

Polymorphisme foliaire consécutif à la culture *in vitro* de *Vitis vinifera* L.

par

S. GRENAN

Leaf polymorphism after *in vitro* culture of *Vitis vinifera* L.

Summary. — Virus-free varieties of *Vitis vinifera* obtained by *in vitro* heat therapy showed unexpected morphological features after transfer into the vineyard.

Discriminant multivariate analysis of the leaf characters revealed differences between the control plants and the plants from *in vitro* therapy. This analysis also showed on the one hand that heat treatment is not accountable for leaf modifications, on the other hand that these modifications are stable under vineyard conditions.

Study of cuttings from modified plants showed a morphogenetic gradient along shoots. The persistence of new forms is not irreversible. Pruning is responsible for the artificial maintainance of juvenility in consequence of *in vitro* culture.

Introduction

Chez les variétés de *Vitis vinifera* atteintes de diverses maladies à virus, le bouturage *in vitro* associé à un traitement par la chaleur conduit à l'obtention d'individus sains. Mais les plants, issus de ces boutures traitées, placés dans les conditions traditionnelles de culture au vignoble, présentent des modifications morphologiques qui rendent certains cépages méconnaissables pour le praticien.

Cette non-conformité des caractéristiques ampélographiques des variétés concernent, pour l'essentiel, les rameaux et le feuillage. D'une part, on observe une intensification de la pigmentation anthocyanique des rameaux mais aussi des pétioles et des nervures des feuilles. D'autre part, l'échancrure très prononcée des sinus latéraux et l'augmentation de la densité de poils dressés à la face inférieure du limbe rendent les feuilles plus découpées et plus pubescentes. Ces modifications sont très marquées à la base des rameaux et s'estompent vers le sommet.

La morphogenèse des plants issus de thermothérapie *in vitro* a fait l'objet d'observations visuelles rapportées par MUR *et al.* (1972) et d'études sur les possibilités de réacquisition des caractéristiques variétales (GRENAN 1979, 1982).

Faisant suite à une précédente publication (GRENAN et CARAUX 1984) nous exposons ici les principaux résultats d'une part, de l'analyse biométrique, réalisée sur plusieurs cépages, à partir de mesures foliaires; d'autre part, de l'étude du comportement de la descendance par multiplication végétative des plants modifiés de la variété Grenache Noir.

Matériel et méthodes

Nous ne reprendrons pas ici en détail les protocoles décrits entièrement (GRENAN et CARAUX 1984) mais nous rappellerons simplement les principaux points nécessaires à la compréhension des résultats.

1 Matériel végétal

Notre travail porte sur cinq variétés de *Vitis vinifera* choisies pour leurs caractéristiques foliaires intéressantes avant et après thermothérapie *in vitro*: Carignan Noir, Grenache Noir, Maccabeu Blanc, Muscat à petits grains Blanc (ou Muscat de Frontignan) et Syrah Noir.

Les bourgeons de la variété Carignan Noir, introduits en culture aseptique sont issus d'un cep infecté par les virus de l'Enroulement et de la Marbrure. Les bourgeons de la variété Grenache Noir proviennent d'un cep atteint du virus de la Marbrure et ceux de la variété Syrah Noir d'un cep enroulé. Les pieds-mères des variétés Maccabeu Blanc et Muscat à petits grains Blanc ont été perdus mais l'on sait que pour cette dernière variété il existe une importante proportion de souches infectées par le virus du Court-Noué. Les résultats des indexages montrent que les plants traités de ces diverses variétés ont été débarrassés de ces virus.

Les mesures ampélographiques ont été réalisées d'une part, au Domaine de l'Espiguette, sur les individus, issus de boutures traitées, plantés non greffés dans les sables du littoral et sur les ceps (non greffés) d'un clone pris comme témoin, d'autre part, au Domaine du Chapitre, sur les individus (greffés), issus de plants traités provenant du Domaine de l'Espiguette et sur les ceps (greffés) issus de pied-mère de chacune des variétés.

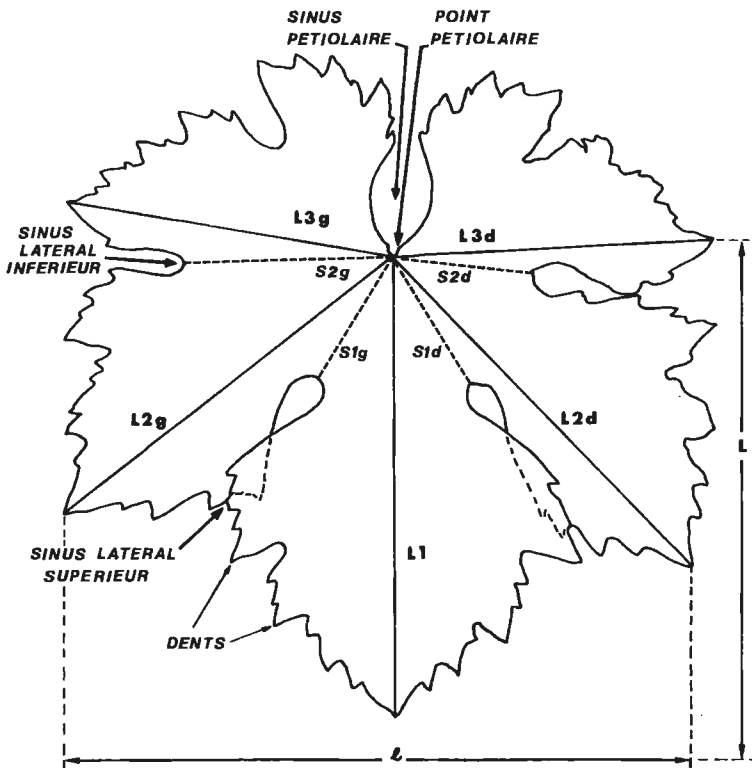


Fig. 1: Schéma d'une feuille de vigne avec figuration des dix mensurations effectuées.
Schema of a grapevine leaf showing the ten measurements taken.

Par ailleurs, des mesures de feuilles ont été faites sur la descendance, soit par bouturage, soit par greffage des plants témoins et des plants traités de la variété Grenache Noir.

2 Méthodes

2.1 Mesures ampélographiques

Les six paramètres utilisés (Fig. 1) qui permettent de différencier au mieux les ceps témoins des ceps issus de thérapie *in vitro*, et que nous appellerons désormais, *modifiés*, sont les suivants:

- L1 — distance linéaire entre le point pétiolaire et l'extrémité de la nervure principale.
- l — distance linéaire entre les deux premières nervures latérales.
- L2 — distance linéaire entre le point pétiolaire et l'extrémité de la première nervure du côté gauche L2 (g) et droit L2 (d).
- L3 — distance linéaire entre le point pétiolaire et l'extrémité de la deuxième nervure du côté gauche L3 (g) et droit L3 (d).
- S1 — distance linéaire entre le point pétiolaire et le fond (vers le point pétiolaire) du sinus latéral supérieur gauche S1 (g) et droit S1 (d).
- S2 — distance linéaire entre le point pétiolaire et le fond du sinus latéral inférieur gauche S2 (g) et droit S2 (d).

Afin de tenir compte de la dissymétrie des feuilles par rapport à la nervure principale on additionne les mesures faites à gauche et à droite pour chacun des quatre derniers paramètres.

En nous inspirant des travaux de CARBONNEAU (1976) pour déterminer la surface et les types de feuilles des différents cépages, nous avons introduit, à l'aide de ces paramètres, cinq variables susceptibles de différencier les feuilles des ceps témoins de celles des ceps modifiés.

La découpeure des feuilles est caractérisée par deux variables:

$$a = \frac{\sum S1}{\sum L2} = \text{coefficient de découpeure des sinus latéraux supérieurs}$$

$$b = \frac{\sum S2}{\sum L3} = \text{coefficient de découpeure des sinus latéraux inférieurs}$$

Les coefficients de découpeure sont d'autant plus faibles que les feuilles sont plus découpées.

La forme des feuilles est caractérisée par deux variables:

$$c = \frac{L1}{\sum L2} = \text{coefficient d'allongement de la nervure principale}$$

$$d = \frac{1}{\sum L2} = \text{coefficient d'écartement des premières nervures principales}$$

La surface foliaire est estimée par $s = (\sum L2)^2$ exprimée en cm^2 à une constante variétale près. En fait, cette dernière variable rend compte de la surface du limbe en faisant abstraction de la présence d'échancre au niveau des sinus. Elle permet seulement d'apprécier la grandeur de la feuille. Enfin, il faut souligner que la surface correspond à une mesure absolue alors que les quatre premières variables sont des valeurs relatives.

2.2 Notation de la pubescence

Pour la variété Grenache Noir en plus des cinq variables caractérisant les feuilles nous avons effectué une notation de la pubescence. En effet, chez cette variété, après

multiplication *in vitro*, la face inférieure du limbe est recouverte de nombreux poils dressés alors que les feuilles au départ sont glabres.

En nous inspirant des travaux de HEGEDUS (1975) nous avons adopté une échelle de notation simplifiée correspondant à une appréciation visuelle de la densité des poils.

L'échelle de notation utilisée est la suivante:

0 = feuilles glabres

1 = feuilles possédant quelques poils dressés (5 à 10 poils/cm² de feuille)

2 = feuilles ayant de nombreux poils dressés (20 à 30 poils/cm² de feuille)

3 = pubescence importante sur les deux faces du limbe.

2.3 Echantillonnage

Les mesures de dix paramètres précédemment définis, sont réalisées sur 50 feuilles prises sur 10 ceps de chacune des variétés témoins et modifiées. Le prélèvement au hasard de feuilles situées entre le 6^e et le 15^e oeil permet de constituer un échantillon représentatif de la variabilité morphologique des feuilles.

Les prélèvements sont effectués courant juillet pour les ceps en plein champ, à la fin août pour les boutures cultivées en serre et courant septembre pour les plants greffés mis en pépinière. Les mesures sont réalisées immédiatement après la récolte des feuilles.

2.4 Analyse discriminante multidimensionnelle

Les données collectées ont été exploitées selon la méthode d'analyse discriminante (ROMEDER 1973) qui permet un regroupement *a priori* des individus à partir d'un nombre de variables mesurées sur eux.

Nous avons utilisé cette méthode pour mettre en évidence ce qui différencie les mensurations foliaires d'une population prise comme référence (individus d'une variété avant traitement) et celles d'une population qu'on se propose d'étudier (plants de la même variété, issus de culture *in vitro*).

Dans cette approche du regroupement des individus on a utilisé la procédure de «pas à pas» qui n'introduit que les variables nécessaires à une bonne discrimination. On simplifie ainsi le modèle tout en atteignant l'objectif fixé.

La représentation graphique fournie par cette méthode permet de regrouper au mieux les individus d'une population et de séparer les populations entre-elles.

2.5 Bouturage et greffage

Pour analyser les modifications dans la descendance de la variété Grenache Noir, nous avons isolé des bourgeons à différents niveaux sur les sarments des ceps modifiés.

A l'époque de la taille, la partie des sarments comprise entre le 4^e et le 35^e oeil est conservée et mise à 4 °C pendant 2 mois pour lever la dormance. A la sortie de la chambre froide les bourgeons sont numérotés et isolés avec un fragment d'entre-nœud sous-jacent. Les boutures sont mises dans des pots renfermant un mélange de tourbe et de pouzzolane, placés sur une couche chauffante. Après l'émission des racines et le débourrement du bourgeon les boutures sont transférées sur des banquettes (contenant le même mélange), en respectant l'ordre d'insertion sur le sarment de départ. Un arrosage à l'eau assure une croissance minimum des plants.

L'hiver suivant, les plants sont taillés au dessus du 2^e oeil. Une partie est conservée dans les conditions décrites précédemment. Une autre partie est transférée dans des conteneurs renfermant le même mélange. Une quantité plus importante de substrat, un espace plus grand entre les plants et un arrosage à la solution nutritive favorisent une croissance plus rapide que celle des plants maintenus sur banquette.

Le comportement des boutures a été comparé à celui de greffes obtenues selon les procédés habituels du greffage sur table.

Des bourgeons prélevés, sans tenir compte de leur position sur les sarments, ont été greffés sur un clone de la variété SO 4 (*V. berlandieri* × *V. riparia*). Après paraffinage du point de greffe et stratification les plants sont mis en pépinière.

Resultats

1 Comparaison de la morphologie foliaire des plants témoins et des plants modifiés

Les comparaisons sont faites à partir de mesures réalisées sur les plants témoins et modifiés cultivés dans les sables de l'Espiguette et sur ceux cultivés au Domaine du Chapitre. L'analyse discriminante multivariée fournit des résultats globalement identiques pour les cinq variétés. L'examen du Tableau 1 sur l'analyse de variance permet d'apprécier le comportement des différentes variétés.

Les différences entre les feuilles témoins et modifiées sont très hautement significatives pour les deux coefficients de découpeure (a et b).

Les coefficients d'allongement (c) et d'écartement (d) dans la majorité des cas ne permettent pas de distinguer les feuilles témoins des feuilles modifiées. Les deux variables apparaissent comme des constantes de la forme des feuilles pour un cépage donné.

Selon la variété, la surface foliaire des plants témoins et modifiés peut être différente (Grenache Noir, Maccabeu Blanc) ou non (Muscat à petits grains Blanc, Syrah

Tableau 1

Analyse de la variance univariée (test de F) par variété pour chaque variable observée

Variance analysis (F test) of varieties for each observed variable

Paramètres	Plants non greffés (Espiguette) Témoins — Modifiés				Plants greffés (Chapitre) Témoins — Modifiés				
	C	G	MF	S	C	G	M	MF	S
a	***	***	***	***	***	*	**	***	***
b	***	***	***	**	***	NS	***	***	***
c	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
d	NS	NS	NS	*	NS	NS	*	***	NS
s	***	***	NS	NS	NS	*	***	NS	NS

C: Carignan Noir; G: Grenache Noir; M: Macabeu Blanc; MF: Muscat de Frontignan; S: Syrah Noir.

a: Coefficient de découpeure des sinus latéraux supérieurs.

Depth coefficient of the upper lateral sinuses.

b: Coefficient de découpeure des sinus latéraux inférieurs.

Depth coefficient of the lower lateral sinuses.

c: Coefficient d'allongement.

Length coefficient.

d: Coefficient d'écartement.

Width coefficient.

s: Estimation de la surface.

Estimation of the surface.

Risque/risk ***: P = 0,1 %; **: P = 1 %; *: P = 5 %; NS = Non significatif/not significant.

Tableau 2

Analyse de la variance univariée (test de F), pour la variété Syrah Noir, entre les plants témoins et les plants issus de boutures cultivées *in vitro* à différentes températures

Variance analysis (F test) between control plants and plants from cuttings grown *in vitro* at different temperatures; variety Syrah Noir

Paramètres	Plants non greffés (Espiguettes)					Plants greffés (Chapitres)				
	t-20 °	t-38 °	t-(38 ° + 35 °)	20 °-38 °	20 °-(38 ° + 35 °)	t-20 °	t-38 °	t-(38 ° + 35 °)	20 °-38 °	20 °-(38 ° + 35 °)
a	***	***	***	NS	NS	***	***	***	*	NS
b	*	**	**	NS	NS	***	***	***	NS	NS
c	**	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*
d	*	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
s	***	***	NS	*	**	NS	NS	NS	NS	NS

t : Plants témoins.

20 ° : Plants issus de boutures cultivées *in vitro* à une température constante de 20 °C.

38 ° : Plants issus de boutures cultivées *in vitro* ayant subi un traitement de 70 d à 38 °C.

38 ° + 35 ° : Plants issus de boutures cultivées *in vitro* ayant subi un traitement de 70 d à 38 °C puis un traitement de 90 d à 35 °C.

Autres abréviations: voir Tableau 1.

t : Control plants.

20 ° : Plants from cuttings grown *in vitro* at 20 °C.

38 ° : Plants from cuttings grown *in vitro* at 38 °C during 70 d.

38 ° + 35 ° : Plants from cuttings grown *in vitro* at 38 °C during 70 d, then at 35 °C during 90 d.

For other abbreviations see Table 1.

Noir). En fait l'estimation de la surface telle qu'elle a été calculée rend compte seulement de la grandeur du limbe sans tenir compte de la découpeure des sinus. Par conséquent, la surface foliaire peut varier en fonction de l'origine du clone mais aussi en fonction des conditions du milieu (Carignan Noir).

2 Influence de la température sur l'apparition des modifications foliaires

L'étude de la variété Syrah Noir pour laquelle il existe des plants issus de boutures placées à des températures élevées 35 et 38 °C, mais aussi des plants issus de boutures maintenues à une température de 20 °C permet d'apprécier le rôle du passage à la chaleur sur les modifications morphologiques.

Pour les deux coefficients de découpeure (Tableau 2) l'analyse met en évidence une différence importante entre les plants témoins et les plants issus de multiplication *in vitro* quelle que soit la température de culture. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les plants issus de boutures cultivées *in vitro* à 20 °C et les plants issus de thermothérapie.

Il ressort de cette analyse que la modification des caractères de découpeure des feuilles de la variété Syrah Noir est uniquement la conséquence du bouturage *in vitro*, indépendamment des températures de culture. On peut considérer qu'il en est ainsi pour toutes les autres variétés soumises aux mêmes traitements.

3 Persistance des modifications foliaires au cours des années

Depuis 12 ans le comportement au vignoble des plants issus de culture *in vitro* apparaît visuellement homogène et stable. Nous avons confirmé ces observations par une analyse biométrique pendant 3 années consécutives pour la variété Grenache Noir.

Quelle que soit l'année, dans les conditions de culture du Domaine de l'Espigette, les coefficients de découpeure sont différents entre les plants témoins et les plants modifiés (Tableau 3). Par contre, dans les conditions du Domaine du Chapitre il n'y a pas, dans tous les cas, de différence significative. Ce comportement particulier qui peut

Tableau 3

Analyse de la variance univariée (test de F), pour la variété Grenache Noir, pendant 3 années consécutives. Abréviations: voir Tableau 1

Variance analysis (F test), during 3 subsequent years; variety Grenache Noir. For abbreviations see Table 1

Paramètres	Plants non greffés (Espigette) Témoins — Modifiés			Plants greffés (Chapitre) Témoins — Modifiés		
	1979	1980	1981	1979	1980	1981
a	*	***	***	**	*	*
b	***	***	***	NS	*	NS
c	—	NS	NS	—	NS	NS
d	—	*	NS	—	NS	NS
s	NS	NS	***	NS	*	*

s'expliquer par l'origine des plants, a été discuté dans un précédent article (GREANAN et CARAUX 1984).

Par ailleurs, nous avons pu vérifier que les plants témoins d'une part, et les plants modifiés d'autre part, ont des caractéristiques de découpe stables au fil des années. (Tableau 4).

En outre, pour ce cépage la persistance au cours du temps de la pilosité contribue à différencier les plants témoins à feuilles glabres (note 0) des plants modifiés à feuilles pubescentes (notes 1 et 2).

4 Etude des caractéristiques foliaires dans la descendance par multiplication végétative de la variété Grenache Noir

4.1 Comportement des boutures en conditions de croissance minimum

Les bourgeons prélevés sur les sarments modifiés cultivés dans les conditions de l'Espiguette sont mis à bouturer en serre selon le protocole expérimental précédemment décrit.

Tableau 4

Evolution pendant 3 années consécutives (1979 à 1981) des paramètres foliaires pour la variété Grenache Noir · Abréviations: voir Tableau 1

Evolution of the leaf variables during 3 subsequent years (1979 to 1981); variety Grenache Noir · For abbreviations: see Table 1

Paramètres	Plants non greffés (Espiguette)		Plants greffés (Chapitre)	
	Témoins	Modifiés	Témoins	Modifiés
a	NS	NS	NS	*
b	NS	NS	NS	NS
s	***	NS	NS	*

Tableau 5

Analyse de la variance (test de F), pour la variété Grenache Noir, entre les plants témoins (t) et modifiés (Th) cultivés à l'Espiguette et leur descendance par bouturage (B) ou par greffage (G.B.) · Abréviations: voir Tableau 1

Variance analysis (F Test) between control plants (t), modified plants (Th) grown in Espiguette and cuttings (B) or graftings (G.B.) from modified plants; variety Grenache Noir · For abbreviations see Table 1

Paramètres	A	B	C	D	E	F	G
	t—B.Th	Th—B.Th	G.B.t—G.B.Th	t—G.B.	Th—G.B.	G.B.t.—B.Th	G.B.Th—B.Th
a	***	***	NS	***	***	NS	NS
b	*	***	NS	***	***	***	**
c	***	***	NS	NS	NS	***	***
d	***	***	NS	***	***	NS	NS
s	***	***	***	***	***	NS	***

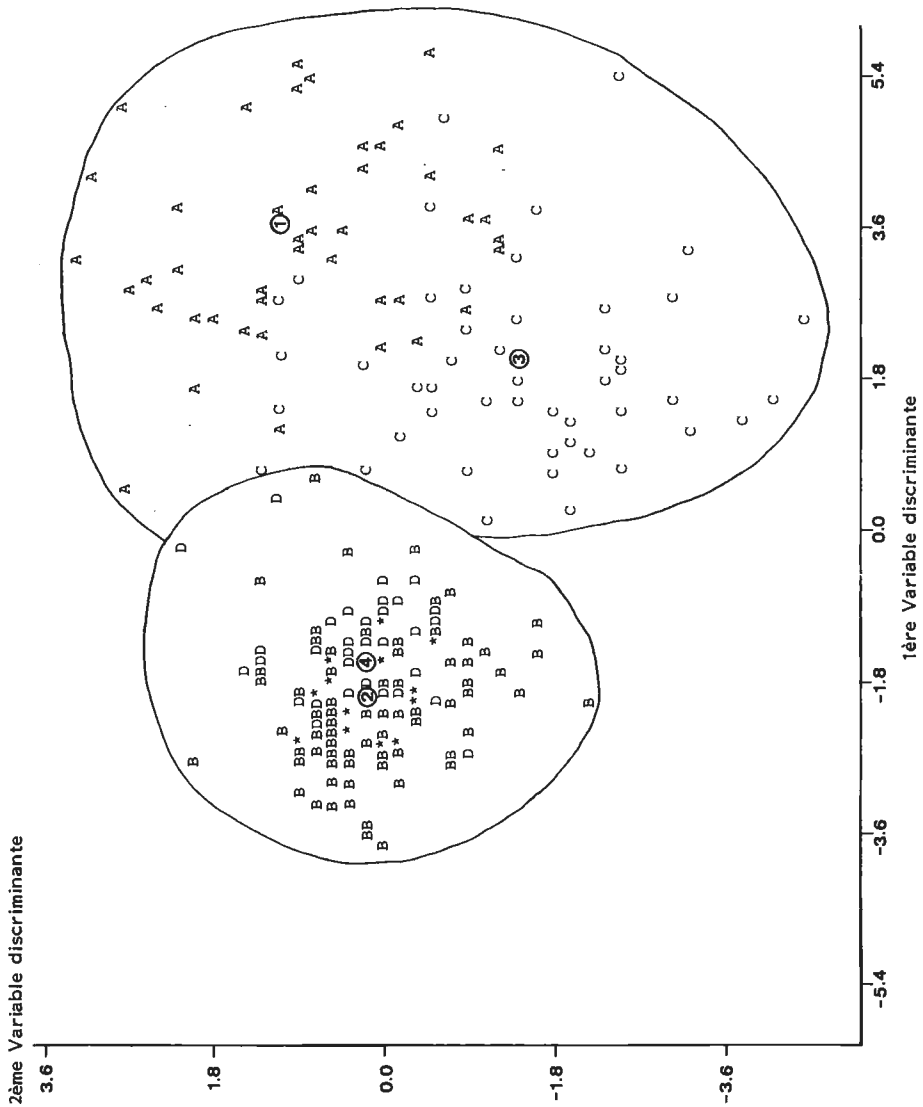


Fig. 2: Analyse discriminante des variables foliaires pour la variété Grenache Noir.

- A ①: Plants témoins Espiguette.
- B ②: Plants greffés, en pépinière, issus des plants témoins et modifiés.
- C ③: Plants modifiés Espiguette.
- D ④: Boutures des plants modifiés. 1^{re} année de végétation en serre.

Discriminant analysis of the leaf variables for the variety Grenache Noir.

- A ①: Control plants, Espiguette.
- B ②: Grafted plants from control and modified plants, nursery.
- C ③: Modified plants, Espiguette.
- D ④: Cuttings of the modified plants. 1st year of growth, greenhouse.

L'observation de la végétation issue de ces différents bourgeons montre que les feuilles sont uniformément rondes, entières et glabres, avec des sinus latéraux à peine marqués; ceci quelle que soit la position du bourgeon sur le sarment de départ.

La singularité du contour des feuilles de ces boutures (B.Th) est confirmée par l'analyse des divers coefficients foliaires par rapport aux plants témoins (t) et aux plants modifiés (Th) qui leur ont donné naissance (Tableau 5, A et B).

On peut considérer que ces bourgeons, issus de plants modifiés, produisent en 1^{re} année de bouturage un troisième type de feuille caractérisé par une régression des sinus conduisant à un contour presque circulaire du limbe.

Le maintien de ces plants dans les mêmes conditions de culture assure la persistance de ces caractéristiques originales au fil des années.

4.2 Comportement des greffes en pépinière

Les greffes issues des plants témoins (G.B.t.) et des plants modifiés (G.B.Th) ont des caractéristiques foliaires identiques (Tableau 5, C) exceptée la surface du limbe qui est plus grande pour les greffes issues des plants témoins.

Comme les boutures, les greffes ont des caractéristiques foliaires différentes de celles des plants qui leur ont donné naissance (Tableau 5, D et E). Par contre, les coefficients de découpage des sinus latéraux supérieurs et d'écartement des boutures et des greffes ne sont pas significativement différents (Tableau 5, F et G).

La répartition des nuages de points fournis par l'analyse discriminante montre que les boutures (D) et les greffes (B) sont deux populations presque confondues et très différentes des plants témoins (A) et des plants modifiés (C) qui leur ont donné naissance (Fig. 2).

De ces diverses analyses, il ressort que la morphologie foliaires des boutures et des greffes en première année de végétation ne peut être rapprochée de celle du type variétal avant culture *in vitro*, au moins pour la variété Grenache Noir.

4.3 Comparaison des feuilles des boutures et des greffes en première année de végétation et des feuilles de la base des rameaux

Ces caractéristiques particulières des feuilles des boutures et des greffes nous amènent à effectuer une comparaison avec les feuilles de la base des rameaux. En effet,

Tableau 6

Analyse de la variance (Test de F), pour la variété Grenache Noir, entre les trois premières feuilles de la base des rameaux témoins (Base) et les feuilles de boutures (B) ou de greffes (G.B.) des plants modifiés. Abréviations: voir Tableau 1

Variance analysis (F test), between three first leaves of the bottom of the control shoots (Base) and leaves of the cuttings (B) or the graftings (G.B.) from modified plants; variety Grenache Noir. For abbreviations see Table 1

Paramètres	Base — B.	Base — G.B.
a	**	NS
b	*	***
c	***	***
d	***	***
s	**	***

jusqu'au niveau de la première grappe les feuilles ont des caractéristiques ampélographiques différentes de celles situées immédiatement au-dessus. Seules ces dernières sont utilisées pour la description des cépages (GALET 1971).

L'examen du Tableau 6 montre que les paramètres foliaires des boutures (B) et des greffes (G.B) sont significativement différents de ceux des trois premières feuilles d'un clone de Grenache Noir. Ces dernières ont des sinus latéraux plus marqués, le contour du limbe n'est pas de type circulaire et la surface du limbe est supérieure. En outre, de nombreux poils dressés (note 2) les distinguent des autres types de feuilles.

Ces feuilles de la base élaborées par la tige préformée dans le bourgeon latent sont soumises à des corrélations d'inhibition qui au moment du débourrement conduisent à leur conférer une morphogénèse originale qui peut être considérée comme de type juvénile (NOZERAN *et al.* 1982).

4.4 Comportement des boutures en conditions de croissance active

Une partie des plants de la première année cultivés sur banquette est transférée dans des conteneurs. Après une taille au dessus du 2^e oeil l'observation de la végétation permet d'étudier la morphogénèse foliaire en fonction de l'origine des plants. L'ensemble des résultats est résumé dans la Fig. 3.

Les plants issus de la région basale du rameau (rangs 4 à 10) portent des feuilles très découpées et très pubescentes (notes 2 et 3). Ceux issus de la région médiane (rang 12 à 20) ont des feuilles découpées et pubescentes à la base des rameaux puis des feuilles entières et glabres vers le sommet. Enfin ceux issus de la région terminale n'ont que des feuilles peu découpées et glabres.

Cette morphologie foliaire liée à la position du bourgeon sur le rameau de départ se maintient au fil des ans si l'on ne modifie pas les conditions de culture (conteneurs, taille à 2 yeux).

Les plants (P4-4. . . P4-32) issus du plant 4 reproduisent les mêmes différences morphologiques liées à l'origine du bourgeon. Par contre, les plants (P.32-4. . . P.32-30) issus du plant 32 ont une morphologie homogène et comparable à celle du plant qui leur a donné naissance. Ces derniers présentent donc des caractéristiques foliaires proches de celles des plants témoins avant passage en culture *in vitro*.

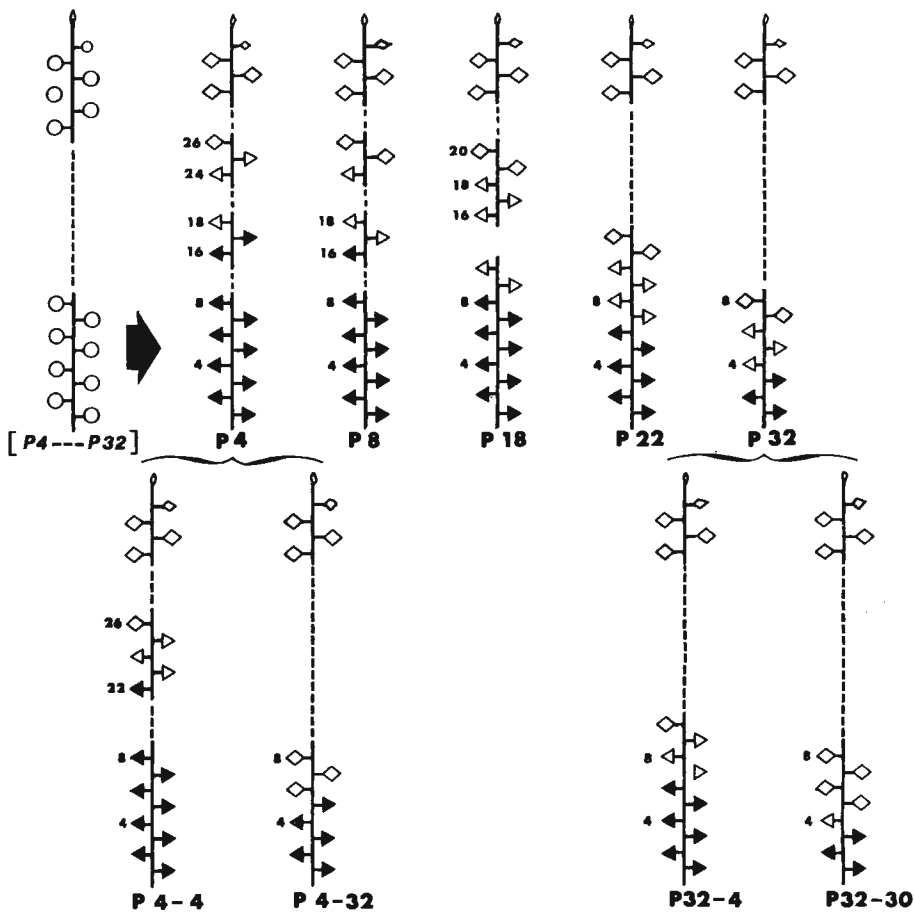
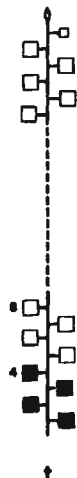
Il ressort de nos expériences sur la multiplication, par voie végétative, des plants modifiés qu'il est possible soit de conserver les caractères nouveaux acquis après culture *in vitro* (cas du bouturage de la portion basale des sarments), soit d'obtenir un retour au type variétal (cas du bouturage de la région terminale des sarments). Les modifications morphologiques observées ne sont donc pas irréversibles.

Discussion

Les principaux résultats obtenus conduisent à formuler quelques réflexions d'ordre fondamental mais aussi à émettre quelques remarques sur les applications relatives à la multiplication du matériel traité.

L'analyse discriminante selon le processus «pas à pas» a permis de confirmer les observations visuelles antérieures tout en apportant quelques précisions sur les caractéristiques foliaires des plants témoins et modifiés.

Il ressort de cette analyse multidimensionnelle que les deux coefficients de découpe sont les variables qui discriminent le mieux les feuilles en fonction du génotype.



L'intensité de la profondeur des sinus latéraux est fonction du génotype. Les coefficients d'allongement et d'écartement apparaissent comme des caractéristiques stables, généralement non affectées par la culture *in vitro*. Ces informations conduisent à penser que, lors de l'ontogenèse des feuilles des plants modifiés, la croissance des nervures principales et secondaires s'effectuerait normalement, leur position relative ne serait pas perturbée mais l'élaboration du limbe situé entre ces nervures cesserait plus précocement par suite d'un blocage de la croissance submarginale déterminant la zone périphérique du limbe (MOUTON 1970). La surface foliaire, telle qu'elle a été estimée, bien qu'influencée par l'origine des plants, est surtout sensible aux variations des conditions de milieu.

Si l'on prend soin d'écartier toute incidence de l'action des maladies à virus sur les déformations foliaires, nous pensons que cette méthode d'analyse biométrique peut se révéler être un outil intéressant pour l'étude d'autres phénomènes conduisant également à des modifications de la morphogenèse des feuilles.

Fig. 3: Schéma des différentes morphologies foliaires observées lors des expériences de bouturage de la variété Grenache Noir.

t: Plant de départ.

T: Plant issu de thermothérapie *in vitro*.

[P4 . . . P32]: Plants issus du Plant T par bouturage, en 1^{re} année de culture en serre sur banquette.

P4, P8, P18, P22, P32: En 2^e année, plants transférés de la banquette en conteneurs et maintenus dans ces conditions pendant 6 ans.

P4—4 . . . P4—32: Plants issus de P4, en 2^e année de culture en serre, en conteneurs.

P32—4 . . . P32—30: Plants issus de P32, en 2^e année de culture en serre, en conteneurs.

⇨ : Bouturage ordonné, en 1^{re} année, sur banquette.

⇒ : En 2^e année, transfert de la banquette en conteneurs.

Feuilles des plants de départ:

■ : Feuilles pubescentes de la base des rameaux.

□ : Feuilles non découpées et glabres, typiques de la variété.

Feuilles des plants modifiés:

◄ : Feuilles découpées et pubescentes.

◁ : Feuilles découpées et glabres.

◇ : Feuilles peu découpées (sinus supérieur marqué) et glabres.

○ : Feuilles rondes (sans sinus latéraux) et glabres.

Scheme of the morphological differences of the leaves observed during cutting experiments with the variety Grenache Noir.

t: Starting plant.

T: Plant from *in vitro* thermotherapy.

[P4 . . . P32]: Plants from cuttings of plant T, 1st year of growth on bench, greenhouse.

P4, P8, P18, P22, P32: 2nd year of growth, plants removed from bench to containers and kept in these conditions during 6 years.

P4—4 . . . P4—32: 2nd year of growth, plants from P4, in containers.

P32—4 . . . P32—30: 2nd year of growth, plants from P32, in containers.

⇨ : 1st year of growth, ordered cutting, on bench.

⇒ : 2nd year of growth, remove from bench to container.

Leaves of the starting plants:

■ : Pubescent leaves at the basal part of the shoots.

□ : Hairless leaves with shallow sinuses, typical of the variety.

Leaves of the modified plants:

◄ : Pubescent leaves with deep sinuses.

◁ : Hairless leaves with deep sinuses.

◇ : Hairless leaves with shallow sinuses (upper sinus marked).

○ : Hairless round leaves (without sinuses).

Les comparaisons effectuées sur la variété Syrah Noir montrent bien que seule la culture *in vitro* est responsable des variations morphologiques observées, indépendamment des traitements thermiques. Ce résultat est en accord avec le fait que le passage à la chaleur de boutures traditionnelles ne semble pas induire de telles modifications (BOVEY *et al.* 1975, DOAZAN *et al.* 1979). Par contre ces derniers auteurs ont constaté que des boutures provenant de plantes cultivées en pot, traitées à la chaleur, puis mises en culture *in vitro* à 20 °C uniquement pendant une période de 2 mois, donnent des individus aux rameaux plus pigmentés portant des feuilles plus découpées. Ces modifications persistent après un bouturage classique. Ces résultats corroborent nos observations.

Cette morphologie nouvelle des plants issus de culture *in vitro* et que nous avons appelée modifiée, apparaît, au moins en partie, comme la conséquence de processus de rajeunissement. On sait, en effet, que dans ces conditions écologiques particulières, on obtient au cours des multiplications successives un rajeunissement des boutures miniaturisées. Ce phénomène s'accompagne de la diminution de la taille du méristème laquelle pourrait constituer un des éléments de ce retour à un fonctionnement de type juvénile (NOZERAN et BANCILHON 1972, NOZERAN *et al.* 1982, 1983).

Chez *Vitis vinifera* les individus ainsi multipliés conservent lorsqu'ils sont transplantés au vignoble, certains traits juvéniles (pigmentation, découpe, pubescence) qui rappellent ceux des plants de semis et de leur descendance par voie végétative (GREANAN et TRUDEL 1983).

Dans les conditions agronomiques de culture de la vigne (en particulier système de taille à 2 yeux dans le vignoble méridional) les formes nouvelles apparues sont stables dans le temps. Pour la variété Grenache Noir l'étude de la descendance par bouturage des plants modifiés, que nous pouvons qualifier de r a j e u n i s, a permis de montrer que ces modifications ne sont pas définitivement fixées.

L'apparition de caractéristiques foliaires conformes au type variétal révèle l'existence d'une progression morphogénétique le long du sarment allant d'un fonctionnement de type juvénile à la base (forme découpée et pubescente) à un fonctionnement de type adulte au sommet (forme entière et glabre). La présence de formes intermédiaires implique l'intervention de phénomènes quantitatifs dans le déterminisme de ce polymorphisme.

Dans les conditions agronomiques, ce gradient morphogénétique se maintient au cours des années pour un individu donné et au cours des générations par multiplication végétative. L'intensité de ce gradient varie en fonction du génotype et aussi selon le caractère étudié. Ainsi la pubescence disparaît plus rapidement que la découpe des feuilles.

Enfin ce gradient est soumis à deux facteurs externes, l'un climatique, l'autre lié aux pratiques culturales, tous deux concourant à l'élimination de l'extrémité des sarments. On sait, en effet, que l'absence de lignification d'une portion apicale (variable selon le cépage) du rameau conduit à sa mort puis à sa chute. En outre, la taille pratiquée chaque année ne laisse subsister que la partie basale du sarment et ne conserve donc que les bourgeons qui n'ont parcouru que le début du gradient morphogénétique. Il en résulte une perpétuation artificielle des caractères juvéniles au fil des années.

La vigne étant une liane, on peut considérer que les systèmes de taille sévère généralement pratiqués sont responsables du maintien des formes de jeunesse des individus, issus de multiplication *in vitro*. Mais nos expériences nous autorisent désormais à utiliser cette technique pour la production de matériel sain et conforme au type variétal. Il suffit à partir des boutures cultivées *in vitro*, de créer les conditions de croissance qui permettent le franchissement des étapes morphogénétiques conduisant à un état adulte. Pour cela, il est nécessaire de s'affranchir des contraintes écologiques et agronomiques qui entraînent une perte de l'extrémité des sarments. C'est ainsi que la mise

en culture hydroponique sur sol artificiel du matériel sain issu de tube permet la constitution de plants vigoureux à croissance en liane sur lesquels il est alors possible de prélever des bourgeons, suffisamment éloignés de la base, qui donneront naissance à des individus ayant acquis un fonctionnement de type adulte.

Conclusion

L'analyse discriminante réalisée sur les plants témoins et les plants modifiés, a permis de préciser les observations faites antérieurement sur ce polymorphisme foliaire lié à l'origine du matériel végétal.

Nos investigations apportent des éléments de compréhension du déterminisme de ces phénomènes. La culture *in vitro* conduit à des processus de rajeunissement. Les nouvelles caractéristiques ainsi obtenues sont soumises à des facteurs internes et externes (écologiques et agronomiques), ces derniers étant responsables du maintien d'un mode de fonctionnement de type juvénile. En s'affranchissant de ces contraintes il est possible de produire des individus, issus de ces techniques de multiplication, et conservant leur authenticité variétale.

Notre étude apporte, outre les aspects fondamentaux concernant la conduite d'un végétal ligneux après culture *in vitro*, une ouverture sur des perspectives agronomiques en rendant possible l'utilisation de ce mode de culture, en particulier pour résoudre des problèmes phytopathologiques.

Résumé

Pour l'espèce *Vitis vinifera* L. les variétés assainies par thérapie *in vitro*, replacées dans les conditions de culture au vignoble présentent une morphogénèse inattendue.

L'analyse discriminante portant sur des paramètres foliaires permet de différencier les plants témoins des plants issus de culture *in vitro*. Cette analyse montre également d'une part, que la température de traitement n'est pas responsable des modifications morphologiques; d'autre part, que ces caractéristiques nouvelles sont stables dans les conditions traditionnelles de culture au vignoble.

L'étude de la descendance végétative des plants modifiés révèle l'existence d'un gradient morphogénétique le long des sarments. La persistance des formes nouvelles n'est pas irréversible. La pratique de la taille est responsable du maintien artificiel d'un fonctionnement de type juvénile consécutif à la culture *in vitro*.

Références bibliographiques

- BOVEY, R., ROCHAIX, M., et SIMON, J. L., 1975: Résultats et perspectives d'avenir de la sélection sanitaire de la vigne. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hort. 7, 161—166.
- CARBONNEAU, A., 1976: Principes et méthodes de mesure de la surface foliaire. Essai de caractérisation des types de feuilles dans le genre *Vitis*. Ann. Amélior. Plantes 26, 327—343.
- DOAZAN, J. P., HEVIN, M., et OTTENWALTER, M. M., 1979: Remarques sur la thérapie de plants de vigne cultivés en pots. Progr. Agric. Vitic. 7, 146—147.
- GALET, P., 1971: Précis d'ampélographie. Ed. Dehan, Montpellier.
- GRENNAN, S., 1979: Possibilités d'éliminer des modifications foliaires, apparues sur la variété Grenache N. après un passage prolongé en culture *in vitro*. Progr. Agric. Vitic. 7. 152—157.

- —, 1982: Quelques réflexions à propos de modifications morphogénétiques consécutives à la culture *in vitro* chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). Ann. Sci. Nat. Bot. 4, 135—146.
- — et CARAUX, G., 1984: Influence de la thermothérapie sur le polymorphisme foliaire de variétés de *Vitis vinifera* L. Soc. Bot. Fr. (à paraître).
- — et TRUDEL, P., 1983: Réflexions sur un aspect de la variabilité au cours de la multiplication de variétés de vignes issues de semis. Agronomie 3, 675—680.
- HEGEDUS, A., 1975: Classification des cépages d'après la villosité. (Ho.) Szölesz. Boras. Kut. Intez. Evkon 1, 81—96.
- MOUTON, J. A., 1970: Architecture de la nervation foliaire. C.R. 92^e Congr. Natl. Soc. Savantes (Strasbourg, Colmar, 1967) Sect. Sci. 3, 165—176.
- MUR, G., VALAT, C. et BRANAS, J., 1972: Effets de la thermothérapie. Progr. Agric. Vitic. 1, 4—7.
- NOZERAN, R. et BANCILHON, L., 1972: Les cultures *in vitro* en tant que techniques pour l'approche de problèmes posés pour l'amélioration des plantes. Ann. Amélior. Plantes, 22, 167—185.
- —, DUCREUX, G., et ROSSIGNOL, L., 1982: Réflexions sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux. Bull. Soc. Bot. Fr. 129, Lettres Botaniques (2), 107—130.
- —, GREANAN, S., TRUDEL, P., et FAVRE, J. M., 1983: Morphogenèse à partir d'un stade juvénile, de plants issus de graine et de culture *in vitro*, de *Vitis vinifera* L. Agronomie, 3, 681—684.
- ROMEDER, J. M., 1973: Méthodes et programmes d'analyse discriminante. Ed. Dunod, Paris.

Eingegangen am 22. 12. 1983

S. GREANAN
A.N.T.A.V.
Domaine de l'Espiguette
30240 — Le Grau du Roi
France