

## Etude histogénétique du greffage herbacé de combinaisons compatibles du genre *Vitis*

par

A. DELOIRE

### A histogenetic study of green-grafting between two compatible cultivars of *Vitis*

**S u m m a r y .** — Green-grafting was performed between *Vitis berlandieri* × *V. rupestris* 99 Richter (stock) and *V. vinifera* Carignan (scion). Various tissues from both partners contribute to the formation of the callus. During the development of the union, newly formed tissues originate preferentially from the cortical parenchyma cells and from the cambial initials (including those of the interfascicular rays). The relative importance of the different tissues in the development of the union varies according to the orientation of the cuts. The union between the two partners occurs preferentially at the level of the neoformed tissues and is accomplished through wall alterations and reorganization. A cambium differentiates within callus tissues, which connects the cambia of stock and scion. Newly formed xylem and phloem ensure efficient transport of water, inorganic and organic nutrients.

### Introduction

Le greffage de la vigne est une technique largement utilisée de nos jours. Ses modalités pratiques ont fait l'objet de nombreux travaux (cf. FOEX 1899, GALET 1973, BRANAS 1974, . . .). Par ailleurs, certains auteurs ont entrepris des recherches concernant divers aspects plus spécifiques, tels l'influence mutuelle exercée par les deux partenaires (CONSTANTINESCU 1963, KOZMA 1963, LEFORT et LEGLISE 1977), ou les problèmes d'incompatibilité (HIDALGO et CANDELA 1974, BOUQUET 1980).

Toutefois les études réalisées sur l'anatomie et la morphogénèse du greffage de la vigne sont peu nombreuses et pour la plupart anciennes (TOMPA 1900, ISTVANFFI 1906, BRANAS *et al.* 1939). L'origine des tissus néoformés, de même que les mécanismes responsables de la soudure entre le porte-greffe et le greffon, sont des processus non encore totalement élucidés. Pour ces raisons, nous avons entrepris une étude histologique de la zone de jonction du greffage herbacé de deux cultivars compatibles du genre *Vitis*.

Le greffage en vert, surtout usité en Europe centrale (CSIZMAZIA 1971), a été choisi en raison de son adaptation au type de problèmes étudiés: commode à réaliser de façon reproductible et sans équipement spécialisé, il porte sur des axes encore peu lignifiés, et de ce fait plus favorables aux études histologiques.

### Matériel et méthodes

Les cultivars utilisés sont: comme greffon, le *Vitis vinifera* L. Carignan, comme porte-greffe, *V. berlandieri* × *V. rupestris* 99 Richter. 70 greffes en fente simple ont

été pratiquées en plein champ, à l'E.N.S.A. de Montpellier, en juillet 1980. Les prélèvements ont été effectués toutes les 48 h pendant 10 d à compter du début de l'expérimentation et, par la suite, à des intervalles plus longs, de 5 ou 10 d.

Les échantillons ont été fixés sur place au FAA (Sass 1958).

**Microscopie optique.** — Des fragments de 2—3 mm ont été prélevés à différents niveaux de la zone de greffage. Des coupes ont été réalisées après inclusion dans une résine polyester selon un procédé décrit dans une autre publication (HEBANT *et al.*, soumis pour publication). Les sections ainsi obtenues ont été colorées au paragon.

**Microscopie électronique à balayage.** — Des coupes à main levée dans le matériel préalablement fixé au F.A.A. ont été traitées 3 min par l'eau de javel diluée à 50 %. Les échantillons ont ensuite été déshydratés progressivement par l'alcool, puis traités par la méthode du point critique (cf. ROBARDS 1978). Après métallisation à l'or-palladium, ils ont été observés dans un microscope Jeol JSM 35.

Figs. 1—4: Greffes de Carignan sur 99 Richter âgées de 14 d. Coupes transversales au niveau de la zone de jonction.

Fig. 1: Le porte-greffe a mis en place un cal relativement important. Le greffon présente une activité mitotique encore faible ( $\times 50$ ).

Fig. 2: Les tissus néoformés assurent un contact étroit entre les deux partenaires. Des débris cellulaires dégénérés persistent au niveau de l'interface ( $\times 130$ ).

Figs. 3 et 4: Activité mitotique et développement des cals ( $\times 130$ ). Le greffon (Fig. 3) et le porte-greffe (Fig. 4) mettent en place un cal issu de la prolifération cellulaire des rayons interfasciculaires, du parenchyme cortical, des dérivés récents du cambium et des initiales cambiales elles-mêmes. Les parenchymes xylémiens et phloémiens se divisent également. Fig. 3, les cellules du cal situées directement en contact avec le milieu extérieur protudent (flèches).

Fig. 5: Fragment de pampre (cultivar Carignan) après 25 d de culture *in vitro*. Des cals sphériques se sont développés au niveau de la zone cambiale (microscopie électronique à balayage,  $\times 20$ ).

Abbréviations: C = cambium préexistant, CN = cambium néoformé, Co = collenchyme, DC = débris cellulaires, Fp = fibres periphloémiennes, G = greffon, M = moelle, PC = parenchyme cortical, PG = porte-greffe, Ph = phloème, Ph1 = phloème primaire, Ph2 = phloème secondaire, Th = thyloses, TN = tissus néoformés, X = xylème, RI = rayons interfasciculaires.

Figs. 1—4: Grafts of Carignan on 99 Richter, 14 d old. Transverse sections of the union zone.

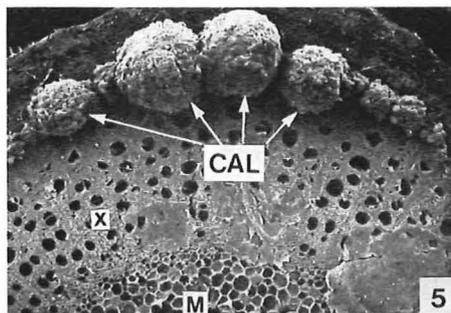
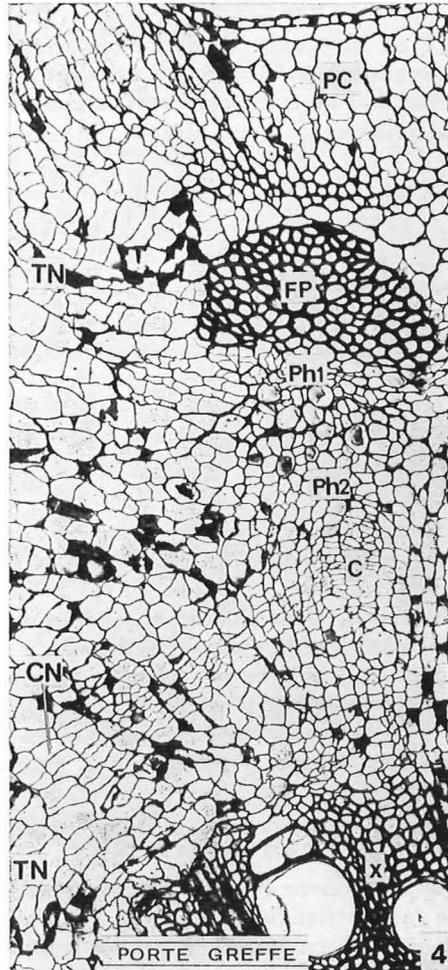
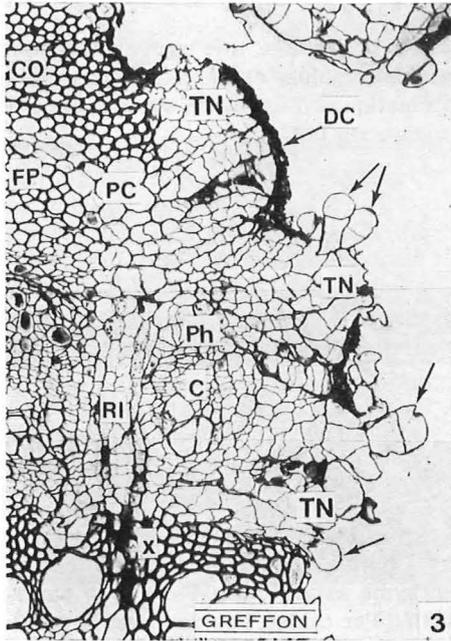
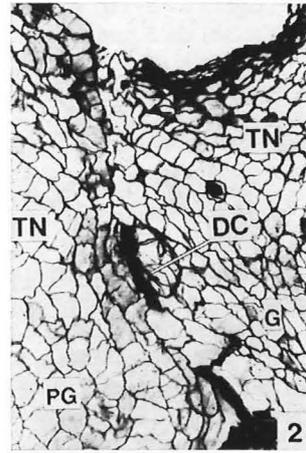
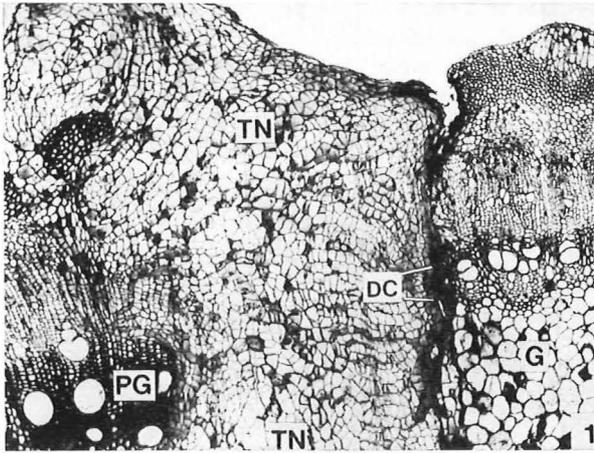
Fig. 1: A large callus has originated from the stock. Only a few cell divisions have occurred in the scion ( $\times 50$ ).

Fig. 2: Detail of graft line. Some necrotic cellular remnants remain between both partners ( $\times 130$ ).

Figs. 3 and 4: Cell divisions and formation of the callus ( $\times 130$ ). Callus originates from interfascicular rays, cortical parenchyma and from cambial zone. Mitoses also occur in xylem and phloem parenchyma. In Fig. 3, certain cells located at periphery of the callus protrude in the cavity between stock and scion (arrows).

Fig. 5: Stem fragment after 25 d of *in vitro* cultivation. Spherical calluses have developed from cambial zone (scanning electron micrograph,  $\times 20$ ).

Abbreviations: C = preexisting cambium, CN = newly formed cambium, CO = collenchyma, DC = necrotic cellular remnants, FP = perivascular fibers, G = scion, M = medulla, PC = cortical parenchyma, PG = stock, Ph = phloem, Ph1 = primary phloem, Ph2 = secondary phloem, TH = tylose, TN = newly formed callus, X = xylem, RI = interfascicular rays.



**Culture in vitro.** — Des fragments de pampres (cultivars 99 Richter et Carignan) de 5 mm d'épaisseur ont été mis en culture semi-stérile sous un éclairage continu de 1500 lx et une température de 25 °C. Les fragments ont été prélevés à des intervalles de 3, 5 ou 10 d et traités par la méthode du point critique en vue de leur observation au microscope électronique à balayage.

### Résultats

La condition essentielle de réussite d'une greffe est la réalisation d'une soudure anatomique entre les deux partenaires. Immédiatement après le greffage, une séquence de phénomènes se produit, parmi lesquels on relève: de dégénérescence des débris cellulaires au niveau de la zone traumatisée, l'initiation et le développement du cal, l'intervention de remaniements pariétaux au niveau de l'interface et la différenciation vasculaire.

#### Dégénérescence des débris cellulaires

Au niveau de la zone de contact, peu après le greffage, une couche de cellules nécrotiques est identifiable. Les contenus protoplasmiques et les parois des cellules tuées lors de la coupure sont fortement chromatiques (Fig. 1). Un stade avancé de dégénérescence de ces débris cellulaires est visible sur la Fig. 2.

#### Développement du cal

Les premiers recloisonnements sont identifiables 1 d après le greffage chez le porte-greffe; ils sont en général légèrement plus tardifs chez le greffon. De fait, le porte-greffe présente souvent une activité mitotique plus importante que ce dernier durant les premiers jours qui suivent le greffage. Il en résulte que chez de nombreux échantillons âgés d'environ 10 d, le cal assurant la jonction entre les deux partenaires est issu essentiellement du porte-greffe (Fig. 1).

Par la suite et durant une période de 20—25 d, l'activité mitotique des deux partenaires devient à peu près équivalente. Le cal mis en place durant cette période a tendance à remplir l'espace libre disponible entre le porte-greffe et le greffon (Fig. 6).

**Origine du cal.** — En général, les rayons interfasciculaires, le parenchyme cortical, les dérivés récents du cambium et les cellules cambiales elles-mêmes prolifèrent et sont à l'origine du cal. Le parenchyme associé au xylème et le parenchyme associé au phloème sont également actifs. Par contre, l'épiderme et la moelle ne se divisent qu'occasionnellement. Enfin, les cellules lignifiées (le parenchyme xylémien âgé, la moelle sclérifiée), les fibres périphloëmiennes et le collenchyme ne prolifèrent jamais (Figs. 3 et 4).

L'importance relative prise par ces différents tissus dans le processus de régénération dépend largement de la nature des entailles pratiquées au moment du greffage.

#### Remaniements pariétaux

La soudure entre les deux partenaires découle de remaniements pariétaux et se fait préférentiellement par l'intermédiaire des tissus néoformés. Des îlots de débris cellulaires restent parfois emprisonnés au niveau de l'interface (Fig. 2). A

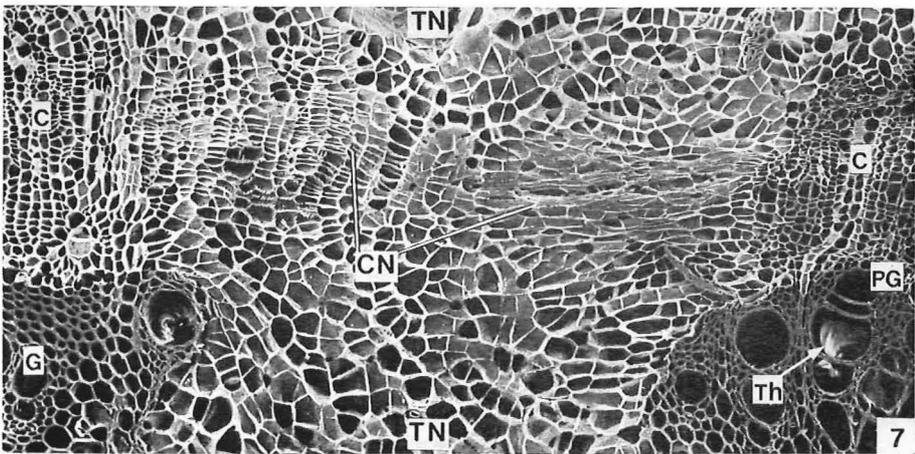
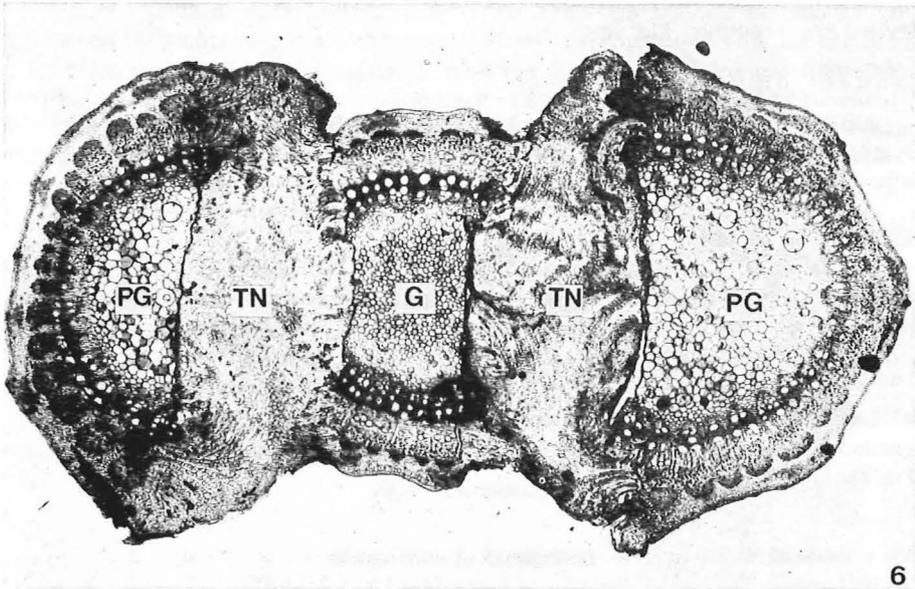


Fig. 6: Greffe de 25 d. Un cal important a été mis en place, qui assure une jonction étroite entre les deux partenaires ( $\times 16$ ).

Fig. 7: Greffe de 20 d. Un cambium s'est différencié dans le cal. Il assure la jonction entre le cambium du porte-greffe et celui du greffon (microscopie électronique à balayage,  $\times 115$ ).

Abréviations voir Figs. 1—5.

Fig. 6: 25 d old graft. The union between the two partners is ensured by a well developed callus ( $\times 16$ ).

Fig. 7: 20 d old graft. A graft bridging cambium has differentiated within the callus (scanning electron micrograph,  $\times 115$ ).

For abbreviations see Figs. 1—5.

un stade avancé de développement, la limite entre le porte-greffe et le greffon devient imperceptible (Fig. 6).

#### Connexion vasculaire

Au début du développement de la greffe, les relations entre le porte-greffe et le greffon se font uniquement par l'intermédiaire des cellules en contact. Par la suite une connexion vasculaire s'établit entre les deux partenaires.

A l'intérieur du cal un cambium se différencie, qui assure la jonction avec les cambiums du porte-greffe et du greffon (Figs. 4 et 7).

Par la suite, des tissus conducteurs, xylème et phloème, se différencient, qui permettent des échanges plus importants d'eau, d'éléments minéraux et de métabolites.

#### Culture in vitro

Les fragments de tige mis en culture in vitro montrent, après 15—25 d, la prolifération de cals sphériques et de tailles variables au niveau de la zone cambiale (Fig. 5).

#### Discussion et conclusion

Chez *Vitis* — cultivar Carignan greffé sur 99 Richter — différents tissus peuvent contribuer à la formation du cal. En général, les rayons interfasciculaires, le parenchyme cortical, les dérivés récents du cambium et les cellules cambiales elles-mêmes prolifèrent et sont à l'origine des tissus néoformés. Les parenchyms associés au xylème et au phloème participent également à l'élaboration du cal. L'importance relative de ces tissus dans le processus de régénération dépend largement de la nature des entailles pratiquées au moment du greffage. Ces résultats diffèrent donc sensiblement de ceux obtenus par certains auteurs qui attribuent un rôle exclusif au cambium (BRANAS *et al.* 1939, FALLOT 1970).

Dans le cas de fragments de pampres cultivés in vitro, seule une prolifération de la zone cambiale est observée. Mais ces fragments ne sont pas soumis aux conditions réelles du greffage. Ce dernier engendre, entre les deux partenaires, des interactions complexes et non encore totalement élucidées (SCHEIDECKER 1961, KOZMA 1963, CHAMPAGNAT 1980): ceci expliquerait les différences de comportement observées entre les fragments isolés et la greffe elle-même.

La soudure entre greffon et porte-greffe s'effectue essentiellement grâce à l'intervention de remaniements pariétaux dans la zone d'affrontement entre tissus néoformés. Ces observations rejoignent celles d'auteurs comme TOMPA (1900) ou BRANAS *et al.* (1939).

Une dernière remarque concerne le porte-greffe: son aptitude à se diviser de façon plus active au début du greffage est vraisemblablement due à ses importantes réserves métaboliques.

#### Résumé

Des greffes herbacées de deux cultivars compatibles du genre *Vitis* (Carignan et 99 Richter) ont permis de réaliser une étude histologique détaillée de la zone de greffage.

Différents tissus peuvent contribuer à la formation du cal. En général, les rayons interfasciculaires, le parenchyme cortical, les dérivés récents du cambium et les cellules cambiales elles-mêmes prolifèrent et sont à l'origine des tissus néoformés. Les parenchymes associés au xylème et au phloème participent également à l'élaboration du cal. Toutefois, l'importance relative de ces différents tissus dans le processus de régénération dépend largement de la nature des entailles pratiquées au moment du greffage.

L'existence de la soudure greffon/porte-greffe résulte de remaniements pariétaux et se fait préférentiellement par l'intermédiaire des tissus néoformés.

A l'intérieur du cal un cambium se différencie, qui assure la jonction des cambiums du porte-greffe et du greffon. Le développement d'éléments conducteurs spécialisés (vaisseaux et tubes criblés) permet d'établir des échanges plus importants d'eau, d'éléments minéraux et de métabolites.

### Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur C. BERNARD, Dr ès Sciences, à qui je dois de m'être orienté vers les Vitacées et qui m'a généreusement facilité l'accès aux collections expérimentales de la chaire de Viticulture (E.N.S.A. Montpellier). Je remercie également Monsieur le Professeur C. HÉBANT pour son aide lors de la préparation de ce travail et Monsieur A. BONNET (A.N.T.A.V.) qui m'a enseigné les techniques de greffage.

Gil COURBET pour la mise en planches trouvera ici l'expression de ma reconnaissance sincère.

### Bibliographie

- BOUQUET, A., 1980: Differences observed in the graft compatibility between some cultivars of Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* MICHX.) and European grape (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). *Vitis* 19, 99—104.
- BRANAS, J., 1974: Viticulture. Imprimerie Dehan, Montpellier.
- — —, BERNON, G. et LEVADOUX, L., 1939: Les portes-greffes en viticulture. *Ann. Epiphytie* 5, 461—535.
- CHAMPAGNAT, A., 1980: La greffe végétale. In: CHAUSSAT, R. et BIGOT, C. (Ed.): La multiplication végétative des plantes supérieures, 99—114. Gauthier-Villars, Paris.
- CONSTANTINESCU, G., 1963: Aspect scientifique des rapports mutuels entre porte-greffes et greffons. *Bull. OIV* 36, 1143—1163.
- CSIZMAZIA, J., 1971: Greffage en vert. *Bull. OIV* 44, 893—902.
- FALLOT, J., 1970: Callogenèse, soudure, culture des tissus. *Bull. OIV* 43, 908—918.
- FOEX, G., 1899: Manuel pratique de viticulture pour la reconstitution des vignobles méridionaux. Masson et Cie, Paris.
- GALET, P., 1973: Précis de viticulture. Imprimerie Dehan, Montpellier.
- HIDALGO, L. et CANDELA, M. R., 1974: Affinité du greffon et du sujet. *Bull. OIV* 47, 379—391.
- ISTVANFFI, G., 1906: Recherches anatomiques sur la soudure de la greffe herbacée de la vigne. *C. R. Acad. Sc. Hongroise, Budapest* (cité par BRANAS *et al.* 1939).
- KOZMA, P., 1963: Aspect scientifique des rapports mutuels entre sujet et greffon. *Bull. OIV* 36, 1406—1425.
- LEFORT, P. L. and LEGLISE, N., 1977: Quantitative stock-scion relationships in vine. Preliminary investigations by the analysis of reciprocal graftings. *Vitis* 16, 149—161.
- ROBARDS, A. W., 1978: An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. (Ed.): *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*, 343—414. Elsevier, Amsterdam.
- SASS, J. E., 1958: *Botanical microtechnique*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

SCHEIDECKER, D., 1961: La greffe, ses conditions anatomiques, ses conséquences physiologiques et ses résultats génétiques éventuels. *Ann. Biol.* 37, 109—172.

TOMPA, A., 1900: Soudure de la greffe herbacée de la vigne. *Ann. Inst. Cent. Amp. R. Hongr.* 1, 5—43.

*Eingegangen am 11. 3. 1981*

A. DELOIRE  
Laboratoire de Biologie végétale  
Université des Sciences et  
Techniques du Languedoc  
Place E. Bataillon  
34060 Montpellier Cedex  
France