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

II - ÉTUDE DE CERTAINS ASPECTS DES RELATIONS HOTE-VIRUS CHEZ LES CLONES DE VIGNE

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

La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'étude de quelques aspects des relations hôte-virus chez des clones de vigne.

Dans un premier temps, on a pu démontrer que, chez des souches de vigne cultivées en conditions naturelles, la répartition du virus pouvait être irrégulière. Il est possible en effet d'isoler, à partir de ces souches, des bourgeons sans virus qui constituent le point de départ de clones sains.

Dans un deuxième temps, on a étudié systématiquement l'influence de la température sur les relations hôte-virus. Cette étude a été réalisée en culture in vitro. Elle a permis notamment de définir les conditions de température qui provoquent une élimination définitive du virus.

Enfin, on a pu vérifier que cette méthode de thermothérapie pouvait être appliquée avec succès à divers clones de vigne atteints de court-noué. Les plantes guéries peuvent être ramenées facilement à la culture en conditions naturelles.

I. - REPARTITION DU VIRUS A L'INTERIEUR D'UNE PLANTE CULTIVEE EN PLEIN CHAMP

Il était généralement admis autrefois que toutes les plantes obtenues par multiplication végétative à partir d'une souche de vigne court-nouée présentaient un état pathologique identique à celui de la plante mère. Le virus aurait donc été uniformément réparti dans tous les organes de l'hôte. Cette idée était fondée sur l'observation de clones obtenus par la technique viticole habituelle où les bois sont prélevés en hiver et les parties terminales des rameaux éliminées. En prélevant, au contraire, des organes pendant toute l'année sur l'ensemble du rameau et en les cultivant **in vitro,** nous avons pu faire des observations nouvelles sur la répartition du virus. Les bourgeons ont été prélevés sur des souches de vigne virosées et mis en culture individuellement sur le milieu de référence à 20° C en tenant compte de leur rang sur le rameau et de leur souche d'origine.

Ce matériel a été étudié d'abord en culture **in vitro.** On a suivi le développement, non seulement des bourgeons eux-mêmes, mais de leur descendance. On a particulièrement noté les symptômes de court-noué

TABLEAU II

Principaux caractères physiologiques et morphologiques permettant de distinguer le clone M.20 des clones sains cultivés in-vitro à 20° C sur le milieu de référence.

CLONES	I CONDAMINE		I. S. 58 VASSAL	
	Non traité (M. 20)	Traité thermo thérapie (M. 35)	Non traité (S. 20)	Traité thermo-thérapie (S. 35)
Nombre de boutures enracinées p. 100, après 30 jours	9,1	96,0	94,1	93,9
Vitesse moyenne d'émission des racines .	0,6	9,1	9,3	8,4
Vitesse maximale moyenne de croissance des racines (mm/j)	2,2	3,2	3,2	3,2
Vitesse maximale moyenne de croissance des tiges (mm/j)	0,7	1,8	1,6	1,6
Début de la croissance linéaire des tiges (en jours)	40 à 50e	20 - 25e	20 - 25e	20 - 25e
R (dent médiane)	2,26	1,68	1,66	1,66
r (dents latérales)	1,52	0,70	0,78	0,74

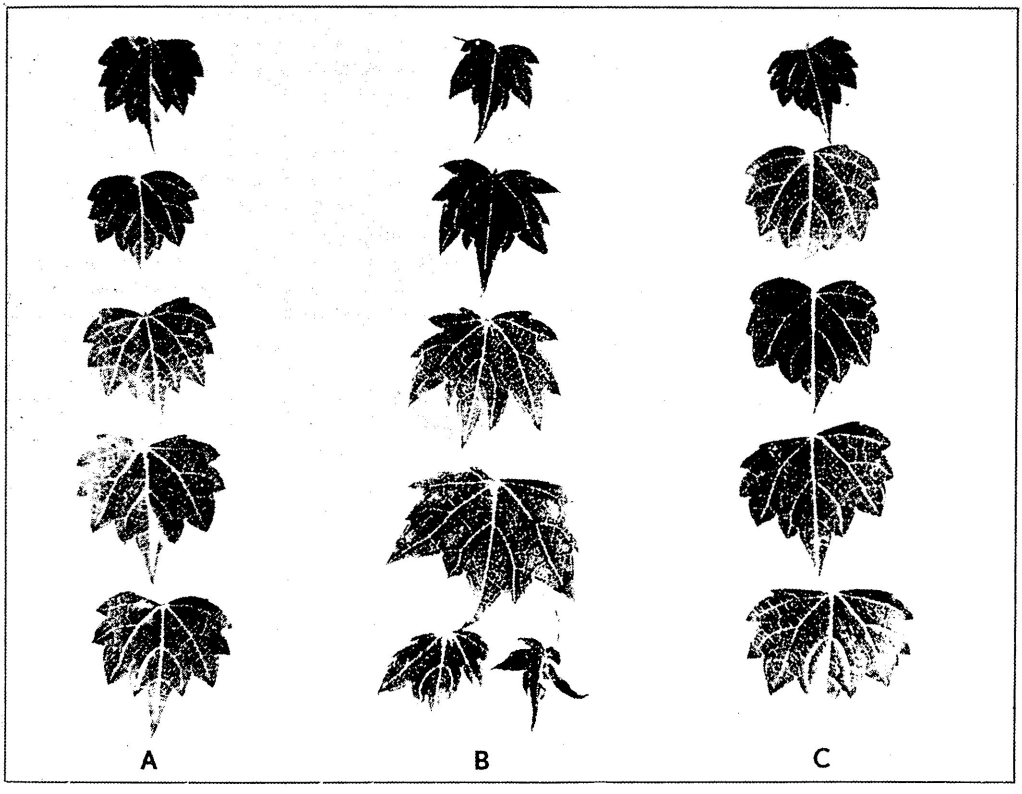


Fig. 14 - Feuilles prélevées sur des plantes de *Vitris rupestris* cultivées *in vitro* à 20°
A - clone S 20 ; B - clone M 20 ; C - clone M 35 ;

et la rhizogénèse des boutures. Le virus du court-noué provoque en effet une réduction importante de la rhizogénèse **in vitro** à 20° C. Le tableau 2 et la figure 14 permettent de comparer, à titre d'exemple les caractères de 4 clones de **Vitis rupestris** maintenus en culture **in vitro** à 20° C :

— le clone I S 58 cultivé au domaine de Vassal, sélectionné pour son état sanitaire satisfaisant, a été considéré au départ comme témoin sain. Il est désigné par la lettre S.

— le clone I Condamine provient d'une souche de Montpellier atteinte d'une forme grave de court-noué. Il est désigné par la lettre M.

Les deux clones S et M après avoir été mis en culture **in vitro** ont été soumis à des traitements thermiques divers. On doit donc distinguer

actuellement, au lieu des clones originaux, des sous-clones dont l'état sanitaire peut être différent selon la température et la durée du traitement thermique qu'ils ont subi. Ainsi, S 20 provient de plantes S constamment cultivées **in vitro** à 20° C et S 35 a été obtenu à partir de plantes S cultivées pendant 100 jours à 35° C avant d'être ramenées à 20° C. De la même façon, on a obtenu à partir du clone M des plantes qui peuvent être désignées par M 20 et M 35. On peut penser que l'état sanitaire des clones S 20 et M 20 cultivés **in vitro** à 20° C n'est pas différent de celui des clones I S 58 et I Condamine dont ils proviennent respectivement. Le traitement de 100 jours à 35° C n'a pas modifié de façon appréciable le comportement du clone S en culture **in vitro.** Par contre, le même traitement appliqué au clone M a provoqué la disparition irréversible des symptômes de court-noué. Clutivé à 20° C sur le milieu de base le clone M 20 se distingue nettement des clones réputés sains par la forme des feuilles, par la rhizogénèse au bouturage et par sa croissance.

L'allongement des dents de la feuille, déformation typique des plantes court-nouées, peut être caractérisé par le rapport de la longueur de la dent à sa largeur à la base. Cette valeur a été calculée pour la dent terminant la nervure médiane (rapport R) et pour celles terminant les deux premières nervures latérales (rapport r). Le tableau II indique les valeurs de R et r caractéristiques des 4 clones. Ces exemples montrent qu'il est posible de reconnaître, au cours de la multiplication végétative **in vitro,** les bourgeons virosés et les bourgeons sains.

A) CAS DE **VITIS RUPESTRIS** ATTEINT DE COURT-NOUE.

Les observations ont porté sur plusieurs cas de court-noué.

1° **Prélèvements effectués à la vigne de la Condamine en 1961 et 1962**

Ces prélèvements ont porté sur des souches de **Vitis rupestris** gravement court-nouées (figure 15). Taillées en tête de saule, elles portent un grand nombre de rameaux grêles, à croissance lente. La plupart d'entre eux présentent des anomalies telles que double-nœuds ou fasciations. Les feuilles ont une forme en palmette et une mosaïque intense. Les déformations foliaires et le retard de la croissance sont particulièrement remarquables au début de la végétation. Cependant, tous les symtômes continuent à apparaître avec une grande netteté jusqu'à la fin de la croissance, sur toute la longueur du rameau. L'augmentation de la vitesse de croissance obtenue pour quelques souches par ombrage, arrosage et apport d'engrais, n'a pas modifié la généralisation et l'homogénéité des symptômes le long du rameau.

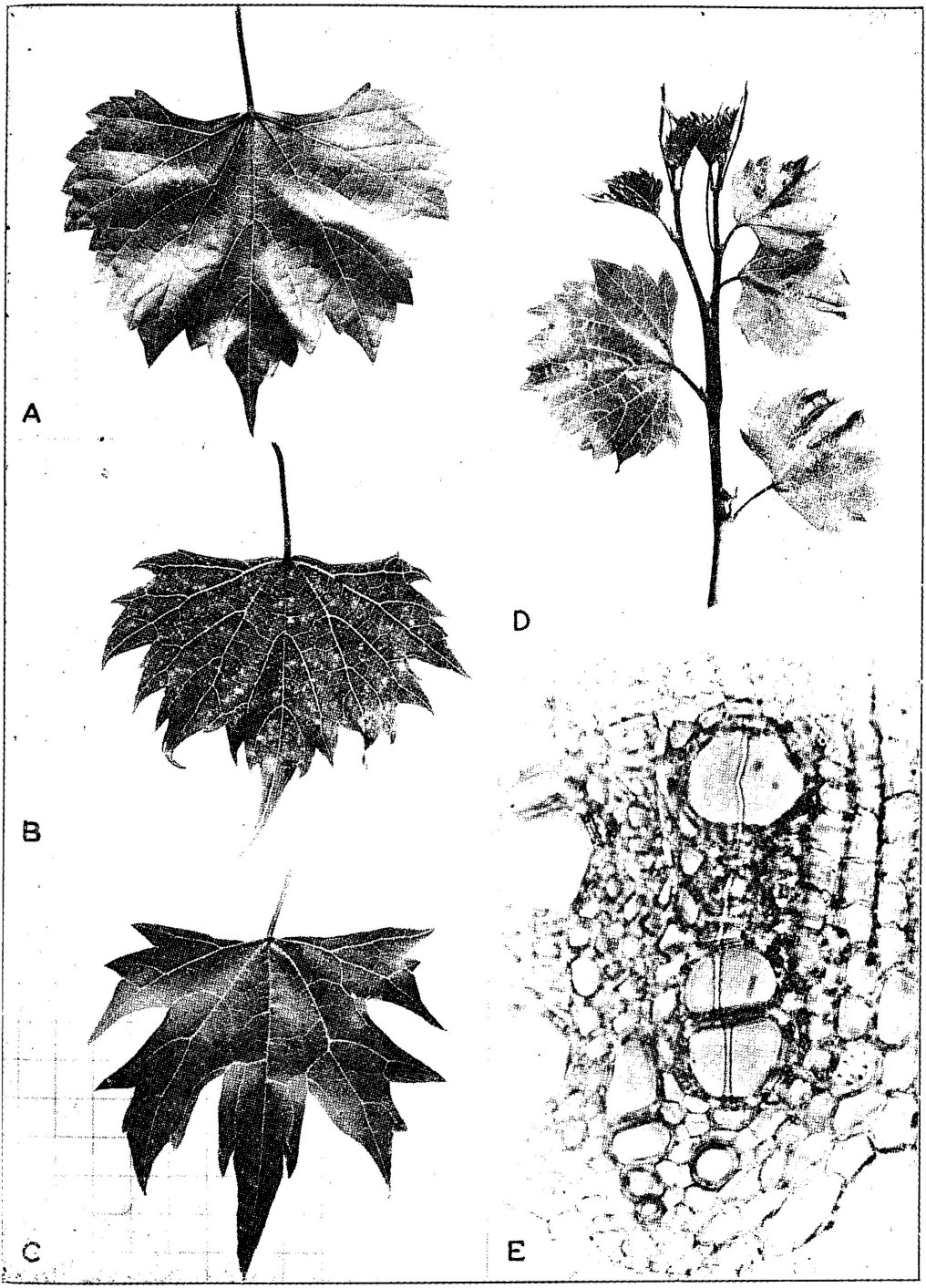


Fig. 15 - Echantillons prélevés sur des plantes saines et court-nouées de Vitis rupestris var. du Lot.

A - Feuille provenant d'une plante saine.
B - Mosaïque.
C - Déformations foliaires observées surtout à la base des rameaux.
D - Fasciation sur un rameau.
E - Cordon endovasculaire dans un faisceau ligneux.

La plupart des bourgeons prélevés sur ces souches se sont développés en donnant une tige qui présentait les symptômes du court-noué. Cependant, quelques-uns ont, au contraire, donné des plantes apparemment saines. Sur plus de 1.100 bourgeons développés **in vitro,** 1,4 p. 100 ont ainsi paru être indemmes de court-noué. Les plantes formées **in vitro** à partir de ces bourgeons se sont distinguées par leur croissance rapide, par la forme régulière de leurs feuilles et par une rhizogénèse normale. De tels « bourgeons sans symptômes » n'ont été rencontrés qu'à la fin de la période de croissance active, alors que les rameaux portaient au moins une trentaine de feuilles. Il s'agissait de bourgeons latents situés sur la partie herbacée des rameaux, à l'aisselle de l'une des huit dernières feuilles étalées.

Les plantes issues de bourgeons sains ont été transférées à la culture en serre puis en plein champ. Elles ont conservé un très bon état sanitaire. Une partie d'entre elles a pu être contaminée expérimentalement par greffage.

2° **Prélèvements effectués à la vigne de la Condamine en 1966.**

Ces prélèvements ont été effectués sur des souches de **Vitis rupestris** présentant la même forme de court-noué mais ayant subi une taille différente. Au cours des deux années précédentes, on avait laissé à la base de ces souches des rameaux longs. En juillet 1966 l'aspect de la végétation était très différent de celui des souches voisines. Des bourgeons prélevés sur ces souches ont été mis en culture le 1er juillet 1966. On peut distinguer trois cas selon la position des rameaux sur la souche (figure 16).

a) Les rameaux formés au centre de la souche, sur la partie taillée en tête de saule étaient grêles et présentaient ds symptômes très graves de court-noué. Les bourgeons prélevés sur ces rameaux se sont développés en donnant des plantes qui présentaient toutes des symptômes de court-noué.

b) Les rameaux formés à la base du bois de 2 ans (c'est-à-dire à partir des bourgeons de rangs 1 à 6) étaient un peu plus vigoureux que les précédents mais leurs feuilles présentaient néanmoins les déformations et la mosaïque, caractéristiques du court-noué. Les bourgeons prélevés sur ces rameaux n'ont donné naissance qu'à des plantes malades.

c) Les rameaux formés à l'extrémité du bois de deux ans (à partir des bourgeons de rangs 7 et 8) présentaient un grand développement. Les entrenœuds étaient longs et les feuilles du sommet ne présentaient

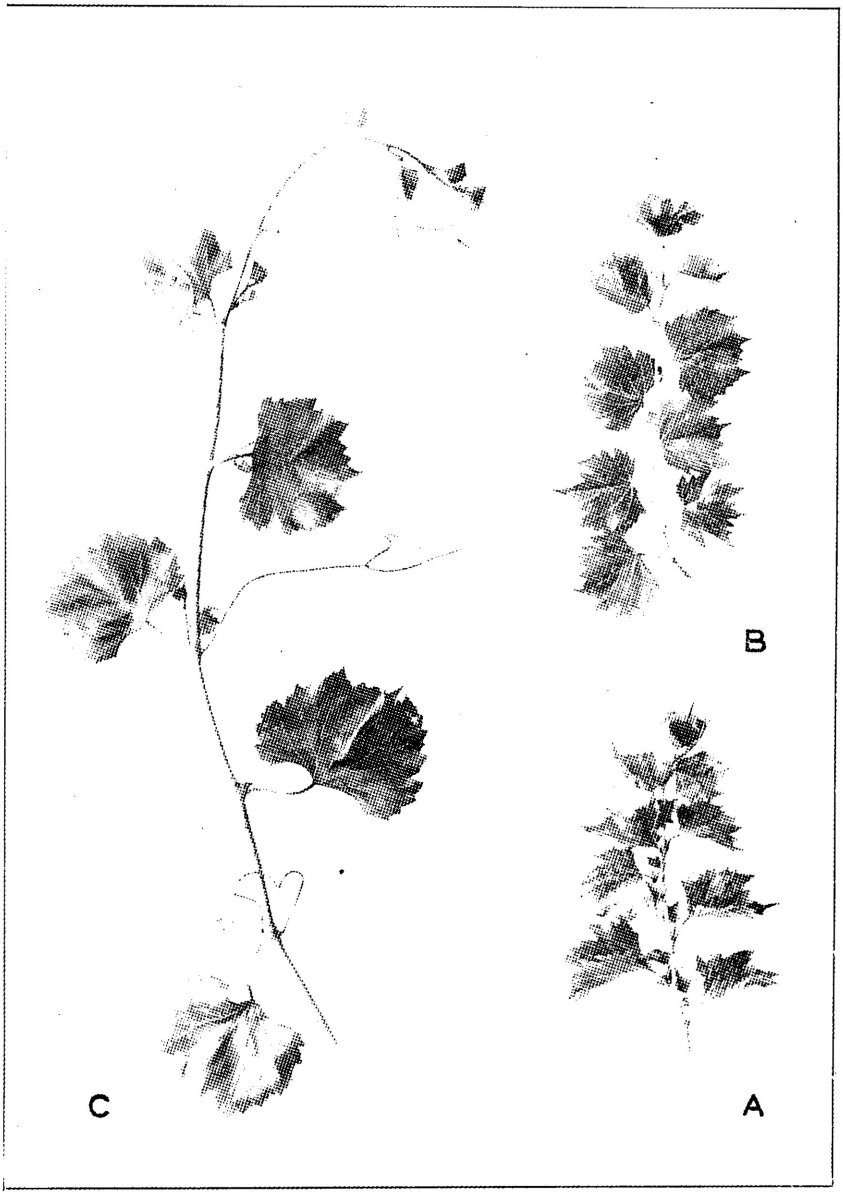


Fig. 16 - Trois rameaux provenant d'une même souche de Vitis rupestris et prélevés à la « Condamine » en 1966.

A - Rameau provenant du centre de la souche et présentant des symptômes très graves de court-noué.

B - Rameau formé à la base du bois de deux ans et présentant des symptômes plus atténués.

C - Rameau vigoureux formé à l'extrémité du bois de deux ans et portant des feuilles d'aspect à peu près normal.

pas de déformations. Les bourgeons prélevés sur le rameau n° 8 et sur les prompt-bourgeons qu'il portait se sont développés **in vitro** en donnant, soit des plantes nettement court-nouées, soit des plantes saines. Les plantes saines provenaient surtout des parties terminales du rameau et des prompt-bourgeons.

Ces observations semblent indiquer que le mode de conduite pourrait avoir une influence sur la répartition du virus à l'intérieur de la souche de vigne. L'allongement de la charpente parait en effet s'accompagner ici d'une dilution du virus dans les rameaux les plus éloignés du tronc.

3° **Prélèvements effectués au Domaine de Lavalette en 1961.**

Les souches étudiées à Lavalette sont beaucoup moins gravement court-nouées que celles de la Condamine. Elles sont taillées en tête de saule. Leur croissance est assez bonne. Cependant, au début de la végétation, la plupart des feuilles présentent une mosaïque nette et les plus basses sont déformées (dents longues, sinus pétiolaire anormalement ouvert). On peut également relever un petit nombre d'anomalies sur les rameaux. Mais, vers le 1er juin et alors que les rameaux ont atteint le stade 10 feuilles environ, les nouvelles feuilles formées commencent à être plus régulières, plus larges et indemnes de mosaïque. L'aspect des souches s'améliore ainsi au cours de l'été. Ces observations suggèrent que l'on a affaire ici à une souche de virus dont la migration à l'intérieur des rameaux est lente. Des bourgeons ont été prélevés le 30 juin alors que les rameaux étaient au stade 22 feuilles environ.

On a pu trouver parmi ceux-ci un grand nombre de bourgeons ne présentant pas les symptômes du court-noué. Leur fréquence était particulièrement élevée (75 p. 100) dans la moitié supérieure du rameau (rangs 11 à 20).

On retrouve donc à Lavalette et à la Condamine un comportement analogue des boutures à un œil cultivées **in vitro** à 20° C. Certaines ont une descendance végétative incapable de s'enraciner et elles sont rapidement éliminées ; d'autres ont une descendance apparemment saine et elles sont en quelque sorte sélectionnées dans nos conditions de culture. Cependant, la proportion des bourgeons dont la descendance présente une rhizogénèse normale en culture **in vitro** et se maintient apparemment saine en culture normale parait être très différente chez **Vitis rupestris** selon le cas de court-noué étudié et selon le mode de conduite adoptée.

B) CAS DU CEPAGE UGNI-BLANC ATTEINT DE LACINIURE.

Des cultures de bourgeons isolés ont également été effectuées dans le cas d'un cépage de **Vitis vinifera** présentant des caractéristiques intéressantes. Il s'agit d'un clone d'Ugni-blanc à feuilles laciniées trouvé en Charente. Les plantes présentent des feuilles extrèmement découpées et très caractéristiques. Cependant la laciniure n'est pas générale. Il peut arriver qu'un rameau porte, à partir d'un certain niveau, des feuilles ayant les caractères de l'Ugni blanc normal. Ce phénomène est particulièrement net lorsque la plante est vigoureuse et se développe à une température élevée. Ainsi, une plante cultivée en serre en 1967 a donné un rameau de 3,60 m. portant 58 feuilles dont les 20 premières seulement étaient laciniées. D'autre part, les plantes laciniées que nous avons pu observer présentaient généralement des symptômes identiques à ceux du court-noué (double-nœud, fasciations, millerandage). Le 28 juin 1963 des bourgeons latents prélevés sur une souche normale d'Ugni blanc et sur une souche laciniée ont été mis en culture **in vitro.** Un seul des bourgeons provenant de la plante laciniée s'est développé en donnant une tige à feuilles découpées. Il s'agissait d'un bourgeon prélevé à la base d'une tige (rang 9). On doit noter que plusieurs cultures ont été perdues, dans cette expérience, par suite de contaminations. Il est certain néanmoins, qu'au moment de la mise en culture le caractère lacinié n'était pas présent chez tous les bourgeons latents bien que les rameaux n'aient porté, à ce moment là, que des feuilles découpées. Chaque culture de bourgeon multipliée végétativement **in vitro** à 20° C a donné naissance à un clone. L'ensemble de la descendance végétative du bourgeon n° 9 a présenté le caractère lacinié alors que les autres clones ne l'ont jamais présenté. Le clone lacinié se distinguait également des autres par une rhizogénèse très faible à 20° C sur le milieu de référence. Chacun des clones isolés en culture **in vitro** a conservé ses caractères propres, aussi bien au cours de la multiplication **in vitro** que lors de la cluture ultérieure en serre et en plein champ.

En conclusion, le caractère lacinié de l'Ugni blanc se comporte à certains égards, comme une virose puisque sa répartition à l'intérieur de la plante est hétérogène dans certaines circonstances et que son élimination par un traitement thermique peut être obtenue (voir chapitre suivant).

C) CONCLUSION.

La culture **in vitro** de bourgeons isolés a permi, dans plusieurs cas, la mise en évidence de zones indemnes de virus chez des souches de

vigne virosées. La répartition irrégulière du virus à l'intérieur de la plante n'est pas en contradiction avec les données de la virologie. On sait en effet depuis longtemps que certains virus ne sont pas capables d'envahir toutes les cellules de leur hôte. Une étude détaillée des mouvements du virus de la mosaïque du Tabac chez la tomate (KUNKEL, 1939) a montré que ce virus pouvait traverser certaines zones de la tige sans s'y fixer. Des cas analogues ont été rencontrés par la suite chez des plantes annuelles aussi bien que chez des arbres fruitiers. La répartition irrégulière du virus a même été mise à profit dans la pratique, pour obtenir, par bouturage, des clones sains à partir de variétés virosées (HOLMES, 1955). En réalité, la guérison est souvent obtenue en boutu-rant des extrémités de tiges en cours de croissance rapide. Il est connu en effet que la teneur en virus est d'autant plus faible que l'on se rapproche davantage des sommets végétatifs (LIMASSET et CORNUET, 1950). Dans les cas décrits ici, « les bourgeons sans symptôme » se sont trouvés le plus souvent vers le sommet des rameaux. Leur isolement et leur multiplication en culture **in vitro** ont permis de créer des clones apparemment sains à partir de souches virosées. Cette méthode de guérison des clones de vigne peut présenter, dans certains cas, un intérêt pratique. Cependant, la culture de méristèmes devrait permettre d'obtenir un pourcentage plus élevé de plantes guéries.

On doit souligner, par ailleurs, que la présence sur une même souche de bourgeons malades et de « bourgeons sans symptôme » pourrait être de nature à compliquer les travaux de sélection clonale s'il s'avèrait que la répartition irrégulière du virus peut conduire à des clones hétérogènes du point de vue sanitaire. Il est évident que les techniques viticoles de multiplication végétative sont moins favorables que la culture **in vitro** à la séparation des parties saines et des parties malades. Cependant, la grande fréquence des « bourgeons sans symptôme » sur certaines souches faiblement court-nouées constitue un élément favorable à l'apparition d'une descendance hétérogène. Dans ces conditions, la présence d'une souche malade dans un clone considéré comme satisfaisant au point de vue sanitaire, ne serait pas forcément le résultat d'une contamination accidentelle. Cela pourrait indiquer au contraire que tout le clone est suspect et doit être rejeté. Cette façon de voir a d'ailleurs été exprimée par certains auteurs (RIVES, 1958). Cette situation peut encore être compliquée par la lenteur de l'établissement des symptômes. Pour s'assurer du parfait état sanitaire du matériel sélectionné, il conviendrait donc de l'observer et de le tester pendant plusieurs années et à chaque étape de sa multiplication.

Enfin, les observations faites sur la rhizogénèse suggèrent que les diverses techniques de multiplication végétative pourraient jouer des rôles très différents dans l'extension du court-noué. En culture **in vitro,** les plantes court-nouées, incapables de s'enraciner, sont rapidement éliminées au cours des bouturages. Les différences de rhizogénèse sont certainement moins nettes dans les conditions naturelles. Elles existent cependant et elles ont paru suffisantes pour servir de test de l'état sanitaires des boutures (WURGER, 1955). On peut donc se demander si la généralisation du bouturage avant l'invasion phylloxérique n'était pas un facteur naturel de sélection. A une époque où le mode de transmission et les symptômes du court-noué étaient peu connus, la suppression du bouturage et son remplacement par le greffage ont pu modifier totalement le rythme d'expansion de cette maladie chez les cépages de **Vitis vinifera.** Il serait certainement intéressant de rechercher quelle influence pouvaient avoir les anciennes pratiques culturales (bouturage et marcottage) sur l'état sanitaire des vignobles.

II. - ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LES RELATIONS HOTES-VIRUS

Nous avons vu, au paragraphe précédent, qu'il n'est pas rare de rencontrer des zones sans virus chez une souche de vigne atteinte de court-noué. C'est à dire que, dans les conditions naturelles, les relations hôte-virus peuvent présenter des modalités très diverses. Il était naturel de penser que la température était un facteur susceptible d'agir sur les relations hôte-virus, (GALZY, 1961). On a pu constater, en effet, que des cultures **in vitro** de bourgeons court-noués se comportaient comme des cultures saines lorsqu'elles étaient maintenues à 35 ° C. Ce traitement, prolongé pendant 3 mois, avait permis d'obtenir la disparition apparemment irréversible des symptômes du court-noué. On a donc cherché à précider l'action de la température sur la croissance des boutures saines et virosées d'une part et sur l'expression des symptômes du court-noué, d'autre part. Cette étude a porté essentiellement sur un clone de **Vitis rupestris** présentant une forme grave de court-noué. Cependant on a pu constater que d'autres clones virosés se comportaient de façon analogue. L'ensemble de ce travail a conduit à la mise au point d'une méthode de traitement des clones virosés par thermothérapie.

A) ETUDE D'UN CLONE DE **VITIS RUPESTRIS** PRESENTANT UNE FORME GRAVE DE COURT-NOUE.

Le matériel végétal utilisé tout au long de cette étude a été choisi parmi les quatre clones de **Vitis rupestris** décrits au tableau 2. Les plan-

tes malades appartenaient toujours au clone I Condamine conservé en culture **in vitro** à 20 ° et désigné par M 20. Comme témoin sain, on a retenu, le plus souvent, le clone I. S. 58 traité pendant 3 mois à 35 ° C et désigné par S. 35.

1) **Croissance de** Vitis rupestris **sain et court-noué cultivé** in vitro **à différentes températures.**

Des lots de boutures appartenant aux deux clones, sain et court-noué, ont été cultivés **in vitro** à différentes températures comprises entre + 2 et + 40 ° C. Dans chaque cas la croissance des boutures a été suivie en analysant l'émission des racines, la vitesse de croissance des racines et la vitesse de croissance des tiges. Ce travail a permis de comparer l'action de la température sur le développement et la croissance des boutures saines et virosées en déterminant notamment pour chaque phénomène étudié le Q_{10} et la température optimale.

Les graphiques rassemblés figure 17 résument l'essentiel des résultats obtenus. Cette étude a permis de faire des observations dans le domaine de la physiologie et dans celui de la pathologie (GALZY, 1969 a).

a. Influence de la température sur la rhizogénèse **in vitro** des boutures saines et virosées.

Le phénomène de rhizogénèse constitue évidemment la phase essentielle de la multiplication végétative. Il en conditionne à lui seul la réussite. Nous avons constaté, dès le début de ce travail, que chez le clone malade étudié, la virose agissait de façon très nette sur la différenciation des racines. On pouvait donc penser que l'étude de la rhizogénèse apporterait des indications sur l'évolution de l'état pathologique des plantes.

1° - Pourcentage de boutures capables de s'enraciner (figure 17 A).

Chez les plantes saines, le pourcentage de boutures enracinées reste à peu près constant et supérieur à 90 p. 100 pour une gamme de température assez large (+ 15 à + 37 ° C).

Chez les plantes malades, au contraire, la rhizogénèse reste faible aux températures 20 et 26 ° C. Elle atteint une valeur maximum pour les températures 33, 35 et 37 ° C. Il semble que l'inhibition de la rhizogénèse par la virose commence à être levée entre 26 et 30 °. En outre, il ressort très nettement de la figure 17 A que le test d'enracinement **in vitro** à 20° permet de distinguer facilement les deux clones S. 35 et M. 20.

2° - Vitesse moyenne d'émission des racines (figure 17 B)

α - Boutures provenant d'un clone sain (S. 35).

Cas des températures comprises entre + 8 et + 38 °.

La courbe obtenue dans le cas des plantes saines présente une forme générale classique. La température optimale, assez élevée, est de l'ordre de 33 ° C. Entre + 8 et 33 ° C la vitesse augmente progressivement avec

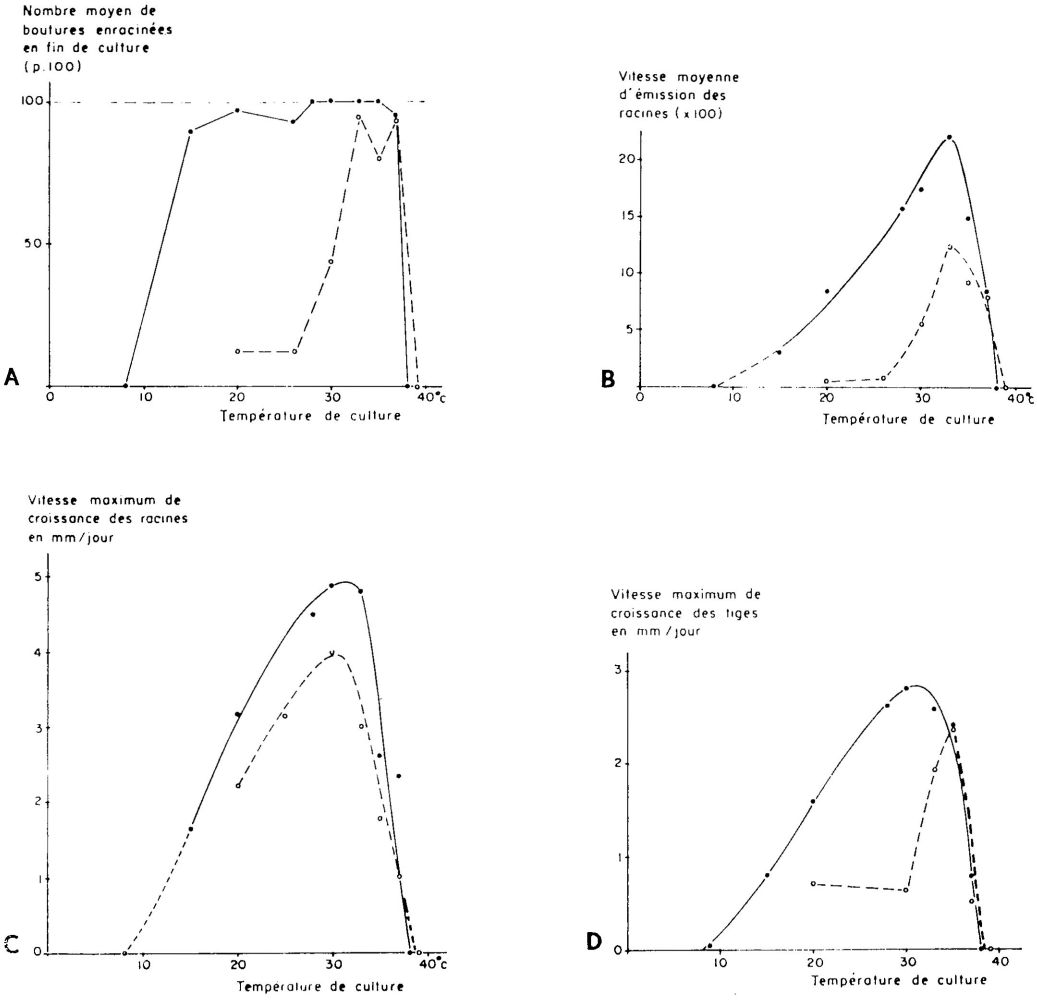


Fig. 17 - Etude de la rhizogénese et de la croissance de boutures de Vitis rupestris cultivées in vitro à différentes températures.

● *Clone sain S 35* ○ *Clone court-noué M 20*

la température. Entre 33 et 38 °, la vitesse diminue au contraire très rapidement. La partie ascendante de la courbe semble correspondre assez bien à une variation exponentielle de la vitesse en fonction de la température. Le Q_{10} calculé entre + 15 et + 33° C est égal à 3. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles trouvées pour d'autres phénomènes biologiques.

Cas des températures extrêmes : + 8, + 38 et + 39 °

Aucune racine n'est apparue sur les boutures placées à ces différentes températures. Cependant ces boutures étaient, pour la plupart, vivantes à la fin du séjour. Des lots de boutures S. 35 ayant séjournés à 8, 38 et 39 ° ont donc été placés ensuite à 20 ° et l'émission des racines a été comparée à celle de lots de boutures du même clone placés à 20 ° dès leur mise en culture. Cette expérimentation a permis de constater que la différenciation des racines était en cours avant le retour à 20 °, chez une partie des boutures. Les séjours à 8 et 38 ° n'ont pas modifié le pourcentage final de boutures enracinées. Par contre, cette valeur a été diminuée d'environ 20 p. 100 après 10 jours à 39 °. Ainsi la température 39 ° semble avoir permis la différenciation des racines chez une partie des boutures tout en provoquant la mort chez une autre partie. Etant donné l'intérêt de cette observation dans le cadre des essais de thermothérapie, une expérimentation spéciale a été réalisée pour tenter de préciser l'action des températures extrêmes sur la rhizogénèse. Des lots de boutures ont été placés, dès leur mise en culture, aux températures de 26, 35 et 39 ° C, puis ramené à 20° après 1, 2, 3, 5 et 10 jours. Le temps moyen d'émission des racines a été calculé et comparé au temps d'émission des racines (environ 12 jours) dans le cas d'une culture à 20 °. Dans le cas de la température 39 °, la différence entre le temps moyen à 20 ° et le temps moyen dans les conditions de l'expérience a toujours été négative et cette différence a augmenté plus vite en valeur absolue que la durée du séjour à 39 °. Cette observation suggère que le séjour à 39 ° provoque, surtout au-delà du 3e jour, des dommages irréversibles qui vont en s'aggravant. La présentation graphique des résultats (figure 18) permet d'étudier de façon simple l'action des températures extrêmes sur les boutures cultivées **in vitro.** D'une façon générale, les températures à action dépressive devraient correspondre, sur la figure, à des points expérimentaux d'ordonnée négative et supérieure en valeur absolue à la durée du traitement préalable à la température étudiée. Le retard observé alors pour l'émission des racines serait en effet supérieur au temps de séjour à cette température, ce qui correspondrait à une détérioration des possibilités de rhizogénèse. Une étude de ce genre peut être utile à la mise au point

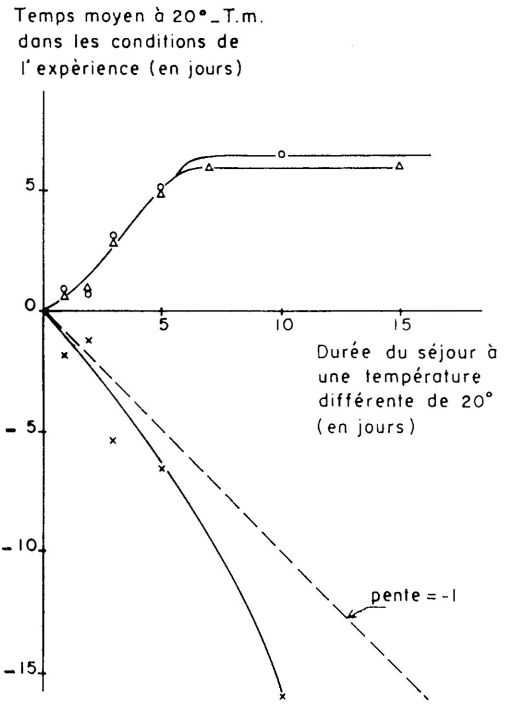


Fig. 18 - *Essai de détermination des températures létales*

Le phénomène étudié est le temps moyen d'émission des racines. En ordonnée est portée la différence entre le temps moyen d'émission des racines à 20° et le temps moyen obtenu lorsque les boutures sont préalablement placées, pour des temps variables, à une température différente de 20°. La durée de ce traitement est portée en abscisse.

○ Traitement préalable à 26°
△ Traitement préalable à 35°
× Traitement préalable à 39°

d'une méthode de thermothérapie en permettant de déterminer avec une certaine précision la température la plus élevée supportée sans dommage par des plantes dans ces conditions de culture.

β - Boutures provenant d'un clone virosé (M. 20).

Les courbes représentant les variations de la vitesse moyenne d'émission des racines en fonction de la température sont très différentes pour les plantes saines et pour les plantes malades. Bien que la température la plus favorable soit la même pour les deux types de boutures (33 °), la vitesse d'émission reste très faible aux températures 20 et 26 ° C chez les boutures malades. Elle augmente ensuite rapidement jusqu'à 33 °. Le Q_{10} calculé entre 26 et 33 ° est égal à 14. Cette valeur

est environ 5 fois supérieure à celle obtenue pour les plantes saines. L'élévation de la température agit donc d'une façon bien particulière sur les boutures malades : on peut penser qu'à partir d'une certaine température, il se produit en plus de l'action physiologique normale ($Q_{10} = 3$) une levée de l'inhibition exercée par la virose sur la rhizogénèse. La levée partielle de l'inhibition que l'on observe à la température 35 ° est sans aucun doute un phénomène différent de la guérison. On doit noter, en effet, que les observations relatives à l'émission des racines sont généralement faites avant le 10e jour le culture. Or, on sait qu'à 35 ° C aucune guérison définitive n'a été observée à la suite de traitement d'aussi courte durée (voir chapitre suivant). On peut faire l'hypothèse qu'un ou des gènes permettant la différenciation des racines se trouveraient réprimés chez les plantes virosées et que cette répression serait levée aux températures élevées, peut-être par suite de la disparition d'un répresseur sensible à la chaleur. On connaît en effet plusieurs cas où la synthèse d'un enzyme est soumise à l'action d'un répresseur thermo-sensible. (SADLER et NOVICK, 1965 - ESEIN et **al.**, 1968).

b. Influence de la température sur la croissance **in vitro** des racines de plantes sainés et virosées (figure 17 C).

♂ - Boutures provenant d'un clone sain (S. 35)

Chez les plantes saines, la vitesse de croissance des racines à 8 ° paraît être nulle ou tout au moins très faible. La vitesse de croissance la plus grande a été obtenue pour la température 30 °. Il semble donc que la température optimum pour la croissance des racines soit légèrement inférieure à celle observée pour la vitesse d'émission. D'autre part, le coefficient de température calculé entre 20 et 30 ° est égal à 1,5. Il est donc nettement plus faible que celui observé pour la vitesse d'émission des racines.

♀ - Boutures provenant d'un clone malade (M. 20)

On peut considérer que la courbe obtenue pour les plantes malades présente une forme analogue à celle des témoins sains bien qu'aucune expérience n'ait été réalisée avec le clone M. 20 aux températures les plus basses (8 et 15 °). En effet, la température optimale est la même pour les deux types de boutures. De plus, entre 20 et 35 °, les vitesses de croissance des racines malades ne sont jamais inférieures à 60 p. 100 des vitesses correspondantes observées pour les plantes saines. Le Q_{10} calculé pour les plantes malades, entre 20 et 30 °, est égal à 1,9. Cette

valeur est légèrement supérieure à celle obtenue pour les plantes saines mais elle reste du même ordre de grandeur. L'élévation de la température n'agit donc pas de façon très différente sur la vitesse de croissance des racines saines et des racines malades. Ce résultat contraste avec celui du paragraphe précédent où l'on avait montré l'action particulièrement importante de la température sur la différenciation des racines nouvelles chez les boutures malades. On remarque qu'aux températures les plus basses (20 ° par exemple), la virose n'exerce sur la croissance des racines qu'une action dépressive modérée alors qu'elle exerce un blocage presque total de la rhizogénèse. Cependant il faut noter qu'à ces températures les mesures de croissance n'ont porté que sur une faible proportion des boutures mises en culture. On sait en effet qu'à 20 °, 9 p. 100 seulement des boutures malades sont capables de s'enraciner. On peut se demander si ces boutures là ne diffèrent pas de l'ensemble des lots par certains caractères pathologiques : teneur moins grande en virus par exemple.

c. Influence de la température sur la croissance **in vitro** des tiges de plantes saines et virosées (figure 17 D).

α - Boutures provenant d'un clone sain (S. 35)

— **Vitesses de croissance observées aux températures comprises entre + 9 et + 37 °.**

Les boutures saines de **Vitis rupestris** ont présenté une croissance mesurable aux diverses températures expérimentées entre + 9 et + 37° inclus. La courbe représentant les variations de la vitesse de croissance en fonction de la température, de forme classique, est ascendante entre + 9 et + 30 ° et rapidement descendante ensuite. La température la plus favorable à la croissance des tiges est à peu près la même que pour la croissance des racines. Entre 20 et 30 ° la vitesse de croissance augmente avec un Q_{10} de 1,5, valeur identique à celle trouvée pour la croissance des racines dans la même gamme de température.

Quelques remarques peuvent être faites au sujet de la culture prolongée **in vitro** à 20 ° C. C'est à cette température que le matériel expérimental a toujours été conservé. Un clone de **Vitis rupestris** notamment (le clone S. 20) mis en culture **in vitro** en 1959 a été maintenu dans ces conditions jusqu'en 1970. Pendant cette période les plantes ont subi plus de trente bouturages stériles sans qu'on observe une diminution de la vitesse d'émission des racines ni des vitesses de croissance des racines et des tiges. Aucun phénomème de repos végétatif ne s'est manifesté

dans ces conditions de culture et les bouturages ont pu se succéder à intervalles réguliers. On doit noter que ce mode de multiplication faisait intervenir des boutures comportant une feuille étalée, et prélevées soit à un niveau quelconque de la tige, soit en position terminale. Dans ce dernier cas l'apex de la tige poursuit sa croissance après le bouturage. Il a paru intéressant de préciser les possibilités réelles de survie d'un sommet végétatif dans les conditions de la culture **in vitro** à température constante et sous un éclairage de 12 heures par jour. Des boutures terminales cultivées pendant trois mois à 20 ° ont donné des plantes dont la partie terminale a été prélevée et mise en culture dans un nouveau tube de milieu. La même opération répétée plusieurs fois de suite a permis de maintenir les sommets végétatifs en croissance continue pendant plus de 500 jours. Leur mort n'a pas été observée. Ce comportement est totalement différent de celui rencontré dans les conditions naturelles où, sous nos climats, la durée de vie du sommet végétatif n'excède pas 4 à 6 mois selon les variétés de vigne.

— **Possibilité de conservation des boutures à basse température.**

La conservation d'un lot de plantes en culture **in vitro** à 20 ° exige un nouveau repiquage tous les quatre mois environ. Des essais de conservation à plus basse température ont donc été réalisés dans le but de réduire le nombre des manipulations.

Des lots de boutures maintenus d'abord sous éclairage à 20 ° pendant 24 ou 42 jours ont été ensuite placés dans des enceintes obscures réglées à + 2, + 7 et + 9 ° C. La plupart des boutures placées à 2 et 7 ° n'ont pas survécu et la mort est survenue d'autant plus rapidement que les plantes étaient plus développées au début du stockage à basse température. A 9 °, au contraire, l'ensemble du matériel végétal est resté vivant. Au cours d'une autre expérience, la conservation à 9 ° C a pu être prolongée pendant 250 jours. Transférées à 20 ° C sous éclairage, ces plantes ont repris immédiatement leur croissance et ont pu être multipliées. Une technique de ce genre pourrait être utile à la conservation **in vitro** de matériel expérimental ou de plantes traitées par thermothérapie.

β - Boutures provenant d'un clone malade (M. 20)

La vitesse maximum de croissance des tiges est obtenue, dans le cas des plantes malades, pour la température 35°. La température optimum est donc nettement différente pour les deux types de plantes. La forme générale de la courbe d'action de la température est également très différente. A 20 ° et 30 ° la vitesse de croissance reste faible. Elle

augmente ensuite très rapidement pour atteindre, à 35 °, une valeur égale à celle observée pour les plantes saines. Entre 30 et 35 °, le Q_{10} est égal à 10 pour les plantes malades, alors qu'il avait une valeur inférieure à l'unité pour les plantes saines. Le rapport des Q_{10} est donc particulièrement élevé, ce qui traduit une action très importante de l'élévation de la température sur la croissance des tiges malades. On observe ici une action des températures élevées plus nette encore que celle décrite pour la vitesse d'émission des racines. Il faut également noter que la gamme des températures actives dans les deux cas est légèrement différente et que les temps d'action de ces températures ne sont pas du tout les mêmes. En effet, les mesures de croissance des tiges ont porté sur la phase de croissance active qui se situe approximativement entre le 20e et le 80e jour de culture. Au contraire, la levée de l'inhibition de la rhizogénèse par le virus se produit à 35 °, avant le 7e jour. Les deux phénomènes sont donc bien différents et on peut penser que l'effet de la température sur la croissance des tiges est lié à l'élimination définitive du virus. Cette hypothèse pourra être confirmée par l'expérimentation réalisée à 35 ° et qui sera résumée au prochain paragraphe.

d. Conclusion.

L'étude réalisée ici démontre que l'infection chronique par une souche de court-noué très virulente modifie souvent de façon profonde le comportement des boutures de **Vitis rupestris.** A température égale, les vitesses de développement (rhizogénèse) et de croissance sont en général plus faibles chez les plantes malades. D'autre part, les courbes d'action de la température n'ont pas toujours, lorsque le matériel est virosé, la forme considérée comme classique. Ainsi, la vitesse moyenne d'émisison des racines reste très faible aux températures inférieures à 26° C. Mais, lorsque la température dépasse cette valeur, l'effet de la virose s'atténue et la vitesse d'émission des racines augmente alors avec un Q_{10} anormalement élevé puisqu'il est de l'ordre de 14. L'inhibition de la rhizogénèse par la virose se trouve alors levée en grande partie. Ce phénomène se produit entre le 1er et le 10e jour d'exposition aux températures élevées.

On observe pour la vitesse de croissance des tiges un phénomène analogue bien qu'il corresponde à des temps d'action de la température beaucoup plus longs (20 à 80 jours). La vitesse de croissance, d'abord très faible et peu sensible aux variations de la température jusqu'à 30 ° C, augmente ensuite très vite ($Q_{10} = 10$) pour atteindre, à 35 °, une valeur égale à celle obtenue pour les plantes saines.

Enfin, en précisant le comportement des plantes aux températures élevées, ce travail apporte des indications indispensables pour réaliser, dans de bonnes conditions, des traitements par thermothérapie.

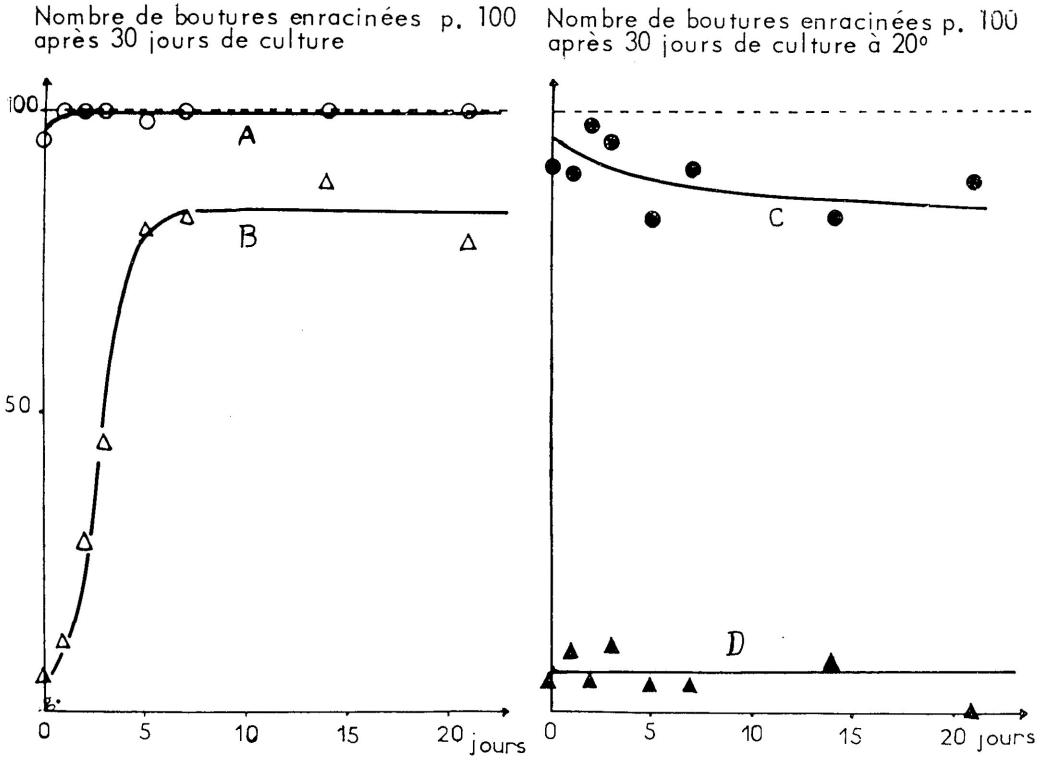
2) Action de la température 35 ° C appliquée pendant des temps plus ou moins longs.

Nous avons vu, au paragraphe précédent, que la température 35 ° permet d'obtenir une vitesse de croissance égale pour les plantes saines et pour les plantes virosées appartenant au clone M. 20. On sait, d'autre part, que les plantes malades maintenues à cette température pendant 90 jours, ont été guéries. Il a donc paru nécessaire d'étudier les modalités de l'élimination du virus à cette température particulière. Des lots de boutures appartenant au clone malade M. 20 et des lots de boutures témoins S. 35 ont donc été placés à 35 ° C dès leur mise en culture et maintenus à cette température pendant des temps variables, compris entre 1 et 100 jours (GALZY, 1965 et 1966). Pour l'exposé des résultats nous distinguerons les traitements courts (jusqu'à 21 jours) et les traitements longs (de 21 à 100 jours).

a) Action de traitements thermiques courts.

Des lots de boutures court-nouées et des témoins sains ont été maintenus à 35 ° pendant 1, 2, 3, 5, 7, 14 et 21 jours. Dans chaque expérience, deux tests utilisant chacun la moitié du matériel végétal, ont été réalisés pour mettre en évidence l'influence de la durée d'exposition à 35 ° C (figure 19).

Le premier test consistait à placer directement à 20 ° C après la sortie de l'étuve la moitié des boutures de chaque lot. L'influence de la durée de séjour à 35 ° C était analysée en déterminant pour chaque lot le pourcentage de boutures capables de s'enraciner, c'est à dire présentant une ou plusieurs racines après 30 jours de culture. Les valeurs moyennes obtenues pour les divers temps de séjour préalable à 35 ° C sont présentées sur la figure 19 a. On constate que dans la plupart des cas, les boutures saines traitées ou non à 35 ° C se sont enracinées (courbe A). Au contraire, 6 p. 100 seulement des boutures malades se sont enracinées en l'absence de traitement thermique. Mais cette proportion a augmenté très rapidement et de façon régulière avec la durée du séjour à 35 ° C, jusqu'à 7 jours environ (courbe B). De 7 à 21 jours, les pourcentages de boutures enracinées sont restés à peu près constants. Ils ont été en moyenne de 84 p. 100. La culture à 35 ° C a donc modifié de façon impor-



a — *Pourcentage de boutures enracinées à la suite d'un traitement court à 35°C (sans ablation des racines)*
○ : boutures saines
△ : boutures malades

b — *Pourcentage de boutures enracinées à 20°C, après l'ablation des racines formées au cours du traitement thermique.*
● : boutures saines
▲ : boutures malades

Fig. 19 - *Influence de traitements courts à 35 °C sur l'enracinement* in vitro *des boutures de* Vitis rupestris *saines et court-nouées.*

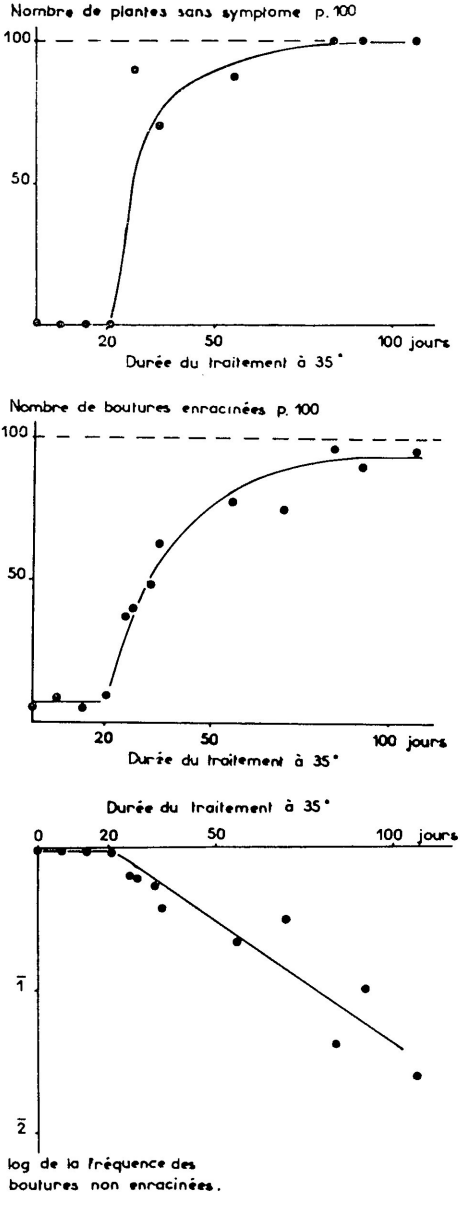
tante les possibilités de rhizogénèse des boutures malades. On retrouve ici, comme au paragraphe précédent, la levée partielle de l'inhibition qu'exerce le virus sur la rhizogénèse. Il était nécessaire de préciser si ces traitements thermiques intervenaient d'une manière momentanée en permettant la rhizogénèse en présence du virus ou s'ils modifiaient de façon durable les propriétés de ce virus. C'est pourquoi un second test a été réalisé parallèlement au premier et suivant un protocole analogue.

Ce deuxième test consistait à placer à 20 ° C des boutures de chaque lot après les avoir retaillées à leur partie inférieure de façon à supprimer les racines ou les ébauches de racines formées à 35 ° C. Le pourcentage de boutures capables de former de nouvelles racines à 20° C

était ensuite noté. La moyenne des résultats obtenus est portée sur la figure 19 b en fonction de la durée du séjour préalable à 35 ° C. En ce qui concerne les plantes saines, Il apparaît tout d'abord que 95 p. 100 des boutures témoins (non soumises à la température 35° C) se sont enracinées. Par contre chez les lots traités à 35° C, on observe, par comparaison avec la figure 19 a (courbe A), une certaine action dépressive de l'ablation des racines formées pendant le séjour à 35 ° C. Cette action est d'autant plus marquée que le séjour a été plus long. Cependant, la rhizogénèse des plantes saines demeure importante puisque la proportion de boutures enracinées est comprise entre 80 et 97 p. 100. Au contraire, les boutures malades cultivées uniquement à 20° C ne se sont enracinées que dans 4,5 % des cas. Or, les traitements thermiques préalables de 1 à 21 jours n'ont permis d'obtenir que de 0 à 12 p. 100 de boutures capables de donner des racines (courbe D). A la suite de ces traitements, la possibilité de former des racines à 20° C n'est donc pas réapparue chez les plantes malades. Ces résultats permettent de penser que les traitements thermiques de moins de 21 jours ne provoquent pas l'élimination irréversible du virus et ne font que bloquer momentanément l'action de celui-ci sur la différenciation des racines. On doit souligner en effet que toutes les plantes malades traitées de 1 à 21 jours ont présenté, par la suite, les symptômes foliaires du court-noué aussi bien en culture **in vitro** à 20 ° C qu'après leur transfert à la culture en serre. Donc, la température 35° C agissant pendant un temps court n'a apporté aucune modification durable à l'influence du virus sur la morphologie foliaire.

b. Action de traitements thermiques longs.

L'action de la température 35 ° C pendant des temps plus longs a été ensuite étudiée sur le même matériel et avec les mêmes techniques (fig. 20). Les temps de séjours à l'étuve ont varié entre 21 et 100 jours. Les boutures saines émettent toutes une ou plusieurs racines entre le 4^{e} et le 10^{e} jour de culture à 35 ° C puis le prompt-bourgeon situé à l'aisselle de leur feuille commence à se développer. Dans le cas de boutures malades, l'apparition des racines s'échelonne entre le 6^{e} et le 15^{e} jour mais le pourcentage final de boutures enracinées n'est en moyenne que de 85 p. 100. A cette température, le prompt-bourgeon se développe en donnant une tige feuillée qui ne présente pas les symptômes du court-noué. Après le traitement thermique, les plantes sont ramenées à 20 ° C et deux tests différents sont réalisés pour mettre en évidence l'influence de la durée d'exposition à 35 ° C.



a - Evolution du nombre de plantes sans symptone en fonction de la durée du traitement à 35°. Comptages faits deux ans après le traitement thermique sur des lots de plantes en pots.

b - Evolution de la rhizogénèse in vitro à 20° en fonction de la durée du traitement préalable à 35° C.

c - Résultats des tests de rhizogénèse effectués in vitro. Mêmes données pour la fig. 20 b, mais on a représenté ici, en fonction du temps de traitement, le logarithme de la fréquence des boutures non enracinées.

Fig. 20 - Etude de la guérison d'un clone court-noué de Vitis rupestris soumis à des traitements thermiques longs.

Le premier test consistait simplement à dénombrer pour chaque durée de traitement, les plantes présentant les symptômes foliaires de court-noué. Afin d'être assuré du caractère définitif de la guérison, ce test a été réalisé 2 ans après le traitement thermique, sur des plantes en pots. Les résultats de ces comptages sont présentés sur la figure 20 a. Toutes les plantes malades conservées à 20 ° C ou traitées à 35 ° C pendant moins de 21 jours sont restées malades. Les traitements de 28, 35 et 56 jours ont permis d'obtenir de 70 à 93 p. 100 de plantes ne présentant plus de symptôme. Enfin, la totalité des plantes qui s'étaient développées à 35 ° C pendant 84, 92 et 107 jours ont été guéries.

Le second test avait pour but d'apprécier, chez le clone malade, le rétablissement de l'aptitude à la rhizogénèse à 20 ° C. Il a été réalisé **in vitro** dans les semaines qui ont suivi le traitement thermique. Les plantes qui s'étaient développées à 35° C ont été retaillées comme précédemment de façon à éliminer la partie inférieure de la tige portant les racines. Ces boutures ont été remises en culture à 20 ° C et après 30 jours, le pourcentage de boutures présentant au moins une racine a été noté. Mais, l'étiolement des plantes au cours des traitements thermiques longs rend parfois difficile la réalisation de ce test. C'est pourquoi, dans un grand nombre d'expériences, une technique différente a été utilisée. A la fin du traitement thermique, les plantes étaient retaillées au contraire de façon à ne conserver que leurs racines et la base de leur tige jusqu'au niveau de la première feuille. Placées à 20 ° C, ces plantes reprenaient leur croissance; le prompt-bourgeon situé au niveau de la première feuille donnait un nouvelle tige. Après deux mois de croissance, cinq boutures à une feuille étaient prélevées sur chaque plante et mises en culture à 20 ° C sur de nouveaux tubes de milieu. Le test consistait donc à apprécier les possibilités de rhizogénèse sur les tissus formés à 20 ° C après le traitement thermique. Les deux méthodes ont donné des résultats très comparables. Les résultats de l'ensemble des tests réalisés ont donc été groupés pour présenter sur la figure 20 b l'évolution du pourcentage des plantes où la rhizogénèse est établie en fonction de la durée du traitement préalable à 35 ° C.

Ces valeurs moyennes ont été établies à partir des résultats de 84 tests portant sur un total de 3.479 boutures. Ces expériences ont permis de mettre en évidence un rétablissement progressif de la rhizogénèse au cours de traitements thermiques de plus en plus longs. Les cultures d'origine, conservées à 20° C, ont donné des boutures qui ne s'enracinaient que dans 4 p. 100 des cas. Nous avons vu que les traitements de 7, 14 et 21 jours ne modifiaient pas ce pourcentage. Au contraire, les traitements

de 84 jours et plus ont permis d'obtenir une rhizogénèse identique à celle des boutures saines. Dans les mêmes conditions expérimentales, les plantes saines ont donné 90 à 100 p. 100 de boutures capables de s'enraciner, quelle que soient la durée du traitement thermique préalable. La moyenne a été de 94 p. 100 pour l'ensemble des boutures saines transférées à 20 ° C.

Les figures 20 a et b montrent que les deux tests permettent la même conclusion : le pourcentage de plantes guéries passe de 0 à 100 entre 21 et 84 jours. Il semble cependant que les tests réalisés **in vitro** conduisent à sous estimer le nombre de plantes guéries. La différence est probablement due au fait que certaines boutures pourtant prélevées sur des plantes guéries, ne se sont pas enracinées pour des raisons physiologiques. Malgré cet inconvénient et à défaut d'un test plus précis de l'état sanitaire, il a paru possible de considérer le test de rhizogénèse **in vitro** comme un test de guérison. Les résultats de ce test ont donc été utilisés pour tenter de construire une courbe de survie du virus à 35 ° C. On a porté le logarithme de la fréquence des boutures non enracinées en fonction de la durée du traitement thermique (Fig. 20 c). Entre 0 et 21 jours la courbe est presque confondue avec l'axe des x puis elle s'infléchit. Pour la zone 21 - 100 jours, la déviation par rapport à une droite, n'est pas significative (point 1 %). Le graphique obtenu semble donc présenter l'aspect d'une courbe à plusieurs coups. Il se rapproche assez des courbes relatives à l'élimination par la chaleur du virus σ dans les ovogonies de la drosophile (BRUN, 1963).

c. Conclusion.

On a pu constater de nouveau que la souche de virus du court-noué présente dans le matériel étudié, empêche l'initiation des racines chez les boutures de **Vitis rupestris** cultivées **in vitro** à 20 ° C et que cet effet du virus disparaît lors de la culture à 35 ° C. L'étude faite à cette température a permis de préciser que la levée de l'inhibition débute après 1 à 2 jours de culture à 35 ° C et atteint un maximum après 7 jours. D'autre part, cette action de la température est apparue comme reversible. En effet, pour des séjours à 35 ° C ne dépassant pas 21 jours l'inhibition de la rhizogénèse se manifeste de nouveau dès que les plantes sont ramenées à 20 ° C. Ce premier phénomène est donc bien différent de l'élimination définitive du virus par les traitements thermiques. Il pourrait être apparenté à la diminution du pouvoir pathogène observé pour d'autres virus lorsque leur hôte est placé à une température élevée (KUHN, 1965 - LEBEURIER et HIRTH, 1964 - MATTHEWS et LYTTLETON, 1959).

Des cas de guérison ont été observés à partir de 28 jours de traitement à 35 ° C. Pour obtenir la guérison de l'ensemble des boutures, il a été nécessaire de prolonger les traitements pendant 80 jours au moins.

B) ETUDE D'AUTRES CLONES VIROSES - APPLICATIONS AGRONOMIQUES

L'effet curatif d'un traitement de 90 jours à 35 ° C a été vérifié pour d'autres clones de vigne virosés (GALZY et COMPAN, 1968). Dans un premier temps, on a pu mettre en évidence le rétablissement de la rhizogénèse **in vitro** à la suite du traitement thermique. La figure 21 présente, sous forme de diagramme, les résultats obtenus pour 4 clones gravement atteints :

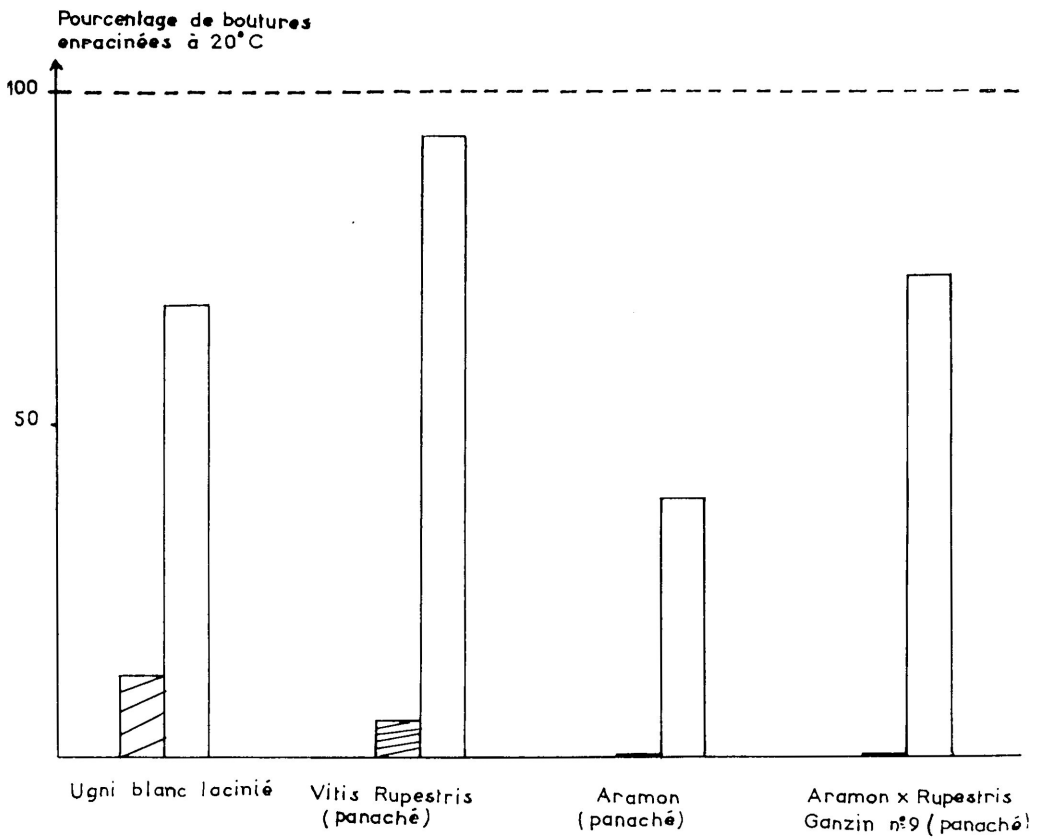


Fig. 21 - Rétablissement de la rhizogénèse à la suite d'un traitement thermique appliqué à 4 clones de vigne présentant des symptomes graves de virose. Pourcentage de boutures capables de s'enraciner in vitro à 20° C sur le milieu de référence avant le traitement (hachuré) et après le traitement (non hachuré).

1) **Vitis rupestris,** var. du Lot. clone P. Condamine, présentant de la panachure et des déformations foliaires.

2) **Vitis vinifera,** var. Aramon, clone Condamine, présentant de la panachure et des déformations foliaires.

3) Hybride interspécifique,Aramon x Rupestris Ganzin n° 9 présentant de la panachure et des déformations foliaires.

4) **Vitis vinifera,** var. Ugni blanc, clone n° 9 présentant le symptôme de la laciniure.

Le traitement a provoqué, dans chaque cas, une augmentation importante de la rhizogénèse. La valeur atteinte est naturellement une caractéristique génétique de la variété. On remarque sur le diagramme que cette valeur est voisine de 95 p. 100 chez le clone de **Vitis rupestris,** de l'ordre de 40 p. 100 chez l'Aramon et qu'elle présente une valeur intermédiaire (75 p. 100) chez l'hybride interspécifique Aramon x Rupestris Ganzin n° 9.

On a également observé, dans tous les cas, la disparition complète des symptômes de virose : panachure, anomalies morphologiques diverses et laciniure de l'Ugni blanc (figure 22). Les modifications acquises à la suite de la thermothérapie se sont montrées jusqu'à maintenant irréversibles, aussi bien en culture stérile qu'après le retour à la culture en conditions normales.

On peut citer par exemple l'expérience de comportement en plein champ réalisée dans le cas du Rupestris du Lot court-noué.

En 1965, des boutures racinées ont été plantées au Domaine de Lavalette, 56 d'entre elles proviennent directement de la souche « I Condamine » et 84 ont été obtenues à partir de cultures **in vitro** ayant subi un traitement de 3 mois à 35° C. Les plantes traitées présentent chaque année des feuilles larges et de forme régulière alors que les témoins ont des feuilles très déformées (figure 23). Cependant la différence la plus spectaculaire entre les deux parcelles réside dans la vigueur des plantes. En 1967, la longueur moyenne des rameaux en fin de croissance est de 35,6 cm pour les témoins malades et de 160,1 cm pour les plantes traitées. Un essai de bouturage a été réalisé pour le clone traité, à partir des rameaux développés la deuxième année de culture en plein champ. Sur 113 boutures plantées dans un terrain arrosable de Lavalette, III (soit 98 p. 100) se sont enracinées et développées. Les témoins malades n'ont pas encore pu être bouturés dans les mêmes

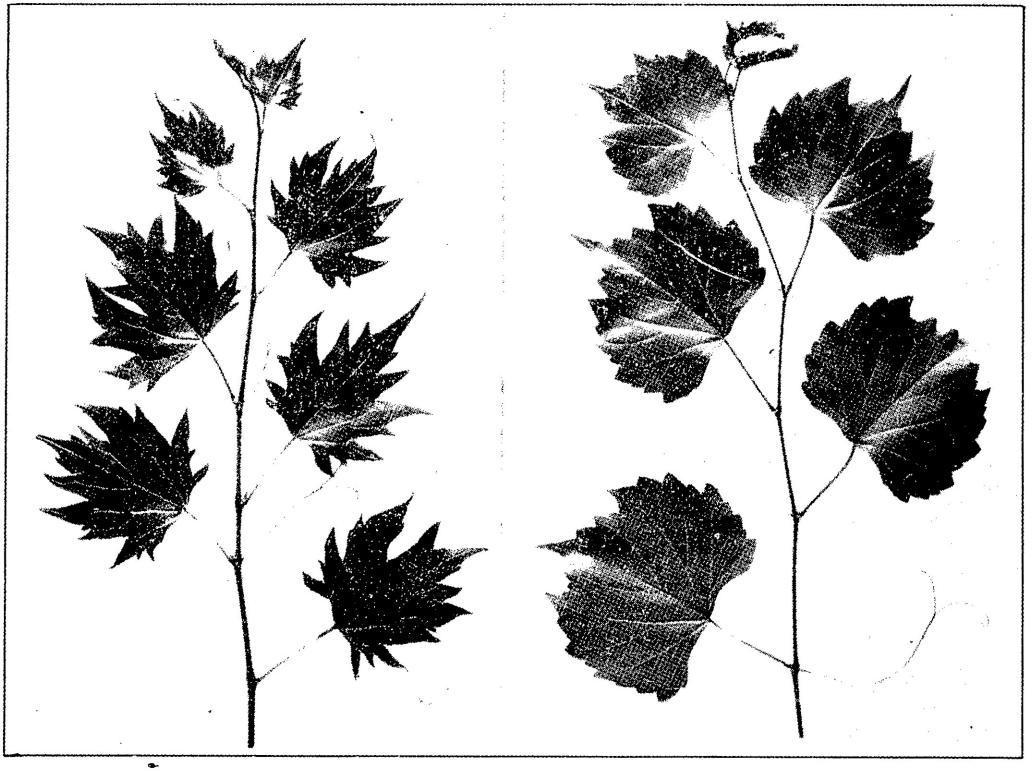


Fig. 23 - *Rameaux prélevés sur deux plantes appartenant à un même clone court-noué de* Vitis rupestris.
A gauche, plante malade ,à droite, plante guérie par un traitement thermique.

conditions faute d'un développement suffisant. Mais on peut souligner que, pour l'ensemble des pépinières françaises, la reprise au bouturage du Rupestris du Lot est de l'ordre de 39 à 52 p. 100 (GALET, 1956). Ces chiffres s'expliquent probablement par le mauvais état sanitaire du vignoble français. Le comportement en plein champ de l'hybride Aramon Rupestris Ganzin n° 9 a été également suivi. La comparaison des plantes témoins et des plantes traitées par thermothérapie fait ressortir une augmentation importante de la vigueur et de la disparition totale des symptômes de panachure à la suite du traitement thermique.

L'ensemble des observations précédentes montre bien qu'il est possible d'obtenir la disparition irréversible des symptômes du court-noué en appliquant un traitement thermique à des boutures de vigne cultivées **in-vitro.** Nous avons pu vérifier, d'autre part, qu'il est possible de cultiver **in-vitro,** de multiplier par bouturage et de traiter à 35° un grand nombre de variétés de vigne. Actuellement notre collection



Fig. 22 Deux plantes d'Ugni blanc provenant du même bourgeon prélevé sur une souche à feuilles laciniées,

A - plante témoin non traitée
B - plante traitée pendant 3 mois à 35° C.

comporte plus de trente variétés de vigne traitées par thermothérapie. Il s'agit de variétés de **Vitis vinifera, Vitis rupestris** et **Vitis riparia** ainsi que d'hybrdes interspécifiques. Le pourcentage moyen de boutures capables de s'enraciner sur le milieu de référence à 20° est un caractère génétique des cépages. Pour des clones ayant subi un traitement thermique, ces valeurs peuvent être comprises entre 15 p. 100 (v. vinifera var. Alphonse Lavallée) et 100 p. 100 (v. riparia var. Gloire de Montpellier). Cependant, certains cépages s'enracinent très difficilement lors de la mise en culture, mais par la suite leur rhizogénèse s'améliore puis se stabilise à une valeur maximum. Cette observation est valable notamment pour les hybrides de **Vitis Berlandieri** (161-49, 41 B, 110 R) et pour quelques cépages de **Vitis vinifera** (Muscat d'Alexandrie, Muscat de Frontignan, Muscat de Hamburg, Ugni blanc). Il semble que ce comportement soit lié à une modification de la physiologie de la plante lorsque celle-ci se développe en culture **in-vitro.** Quoi qu'il en soit, il est intéresant de souligner que la culture **in-vitro** permet une multiplication très efficace de porte-greffes comme le 110 R, dont la reprise au bouturage dans les conditions normales de culture serait de 10 à 15 p. 100 seulement (GALET 1956), alors qu'elle atteint 100 p. 100 en culture **in-vitro.** Cette expérimentation a démontré que la thermothérapie des variétés de vigne virosées pourrait être réalisée à grande échelle dans le but de fournir aux producteurs du matériel végétal indemne de court-noué (GALZY, 1964 à, GALZY et COMPAN, 1968).

La méthode proposée peut être résumée de la façon suivante :
Les bourgeons prélevés sur la souche constituent un stock conservé à 20° C et sur lequel sont prélevées les boutures destinées à subir le traitetement thermique. Ces boutures s'enracinent d'abord à 20° C puis elles sont maintenues pendant 3 mois à 35° C. Les étuves utilisées pour le traitement thermique ont été conçues spécialement pour ce travail. Elles consistent en une double enceinte de plexiglas parcourue par deux circuits d'air pulsé dont la température est réglée par des thermomètres à contact de mercure. L'éclairage est apporté par quatre tubes fluorescents de 40 watts (GALZY et NIGOND, 1968). A la suite du traitement thermique les plantes sont ramenées à 20° C pour subir une multiplication par bouturage en conditions stériles. Enfin, les boutures sont transférées à la culture en serre lorsqu'elles présentent 3 ou 4 feuilles et des racines bien développées. La transplantation réussit dans 90 p. 100 des cas. La période la plus favorable à la mise en pots est celle de Janvier à Avril. Il est donc nécessaire de disposer d'une serre chauffée et munie d'un éclairage d'appoint. Si la plantation est faite assez tôt, au début de l'année, les plantes donnent

au cours du premier cycle végétatif un tige aoûtée d'un mètre environ. La plupart d'entre elles peuvent donc être mises en pépinière au printemps suivant.

Cependant il est souhaitable de conserver en culture **in-vitro** quelques exemplaires de chaque variété traitée par thermothérapie. On dispose ainsi d'une collection de vignes saines à l'abri des contaminations par le court-noué. On peut en effet maintenir les clones dans ces conditions de culture pendant de longues années grâce à des bouturages successifs. Rappelons qu'il est possible d'espacer les repiquages à condition de stocker les tubes de culture à 10° C environ. A tout moment un clone de la collection peut être multiplié rapidement par bouturage à 25° C par exemple et transféré à la culture en pots.

Une autre méthode de thermothérapie mise au point aux Etats-Unis a également permis d'obtenir la guérison de cépages atteints de court-noué (GOHEEN, LUHN et HEWITT, 1965). Elle consiste à traiter à 37° C des plantes cultivées en pots. Les extrémités des rameaux développés à cette température sont prélevées et bouturées sous brouillard. En effet, dans ces conditions de culture, la température obtenue au niveau des racines reste généralement inférieure à celle de l'air. La culture **in-vitro** permet d'éviter cette difficulté et d'obtenir la guérison de toute la plante. Elle se prête d'autre part à un contrôle plus rigoureux de la température. Enfin, la culture **in-vitro** constitue une méthode pratique et peu onéreuse pour multiplier et pour stocker sous un faible volume un abondant matériel végétal.

CONCLUSIONS

Les techniques de culture **in-vitro** d'organes ou de plantes entières sont très utilisées pour l'étude du métabolisme des végétaux. Il semble qu'elles permettent en réalité des observations différentes. La culture de tissus ou d'organes isolés peut conduire à localiser les lieux de synthèse ou de consommation des métabolites. La culture **in-vitro** de plantes entières doit permettre de préciser les relations entre organes ainsi que l'évolution des besoins au cours des différentes phases du développement. La culture en milieu naturel ne fournirait pas à cet égard les mêmes possibilités car celui-ci, plus complexe, contient généralement tous les éléments nécessaires à la croissance et au développement de la plante. Ainsi, la présence dans la rhizosphère de vitamines produites par les microorganismes du sol, ne peut pas permettre d'apprécier exactement le degré d'autotrophie des plantes phototrophes. Il est évident que les plantes cultivées **in-vitro**

à température constante et sur un milieu nutritif synthétique présentent souvent des caractères physiologiques très différents de ceux observés dans les conditions naturelles. Néanmoins, cette méthode de culture permet d'étudier différents problèmes de physiologie et de pathologie végétale. On ne doit pas sous-estimer non plus les possibilités d'applications pratiques qu'elle offre.

Vitis rupestris cultivé **in vitro** a pu se développer entre les températures limites + 8 et + 38 ° C. Dans ces conditions de culture les plantes ont présenté une vitesse de croissance plus faible que dans la nature et, au contraire, une rhizogénèse plus rapide (du moins dans le cas des boutures indemnes de virus) On a remarqué également l'absence de rythme endogène apparent et la croissance continue des sommets végétatifs. Enfin, cultivées sur milieu synthétique, les boutures de vigne comportant une feuille étalée, ne sont pas complètement autotrophes à tous les stades de leur croissance. La présence de sucre et de vitamines est nécessaire pour obtenir une croissance normale (notamment aux températures élevées). Certains équilibres doivent d'ailleurs être respectés entre les éléments nutritifs du milieu. Ainsi, l'absence de vitamine se traduit par de graves nécroses et un arrêt brusque de la croissance des racines lorsque le milieu contient du saccharose, alors que ce phénomène n'est jamais observé en l'absence de sucre.

L'analyse systématique du développement des boutures a permis de déterminer certaines conditions de milieu et certains éléments nutritifs favorables à chaque stade de la culture : rhizogénèse, croissance des racines, croissance des tiges. A chacun de ces phénomènes correspondent en effet des besoins particuliers. Ainsi, la différenciation des racines admet une température optimale de 33 ° C et elle se trouve nettement favorisée par l'acide naphtalène acétique et par les concentrations élevées en cations monovalents K^+ et NH^+_4. Au contraire, la croissance des tiges et celle des racines est maximale à 30 ° C seulement. Elle est, d'autre part, réduite en présence d'ANA ou de fortes concentrations de potassium et d'ammonium. Cette opposition entre les conditions qui favorisent la néoformation des racines et celles qui permettent la croissance, s'accentue lorsque l'on cultive des explantats prélevés à proximitié du sommet végétatif. Ainsi, il a été possible de trouver un milieu nutritif capable d'assurer les différents stades de la croissance dans le cas de boutures comportant une feuille étalée. Par contre, dans le cas de boutures terminales à 2 ou 3 ébauches foliaires, il a été nécessaire d'adopter un milieu différent pour chacun de ces stades. Il est possible, en quelque sorte, de remplacer pour de petits explantats, le gradient de différenciation qui existe le long de l'axe,

par l'action de milieux nutritifs différents utilisés successivement. Si la composition et le temps d'action de ces milieux sont convenablement choisis, ils peuvent permettre d'induire l'une après l'autre, les différentes phases du développement des méristèmes. Il semble que des techniques de ce genre pourraient offrir d'importantes possibilités expérimentales pour l'étude des phénomènes de différenciation.

Enfin, la culture des méristèmes de vigne, telle que nous l'avons réalisée, doit permettre d'étudier la répartition du virus à proximité de l'apex. Sur le plan pratique, s'il s'avérait qu'elle ne peut pas conduire à l'obtention de plantes indemnes de court-noué; elle pourrait éventuellement être utile dans la lutte contre d'autres viroses de la vigne.

La culture **in vitro** de boutures de vigne saines et court-nouées a permis d'aborder l'étude de quelques aspects des relations hôte-virus. Les rapports de la vigne et du virus du coutr-noué paraissent très complexes. Plusieurs types d'explantats ont, en effet, été rencontrés à l'intérieur d'un même clone. Certains bourgeons se sont révélés être indemnes de virus. C'est à dire qu'une plante infectée de façon chronique peut porter des organes où le virus ne s'est pas multiplié.

En cultivant les boutures à diverses températures et en présence de doses variables d'ions K et NH_4, nous avons également pu faire varier de façon considérable l'influence du virus sur la plante. On sait que le virus est capable de troubler les phénomènes de différenciation. Ainsi la néoformation des racines est presque totalement inhibée par certaines souches du virus du court-noué. Mais cette inhibition a pu être levée en grande partie par des traitements thermiques de courte durée et par des milieux riches en ions K^+ et NH^+_4. Certains auteurs ont mis en évidence une diminution du pouvoir pathogène de plusieurs virus lorsque leur hôte est placé à une température élevée. Les traitements thermiques courts appliqués à la vigne pourraient, de la même façon, permettre le rétablissement de la rhizogénèse en modifiant les propriétés du virus. Cependant, on peut également envisager, pour expliquer le rétablissement de la rhizogénèse, une action des températures élevées et des cations monovalents sur certains mécanismes de régulation de l'hôte. Rappelons que le virus agit de façon assez spécifique sur la différenciation des racines puisqu'il est capable de l'inhiber à 90 p. 100, alors qu'il ne réduit la croissance que dans de plus faibles proportions. Il n'est pas impossible que le virus agisse en réprimant les gènes responsables de la différenciation des racines et qu'inversement, les températures élevées et les cations monovalents soient capables de lever ces inhibitions. Rappelons que ces derniers facteurs se sont également mon-

trés actifs sur la différenciation des racines dans le cas des tissus sains (boutures et surtout apex). Il serait particulièrement intéressant de pouvoir préciser le rôle joué par les températures élevées et les cations monovalents dans les phénomènes de différenciation cellulaire. Il serait important notamment de comprendre par quel mécanisme ces facteurs pourraient agir, au niveau moléculaire, pour induire la dérépression des gènes.

Enfin, l'action de la température 35 ° C, lorsqu'elle se prolonge au-delà de 21 jours, permet d'obtenir la disparition irréversible du virus. Toutes les boutures qui s'enracinent et poussent à 35 ° sont débarrasées du virus, pourvu que le traitement se prolonge pendant plus de 80 jours. La cinétique de la guérison semble correspondre à une « courbe à plusieurs coups ». Il aurait été intéressant d'étudier également l'évolution de l'état pathologique des boutures incapables de s'enraciner (15 % des lots environ).

Au cours de ce travail, se sont également dégagées plusieurs possibilités d'applications agronomiques. Certaines d'entre-elles sont dès maintenant au point et elles peuvent contribuer efficacement à la lutte contre les viroses de la vigne. Il s'agit de la guérison des clones court-noués, par thermothérapie ou par culture de bourgeons sans virus, et aussi de la multiplication des plantes saines en culture **in vitro.**

D'autre part, la culture **in vitro** de bourgeons de vigne, ou d'autres plantes cultivées, en facilitant l'étude de certains phénomènes de différenciation pourrait conduire à de nouvelles applications agronomiques. On peut souligner par exemple l'importance pratique que pourrait présenter, pour la culture des plantes à reproduction végétative, une étude plus approfondie des inducteurs de la rhizogénèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

EISEN H., PEREIRA DA SILVA L., JACOB F., 1968. — Sur la régulation précoce du bacteriophage . **C. R. Acad. Sci., 266 D, II,** 1176-1178.

GALET P., 1956. — Cépages et vignobles de France. Tome I.

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

GALZY R., 1963. — Essais de thermothérapie du court-noué de la vigne sur des cultures **in vitro.** 3e Conférence Internationale et mal. à virus de la vigne. Lisbonne, 1962. **Bull. O.I.V. 36,** 41-44.

GALZY R., 1963. — Thermothérapie de quelques variétés de vigne. **Progr. Agric. Vitic., 160,** 255-261, 292-297.

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

GALZY R., 1964 b. — Premières observations sur la distribution de l'infection chez des souches de vigne atteintes de court-noué. **C. R. Acad. Sci., 259,** 1761-1763.

GALZY R., 1965 a. — Action de traitements thermiques courts sur la rhizogénèse **in vitro** d'un clone de **Vitis rupestris** court-noué. **C. R. Acad. Sci., 261,** 524-527.

GALZY R., 1965 b. — Observations sur les variations de l'état sanitaire à l'intérieur d'un clone de **Vitis rupestris** court-noué. **Ann. Epiph. 16, n° H.S., I,** 97-108.

GALZY R., 1966. — Action de la température 35 ° C sur **Vitis rupestris** atteint de court-noué. **Bull. Soc. fr. Physiol. Vég., 12,** 391-399.

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., COMPAN H., 1968. — Thermothérapie de quelques variétés de vigne présentant des symptômes de viroses. **Vignes et Vins, 166,** 13-20.

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.

GOHEEN A.C., LUHN C.F., HEWITT W.B., 1965. — Inactivation of grapevine viruses **in vivo.** Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial host. **Davis Calif.,** 255-265.

HOLMES F.O., 1955. — Elimination of spotted-wilt from dahlias by propagation of tip cuttings. **Phytopath, 45,** 224-226.

KUHN C.W., 1965. — Decline of specific infectivity of Cowpea Chlorotic Mottle virus **in vivo. Virology, 25,** 9-14.

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

LEBEURIER G., HIRTH L., 1964. — Action des températures supraoptimales sur la multiplication du virus de la mosaïque du Tabac dans des disques de feuilles disposées en milieu liquide. Etude des propriétés des virions. **C. R. Acad. Sci., 259,** 2563-2566.

LIMASSET P., CORNUET P., 1950. — Etude de la corrélation entre l'âge des organes aériens et la quantité de virus contenue dans ces derniers chez le tabac infecté par le virus de la mosaïque du tabac (Marmor tabaci (ORTON) HOLMES). **Ann. Epiphyties, I,** 274-285.

MATTHEWS R.E.F., LYTTLETON J.W., 1959. — Heat inactivation of Turniq yellow mosaic virus **in vivo. Virology, 9,** 332-342.

RIVES M., 1958. — Une expérience de sélection clonale : l'amélioration variétale du Chasselas de Moissac. **Proc. 15th Intern. Hort. Congr., II,** 92-95.

SADLER J.R., NOVICK A., 1965. — The properties of repressor and the kinetics of its action. **J. Mol. Biol. 12,** 305-327.

WURGLER W., 1955. — La bouture de Vitis comme test biologique. **Actes Soc. Helvet. Sci. Nat., 135,** 134-135.