Vitis 8, 191—205 (1969)

Centre de Recherches Agronomiques du Midi, Montpellier, France

Remarques sur la croissance de Vitis rupestris cultivée in vitro sur différents milieux nutritifs

par

R. Galzy

Il est possible de cultiver la vigne en condition stérile sur un milieu nutritif synthétique. Les clones peuvent être conservés *in vitro* pendant de nombreuses années grâce à des bouturages successifs. Dès 1960, un milieu nutritif était mis au point et permettait de cultiver de façon prolongée, non seulement *Vitis rupestris*, mais également, par la suite, *Vitis riparia*, des hybrides interspécifiques et de nombreuses variétés de *Vitis vinifera* (Galzy et Compan, 1968). Cette technique a fait l'objet de plusieurs applications. Elle a notamment permis d'étudier la croissance, à différentes températures, de *Vitis rupestris* sain et atteint de court-noué. Ce travail a conduit à la mise au point, d'une part, d'une méthode de thermothérapie des variétés de vigne court-nouées, d'autre part, d'une technique de conservation prolongée, sans croissance, à basse température, valable pour les plantes cultivées *in vitro*.

Il était néanmoins nécessaire de préciser certains aspects de la nutrition des boutures de vigne ainsi maintenues en culture sur milieu synthétique. Ce travail a porté sur *Vitis rupestris* var. du Lot. Nous avons tenu à distinguer, dans la mesure du possible, les besoins nutritifs correspondant à chaque stade du développement des boutures: émission des racines, croissance des racines et croissance des tiges. La plus grande difficulté de la multiplication de la vigne en culture stérile consiste à obtenir l'enracinement des boutures dans tous les cas. Certaines variétés (Aramon, Cinsaut, divers Muscats, etc.) ainsi que les clones atteints d'une forme grave de court-noué, présentent en effet une mauvaise rhizogénèse. Pour cette raison, l'étude du milieu nutritif a porté essentiellement sur les facteurs susceptibles d'exercer une action favorable sur la différenciation ou la croissance des racines (certains éléments minéraux et des vitamines). Ce travail avait également pour but de préparer une recherche ultérieure sur la culture des méristèmes de vigne, technique pour laquelle l'enracinement est aussi un facteur essentiel de réussite. Enfin, il était intéressant de préciser dans quelle mesure les boutures de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* se comportent comme des plantes autotrophes.

Matériel et Méthode

A. Technique de culture

Les bourgeons de vigne prélevés sur la souche sont stérilisés superficiellement et mis en culture selon une technique classique. Cultivés sur milieu gélosé dans des tubes à essai de dimension 25 × 250 mm, ils se développent en donnant une plante qui peut être à son tour multipliée par bouturage *in vitro*. Il suffit pour cela de prélever des boutures comportant une feuille étalée et de les cultiver stérilement dans un nouveau tube de milieu. Ces cultures sont conservées en conditions contrôlées soit à 20° C, soit à 35° C. Elles reçoivent dans les deux cas un éclairage d'environ 2500 lux pendant douze heures par jour. Cette technique de culture et les installations nécessaires à sa mise en oeuvre ont été décrites précédemment de façon détaillée (Galzy, 1964; Galzy et Nigond, 1968).

B. Milieux nutritifs

Le milieu de référence utilisé pour ces cultures contenait en plus des solutions minérales de KNOP et de BERTHELOT, du saccharose à la dose de 15 g/litre et six vitamines du groupe B, aux doses suivantes: (rapport poids/volume) Thiamine: 10^{-6}, Pyridoxine: 10^{-6}, Panthoténate: 10^{-6}, Acide nicotinique: 10^{-6}, Inositol: 10^{-5}, Biotine: 10^{-8}.

Quelques expériences ont porté sur des milieux plus simples où le saccharose ou les vitamines avaient été supprimés.

D'autres modifications ont porté sur la composition de la solution minérale. On a comparé à cet égard la solution de KNOP et la solution de KNOP modifiée par MOREL (MOREL et MULLER, 1964). Cette deuxième solution, plus riche en potassium et en ammonium, sera désignée par $K.NH_4$.

Solution de KNOP (diluée de moité):

$(NO_3)_2Ca, 4\ H_2O$	500 mg/litre
NO_3K	125 mg/litre
$SO_4Mg, 7\ H_2O$	125 mg/litre
PO_4H_2K	125 mg/litre

Solution de KNOP modifiée ($K.NH_4$):

$(NO_3)_2Ca, 4\ H_2O$	500 mg/litre
$SO_4Mg, 7\ H_2O$	125 mg/litre
PO_4H_2K	125 mg/litre
$SO_4(NH_4)_2$	1000 mg/litre
ClK	1000 mg/litre

La solution $K.NH_4$ a elle même été modifiée en faisant varier les quantités de sulfate d'ammonium, et de chlorure de potassium. Ces deux sels étaient alors utilisés aux doses suivantes: 500, 250, 125 ou 62 mg/litre. Ces solutions seront désignées par $K.NH_4$ ½, ¼, ⅛ et 1/16.

C. Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé provenait de deux clones de *Vitis rupestris:* le clone I.S.58 considéré comme sain et le clone I Condamine, gravement court-noué. Ces clones mis en culture *in vitro* en 1959 ont été soit cultivés à 20° C de façon constante, soit traités à 35° C pendant 10 ou 100 jours avant d'être ramenés à 20° C. On doit donc distinguer actuellement deux clones provenant de I.S.58 (S.20 et S. 35 — 100 jours) et trois clones provenant de I Condamine (M.20; M.35 — 10 jours et M.35 — 100 jours). M.20 et M.35 — 10 présentent de graves symptomes de court-noué. M.35 — 100 jours au contraire se comporte comme un clone sain, guéri par thermothérapie. Ces clones ont été remis en culture en pots en 1961 et conservés en serre par la suite. C'est à partir de ces plantes cultivées en serre qu'ont été obtenues les cultures *in vitro* servant aux expériences décrites ici. Ces boutures étaient maintenues en pré-culture sur un milieu complet contenant les solutions de KNOP et de BERTHELOT, le saccharose et les six vitamines.

D. Méthode d'étude de la croissance des boutures *in vitro*

Des lots de 30 à 50 boutures à une feuille étaient mis en culture sur un même milieu nutritif. Chaque jour, la longueur de la racine était notée. Ces mesures se poursuivaient jusqu'au 30ème jour et parfois jusqu'au 70ème. La longueur des tiges était notée une fois par semaine jusqu'au 100ème jour au moins. On a parfois noté également le nombre total de racines apparues sur chaque bouture. Pour la présen-

tation des résultats on a retenu quatre critères qui permettent de rendre compte du développement d'un lot de boutures:

a. Le pourcentage final de boutures enracinées, c'est-à-dire le pourcentage observé après 30 jours de culture.

b. La vitesse moyenne d'émission des racines établie de la façon suivante: pour chaque bouture le nombre de jours nécessaires à l'apparition de la première racine est noté. L'inverse de ce nombre mesure la vitesse d'émission de cette racine et on appelle vitesse moyenne d'émission des racines d'un lot de boutures, la moyenne des vitesses individuelles. Cette valeur est multipliée par 100 de façon à opérer sur des nombres plus simples.

c. La vitesse maximum de croissance des racines exprimée en mm par jour. La courbe de croissance moyenne d'un lot de boutures est établie et la pente est calculée pour la partie rectiligne de la courbe. Seules les plantes présentant une racine après 30 jours sont prises en considération pour ce calcul.

d. La vitesse maximum de croissance des tiges calculée de la même façon, pour les plantes enracinées.

Rôle du saccharose et des vitamines

Il a paru intéressant de savoir dans quelle mesure les plantes de *Vitis rupestris* sont autotrophes dans nos conditions de culture *in vitro*. Des expériences ont donc été réalisées à 20° et à 35° C dans le but de préciser les conséquences de la suppression des vitamines ou du saccharose dans le milieu nutritif.

A. Effet des vitamines en présence et en l'absence de saccharose

Les milieux nutritifs utilisés dans cette expérience comportaient, en plus des solutions minérales de KNOP et de BERTHELOT, les éléments suivants: Milieu 1: saccharose et 6 vitamines; milieu 2: saccharose, pas de vitamine; milieu 3: pas de saccharose, 6 vitamines; milieu 4: pas de saccharose, pas de vitamine.

Tableau 1

Développement à 20° C de boutures de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* sur des milieux contenant ou non du saccharose et des vitamines

Milieux nutritifs	Bouturage n°	Pourcentage de boutures enracinées	Vitesse moyenne d'émission des racines	Vitesse maximum de croissance des racines en mm/jour	Vitesse maximum de croissance des tiges en mm/jour
1: Saccharose et 6 vitamines	1	100	9,4	3,7	1,6
	2	94	9,6	2,9	1,7
	3	100	8,4	4,2	2,0
2: Saccharose, pas de vitamine	1	95	8,0	3,4	1,1
	2	97	9,9	3,6	1,5
	3	100	6,5	3,1	1,8
3: Pas de saccharose, 6 vitamines	1	92	9,3	3,0	0,6
	2	79	6,2	0,4	0,9
	3	95	6,6	0,8	0,6
4: Pas de saccharose, pas de vitamine	1	94	9,3	3,2	0,6
	2	78	6,5	0,5	0,8
	3	83	5,3	1,7	0,9

Des boutures du clone M.35-100 jours ont été mises en culture sur chacun de ces 4 milieux et s'y sont développées pendant cinq mois environ. Des boutures ont alors été prélevées sur ces premières plantes et mises en culture respectivement sur les mêmes milieux. Trois bouturages successifs ont ainsi été réalisés. Le tableau 1 résume les résultats de cette expérience.

1. Pourcentage de boutures enracinées

Ce pourcentage est le même sur les milieux 1 et 2 contenant du saccharose. La seule suppression des vitamines reste donc sans effet, même au 3ème bouturage. Par contre, la proportion de boutures enracinées est un peu plus faible sur les deux milieux sans sucre (3 et 4). Elle se maintient cependant entre 78 et 95% et ne paraît pas subir une baisse progressive au fur et à mesure des repiquages.

2. Vitesse moyenne d'émission des racines

Au premier bouturage, la vitesse d'émission des racines paraît être la même quel que soit le milieu de culture utilisé. On observe, au contraire, une diminution nette de cette vitesse, dès le 2ème bouturage sur les milieux sans sucre. Une réduction analogue de la vitesse se manifeste au 3ème bouturage sur le milieu 2 avec saccharose et sans vitamine.

3. Vitesse de croissance des racines

Les courbes de croissance obtenues au 1er bouturage sont présentées sur la figure 3. La croissance des racines semble d'abord presque identique sur les quatre milieux. Mais, dès le 25ème jour de culture, la croissance ralentit sur le milieu 2 contenant du sucre mais privé de vitamine. A partir du 35ème jour la croissance de toutes les racines est arrêtée. Le ralentissement de la croissance coïncide avec l'apparition de nécroses brunes à l'extrémité de certaines racines. Par la suite, ces nécroses augmentent en dimension et en nombre (figure 1). Cependant, après trois mois de culture sur le milieu 2, alors que la tige porte 7 ou 8 feuilles, de nouvelles racines apparaissent à la base de la racine principale et se développent normalement jusqu'à la fin de la culture. La croissance se poursuit au contraire sans interruption sur les milieux 1, 3 et 4. On note cependant une croissance un peu plus lente et un aspect moins ramifié des racines sur les deux milieux sans saccharose (figure 2). Il semblerait donc que l'absence simultanée du saccharose et des vitamines (milieu 4) soit moins défavorable à la croissance des racines que l'absence des seules vitamines (milieu 2). En effet, aucune nécrose n'est apparue sur le milieu 4. On peut se demander si la présence de saccharose, assurant un métabolisme plus actif, ne provoque pas la consommation plus rapide et plus complète des vitamines pré-existant dans la bouture au moment de la mise en culture.

Au second et au troisième bouturages la vitesse maximum de croissance des racines reste la même sur les milieux 1 et 2 contenant du saccharose (figure 3). Mais ,après 19 jours de culture, on observe à nouveau la nécrose des racines sur le milieu 2. Ce phénomène n'affecte pas, cette fois, la totalité des racines si bien que la vitesse de croissance moyenne du lot ne s'annule pas complètement. Elle devient néanmoins très faible (0,3 et 0,7 mm/jour). Sur les milieux 3 et 4, sans saccharose, la croissance des racines au deuxième et au troisième bouturages est, au contraire, très lente dès le début. Cette vitesse reste constante pendant une longue période et l'on n'observe pas de nécrose des racines.

En résumé, la présence de vitamines est indispensable à la croissance des boutures de *Vitis rupestris*, notamment lorsque le milieu nutritif contient du saccha-

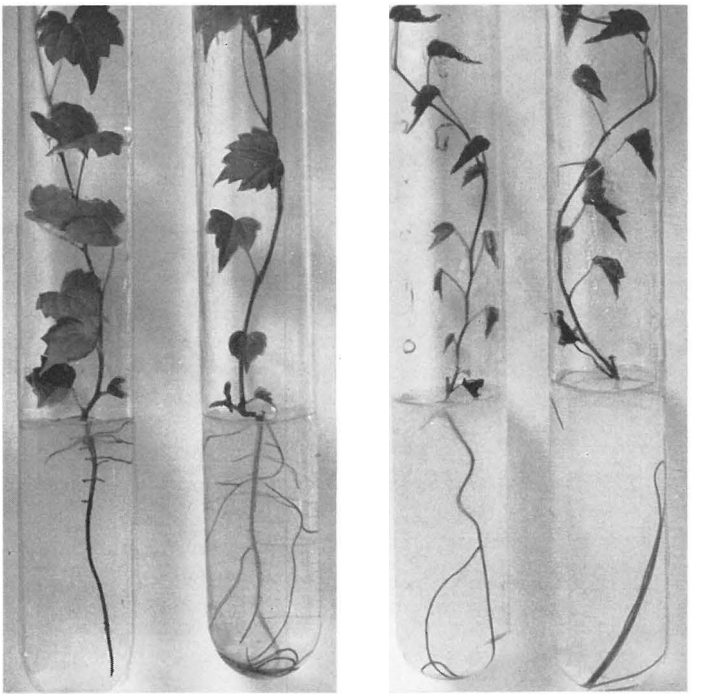

Fig. 1: Plantes de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* à 20° C depuis quatre mois sur des milieux nutritifs contenant des sels minéraux et du saccharose.
A droite, milieu 1, avec vitamines. A gauche, milieu 2, sans vitamine.

Fig. 2: Plantes de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* à 20° C depuis sept mois sur des milieux nutritifs contenant des sels minéraux mais privés de saccharose.
A droite, milieu 3, avec vitamines. A gauche, milieu 4, sans vitamine.

rose. On sait que, chez la plupart des espèces, les racines isolées cultivées *in vitro* se sont montrées hétérotrophes vis-à-vis de certaines vitamines: thiamine, pyridoxine et acide nicotinique. Les deux premières, au moins, sont synthétisées dans les feuilles et se comportent comme des «hormones» de croissance des racines (Bonner et Galston, 1952). Il est probable que, dans nos conditions de culture, la feuille unique portée initialement par la bouture, ne peut assurer qu'un début de croissance des racines. Cette croissance reprendrait par la suite, lorsque la surface foliaire serait suffisante (stade 5 à 8 feuilles environ).

4. Vitesse de croissance des tiges

La croissance des tiges est bonne sur les deux milieux contenant du sucre. Elle est cependant un peu plus faible sur le milieu sans vitamine que sur le milieu complet. On remarque que la vitesse de croissance, sur le milieu sans vitamine, reste la même au cours des repiquages successifs.

La croissance est au contraire très lente sur les milieux sans sucre et cela dès le premier repiquage. Dans ce cas, l'absence de vitamine ne modifie pas la vitesse de croissance des tiges. Les plantes ont un aspect étiolé, des feuilles petites, chlorotiques et enroulées vers leur face supérieure (figure 2). Au deuxième et troisième bouturages une partie des plantes mises en culture sur ces milieux sont mortes après un début de croissance. Les autres ont poursuivi leur croissance et ont atteint

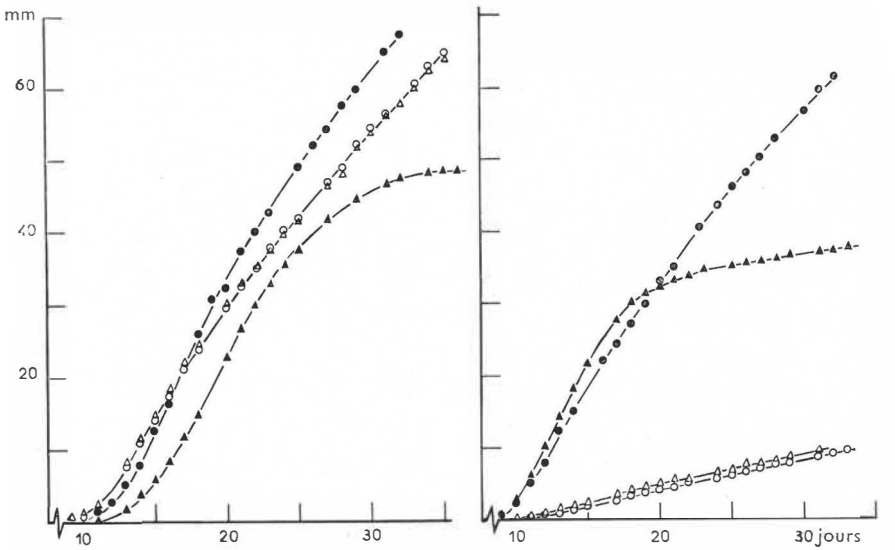

Fig. 3: Courbes de croissance des racines obtenues à 20° C lors du premier et du deuxième bouturage de *Vitis rupestris* sur les quatre milieux suivants:
● Avec sucre et vitamines (1). ▲ Avec sucre, sans vitamine (2). ○ Sans sucre, avec vitamines (3). △ Sans sucre, sans vitamine (4). — A gauche: 1er bouturage, à droite: 2eme bouturage.

environ 150 mm après 140 jours de culture. Elles ont alors paru se rétablir. Ceci explique que les résultats n'aient pas été de plus en plus mauvais au fur et à mesure des bouturages sur les milieux sans sucre.

Il est vraisemblable que les conditions de culture utilisées ne permettent pas une photosynthèse suffisante. Les facteurs limitants pourraient être l'intensité lumineuse ou le renouvellement de l'atmosphère du tube de culture (CO_2). Il n'est cependant pas possible d'augmenter beaucoup l'éclairage en début de culture. Les jeunes boutures placées à la lumière solaire, présentent, en effet, une croissance défectueuse accompagnée de l'épaississement et du rougissement des feuilles (chez les variétés à baies rouges), ce qui semble témoigner d'une accumulation des produits de la photosynthèse. On pourrait envisager une augmentation de l'éclairage après un début de croissance des racines. L'étude expérimentale du rôle de la lumière, qui pourrait être réalisée dans ce domaine, contribuerait vraisemblablement à préciser l'influence des jeunes feuilles dans la morphogénèse de l'individu.

B. Comparaison des besoins en vitamines à 20° et à 35° C

Les expériences rapportées au paragraphe précédent montrent que les vitamines pourraient être supprimées du milieu de culture sans que la croissance des boutures à 20° C soit très gravement compromise, du moins pendant trois bouturages successifs correspondant à une année de culture *in vitro*. Cependant, les nécessités de l'expérimentation, notamment la mise au point d'une technique de thermothérapie, obligeant à effectuer des cultures à différentes températures, il était nécessaire de déterminer les besoins en vitamines aux températures élevées. Une expérience a donc été conduite parallèlement à 20° et à 35° C sur deux milieux contenant les éléments minéraux habituels et le saccharose avec ou sans vitamine (milieu 1 et 2 de l'expérience précédente). Un seul bouturage a été réalisé. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau 2. Elle portait sur le clone S.20.

1. Emission des racines

Le pourcentage des boutures enracinées et la vitesse moyenne d'émission des racines ne sont pas modifiés par l'absence de vitamine, que la culture soit faite à 20° ou à 35° C.

2. Vitesse de croissance des racines

A 20° C on retrouve les résultats exposés au paragraphe précédent. La vitesse de croissance des racines est la même pendant les premiers jours en présence et en l'absence de vitamine. Mais sur ce dernier milieu des nécroses apparaissent à l'extrémité des racines à partir du 23ème jour et la vitesse de croissance moyenne du lot est nulle après le 28ème jour (figure 4). A 35° C au contraire la vitesse maximum de croissance des racines se trouve légèrement réduite dès les premiers jours sur le milieu sans vitamine. D'autre part, l'arrêt de croissance est plus précoce et plus brusque à cette température. Il se produit au 13ème jour de culture.

3. Vitesse de croissance des tiges

A 20° C, la vitesse de croissance des tiges en l'absence de vitamine est d'abord un peu faible (1,6 mm/jour). Mais, après 50 jours, elle augmente progressivement et atteint une valeur légèrement supérieure à celle du témoin. Ce rétablissement se produit lorsque les plantes présentent 4 ou 5 feuilles étalées. A 35° C, au contraire, la vitesse de croissance des tiges est très réduite sur le milieu sans vitamine. Elle

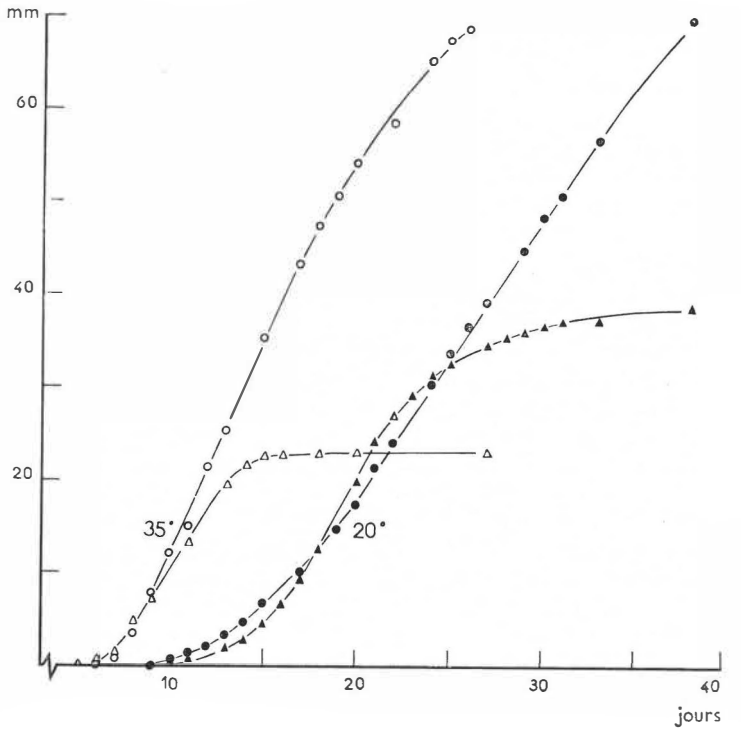

Fig. 4: Comparaison de la croissance des racines de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro* à 20° et à 35° C.
○ Milieu avec sucre et vitamines à 35° C. ● Milieu avec sucre et vitamines à 20° C. △ Milieu avec sucre, sans vitamine, à 35° C. ▲ Milieu avec sucre, sans vitamine, à 20° C.

Tableau 2

Développement à 20° et à 35° C de boutures de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* sur des milieux contenant ou non des vitamines

Milieux nutritifs	Température °C	Pourcentage de boutures enracinées	Vitesse moyenne d'émission des racines	Vitesse maximum de croissance des racines mm/jour	Vitesse maximum de croissance des tiges en mm/jour
Avec vitamines	35	100	14,7	4,3	2,8
	20	100	9,4	2,9	1,9
Sans vitamine	35	100	15,6	3,0	1,2
	20	97	8,6	3,1	2,1

garde pendant toute la durée de la culture une valeur inférieure à la moitié de celle du témoin. Cette expérience montre que, si la présence des vitamines dans le milieu de culture est simplement bénéfique à 20° C, elle est au contraire indispensable à 35° C.

C. Conclusion

Dans nos conditions de culture *in vitro,* les boutures de *Vitis rupestris* ne sont pas entièrement autotrophes. En effet, en l'absence de sucre, la vitesse de croissance des tiges est réduite de moitié dès la première culture. Les vitesses d'émission et de croissance des racines ne sont réduites qu'à partir de la deuxième culture sur un milieu sans sucre.

L'absence de vitamine se traduit par l'apparition de nécroses à l'extrémité des racines lorsque le milieu de culture contient du saccharose. A 20° C, la plante parvient à surmonter cette crise. A 35° C, au contraire, les nécroses apparaissent de façon plus précoce et la croissance de la plante est très réduite sur les milieux sans vitamine.

On sait que les vitamines du groupe B, nécessaires à la croissance des racines, interviennent dans le fonctionnement de certains enzymes. La thiamine, sous forme de pyrophosphate fait partie du groupement prosthétique de carboxylases. Elle joue un rôle dans la respiration des racines et son absence peut entrainer l'arrêt des divisions cellulaires dans le méristème radiculaire (BONNER et GALSTON, 1952). La pyridoxine, nécessaire au fonctionnement des transaminases intervient dans la synthèse des acides aminés. Enfin, l'acide nicotinique, en tant que précurseur du DPN, joue un rôle dans le fonctionnement des déshydrogénases.

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

besoins en vitamines des racines aux températures élevées. En effet, un grand nombre de protéines enzymatiques se trouvent plus ou moins inhibées à ces températures.

Rôle des ions potassium et ammonium

Les cations monovalents K^+ et NH_4^+ jouent un rôle important dans la croissance et la différenciation de nombreux organes végétaux. Ils favorisent notamment le fonctionnement des méristèmes (Morel et Muller, 1964). On sait également que le potassium augmente la vitesse de croissance des tiges chez de nombreuses espèces. Il nous a donc paru important de comparer la croissance des boutures de vigne sur le milieu minéral de Knop et sur le milieu plus riche en potassium et en ammonium mis au point par Morel. Cette étude constitue un travail préliminaire à des recherches sur la culture des méristèmes de vigne.

A. Action des ions K^+ et NH_4^+ sur la croissance des boutures saines et court-nouées

a. Premier bouturage

Des plantes appartenant aux clones M.35-100 et M.35-10 et cultivées sur le milieu de base (solution de Knop, solution de Berthelot, saccharose et vitamines) ont servi de point de départ à une première expérience. Des boutures prélevées sur ces plantes ont été mises en culture à 20° sur deux milieux de composition minérale différente: solution de Knop pour l'un et solution $K\text{-}NH_4$ pour l'autre. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau 3.

1. Emission des racines

L'émission des racines est nettement favorisée par le milieu $K\text{-}NH_4$. Chez les boutures saines, le pourcentage d'enracinement et la vitesse d'émission des racines sont peu modifiés mais on compte en moyenne deux fois plus de racines par bouture sur le milieu riche en potassium et en ammonium. Dans le cas des boutures malades l'avantage est plus net puisque le pourcentage de boutures enracinées passe de 0 à 40%. La vitesse moyenne d'émission des racines reste cependant très faible. Il apparaît, dès le premier bouturage, que les ions K^+ et NH_4^+ jouent un rôle favorable dans la différenciation des racines.

2. Croissance des racines

Le milieu $K\text{-}NH_4$ se montre au contraire, très défavorable à la croissance des racines (figure 5). Après un début de croissance normal on assiste très tôt à une inflexion de la courbe de croissance (après 19 jours de culture pour le clone sain et

Tableau 3

Développement à 20° C de boutures de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* sur deux milieux de composition minérale différente

Milieu minéral	Clone	Pourcentage de boutures enracinées	Nombre moyen de racines par bouture	Vitesse moyenne d'émission des racines	Vitesse maximum de croissance des racines en mm/jour	Vitesse maximum de croissance des tiges en mm/jour
Knop	M35-100	87	1,4	7,9	2,4	1,9
	M35-10	0	—	—	—	0
$K\text{-}NH_4$	M35-100	100	2,8	8,7	0,8	1,2
	M35-10	40	1,2	2,0	0,7	0,8

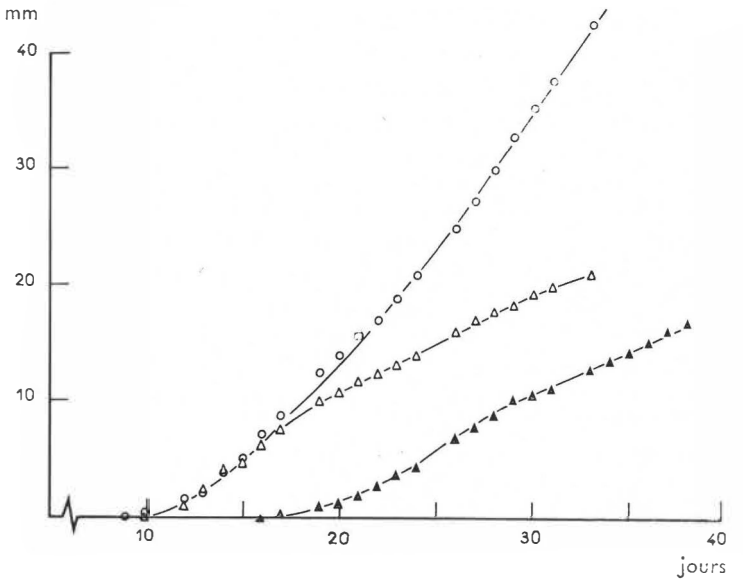

Fig. 5: Croissance des racines de *Vitis rupestris* sain et court-noué cultivé *in vitro* à 20° C sur des milieux de composition minérale différente.
○ Clone sain cultivé sur milieu KNOP. △ Clone sain cultivé sur milieu K-NH_4. ▲ Clone malade cultivé sur milieu K-NH_4.

après 28 jours pour le clone malade). Après 100 jours de culture, les racines sont entièrement brunes sur le milieu K-NH_4.

3. Croissance des tiges

La toxicité du milieu K-NH_4 se manifeste également par une croissance faible des tiges. Cependant la vitesse de croissance maximum est atteinte beaucoup plus vite sur le milieu K-NH_4, ce qui se traduit par une croissance plus importante, sur ce milieu, en début de culture (figure 6). Par contre, après 100 à 110 jours de culture, la croissance des tiges cesse complètement et l'on observe un flétrissement brusque des feuilles du sommet de la plante. On peut se demander si la mortalité observée en fin de culture sur le milieu K-NH_4, riche en chlorure, n'est pas à rapprocher du mauvais développement de la vigne dans certains terrains salés. On sait qu'une dose de 2 p. 1000 de ClNa dans la solution du sol est considérée comme létale pour la vigne dans les conditions habituelles de culture.

b. Deuxième bouturage consécutif

Les plantes cultivées sur milieu KNOP et K-NH_4 ont été, dans une deuxième expérience, multipliées sur les milieux suivants: KNOP, K-NH_4 et K-NH_4 à la dilution un-demi, c'est-à-dire contenant 500 mg/l de ClK et de $SO_4(NH_4)_2$.
Les plantes provenant du milieu KNOP étaient toutes des plantes saines. Le milieu K-NH_4 ½ s'est montré, pour ce clone, très favorable à l'émission de racines. L'action toxique était pratiquement supprimée et, malgré un effet légèrement dépressif sur la croissance des racines, la croissance des tiges a été très bonne. La première culture sur milieu K-NH_4 avait permis d'obtenir le développement de boutures des deux clones, sain et court-noué. Le tableau 4 indique les résultats obtenus lors du bouturage de ces plantes sur les milieux KNOP, K-NH_4 et K-NH_4 ½.

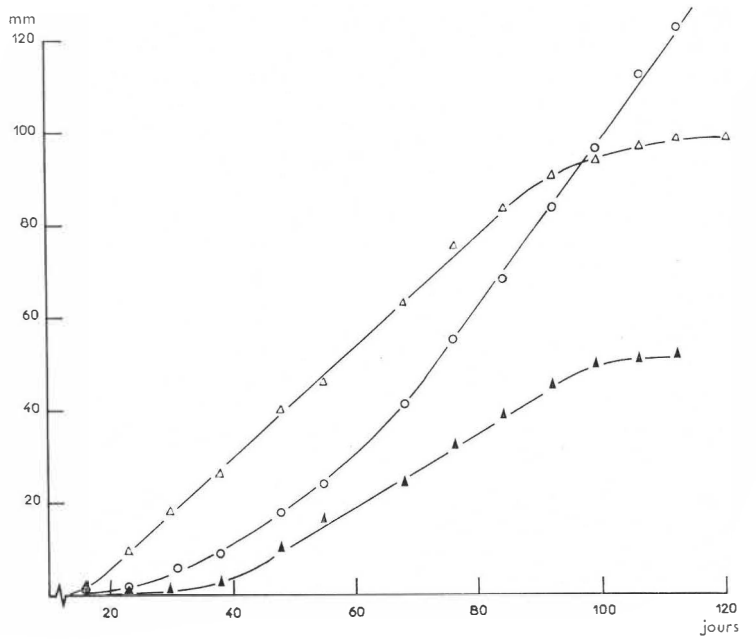

Fig. 6: Croissance des tiges de *Vitis rupestris* sain et court-noué cultivé *in vitro* à 20° C sur des milieux de composition minérale différente.
○ Clone sain cultivé sur milieu KNOP. △ Clone sain cultivé sur milieu K-NH_4. ▲ Clone malade cultivé sur milieu K-NH_4.

1. Emission des racines

La culture sur milieu KNOP a donné à peu près les résultats habituels bien que la culture précédente ait été faite sur milieu K-NH_4.

La deuxième culture consécutive sur milieu K-NH_4 s'est, au contraire, montrée très favorable à l'émission des racines. On observe notamment chez les boutures malades une forte augmentation du nombre de boutures enracinées, du nombre de racines par bouture et de la vitesse d'émission des racines par rapport à la culture précédente (tableau 3, ligne 4).

La culture des boutures malades sur milieu K-NH_4 ½ donne des résultats intermédiaires entre ceux obtenus sur les milieux KNOP et K-NH_4. Au contraire, les boutures saines semblent s'enraciner plus vite sur le milieu K-NH_4 ½.

2. Croissance des racines

Les milieux les plus favorables à la croissance des racines paraissent être celui de KNOP pour les plantes saines et K-NH_4 ½ pour les plantes malades. On retrouve l'action toxique du milieu K-NH_4.

3. Croissance des tiges

Le milieu le plus favorable à la croissance des tiges est K-NH_4 ½ aussi bien pour les plantes saines que pour les plantes malades.

En résumé, le milieu K-NH_4 s'est montré le plus favorable à la différenciation des racines. La plus forte teneur en ions K et NH_4 a permis notamment d'améliorer

Tableau 4

Développement sur différents milieux minéraux de boutures de *Vitis rupestris* saines et court-nouées provenant de deux pré-cultures sur milieu K-NH_4

Milieu minéral	Clone	Pourcentage de boutures enracinées	Nombre moyen de racines par bouture	Vitesse moyenne d'émission des racines	Vitesse maximum de croissance des racines en mm/jour	Vitesse maximum de croissance des tiges en mm/jour
KNOP	M35-100	98	1,2	7,3	2,9	1,3
	M35-10	10	1,0	0,3	—	0,9
K-NH_4	M35-100	85	2,9	6,0	0,8	1,2
	M35-10	81	1,7	4,2	0,3	0,4
K-NH_4 ½	M35-100	95	2,2	8,0	2,3	1,9
	M35-10	64	1,2	3,7	2,0	1,2

de façon importante l'enracinement à 20° C des boutures malades puisque 80% de ces boutures se sont enracinées sur ce milieu alors que celles cultivées sur milieu KNOP ne s'enracinaient que dans 10% des cas. Par contre, le milieu K-NH_4 se montre ensuite toxique et ne permet pas une croissance satisfaisante des plantes enracinées.

B. Essai de diverses concentrations en ions K^+ et NH_4^+

Afin de préciser les risques de toxicité des milieux de type K-NH_4 nous avons expérimenté des doses variables de chlorure de potassium et de sulfate d'ammonium. La croissance des lots de boutures a été comparée sur le milieu K-NH_4 et sur les milieux K-NH_4 ½, ¼, ⅛, et 1/16 où la teneur en ClK et $SO_4(NH_4)_2$ était réduite à la moitié, au quart, etc... Cette expérience a porté sur le clone M35-100 traité par thermothérapie. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

1. Emission des racines

Dans cette expérience toutes les boutures se sont enracinées quelle que soit la teneur du milieu en ions K et NH_4. La vitesse d'émission des racines ne varie pas quand la dose de chlorure de potassium et de sulfate d'ammonium passe de 62 à 500 mg/litre mais elle est un peu plus faible en présence d'un gramme par litre de ces deux sels.

2. Croissance des racines

La meilleure croissance des racines a été obtenue sur le milieu K-NH_4 1/16. La vitesse de croissance des racines diminue régulièrement lorsque les doses de ClK et de $SO_4(NH_4)_2$ augmentent. On remarque cependant que les trois milieux contenant 62, 125 et 250 mg/litre de chacun de ces sels ont permis d'obtenir une croissance des racines supérieures à celle habituellement observée sur le milieu KNOP. Les milieux KNOP et K-NH_4 1/16 diffèrent surtout par la présence des ions Cl et NH_4 dans le second (tableau 6). On peut donc penser que l'ion NH_4 exerce un effet bénéfique sur la croissance des racines de *Vitis rupestris* à des doses très faibles.

3. Croissance des tiges

Le milieu le plus favorable à la croissance des tiges paraît être K-NH_4 ½ mais la différence est faible entre la vitesse de croissance observée sur ce milieu et cel-

Tableau 5

Développement de lots de boutures saines de *Vitis rupestris* cultivées sur des milieux contenant des doses de ClK et de $SO_4(NH_4)_2$ variant de 0,062 à 1 g/litre pour chacun de ces deux sels

Milieu minéral	Pourcentage de boutures enracinées	Vitesse moyenne d'émission des racines	Vitesse maximum de croissance des racines en mm/jour	Vitesse maximum de croissance des tiges en mm/jour
K-NH_4 1/16	100	9,7	3,8	1,7
K-NH_4 1/8	100	10,4	3,5	1,8
K-NH_4 1/4	100	10,2	3,3	1,7
K-NH_4 1/2	100	10,2	2,5	2,2
K-NH_4	100	8,3	0,9	1,2

les obtenues sur les milieux K-NH_4 plus dilués ou, dans d'autres experiences sur le milieu Knop. Il apparaît donc que l'effet toxique des ions K et NH_4 se manifeste vis-à-vis des tiges pour des doses plus fortes que vis-à-vis des racines.

C. Conclusion

Il semble bien qu'à chacun des phénomènes étudiés (différenciation des racines, croissance des racines et croissance des tiges) corresponde un optimum différent de teneur du milieu en ions K et NH_4. La différenciation des racines se fait dans les meilleures conditions sur le milieu K-NH_4 complet. Ce phénomène est surtout net dans le cas des boutures atteintes de court-noué dont la rhizogénèse est faible à 20° C sur le milieu Knop. La croissance des racines est au contraire inhibée lorsque la teneur en ions K et NH_4 augmente. En effet, les concentrations optimales de ces ions paraissent être respectivement $1{,}7 \times 10^{-3}$ et $0{,}9 \times 10^{-3}$ ion-grammes par litre. Enfin, la croissance des tiges se fait dans les meilleures conditions en présence de $7{,}6 \times 10^{-3}$ ions-grammes de potassium et $7{,}5 \times 10^{-3}$ d'ammonium. Dans ces conditions, ne serait-il pas utile d'adopter un milieu nutritif particulier pour chacun des stades de la culture *in vitro* des boutures de vigne? Le milieu Knop, bien que peu favorable à la différenciation des racines, convient pour la culture des clones ayant une bonne rhizogénèse. Mais pour d'autres clones, comme ceux qui sont atteints de court-noué, il pourrait être intéressant de provoquer l'émission des racines en présence d'un milieu comme K-NH_4 puis de transférer les plantes, vers le vingt-cinquième jour de culture, sur un milieu plus favorable à la croissance (Knop ou K-NH_4 dilué par exemple). On doit noter que, si la culture sur un milieu riche en

Tableau 6

Composition des milieux Knop, K-NH_4 1/16, K-NH_4 1/2 et K-NH_4 exprimée en millièmes d'ions-grammes par litre

	Cl^-	NO_3^-	SO_4^{--}	PO_4^{---}	K^+	NH_4^+	Ca^{++}	Mg^{++}
Knop	0	5,4	0,5	0,91	2,2	0	2,1	0,5
K-NH_4 1/16	0,84	4,2	0,97	0,91	1,7	0,94	2,1	0,5
K-NH_4 1/2	6,7	4,2	4,3	0,91	7,6	7,5	2,1	0,5
K-NH_4	13,4	4,2	8,1	0,91	14,3	15,1	2,1	0,5

potassium et en ammonium permet d'obtenir l'enracinement de boutures court-nouées de *Vitis rupestris*, il n'en est pas toujours de même lorsque la mauvaise aptitude au bouturage est un caractère lié à la variété.

On connaît depuis plusieurs années l'action inhibitrice de certaines souches du court-noué de la vigne sur la rhizogénèse de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro* sur KNOP à 20° C. Il est apparu ici que les ions K^+ et NH_4^+ étaient capables d'activer la rhizogénèse chez les plantes saines et plus encore chez les plantes court-nouées. Dans ce deuxième cas, il semble d'ailleurs que l'action de ces cations est de plus en plus nette au fur et à mesure des repiquages successifs. On peut donc se demander s'il n'existe pas des interactions complexes entre le phénomène de différenciation des racines, la virose et la présence dans les cellules de quantités importantes d'ions K^+ et NH_4^+. Rappelons à cet égard qu'une action particulière du potassium sur le fonctionnement du matériel génétique a été signalée (KROEGER, 1963). Cet élément serait responsable, chez certains insectes, d'une activité très intense des gènes conduisant à la mue. La même hypothèse a été reprise pour expliquer des phénomènes particuliers de croissance et de différenciation observés chez les plantules de blé (CHAUSSAT, 1968). La même propriété des ions K^+ ne pourrait-elle pas expliquer leur action, d'une part, sur la différenciation des racines, d'autre part, sur le développement de la virose, celui-ci pouvant être soumis à une régulation de la part d'inhibiteurs d'origine génique?

Conclusions générales

Cette étude, quoique très fragmentaire, a permis de préciser certains des besoins nutritifs de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro*. D'autre part, les observations faites au cours de ce travail ont été utiles pour aborder l'étude des besoins nutritifs d'organes moins différenciés tels que des boutures terminales ne comportant pas de feuille étalée ou même des méristèmes isolés de *Vitis rupestris*.

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 saccharose dans le milieu nutritif est indispensable. En l'absence de sucre la vitesse de croissance des racines est en effet cinq fois plus faible et celle des tiges deux fois plus faible. La présence de vitamines assure, à 20° C, une croissance plus régulière notamment au niveau des racines. A 35° C, au contraire, les vitamines sont «indispensables» puisque la vitesse de croissance des tiges est réduite de moitié en leur absence. Il serait intéressant d'expliquer cette importante différence de métabolisme entre les cultures maintenues à 20° et à 35° C. On doit souligner également que certains équilibres doivent 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.

D'autre part, dans le domaine de la nutrition minérale, les ions K et NH_4 utilisés à fortes doses (15×10^{-3} ions-grammes par litre) se sont montrés très favorables à la différenciation des racines. Ils ont permis notamment de lever l'inhibition qu'exerce le virus du court-noué sur la rhizogénèse. Les fortes teneurs en potassium et en ammonium ont au contraire inhibé la croissance des racines. Les doses les plus favorables à cette croissance sont de l'ordre de 1 à 2×10^{-3} ions-grammes par litre. La composition minérale du milieu nutritif n'a donc pas une action identique vis-à-vis de la différenciation des racines et de leur croissance. On peut rappeler que d'autres facteurs ont également des actions différentes à l'égard de ces deux phénomènes (GALZY, 1969). Ainsi, le virus du court-noué est capable de

bloquer la rhizogénèse des boutures de *Vitis rupestris* cultivées sur une solution de KNOP à 20° C alors qu'il ne réduit pas de façon très sensible la croissance des racines déjà formées.

En résumé, aux différents stades de la culture *in vitro* de *Vitis rupestris* correspondent souvent des besoins nutritifs particuliers, tant au point de vue des glucides et des vitamines qu'à celui des sels minéraux. Plusieurs techniques différentes permettent d'aborder l'étude du métabolisme des organes végétaux; elles permettent en réalité des observations différentes. La culture *in vitro* 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 de différentes phases du développement. La culture en milieu naturel ne fournirait pas toujours 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.

Références bibliographiques

BONNER, J. et GALSTON, A. W., 1952: In: Principles of plant physiology, p. 336—342. Freeman Ed, San Francisco.

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

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

— —, 1969: Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* SCHEELE sain et court-noué cultivé *in vitro* à différentes températures. Ann. Phytopath. **1**, 149—166.

— — et COMPAN, H., 1968 Thermothérapie de quelques variétés de vigne présentant des symptômes de virose. Vignes et Vins (Paris) **166**, 13—20.

— — et NIGOND, J., 1968: Description d'une enceinte éclairée et thermostatée destinée à la culture *in vitro* des végétaux supérieurs. Vignes et Vins (Paris) **168**, 11—13.

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

LANGRIDGE, J. et MCWILLIAM, J. R., 1967: Heat responses of higher plants. In: Thermobiology. Acad. Press, New York, p. 272—275.

MOREL, G. et MULLER, J. F., 1964: La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) **258**, 5250—5252.

Eingegangen am 10. 4. 1969

R. GALZY
Lab. de Rech. de la Chaire de Botanique
Ecole Nationale Sup. Agronomique
Montpellier (34)
France