

ETUDE COMPARATIVE DE LA REPONSE DE CINQ VARIETES PORTES GREFFES DE VIGNE (*Vitis vinifera* L.) A LA CULTURE *IN VITRO*

Reçu le 07/07/2008 – Accepté le 13/03/2011

GUETTOUCHI A¹, H. BOUZERZOUR², A. DJEKOUN³

¹ Dépt. Des sciences de la nature et de la vie, Fac. Des sciences, Université Mohamed Boudiaf, M'Sila

² Dépt. de Biologie, Fac. Sci. Université Ferhat Abbas, Sétif

³ LGBBV, Fac. Sci. Université Mentouri-Constantine

Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier la réponse de cinq variétés de vigne (*Vitis Vinifera* L) a la culture *in vitro*. Le dispositif employé comporte deux milieux de base, le MS et le NN additionnées de plusieurs hormones. La réponse était mesurée de par l'émission et l'extension foliaire, la rhizogenèse ainsi que la capacité d'acclimatation. Les résultats montrent que le milieu MS se prête globalement mieux à la conduite *in vitro* des variétés de vigne testées. Certaines variétés montrent cependant un comportement très spécifique a un milieu ou a l'autre pour les variables mesurées. Une seule, la 140 R, présente une très grande plastique vis des milieux et des hormones étudiés pour la caulogenèse, la morphogenèse, la rhizogenèse et l'acclimatation.

Mots clés: *Vitis Vinifera* L. -hormones – caulogenèse – morphogenèse – acclimatation.

Abstract

The objective of our work is to study the answer of was to study the response of five vine varieties (*Vitis vinifera* L.) to the *in vitro* culture. The design employed counts two basic mediums, MS and NN, complemented with various hormones. Explant response was measured through leaf emission and leaf extension, roots emission and the ability to acclimation. Results showed that MS was globally more efficient as growth medium as far as genotype response was concerned. Certain varieties exhibited a specific behavior toward a medium or the other for the measured variables. Only one variety, the 140 R showed a large adaptation to mediums and hormones used for the initiation of callus, morphogenesis, rhizogenesis and acclimation.

Keywords: *Vitis vinifera* L -hormones – morphogenesis – rhizogenesis – acclimation.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة استجابة خمسة أصناف من الكروم (فيتيس فينيغيري لينيه) (*Vitis vinifera* L.) للزراعة المخبرية، استعمالنا وسطين قاعديين ميراشيق و شقوق (MS)، نيتش و نيتش (NN)، ثم قمنا بإضافة الهرمونات. قيمت الاستجابة من خلال تتبع تشكل و استطالة الأوراق و أيضا تشكل الجذور و القدرة على التأقلم. تظهر النتائج بأن الوسط ميراشيق و شقوق (MS) اكثر فعالية على العموم في الزراعة المخبرية لأصناف الكروم المختبرة. تظهر بعض الأصناف استجابة خاصة لوسط معين حسب القياسات، يبين الصنف 140 R قدرة عالية على التأقلم مع الوسطين و كافة الهرمونات المختبرة من حيث عدد الأوراق المتشكلة، الكالوس، عدد الجذور و القدرة على التأقلم.

الكلمات المفتاحية: فيتيس فينيغيري لينيه – زراعة مخبرية – هرمونات – كالوس – التأقلم – التشكل النباتي – التشكل الجذري.

La vigne (*Vitis vinifera* L.) reprend peu à peu une place de plus en plus importante dans le secteur agricole, notamment le vignoble pour la production de raisin de table et celui pour la production du raisin sec. Ce regain d'intérêt est motivé par la bonne adaptation de cet arbre aux conditions du milieu. Il s'explique aussi par la volonté de diversifier les productions agricoles. La régénération et l'extension éventuelle du vignoble algérien qui, jadis occupé une importante place dans l'économie du pays, nécessitent la fourniture de plants sains, vigoureux et plus productifs en quantités suffisantes pour ne pas constituer un frein à cette orientation. La production de plants, selon le schéma classique, en arboriculture, est très lourde et longue. L'utilisation des techniques de la culture *in vitro* a l'avantage de réduire considérablement de la durée du cycle de production de plants. Ces techniques assurent également la qualité du produit et en quantités désirables (Torregrosa et Bouquet, 1993). C'est dans ce contexte que la présente contribution se fixe comme objectif d'étudier la réponse de 5 variétés portes-greffes de vigne (*Vitis vinefera* L.) à la culture *in vitro*.

MATERIELS ET METHODES

L'expérimentation a été conduite dans le Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie végétale, Faculté des Sciences, Université Mentouri au cours des années universitaires 2001/02 et 2002/03. Le matériel végétal utilisé est constitué de cinq variétés portes greffes qui sont la 41B, issue du croisement entre *Vitis vinifera* cultivar Chasselas et *Vitis berlandieri*, la 110 R, issue du croisement entre *Vitis berlandieri* et *Vitis Rupestris*, la SO 4 sélection du croisement entre *Vitis Riparia* et *Vitis berlandieri*, la 99 R sélection du croisement entre les espèces *Vitis berlandieri* et *Vitis Rupestris* et la variété 140 R qui est issue du croisement entre *Vitis rupestris* et *Vitis berlandieri*. *Vitis berlandieri*, *Vitis Rupestris* et *Vitis Riparia* sont d'origine américaine et servent de porte-greffe à l'espèce *Vitis vinifera* suite à leur résistance au phylloxéra (Castelan-Estrada, 2001).

La 110R est très utilisée dans le vignoble Oranais (Bentchikou, 1981). La 99 R est résistante au calcaire est modérément tolérant à la sécheresse et occupe la seconde position comme porte-greffe dans le vignoble algérien. La 140R se distingue par une bonne vigueur et de la résistance à des taux élevés de calcaire actif et à la sécheresse (Neggaz et Yahiaoui, 2001). Ces variétés ont été fournies gracieusement par la station de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière de Skikda. Les variétés ont été testées pour leur comportement en culture *in vitro* sur deux milieux de base le MS et le NN. Le dispositif expérimental comporte aussi l'étude de l'addition des hormones (le 2,4-D, l'AIB à 2,2 mg/l et l'ANA à 0,05 mg/l) au milieu de base qui se montre le plus favorable à la croissance de la partie feuillée des explants des portes greffes testés pour initier la rhizogenèse. Les explants formants des racines sont évalués pour leur acclimatation dans la chambre de culture puis sous serre pour faciliter leur transfert en plein champ.

La méthode adoptée pour la préparation des explants de la vigne est celle décrite par Torregrosa *et al.* (1993). Les tiges herbacées de plants de vigne identifiées sont découpées en fragments de 4cm de long portant un nœud, sous asepsie totale des instruments et de l'environnement de travail. Les explants sont stérilisés par passage dans des boîtes de pétri contenant de l'eau javellisée (7,5 g/l d'hypochlorite de sodium) pendant 15 minutes. L'opération de stérilisation est poursuivie par un rinçage dans trois bains successifs d'eau distillée et stérilisée de cinq minutes chacun. Les transplants égouttés sont repiqués dans des tubes à essai contenant le milieu de culture spécifique. L'ouverture du tube à repiquer est enflammée avant et après repiquage. On prend soins de couper 1cm des extrémités de chaque bouture avant son transfert au tube à essai. Les tubes refermés sont placés dans une salle de culture sous une photopériode de 16h et à une température ambiante de 23°C. A la fin de chaque semaine, le nombre de feuilles (NF) émises est compté et la longueur totale (LF), des racines (LR) et la hauteur de l'explant (HT) est estimée à l'aide du papier millimètre.

Les explants qui présentent un bon développement végétatif sur le milieu de base le plus adéquat sont transplantés dans un sol reconstitué de sable, de tourbe et de terre à part égale (1:1:1 volume), préalablement stérilisé à 200°C pendant 30 minutes. L'explant est retiré du tube de culture, les racines sont lavées avec de l'eau stérilisée, on élague les feuilles âgées et on transfère l'explant dans des pots de 8.5 x 7.5 cm stérilisés avec de l'eau de Javel 12°C. Les pots sont irrigués avec une solution nutritive constituée de 5 ml de macro plus 2.5 micro-éléments dans 200 ml d'eau distillée. Les pots sont ensuite mis sous une cloche d'humidification stérilisée et remis dans la chambre de culture. Le transfert des explants dans des pots de dimensions plus grandes est fait 3 semaines plus tard, après enlèvement de la cloche d'humidification pour mettre les explants au contact de l'air ambiant de la salle de culture pendant trois semaines au bout desquelles les explants sont transférés à la serre (Tableau1).

RESULTATS ET DISCUSSION

Influence de la nature du milieu sur la croissance des explants

Le processus de croissance-développement des plantes est en grande partie étroitement liée à la nature du milieu de production. Le milieu de culture se caractérise par la composition en éléments minéraux qui sont puisées par la plante parce qu'ils entrent dans la constitution de la matière sèche et parce qu'ils sont nécessaires aux différentes activités du métabolisme cellulaire (Kirkby et Mengel, 1979). Pour activer ce processus, et surtout dans la technique de la culture *in vitro*, la nature du milieu devient un facteur prépondérant. Certains milieux se montrent, en effet, plus avantageux en terme de vitesse de croissance que d'autres. Ils réduisent de ce fait de la durée de cycle de production des plants. Cette préoccupation justifie l'étude de l'influence de la nature du milieu de culture sur la

croissance des explants dont le processus est analysé en termes de poussées foliaires (émissions et élongation foliaires).

Du point de vue état sanitaire, peu de contamination des explants a été notée sur milieu MS. La contamination a été nulle pour les variétés *140R* et *99R*, sur milieu NN, de 40% pour la *41B* et la *110R* et de 80% pour la *SO4*.

Tableau1 : Dispositif expérimental adopté

Milieu de Culture	Variété	Hormone	# tubes
NN	<i>41 B</i>	sans	5
	<i>110 R</i>	sans	5
	<i>140 R</i>	sans	5
	<i>99 R</i>	sans	5
	<i>SO 4</i>	sans	5
MS	<i>41 B</i>	sans	5
	<i>110 R</i>	sans	5
	<i>140 R</i>	sans	5
	<i>99 R</i>	sans	5
	<i>SO 4</i>	sans	5
MS	<i>41 B</i>	2,4-D	5
	<i>110 R</i>	2,4-D	5
	<i>140 R</i>	2,4-D	5
	<i>99 R</i>	2,4-D	5
	<i>SO 4</i>	2,4-D	5
MS	<i>41 B</i>	AIB	5
	<i>110 R</i>	AIB	5
	<i>140 R</i>	AIB	5
	<i>99 R</i>	AIB	5
	<i>SO 4</i>	AIB	5
MS	<i>41 B</i>	ANA	5
	<i>110 R</i>	ANA	5
	<i>140 R</i>	ANA	5
	<i>99 R</i>	ANA	5
	<i>SO 4</i>	ANA	5

Le milieu MS se révèle plus avantageux pour le développement des explants que le milieu NN qu'il dépasse de 47,5% pour l'émission foliaire et de 62,1% pour l'extension de la feuille. Les portes greffes diffèrent significativement pour les variables mesurées. La 140R suivie de la 41B, montrent des capacités nettement meilleures pour l'émission et l'élongation foliaires (Tableaux 2). 110R et SO4 sont les moins bonnes pour ces caractéristiques. La longueur et le nombre des feuilles émises par la 41B sont équivalents à 88% et 67% des valeurs moyennes de la 140R (Figure 1). La moyenne la plus faible du nombre de feuilles émises est notée sur la SO4, elle représente 43% la valeur de la 140R. Pour la longueur des feuilles émises, la plus faible valeur est mesurée chez la 110R et représente 24% la valeur moyenne de la 140R pour cette variable (Figure 1).

Tableau -2- Moyennes du nombre (NF) et de la longueur des feuilles émises par les variétés de vigne cultivées pendant 4 semaines sur milieux MS et NN. Effets principaux.

Variables	NF	LF
Effet milieu		
MS	1.64	16.67
NN	0.86	6.31
Effet variété		
99 R	0.99	6.81
41 B	1.37	17.65
140 R	2.05	20.13
SO4	0.88	7.96
110 R	0.95	4.90
Effet date		
7 jours	0.62	3.35
14 jours	1.27	9.07
21 jours	1.49	15.28
28 jours	1.62	18.26
Ppds5%	0.74	10.28

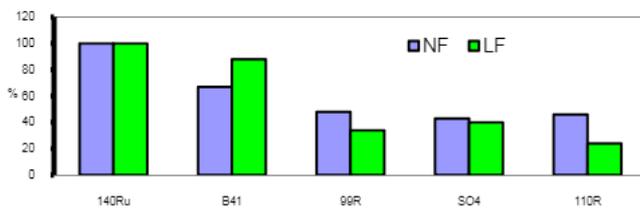


Figure1 : Valeurs relatives du nombre moyen et de la longueur moyenne des feuilles émises par les différentes variétés étudiées (effet moyen). NF: le nombre de feuilles. LF: l'élongation foliaire.

L'élongation moyenne du feuillage émis est pratiquement linéaire, alors que la prolifération des feuilles est plus importante au début de la mise en culture puis fléchit progressivement (Figure 2). En effet les modèles

retenus de l'évolution de ces deux paramètres sont de type quadratique pour le nombre de feuilles émises et linéaire pour l'élongation foliaire (Figure 2).

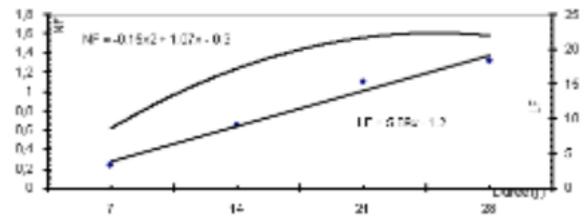
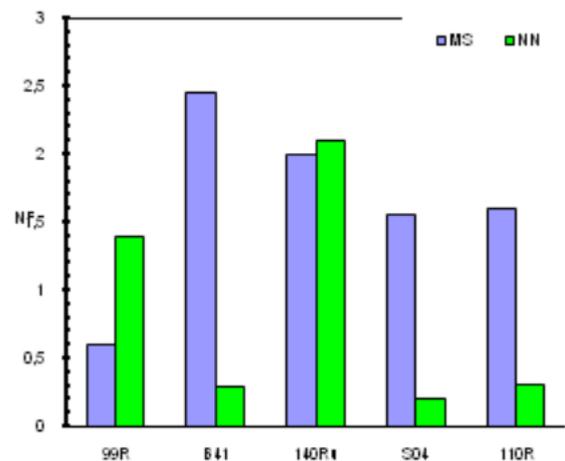
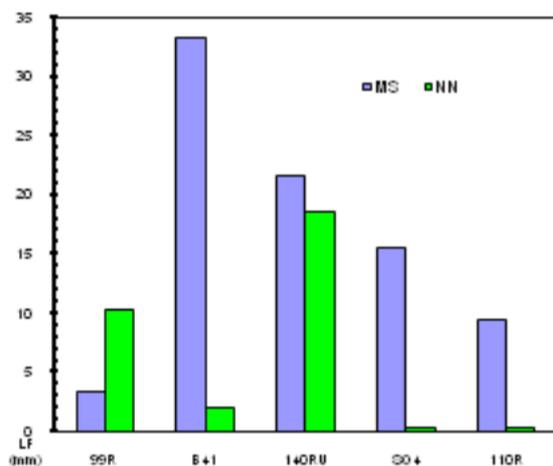


Figure2 : Cinétique d'émission et d'élongation foliaires au cours des 4 premières semaines de mise en culture (effet moyen). NF: Nombre de feuilles. LF: Elongation foliaire.

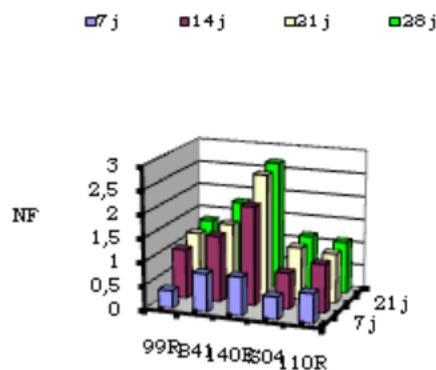
La prolifération du feuillage du porte greffe 41B est plus active sur le milieu de Base MS alors que celle de la 99R s'exprime nettement mieux sur le milieu de base NN. L'émission des feuilles de la 140R ne montre pas de différence significative entre les deux milieux MS et NN. La prolifération foliaire des portes greffes SO4 et 110R est relativement moins bonne sur milieu NN que sur milieu MS (Figure 3). L'élongation foliaire du porte greffe 41B se caractérise par une vitesse plus élevée sur milieu MS que sur milieu NN. Le porte greffe 99R allonge, par contre, nettement plus vite ses feuilles sur milieu NN que sur milieu de base MS (Figure 3). Comme pour le nombre de feuilles émises, 140R ne montre pas de différence significative de vitesse d'élongation du feuillage entre les deux milieux étudiés. Les variétés SO4 et 110R développent, par contre, une surface foliaire plus importante sur milieu Ms que sur milieu NN (Figure 3).



(a)



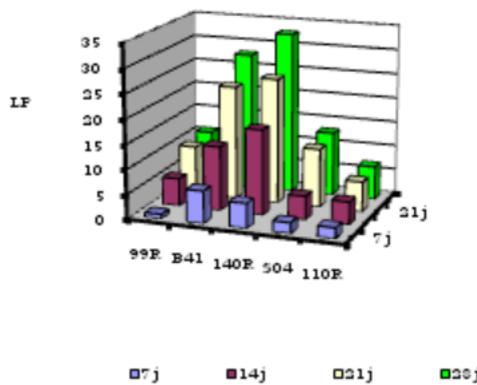
(b)



(a)

Figure 3: Variations du nombre de feuilles et de l'élongation foliaire des cinq portes-greffes en fonction de la nature du milieu de base. NF : nombre de feuilles. LF : Elongation foliaire.

Le taux d'émission foliaire varie en fonction du temps et de la variété porte greffe. Ainsi les variétés 140R, 41B et SO4 adoptent une vitesse d'émission foliaire évolutive au cours des quatre semaines de durée de l'expérience. Le taux d'émission des feuilles de la 99R et la 110R ralentit, par contre, au bout de la deuxième semaine de mise en culture (Figure 4). Pour l'élongation du feuillage, les variétés 140R et la 41B adoptent un rythme d'élongation des feuilles similaire à celui noté pour l'émission des feuilles alors que les autres variétés ralentissent l'élongation foliaire à partir de la deuxième semaine de mise en culture (Figure 4).



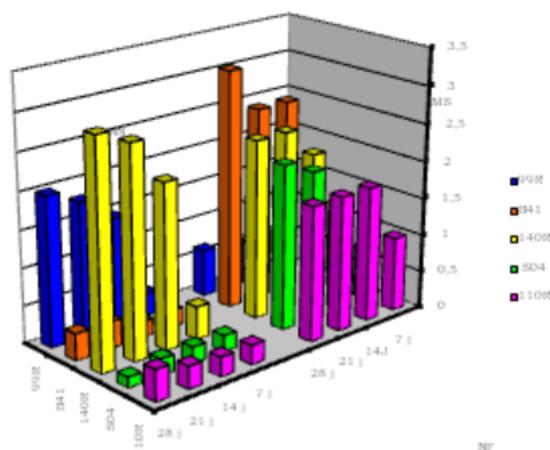
(b)

Le porte greffe 140R se multiplie *in vitro* aussi bien sur milieu de base MS que sur milieu NN. La variété 99R apparaît mieux adaptés à croître sur milieu NN spécifiquement. 41B, 110R et SO4 viennent, par contre, mieux sur milieu MS (Figure 5). En effet au terme de 28 jours de croissance 140R produit 2,4 feuilles pour une longueur totale de 30,4mm sur milieu MS, contre 3,0 feuilles et 35,0 mm sur milieu NN.

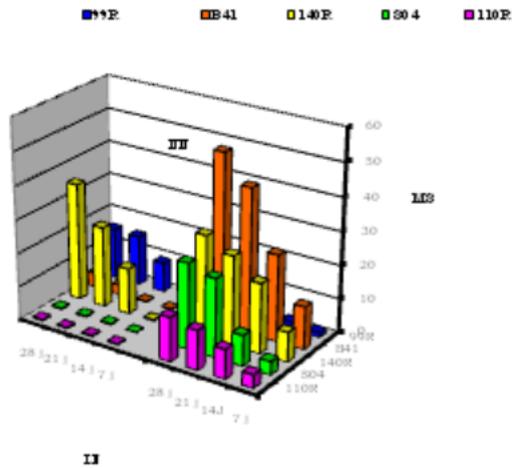
Par contre la variété 41B émit 3,2 feuilles sur milieu MS pour une longueur totale de 51,4 mm contre uniquement une ébauche feuillée de 4,4 mm de long sur milieu NN (Figure 5). 99R développe 2 feuilles sur milieu NN pour une longueur de 15,4 mm contre uniquement une ébauche feuillée de 5,2 mm sur milieu MS.

Ces résultats laissent apparaître des différences entre variétés et des spécificités variétales pour le type de milieu de culture.

Figure-4- Evolution au cours des 4 semaines du nombre de feuilles émises et de l'élongation foliaire des variétés étudiées. NF: Nombre de feuilles. LF: Elongation foliaire.



(a)



(b)

Figure 5 : Variation du nombre de feuilles émises et de l'élongation foliaire en fonction de la date, de la variété et du milieu de culture.

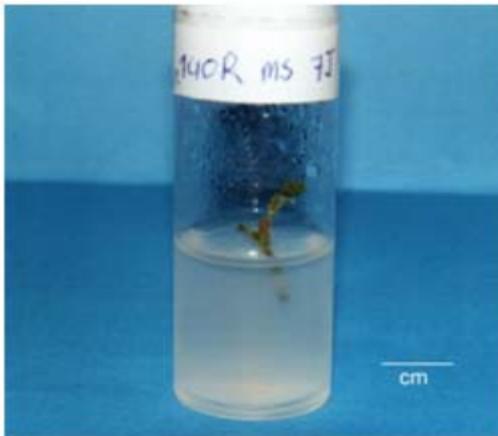


Figure 6 : Variété 140 R après 7 jours de culture sur Milieu MS

Influence des hormones additionnées au milieu MS sur l'induction racinaire

La croissance de la partie feuillée (aérienne) des explants des différents portes greffes est, dans cette deuxième expérimentation, assez similaire de ce qui a été noté sur l'expérimentation comparant les deux milieux de base. Ainsi pour éviter la redondance, les résultats obtenus et relatifs à cette partie ne sont pas discutés pour se concentrer sur l'effet des hormones additionnées au milieu de base MS. Le choix du MS s'est imposé parce que globalement il ressortait comme le milieu le plus proche des besoins nutritionnels des porte-greffes étudiés quoique les résultats discutés ci-dessus laissent apparaître un comportement variétal spécifique.

La rhizogenèse apparaît comme un processus plus complexe comparativement au développement de la partie aérienne des explants des variétés étudiées. Torregrosa

(2001) mentionne que la rhizogenèse est un phénomène très exigeant en hormones, notamment l'acide naphthalène acétique (ANA). L'ajout de l'ANA au milieu de base pour initier la rhizogenèse est aussi mentionné par Lee et Webstein (1990). Roubelakis-Anglakis (1991) trouvent que l'AIB est plus efficace de point de vue initiation de la rhizogenèse que l'ANA ou le 2,4-D sur vigne.

Sans choc auxinique le milieu MS seul n'est pas apte à initier le processus de rhizogenèse. On a noté par contre une prolifération racinaire sur les explants du porte greffe 140R sur milieu NN non additionné d'hormones. Le nombre de racines émises est de 17 au bout de 9 semaines de mise en culture avec une longueur totale de 215 mm. A ce sujet Barlass et Skene (1980) ont pu obtenir une rhizogenèse sur milieu de Base seul sans ajout d'auxines.

L'addition des hormones au milieu MS aboutit à initier la rhizogenèse chez tous les portes greffes sauf 110R. 140R développe des racines sur MS+ 2,4-D et sur MS+ AIB. 99R développe des racines sur MS + AIB alors que le porte greffe 504 initie des racines sur MS + ANA, 41B développe des racines sur MS + AIB. Au terme des 9 semaines de suivi, 140R produit 10 racines pour une longueur totale de 460 mm sur MS + 2,4-D et 6 racines pour une longueur totale de 200 mm sur MS+ AIB. 99R produit 7 pour une longueur de 130 mm et 504 fait une moyenne de 4 racines avec une longueur de 120 mm. En terme de développement racinaire, le porte greffe 140R confirme sa grande plasticité. 110R se montre plus récalcitrant pour ce qui est de la rhizogenèse.



Figure 7 : Variété 140 R après 63 jours de culture sur Milieu MS+AIB (rhizogenèse) .

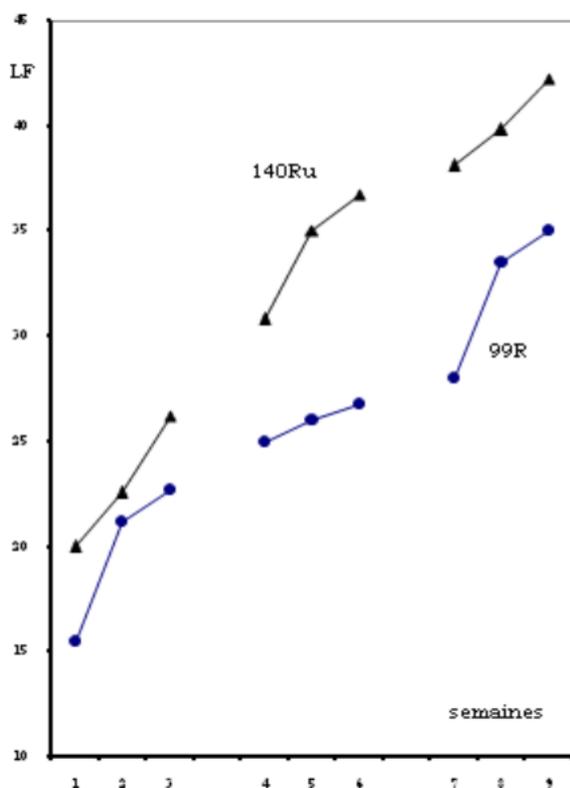
Acclimatation

C'est une étape difficile à maîtriser mais qui est nécessaire pour adapter l'explant progressivement à l'environnement où il est appelé à se développer et à produire. Cultivé dans un environnement aseptique, l'explant doit se maintenir dans un autre environnement qui ne réunit pas forcément toutes les caractéristiques et notamment l'humidité et la température plus clémente et plus stable de la chambre de culture. Pour éviter le changement brutal, des étapes intermédiaires sont nécessaires pour acclimater l'explant.

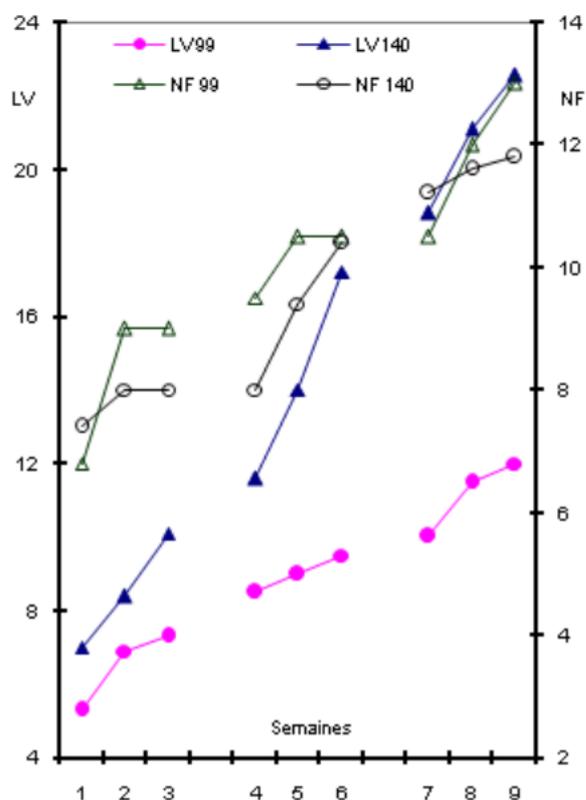
Cette acclimatation est dépendante aussi de la vigueur de l'explant, vigueur qui est liée au développement des parties aérienne et racinaire, c'est à dire à la réponse de l'explant à la culture *in vitro*.

Des quatre portes greffes qui ont initié des racines, 140R et 99R ont réussi à passer la phase d'acclimatation sans perte de sujets pour la 140R avec 80% de pertes des sujets pour le 99R.

Du point de vue des développements au cours de la phase d'acclimatation, l'explant moyen du 140R est passé par une taille de 85 mm au terme de la première semaine sous dessiccateur à 225,6 mm à la fin de la 9ième semaine de suivi, sous serre. Cette variété produit en fin de phase d'acclimatation 11,2 feuilles en moyenne pour une longueur totale de 422,6 mm (figure 8).



(a)



(b)

Figure 8 : Evolution de la hauteur de l'explant (LV), du nombre de feuilles émises (NF) et de la longueur des feuilles (LF) au cours de la phase d'acclimatation.

-a- Evolution de la longueur des feuilles chez la variété 140 R et la 99 R.

-b- Evolution de la hauteur de l'explant et du nombre de feuilles émises chez la variété 140 R et la 99 R.

L'explant moyen du 99R a une taille de 53,0 mm lors de la première semaine de mise en acclimatation pour arriver à une taille de 120 mm à la fin de cette phase. Le nombre de feuilles émises passe de 6,8 à 13 pour une longueur qui variait de 155 mm à 350 mm en fin de phase d'acclimatation (figure 9).



Figure 9 : Variété 140 R après 1 semaine dans la chambre de culture (acclimatation)

CONCLUSION

Le travail que nous avons mené, a permis de tirer les conclusions suivantes :

Concernant le milieu de culture, les résultats montrent que le milieu MS, favorise mieux l'émission et l'élongation rapide du feuillage de la vigne.

- La variété 140 R montre des capacités nettement meilleures pour l'émission des feuilles et l'élongation foliaire dans les deux milieux ; elle est suivie par la variété 41 B.
- On a constaté une spécificité variétale pour les hormones ajoutées au milieu MS. La variété 140 R montre une plus grande plasticité de comportement s'accommodant relativement avec toutes les hormones ajoutées.
- Concernant le développement de rhizogenèse, le milieu NN sans hormones permet un développement racinaire avec une spécificité variétale, seulement chez la variété 140 R et la 99 R.
- L'addition des hormones au milieu MS aboutit à initier et développer la rhizogenèse : La 41 B et la 99 R développent des racines sur MS + AIB par contre la SO 4 préfère le MS + ANA mais la 140 R développe des racines sur le MS + 2,4-D et sur le MS + AIB.
- Seules les deux variétés, 140 R et la 99 R ont réussi à passer la phase d'acclimatation.

La variété 140 R présente une très grande plasticité vis à vis des milieux et des hormones étudiées.

Il est souhaitable de compléter cette étude par d'autres techniques (la culture de méristème, l'embryogenèse.....) pour que nous maîtrisions la culture in vitro de la vigne.

REFERENCES

- [1]- Roubelakis-Anglakis K.A., Zivonovic S.B., 1991. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. HortScience 26: 1551-1553.
- [2]- Barlass M., Skene K.G.M., 1980. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine : I. The regeneration capacity of leaf primordial fits *in vitro*. II Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. J.Exp. Botany, 31, 489-495.
- [3]- Bentschikou M.M., 1981. Recherches sur la nutrition minérale du vignoble d'appellation d'origine garantie (V.A.O.G) de la région de Mascara. Thèse Magistère, INA. , Alger, 1p
- [4]- Castelan-Estrada M., 2001. Répartition de la biomasse chez *Vitis vinifera* L., Rendement de conversion du rayonnement solaire global et couts énergétiques thèse Doctorat, 12-13p.
- [5]- Kirkby J.M., Mengel K.E., 1979. plant nutrition. Eds. McMillian. XY-London- 530p.
- [6]- Lee N., Wetstien Y., 1990. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. J.Amer. Sci. Hort. Sci. 115 : 324-329.
- [7]- Neggaz et Yahiaoui, 2001. Le vignoble Algérien.
- [8]- Torregrosa L., Bouquet A., 1993. Culture *in vitro* : Apports actuels et perspectifs pour la multiplication et l'amélioration de la vigne (Progrès Agricole et viticole N°6 127-134.
- [9]- Torregrosa L., Bouquet A., Goussard P.G., 2001. *In vitro* culture and propagation of grapevine

