terminales présente des difficultés de plus en plus grandes au fur et à mesure que les organes mis en culture sont moins différenciés. En effet,

les milieux capables d'induire la différenciation des racines deviennent alors très différents de ceux permettant la croissance. Ainsi, les organes les plus jeunes ne s'enracinent qu'en présence de doses de plus en plus importantes d'ions $K^+$ et $NH_4^+$ alors que ces mêmes organes ne supportent pas un contact prolongé avec les milieux riches en cations monovalents. De même, la présence d'ANA dans le milieu de culture assure la néoformation des racines mais ne permet pas la croissance des boutures. Ces observations nous ont amené à utiliser successivement plusieurs milieux nutritifs. Ces passages sur des milieux différents ont pour but d'introduire successivement plusieurs types de différenciation au niveau d'un même explantat.

La principale difficulté de cette méthode réside dans le fait que l'action d'un milieu peut modifier l'état physiologique de l'ensemble des tissus dans un sens qui pourrait être défavorable aux étapes suivantes. Ce risque est naturellement d'autant plus grand que la fraction d'axe prélevée est plus petite. Il est donc nécessaire de bien doser l'action de l'élément inducteur présent dans un milieu, de façon à éviter un effet rémanent indésirable.

## RESUME

Ces recherches sur le court-noué de la vigne avaient pour but la production de matériel végétal non virosé.

Après un bref historique des principaux travaux sur le court-noué de la vigne, on rappelle, dans l'introduction, les possibilités actuelles de guérison des maladies à virus. Elles sont généralement fondées sur l'élimination du virus, d'une partie ou de l'ensemble de son hôte. La partie guérie est ensuite isolée et multipliée par bouturage. Mais l'élimination d'un virus peut être favorisée par les facteurs physiques ou chimiques du milieu de culture.

Il était donc nécessaire, dans un premier temps, de disposer d'une méthode de culture en conditions entièrement contrôlées. On expose donc, dans cette première partie, les techniques mises au point pour cultiver in vitro les organes de la vigne : embryons, bourgeons axillaires et apex.

Une méthode d'étude de la croissance a été adoptée et a permis d'étudier systématiquement l'influence du milieu nutritif sur l'enracinement et la croissance des boutures de vigne.

Cette méthode a permis notamment l'étude des besoins nutritifs des apex de vigne isolés en culture in vitro. Ces besoins sont différents selon le nombre d'ébauches foliaires portées par la bouture. On a pu obtenir le développement de méristèmes ne portant que deux ébauches foliaires et mesurant 200 µ environ.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


ARNAUD G. et ARNAUD M., 1931. **Traité de Pathologie végétale.** Vigne : Court-noué et roncet. I., 611-630.

BONNER J. et GALSTON A.W., 1952. **Principles of plants physiology.** Freeman Ed. San-Francisco.

BRANAS J., 1948. La dégénérescence infectieuse de la vigne est une maladie à virus. **C.R. Acad. Agric. France, 34,** 301-302.

BRUN G., 1963. Etude d'une association du virus σ et de son hôte, la drosophile : l'état stabilisé. **Thèse,** 255 p.

CADMAN C.H., DIAS H.F., HARRISON B.D., 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grape vines in Europe and North America. **Nature, 4737,** 577-579.

CAUDWELL A., 1965. Bibliographie des viroses de la vigne des origines à 1965. **Off. Inter. Vigne Vin,** Paris.

CHAUSSAT R., 1968. Action particulière du potassium sur la croissance et la morphologie des plantules étiolées de blé. **Ann. Physiol. Vég.** 10, 5-16.

COSMO I., PIERI G., 1953. Indagini sulla degenerazione infettiva della vite. **Atti. Accad. Ital. Vite e Vino, 5,** 401-445.

GALZY R., 1961. Confirmation de la nature virale du court-noué de la vigne par des essais de thermotérapie sur des cultures *in vitro*. **C. R. Acad. Sci. 253,** 706-708.

GALZY R., 1964.Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. **Ann. Epiphyties, 15,** (3), 245-256.

GALZY R., 1969 a. Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* SCHEELE sain et court-noué cultivé *in vitro* à différentes températures. **Ann. Phytopath., I,** 149-166.

GALZY R., 1969 b. Remarques sur la croissance de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro* sur différents milieux nutritifs. **Vitis, 8,** 191-205.

GALZY R., 1969 c. Culture *in vitro* de boutures terminales de *Vitis rupestris* comportant ou non une feuille étalée. A paraître. **Ann. Physiol. Vég.**

GALZY R., GALZY P., 1964. Action de la température sur la panachure blanche de la vigne. **Progr. Agric. Vitic., 162,** (24), 271-280.

GALZY R., NIGOND J., 1968. Description d'une enceinte éclairée et thermostatée destinée à la culture *in vitro* des végétaux supérieurs. **Vignes et Vins, 168,** 11-13.

GIFFORD E.N., HEWITT W.B., 1961. The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the Grapevine. **Am. J. Enol. Vitic., 12,** 3 : 129-130.

HACKETT D.P., THIMANN K.V., 1952. The action of the auxin - induced water uptate by potato tissue. **Amer. Jour. Bot., 39,** 553-560.

HEWITT W.B., 1945. A graft transmissible disease of grapevine. **Phytopathol. 35** (II), 940-942.

HEWITT W.B., 1968. Viruses and virus diseases of the grapevine. **Rev. Appl. Mycol. 47** (9), 433-455.

HEWITT W.B., RASKI D.J., GOHEEN A.C., 1958. Nematode vector of siolborne fanleaf virus of grapvines. **Phytopath., 48** (II), 586-595.

HEWITT W.B., TAYLOR R. H., 1963. Serological relationships of virus isolates from grapevines with different disease symptoms. (Abst.) **Phytopath., 53,** (8), 878.

HOLLINGS M., 1965. Disease control through virus-free stock. **Ann. Rev. Phytopath., 3,** 367-396.

KASSANIS B., 1963. Interactions of virus in plants. **Adv. Virus Research., 10,** 219-255.

KROEGER H., 1963. Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells. **Nature, 200,** 1234-1235.

KUNKEL L.O., 1939. Movement of tobacco mosaic virus in tomato plants. **Phytopath., 29,** 684-700.

LANGRIDGE J., Mc WILLIAM J.R., 1967. Heat responses of higher plants. In : Thermobiology, **Acad. Press,** New-York, p. 272-275.

L'HERITIER Ph., 1958. The hereditary virus of Drosophile. **Adv. Virus Research, 5,** 195-245.

LWOFF A., LWOFF M., 1958. L'inhibition du développement du virus poliomyélitique à 39° et le problème du rôle de l'hyperthermie dans l'évolution des infections virales. **C.R. Acad. Sc., 246, I,** 190-192.

MARAMOROSCH K., 1949. Occurence of virus-free cuttings from sweet clover infected with wound-tumeur virus. **Plant. Dis. Rep., 33,** 145.

MOREL G., 1948. Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. **Ann. Epiph., 14,** 1-112.

MOREL G., 1964. La culture *in vitro* du méristème apical. **Rev. Cytol. Biol. Vég., 27,** 307-314.

MOREL G., MARTIN C., 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. **C.R. Acad. Sci., 235,** 1324-1325.

MOREL G., MULLER J.F., 1964. La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre. **C.R. Acad. Sc., 258,** 5250-5252.

NIGOND J., 1967. Recherches sur la dormance des bourgeons de la vigne. Thèse. Paris. I.N.R.A.

NYLAND G., GOHEEN A.C., 1969. Heat therapy of virus dieases of perenial plants. **Ann. Rev. Phytopath., 7,** 331-354.

PANTANELLI E., 1911. Roncet. **Viticoltura Moderna, 17,** 311-324, 348-360, 379-386.

PETRI L., 1911. Ricerche istologiche sopra le viti affette da rachitismo. **Rend. R. Acad. Lincei., 20,** S.V., 155-160.

PETRI L., 1931. Sull' « arricciamento » della vite. **Boll. R. Staz. Pat. Veg.,** N.S. II, 61-83.

QUAK F., 1957. Meristem culture combined with heat treatments in order to abtain virus free carnation plants. **Tijdschrift over Planteziekten, 63,** 13-14.

RATHAY E., 1882 Die gabler oder Zwiewipflerreben. **Osterr. Botan. Z., 32,** 316-320.

RAVAZ L., 1900. Le court-noué (Premier mémoire). **Ann. Ecole Nat. Agr. Montpellier** (II), 294-314.

RAVAZ L., 1928. Recherches sur le court-noué. **Progr. Agric. Vitic., 27,** 5-11 et **29,** 53-63.

SAMPATH A., LUTZ A., HIRTH L., 1966. Origine de la faible teneur en virus de la Mosaïque des cultures de tissus de tabac. **Bull. Soc. Physiol. Végét., 12,** 273-283.

SELA I et al., 1964. Separation of a highly active antiviral factor from virus infected plants. **Virology** 22, 446-451.

STOWE B.B., YAMAKI T., 1957. The history and physiological action of gibberellins. **Ann. Rev. Plant Physiol. 8,** 181-216.

VUITTENEZ A., 1952. Transmission par double greffage d'une panachure infectieuse de la vigne. **C.R. Acad. Sc., 234,** 1084-1086.

VUITTENEZ A., 1963. Isolement, propriétés physiques et sérologiques du virus de la dégénérescence infectieuse chez les chénopodes et la vigne. Virologie Appliquée, I.N.R.A., Station Centrale de Pathologie Végétale Versailles, n° 4, 133-142.

VUITTENEZ A., KUSZALA J., 1968. Etudes sur l'extraction du virus du court-noué à partir de tissus de vigne. **Ann. Epiph.,** 19 H.S., 197-217.

WRIGHT S.T.C., 1968. Multiple and sequential roles of plant growth regulators. Proceed. 6th Intern. Conf. Plant. Growth subst. Ottawa, 521-542.