

Comportement de plants de vigne issus de microgreffage d'apex

Ferjani Ben Abdallah, Hassene Zemni, Asma Fnayou, Abdelwahed Ghorbel

Le développement du secteur viticole tunisien passe par la conservation des variétés autochtones, adaptées aux conditions pédo-climatiques locales et appréciées du point de vue tant organoleptique que commercial [1]. Ces variétés sont en régression considérable avec une diminution de la production et une menace d'extinction [1, 2]. Certaines variétés telles que Khdhiri et Blanc n'ont été retrouvées qu'en deux ou trois exemplaires, dans un état sanitaire très déficieux [2].

Deux contraintes majeures s'opposent à la reconstitution d'un patrimoine viticole local sain et conforme : les infections virales, chez plus de 90 % des variétés observées, et la lenteur des techniques classiques de sélection clonale.

Le microgreffage d'apex constitue une méthode rapide et efficace pour régénérer des lignées saines et conformes, mais le retour à l'état juvénile des plants de vigne cultivés *in vitro* est sujet à controverse [3, 4].

F. Abdallah : Faculté des sciences de Sfax, Département de biologie, BP 802, 3018 La Soukra, Sfax, Tunisie. <ferjani_fba@yahoo.fr>

H. Zemni, A. Fnayou, A. Ghorbel : Laboratoire d'adaptation et d'amélioration des plantes, INIRST, BP 95, 2050, Hammam-Lif, Tunisie.

Tirés à part : F. Ben Abdallah

Thèmes : Phytotechnologie ; Physiologie végétale.

Nous avons mis au point un protocole rapide pour la régénération et la multiplication de plants sains à partir de pousses issues de microgreffage de méristèmes prélevés sur des variétés autochtones menacées d'extinction. Les effets de la concentration du milieu de culture en macroéléments et en vitamines sur la croissance, le développement des vitroplants ainsi que le taux de réussite de l'acclimatation ont été étudiés, avec un suivi des vitroplants en culture sous serre.

Matériel et méthode

Des petites pousses issues de microgreffage d'apex méristématiques ont été développées pendant 3 semaines sur le milieu de Murashige et Skoog dilué au 1/2 et additionné d'AIB ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). À partir de ces pousses, des microboutures appartenant aux variétés autochtones de *Vitis vinifera* (Razegui, Hemri Kerkennah et Bezzoul Kelba Bidha) et mesurant 3 à 5 mm ont été repiquées sur quatre milieux M_1 , M_2 , M_3 , M_4 . Leur composition minérale diffère par leur concentration en NH_4NO_3 et/ou CaCl_2 (tableau 1). Ces milieux se composent tous des autres macro-éléments MgSO_4 (200 mg.L^{-1}), KNO_3 (950 mg.L^{-1}), KH_2PO_4 (100 mg.L^{-1}), des micro-éléments de MS, de saccharose (30 g.L^{-1}), de l'agar (7 g.L^{-1}), et des vitamines de Morel et Martin [5]. Le milieu M_4 est renforcé par deux vitamines : la glycine (200 mg.L^{-1}) et la glutamine (200 mg.L^{-1}). Les cultures sont réalisées dans des tubes

de $250 \times 25 \text{ mm}$ contenant 25 ml de milieu de culture et maintenues à $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sous 4 000 lux avec une photopériode de 12 heures.

La croissance des plantes a été mesurée après 6 semaines de culture sur la base du nombre d'entre-nœuds, du nombre de racines, du poids frais des pousses et du taux de plants acclimatés. Trois tubes dépourvus d'explants, par génotype et par milieu, ont été maintenus dans les mêmes conditions expérimentales, dans le but d'évaluer les variations de pH du milieu liées à l'environnement.

Pour chaque génotype et chaque milieu, 15 explants ont été étudiés. Les dispositifs expérimentaux consistent en des blocs aléatoires complets. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (*Statistical Analysis System, Version 6.12*) suivant la procédure Anova (*Analysis of variance*) avec l'utilisation du test de Duncan (*multiple range test*) et celui de Waller-Duncan-K-ratio-t-Test.

Pour la sortie de matériel vers la serre, les vitroplants initialement issus du microgreffage sont repiqués dans des godets contenant de la tourbe stérile humidifiée. L'ensemble est ensuite placé sous un petit tunnel de plastique dans une atmosphère saturée d'humidité à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sous photopériode de 16 heures de jour. De 15 à 20 jours plus tard, le développement du système racinaire et la formation de nouvelles feuilles autorisent la sortie des plants en serre ; le nombre de plants sevrés est recensé, on passe à l'étape d'endurcissement.

Tableau 1**Composition des milieux de culture *in vitro***

Macro-éléments (mg.L ⁻¹)	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄ *
NH ₄ NO ₃	1 000	500	500	500
CaCl ₂	220	220	125	125

* Les milieux M₃ et M₄ diffèrent par l'adjonction de deux acides aminés dans le second : la glycine (200 mg.L⁻¹) et la glutamine (200 mg.L⁻¹).

Composition of tested culture media

Après développement de leur système racinaire, les plantes acclimatées (*photo 1*) ont été transférées en pots et placées dans la serre-tunnel. Les clones sélectionnés ont été transplantés, pendant la période de dormance, dans des cubes de laine de roche imbibés d'une solution nutritive Hydrokani [6] dont la composition en macro-éléments (0,01kg.L⁻¹) est la suivante: N total (2,8), P₂O₅ (2,2), K₂O (8,2), MgO (0,72), SO₃ (1,5), celle en oligo-éléments (0,01 g.L⁻¹): B (4,6), Cu (9,0), Fe (40), Mn (9,0), Mo (1,5), Zn (9,0), Cl (0,54), pH 6, CE 2,2 mS.cm⁻¹. Après 2 mois de développement continu, les cubes de laine de roche contenant les plants acclimatés sont transférés sur des pains de laine de roche (grodan type WPL 20/75, de 20 x 7,5 x 100 cm) en serre contrôlée, avec une densité de 4 plants.m⁻² déposés en lignes jumelées recevant régulièrement la même solution nutritive. Durant leur développement, les plantes ont subi un tuteurage progressif et sont conduites en cordon vertical.

La solution nutritive décrite précédemment est distribuée par un réseau de goutteurs, à la concentration de 4,6 %.

Les arrosages sont assurés par un système d'irrigation localisé au moyen de capillaires et durent 10 min/jour, le pH à l'intérieur des pains étant de 6. Le suivi de l'essai a été réalisé hebdomadairement alors que les plants étaient en pleine phase de croissance végétative à l'état herbacé. Deux systèmes de taille ont été adoptés à partir de la première année: une taille courte (en dessous du 6^e nœud) et une taille longue (au-dessus du 12^e nœud).

Résultats et discussion

Les macro-éléments influencent fortement les différents paramètres: nombre d'entre-nœuds, nombre de racines, poids frais, acclimatation des plants régénérés (*tableau 2*). La culture provoque une diminution de pH surtout dans le milieu le plus riche en NH₄⁺ (M₁). Dans les tubes témoins dépourvus d'explants, les variations de pH sont faibles (entre 5,8 et 6,2). Les variations de pH des milieux

ne semblent pas influencer directement la croissance.

La comparaison des moyennes par le test de Duncan (*tableau 2*) montre que le milieu M₁ est le plus favorable à l'élongation des vitroplants. Ce milieu (M₁) est le plus favorable à l'émission des racines, particulièrement en début de culture, mais un séjour prolongé des pousses dans ce milieu affecte le nombre et la qualité des racines avec un brunissement de ces dernières (*photo 2*). Le pH est plus élevé dans les milieux M₂ et M₃ que dans M₁ avec une nette amélioration de la croissance du système racinaire dans M₂. Il ressort de nos expériences qu'un abaissement des concentrations en NH₄NO₃ et en CaCl₂ permet à la fois d'éviter l'utilisation risquée des auxines dans le milieu de culture et de favoriser la rhizogénèse.

L'utilisation du milieu de culture M₄, de même composition ionique que celle de M₃ mais enrichi en glycine et glutamine, a conduit à une croissance importante des racines (*photo 3*) associée à une baisse du pH du milieu. Étant donné que les potentialités photosynthétiques des plantes cultivées en tubes sont limitées [7], il est possible que l'apport d'acides aminés tels que la glycine et la glutamine corrige un déficit azoté et ait un effet bénéfique sur la vigueur du système racinaire (*photo 3*).

Les milieux M₃ et M₄ donnent les taux les plus élevés de plants acclimatés viables (*tableau 2*), les plantules comprenant cinq entre-nœuds et quatre racines se prêtant le mieux à l'acclimatation. Un nombre d'entre-nœuds élevé n'est pas un indicateur de la réussite d'acclimatation des vitroplants. Celle-ci dépend plus de la vigueur du système racinaire que du développement des parties aériennes (*tableau 2*).

Actuellement, une collection de variétés autochtones saines, manifestant une bonne croissance sur laine de roche, est installée à l'Institut national de recherche scientifique et technique (*photo 4, page 352*); elle jouera le rôle de conservatoire et servira pour le suivi du comportement et de l'état sanitaire des plants obtenus.

Les modifications phénotypiques observées sur les plantes de vignes cultivées *in vitro* présentent un risque sérieux [8]. La littérature mentionne des points de vue différents selon la méthodologie appliquée.

Dans nos conditions expérimentales, certains caractères juvéniles foliaires se manifestent durant les premières semaines d'acclimatation et disparaissent



Photo 1. Vitroplants de vigne acclimatés.

Photo 1. Acclimatized grapevine vitroplants.



Photo 2. Brunissement du système racinaire des pousses cultivées sur le milieu M₁.

Photo 2. Browning rooting system of shoots cultivated on M₁ medium.

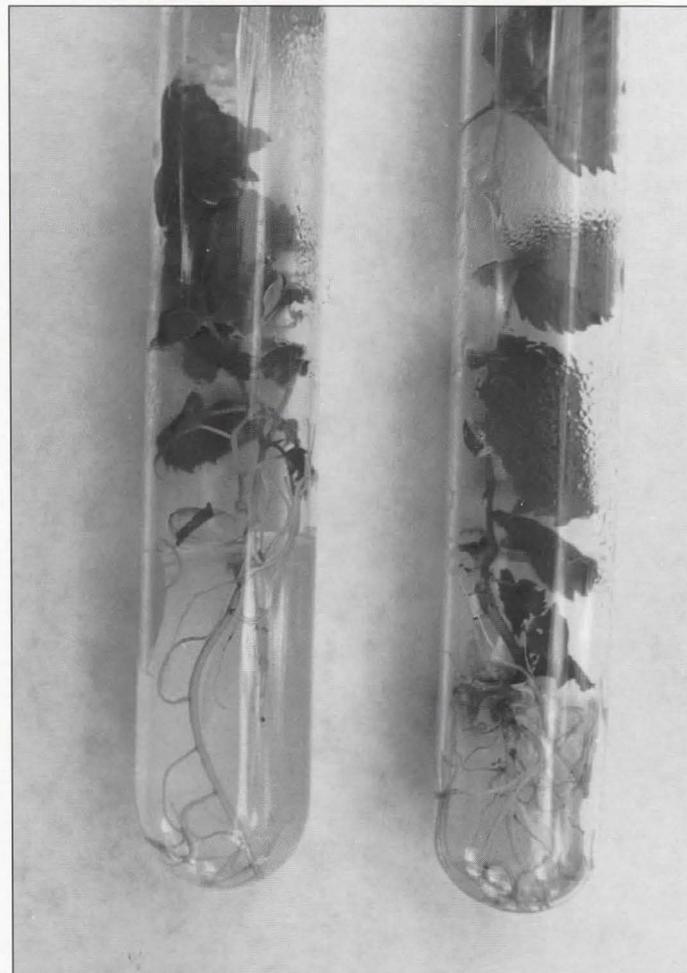


Photo 3. Système racinaire vigoureux des pousses cultivées sur le milieu M₄.

Photo 3. Vigorous rooting system of shoots cultivated on M₄ medium.

sent ensuite. Il s'agit des découpures et de la pubescence des feuilles de la partie basale, observées sur la variété Bez-

zoul Kelba Bidha ; ces anomalies s'atténuent vers le sommet et disparaissent complètement après la première taille.

Les caractères typiques de la forme adulte apparaissent rapidement sur les autres variétés assainies : la tige de structure dressée et de couleur vert pâle ; les feuilles glabres entières et alternes sans sinus ; le bourgeon terminal dressé ; la phyllotaxie 1/2 avec présence de vrilles.

Au cours de la deuxième année, les variétés locales ayant subi une taille au-dessus de 70 cm (du 10^e au 12^e nœud) ont présenté un cycle reproducteur et une fertilité proches de la normale et ont produit des grappes (*photo 5*). En revanche, la presque totalité des variétés ayant subi une taille au-dessus de deux yeux ont montré une fertilité nulle, avec persistance de caractères juvéniles comme l'échancrure des feuilles, tout en maintenant une phyllotaxie 1/2 avec présence de vrilles.

Tableau 2

Effet des milieux de culture sur la croissance des vitroplants de vigne

Milieu	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
Nombre d'entre-nœuds	7,20a	6,69b	5,87c	4,87d
Poids frais (g)	0,34c	0,36c	0,38b	0,40a
Nombre de racines	1,51d	2,27c	3,60b	4,27a
Nombre de plants acclimatés	0,49c	0,78b	0,89b	0,95a
Évolution du pH**	3,97d	5,16a	4,92b	4,15c

* Les moyennes indiquées (a, b, c) montrent une différence significative à $p \leq 0,01$ en utilisant le test de Duncan.

** pH initial : 6,5.

Effect of culture medium on growth of grapevine *in vitro* plantlets



Photo 4. Collection de vignes locales conduite sur laine de roche.

Photo 4. Local vines collection conducted on rockwool substrate.



Photo 5. Production de grappes par la variété Razegui.

Photo 5. Grape production by Razegui variety.

Conclusion

Le milieu M_1 , caractérisé par une dose forte en NH_4NO_3 , semble être favorable au développement des parties aériennes et à l'émission de racines des plantules de vigne, particulièrement en début de culture ; toutefois, un séjour prolongé des pousses sur ce milieu affecte la croissance et la qualité des racines ainsi que le taux de plants acclimatés viables.

L'appauvrissement des milieux de culture en NH_4NO_3 et en $CaCl_2$ ainsi que l'adjonction de glycine et de glutamine améliorent la rhizogenèse des vitroplants en l'absence d'auxines dans le milieu de culture. L'utilisation de milieux de culture dépourvus d'hormones, l'emploi d'une seule étape de « régénération-croissance-enracinement », l'absence des subcultures et l'utilisation de systèmes de taille longue préservent le caractère adulte et la fertilité des régénérants ■

Références

1. Boulila M, Chabbouh N, Cherif C. *Current status of virus diseases of grapevine in Tunisia*. 10th Meeting of the International council for the study of virus diseases of the grapevine, September 3-7, 1990, Volos (Greece).
2. Ben Abdallah F, Ghorbel A. Recovery of tunisian grapevine germplasm by biotechnological methods. *TZFTS Newsletter* 2000 ; 1 : 20-1.
3. Grenan S, Truel P. Observations sur un aspect de la variabilité constatée au cours de la multiplication végétative de variétés de vigne issues de semis de *Vitis vinifera* L. *Agronomie* 1983 ; 3 : 675-80.
4. Walter B. Effets des viroses sur la vigne et ses produits. *Progr Agric Vitic* 1996 ; 22 : 482-8.
5. Morel G, Martin C. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *CR Acad Agric* 1955 ; 41 : 472-5.
6. Ben Abdallah F. Les vignes autochtones : caractérisation, régénération et dépistage *in vitro*. Thèse de doctorat de biologie. Fac Sci Tunis, 1999 ; 200 p.
7. Doazan JP, Lima Da Silva L. Sélection de porte-greffes d'après leurs potentialités de croissance et de photosynthèse *in vitro*. *J Inter Sci Vigne et Vin*. La viticulture à l'aube du III^e Millénaire 1996 ; 1 : 148-53.
8. Koruza B, Jelaska S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv Refosk). *Vitis* 1993 ; 32 : 59-60.

Summary

Behaviour of grapevine from apex micrografting

F. Ben Abdallah, H. Zemni, A. Fnayou, A. Ghorbel

Shoots of three local grapevines of economic importance threatened by extinction were regenerated by apex micrografting. Microcuttings from shoots showed poor and low rate of acclimatization. Salt and vitamin contents were tested in order to design a favorable culture medium for microcutting and for acclimatizing recalcitrant varieties. Results showed that decreasing NH_4NO_3 , $CaCl_2$ concentrations and adding two amino-acids (glycin and glutamin) enhanced the regeneration of such varieties. Growth, rhizogenesis and acclimatization of shoots were obtained on the same medium. Regeneration of healthy, vigorous, conform, and geneticaly stable grapevines was considered in order to establish a soiless collection of local vines growing on rockwool.

Cahiers Agricultures 2002 ; 11 : 349-54.

Résumé

Des pousses appartenant à trois vignes autochtones tunisiennes d'une importance agro-économique considérable et menacées d'extinction ont été régénérées par microgreffage d'apex. Les microboutures issues de ces pousses ont manifesté des difficultés de croissance et un faible taux d'acclimatation. Plusieurs modifications de la composition minérale et vitaminique du milieu de culture ont été testées et ce, afin de mettre au point un milieu favorable au microbouturage et à l'acclimatation de ces souches récalcitrantes. Les résultats ont montré que la réduction des concentrations en NH_4NO_3 , en CaCl_2 et l'addition de deux acides aminés (la glycine et la glutamine), ont favorisé la régénération de ces souches. La croissance, la rhizogenèse et l'acclimatation de ces pousses ont été obtenues sur le même milieu.

La régénération de souches saines, conformes, vigoureuses et génétiquement stables a été considérée afin d'établir une collection de variétés locales sur un substrat à laine de roche.
