

# UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologies

## THESE DE DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Biotechnologie Végétale

### ASSAINISSEMENT ET REGENERATION DE QUELQUES CEPAGES AUTOCHTONES DE VIGNE *Vitis vinifera* L.

Par

**Nassima AITER**

Devant le jury composé de :

BENRBIHA. F.Z	Professeur	UB1	Présidente
CHAOUIA. C	Professeur	UB1	Directrice de thèse
LEHAD. A	M.C.A	ENSA	Co- Directeur de thèse
AMMAD. F	M.C.A	UB1	Examinatrice
MEZIANE. M	M.C.A	UHB Chlef	Examinatrice
BOUSSALHIH. B	M.C A	UDB Khemis-Miliana	Examineur

Blida, 19 Mai 2021

## ملخص

أصناف العنب الأصلية (*Vitis vinifera* L.) هي بشكل رئيسي متواجدة بالمناطق الجبلية في شمال الجزائر، وتتكون من مجموعات صغيرة ومبعثرة تلقائيًا. يتضمن تطوير زراعة الكروم الحفاظ على أصناف العنب التي تتكيف مع الظروف المناخية المحلية. هذه الأخيرة لها خصائص ذوقية وغذائية ملحوظة، وهي مهددة حاليًا وفي حالة تدهور كبير.

التكاثر عن طريق الزراعة المخبرية هو طريقة سريعة وفعالة لتجديد موارد الكروم هذه ومضاعفتها والحفاظ عليها. في هذا السياق وفي مواجهة هذه الإشكالية، تسجل دراستنا التي تهدف إلى تطوير بروتوكول تجديد فعال لثلاثة أصناف من العنب الأصلية (الأحمر بو عمر، تد ليث، ولخزين) عن طريق العقل الصغيرة من أجل حماية هذا المورد الجيني والحفاظ عليه. بغض النظر عن الكروم التي تم اختبارها، تم الحصول على أفضل انتشار للنبات على وسط (Murashige و Skoog (1962)، تم تعديله في محتوى النيتروجين الكلي وشكل النترات والكالسيوم المضاف (MS3)، مضافًا بـ 2.66 (µM) (BAP) و 0.054 (µM) حمض النفتالين اسيتيك (ANA). تم تحقيق أفضل معدل تجذير للبراعم المتجددة (< 81%) على نفس وسط النمو الذي يفتقر إلى (ANA) مع عدم وجود تغييرات شكلية في جميع النباتات التي تم تجديدها في المخبر. نقترح التكاثر الدقيق الذي يمكن أن يكون مسارًا واعدًا للحفاظ على تراث العنب.

تم الإبلاغ عن العديد من فيروسات في الجزائر وخاصة في مجمع الموارد الوراثية للعنب، لذلك فإنه يمثل تحديًا كبيرًا لتطهير هذه الأنواع من العنب من العدوى الفيروسية قبل أي برنامج تربية. ركزت دراستنا على تطوير العلاج الكيميائي والعلاج الحيوي على أصناف العنب الأصلية التي جمعت من محطتي للأصول الوراثية للعنب التابعة للمعهد التقني لأشجار الفواكه والكروم. تم اختبار جميع أصناف العنب هذه بواسطة DAS-ELISA وقد تم تأكيد وجود GLRaV-3 في جميع العينات، وتم تأكيد GFLV في بعض العينات المستخدمة لتطهير الصحي. بعد 8 أسابيع من الزراعة المخبرية من أطراف النبتة في وسط معدل (MS<sub>3</sub> , MS'<sub>3</sub>) ويحتوي على ريبافيرين (20 مل / لتر) ومستخلص الثوم بأربعة تراكيز مختلفة بمستوى كبير 100،75،50 و25%، كشف تحليل DAS-ELISA أنه تم القضاء تمامًا على (< 100%) GLRaV-3 و على GFLV بنسب متفاوتة (< 60%).

**الكلمات المفتاحية:** التكاثر الدقيق، *Vitis vinifera* L.، أصناف العنب الأصلية، GLRaV-3، GFLV، العلاج الكيميائي، العلاج الحيوي.

## Résumé

Les cépages autochtones de vigne (*Vitis vinifera* L.) sont principalement des régions montagneuses du Nord de l'Algérie, composés de populations actuellement dispersées spontanément. Le développement de la viticulture passe par la préservation de ces cépages adaptés aux conditions pédoclimatiques locales. Ces derniers possèdent des caractères organoleptiques et nutritionnelles appréciables, sont actuellement menacés et en régression considérable.

La micropropagation constitue une méthode rapide et efficace pour régénérer, multiplier et conserver ces ressources. Dans ce contexte et face à cette problématique, s'inscrit notre étude qui vise à développer un protocole de régénération efficace de trois cépages autochtones (Ahmar Bou Ameer, Tadhith et Lakhzine) via le microbouturage afin de sauvegarder et de préserver cette ressource génétique. Indépendamment des cépages testés, la meilleure propagation des pousses a été obtenue sur milieu Murashige et Skoog (1962), modifié en teneur d'azote totale, forme de nitrate et calcium apporté (MS<sub>3</sub>), additionné de 2,66 µM de BAP et 0,054 µM d'ANA. Le meilleur taux d'enracinement des pousses régénérées (> 81%) a été atteint sur le même milieu de culture dépourvu d'ANA avec absence de changements morphologiques de tout les vitro-plants. Nous suggérons la micropropagation qui pourrait être une voie prometteuse pour la préservation de notre patrimoine viticole.

Plusieurs virus de la vigne ont été signalés en Algérie et en particulier dans la collection de matériel génétique de la vigne, c'est donc un grand défi d'assainir ces cépages de l'infection virale avant tout programme de sélection. Notre étude s'est concentrée sur le développement de la chimiothérapie et la phytothérapie sur des cépages autochtones collectés à partir des deux collections de vigne de l'ITAF. Tous ces cépages ont été testés par DAS-ELISA et la présence de GLRaV-3 a été confirmée dans tous les échantillons, le GFLV a été confirmé aussi dans certains cépages utilisés pour l'assainissement. Après 8 semaines de culture *in vitro* des pointes de pousses dans un milieu MS modifié (MS<sub>3</sub> et MS'<sub>3</sub>) contenant respectivement de la Ribavirine (20mg/l) et d'extrait d'ail à quatre concentrations différentes (100, 75, 50 et 25 %), le test DAS-ELISA a révélé que le GLRaV-3 était totalement éliminé (100%) et le GFLV à un taux significatif (> 60%).

**Mots clés** : Micropropagation, *Vitis vinifera* L., Cépages autochtones, GLRaV-3, GFLV, Chimiothérapie, Phytothérapie

## Summary

The native grapevine (*Vitis Vinifera* L.) is varieties mainly from the mountainous regions of northern of Algeria, made up of populations of cultivars that are currently spontaneously dispersed and small. Its development requires the preservation of indigenous grape varieties adapted to local soil and climatic conditions.

Micropropagation is a fast and efficient method to regenerate, multiply and conserve these grapevine resources. In this context and in the face of this problematic, fits our study, which aims to develop an efficient regeneration protocol of three indigenous grape varieties (Ahmar Bou Aneur, Tadhith and Lakhzine) via micro-cuttings in order to safeguard and preserve this genetic resource. Regardless of the grapevine tested, the best shoot propagation was obtained on Murashige and Skoog (1962) medium, modified in total nitrogen content, nitrate form and added calcium (MS<sub>3</sub>), added with 2.66 µM 6-benzylaminopurine ( BAP) and 0.054 µM 1-Naphthalene-Acetic Acid (ANA). The best rooting rate of regenerated shoots (> 81%) was achieved on the same growth medium lacking ANA with no morphological changes in all regenerated plants *in vitro*. We suggest micropropagation, which could be a promising path for the preservation of our grapevine patrimony.

Several grapevine viruses were reported in Algeria and especially in grapevine germplasm collection, therefore it is a great challenge to free these varieties from virus infection before any breeding programs. Our study focused on the development of chemotherapy on autochthonous varieties collected in ITAF germplasm grapevine. All these varieties were tested by DAS-ELISA and the presence of GLRaV-3 was confirmed in all samples, GFLV was also confirmed in some grape varieties used for sanitation. After 8 weeks of shoot tips *in vitro* culture in a modified MS medium (MS<sub>3</sub> and MS'3) containing respectively Ribavirin and garlic extract at four different concentrations (100, 75, 50 and 25%), DAS-ELISA test revealed that GLRaV-3 was eliminated (100%) and GFLV to a significant rate (> 60%).

**Keywords :** Micropropagation, *Vitis vinifera* L., Autochthonous grape varieties, GLRaV-3, GFLV, Chimochemistry, Phytotherapy.

## *Dédicaces*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

*A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles*

*Et à ceux à qui je dois tant*

*A mes Chères parents : Omssaad et Ismail pour leur*

*Amour indéfini et leur support continu,*

*A mon mari Benalia : qui a toujours été à mes côtés,*

*Qui n'a jamais cessé de m'encourager*

*et m'aider dans mes études,*

*Vos affections sans limites, m'a accompagnées tout le long de la réalisation de*

*Cette œuvre, je ne pourrai jamais vous en remercier assez.*

*A mes adorables enfants : Yacine, Manel et Yasser ;*

*A toute ma famille Aiter et Haddad sans exception ;*

*A mes chères Sœurs pour leur soutien moral ;*

*Merci pour tous*

*Nassima*

## REMERCIEMENTS

Au terme de cette étude, il m'est agréable d'exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et le mener à bien, je tiens à remercier :

Chaleureusement et profondément ma Directrice de thèse, Mme CHAOUIA Cherifa, Professeur à l'Université de Blida 1, pour sa confiance, ses apports scientifiques et logistiques dans le suivi et la réalisation de cette étude de recherche qui ont été d'une qualité supérieure et fructueuse. Ses conseils m'ont permis de mener à bien ce sujet de recherche. Merci pour votre encouragement, votre sympathie et votre humour réconfortant ;

Du fond de cœur mon Co-directeur de thèse, Mr LEHAD Arezki, Maître de Conférences "A" à l'ENSA d'Alger qui m'a encadré tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de ses connaissances scientifiques et de ses conseils. Je lui exprime ma profonde gratitude pour l'aide qu'il m'a fourni pour la réalisation de ce travail, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, votre bonne humeur et pour tous vos conseils professionnels mais aussi humains qui m'ont permis de m'encourager, d'avancer et de réaliser cette thèse ;

Madame BENRBIHA Fatma Zohra, Professeur à l'université de Blida 1 de me faire l'honneur d'accepter de présider le jury de ce mémoire ;

Mesdames SAHRAOUI Faiza, Maître de Conférences "A" à l'université de Blida 1, Madame MEZIANE Malika, Maître de Conférences "A" à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef et Monsieur BOUSALHIH Ibrahim, Maître de Conférences "A" à l'Université de Khemis-Miliana de bien vouloir accepter d'examiner ce travail.

Avec une immense gratitude Mr HADDAD Benalia, Maître de Conférences "B", à l'ENSA d'Alger, collègue, ami et mari qui m'a beaucoup aidé par sa patience, ses qualités professionnelles et scientifiques et m'a accompagné tout en long de ces années pour accomplir cette belle ouverture de thèse, qu'il trouvera ici mes parfaits respects et grâces ;

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'aide précieuse de certains collègues que je tiens à les remercier aussi :

Vivement et avec une grande gratitude Mme TAIBI Amina, Ingénieur d'Etat et Master 2 en phytotechnie, laboratoire de culture *in vitro* de l'ITAF pour sa fraternité, son

encouragement, son aide, sa grande sympathie, son sérieux et sa disponibilité tout en long de ce travail ;

Mme BRANECI Souhila, Ingénieur d'application en phytotechnie, laboratoire de culture *in vitro* de l'ITAF, pour son aide et sa sympathie ;

Mme MEZIANI Samia, Master en phytopathologie, laboratoire du CNCC pour son aide et de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Mme BOUKHALFA Salima, Ingénieur et Master 2 en Phytopathologie, Département expérimental de l'ITAF pour son aide et ses encouragements.

Mme Ait Yahia Hakima, Ingénieur d'application en phytopathologie, laboratoire de virologie de l'ITAF, pour son aide.

Mesdames LOUTA Bakhta, Directrice de la station expérimentale de Tighennif, Mascara et BENYOUCEF Kheira, Directrice de la station expérimentale de Benchicao, Médéa de l'ITAF, pour leurs aides ;

Monsieur OTSMAN Mohammed, Propriétaire de la Pépinière viticole, de m'avoir accueilli avec plaisir dans son exploitation et de m'avoir aidé, soutenu, je le remercie vivement pour tous ses conseils prodigués, ses connaissances scientifiques, sa gentillesse, sa joie de vivre et sa disponibilité sans limite.

Un énorme merci à tous les collègues sans oublier Mr Rabhi Mohand Larbi, Directeur Général de l'ITAF.

A ceux et celles qui m'ont aidé, conseillé, ouvert leurs portes et ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail de recherche , qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude et mes remerciements.

# TABLE DES MATIERES

ملخص

RESUME

ABSTRACT

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

INTRODUCTION	16
PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
CHAPITRE 1. GÉNÉRALITÉS SUR LA VIGNE	21
1.1. Origine et distribution géographique	21
1.2. Caractéristiques botaniques et classification	23
1.3. Importance de la viticulture dans le monde	25
1.4. Importance de la viticulture en Algérie	27
1.4.1. Répartition géographique de la viticulture	29
1.4.2. Production de plants	30
CHAPITRE 2. REPRODUCTION DE LA VIGNE	32
2.1. Multiplication conventionnelle	32
2.1.2. Multiplication sexuée	32
2.1.3. Multiplication asexuée ou végétative	32
2.2. Nouvelles techniques de multiplication	33
2.2.1. Micropropagation	33
2.2.1.1. Microbouturage	37
2.2.1.1.1. Conditionnement et préparation des plants mères	38
2.2.1.1.2. Établissement de la culture et prolifération des bourgeons	38
2.2.1.1.3. Rhizogénèse	40
2.2.1.2. Embryogénèse somatique	41

CHAPITRE 3. ASSAINISSEMENT DE LA VIGNE	43
3.1. Maladies à virus	44
3.1.1. Enroulement foliaire de la vigne	44
3.1.1.1. Enroulement foliaire de type 3 (GLRaV-3)	45
3.1.1.1.1. Taxonomie et propriétés physiques	45
3.1.1.1.2. Symptômes	46
3.1.1.1.3. Transmission du virus	48
3.1.2. Court-noué (GFLV)	48
3.1.2.1. Taxonomie	49
3.1.2.2. Symptômes	50
3.1.2.3. Transmission du virus	50
3.1.3. Méthodes de détection	51
3.1.3.1. Biologiques	52
3.1.3.2. Microscopie optique	54
3.1.3.3. Microscopie électronique	54
3.1.3.4. Sérologiques	54
3.1.3.5. Moléculaires	55
3.1.4. Méthodes de lutte	56
3.1.4.1. Sélection sanitaire	56
3.1.4.2. Lutte culturale	56
3.1.4.3. Lutte chimique	57
3.1.4.4. Lutte biologique	57
3.1.4.5. Lutte génétique	58
3.1.4.6. Culture de méristèmes	58
3.1.4.7. Thermothérapie	59
3.1.4.8. Cryothérapie	60
3.1.4.9. Chimiothérapie	60
3.1.4.10. Phytothérapie	61

PARTIE 2. MATERIEL ET METHODES	61
Objectif du travail de la recherche	61
2.1. Site expérimental	64
2.2. Matériel végétal utilisé	64
2.3. Préparation des pieds-mères	66
2.4. Microbouturage de la vigne	69
2.4.1. Désinfection en conditions septiques	69
2.4.2. Stérilisation	70
2.4.3. Milieux de culture	72
2.4.4. Etablissement de la culture	73
2.4.4.1. Phase d'initiation	73
2.4.4.2. Phase de multiplication et d'élongation	74
2.4.4.3. Phase d'enracinement	74
2.4.4.4. Phase d'acclimatation	76
2.4.5. Paramètres évalués	77
2.5. Assainissement de la vigne	78
2.5.1. Symptomatologie	78
2.5.2. Chimiothérapie	80
2.5.2.1. Technique de culture	80
2.5.2.2. Mise en culture des explants	80
2.5.2.3. Suivi de la culture	81
2.5.3. Phytothérapie	82
2.5.3.1. Technique de culture	83
2.5.3.2. Mise en culture des explants	84
2.5.3.3. Suivi de la culture	84
2.5.3.4. Analyse immuno-enzymatique	86
2.5.4. Paramètres évalués	85
2.5.5 Expression des résultats	86

PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION	86
3.1. Evaluation sanitaire des pieds-mères	86
3.2. Désinfection du matériel végétal	87
3.3. Microbouturage	88
3.3.1. Phase d'établissement de la culture	88
3.3.2. Phase de multiplication	90
3.3.2.1. Taux de reprise des explants	90
3.3.2.2. développement des pousses	91
3.3.2.3. Longueur des pousses	91
3.3.2.4. Efficacité de l'Elongation des Pousses	91
3.3.2.5. Nombre de feuilles	92
3.3.3. Phase d'enracinement	94
3.3.3.1. Induction racinaire	94
3.3.3.2. Taux d'enracinement, nombre et longueur moyenne des racines	96
3.3.3.3. Génotype	96
3.3.3.4. Efficacité de l'élongation racinaire	97
3.3.4. Phase d'acclimatation	98
3.3.4.1. Taux de réussite à l'acclimatation	98
3.4. Discussion	100
3.4.1. Désinfection du matériel végétal	100
3.4.2. Formulation minérale du milieu de culture développé	101
3.4.2.1. Débourrement des explants	102
3.4.2.2. Multiplication des pousses régénérées	102
3.4.2.3. Rhizogénèse	103
3.4.2.3.1. Milieu avec auxine	103
3.4.2.3.2. Milieu sans auxine	103
3.4.2.4. Acclimatation	104
3.5. Assainissement	105
3.5.1. Chimiothérapie	105
3.5.1.1. DAS ELISA des plants régénérées <i>in vitro</i>	105
3.5.1.2. Effet de la Ribavirine sur la phytotoxicité des explants	106
3.5.1.3. Aspect chlorotique des plantes régénérées	107
3.5.1.4. Effet de la Ribavirine sur la prolifération des pousses	108

3.5.2. Phytothérapie	111
3.5.2.1. DAS ELISA des plants régénérées <i>in vitro</i>	112
3.5.2.2. Effet de l'extrait d'ail sur la prolifération_et l'élongation des pousses	113
3.6. Discussion	116
3.6.1. Effet de la Ribavirine	116
3.6.1.1. Sur l'assainissement viral	116
3.6.1.2. Sur la phytotoxicité des pousses	117
3.6.1.3. Sur la prolifération des pousses	117
3.6.2. Effet de l'extrait d'ail	118
3.6.2.1. Sur l'assainissement viral	118
3.6.2.2. Sur la phytotoxicité des pousses	119
3.6.2.3. Sur la croissance des pousses	119
CONCLUSION GENERALE	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
APPENDICES	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1.1. Carte de répartition de la vigne spontanée	21
Figure 1.2. Arbre taxonomique des Vitacées	23
Figure 1.3. Carte des principaux pays viticoles dans le monde	25
Figure 1.4. Répartition des zones viticoles algérienne	29
Figure 1.5. Principales voies de la micropropagation	35
Figure 1.6. Micrographie électronique de particules de GLRaV-3	44
Figure 1.7. Symptômes de l'enroulement viral	46
Figure 1.8. Vecteurs de l'enroulement foliaire de type 3 (GLRaV-3)	47
Figure 1.9. Techniques d'indexage	51
Figure 1.10. Symptômes de la maladie du court-noué de la vigne	52
Figure 2.1. Multiplication sous serre des pieds-mères des cépages autochtones	62
Figure 2.2. Cépages autochtones utilisés pour le microbouturage	63
<u>Figure 2.3.</u> Cépages autochtones utilisés pour la chimiothérapie	63
<u>Figure 2.4.</u> Collections des cépages autochtones de vigne	65
<u>Figure 2.5.</u> Etapes d'obtention des plants mères	66
Figure 2.6. Elevage des plants des cépages sains de 6 mois sous serre	68
Figure 2.7. Elevage des plants des cépages infectés de 6 mois sous serre	
Figure 2.8. Désinfection du matériel végétal sous conditions septiques	70
Figure 2.9. Stérilisation sous hotte à flux laminaire horizontal	71
Figure 2.10. Etablissement de la culture	73
Figure 2.11. Multiplication et élongation des pousses	74
Figure 2.12. Etapes de préparation des pousses pour l'enracinement	75
Figure 2.13. Pré acclimatation des plantules	76
Figure 2.14. Symptômes observés sur les cépages étudiés	79
Figure 2.15. Etapes de l'établissement de la culture	81
Figure 2.16. Préparation des milieux de culture enrichis d'extrait d'ail	83
Figure 3.1. Débourrement après 5 jours de la mise en culture	89
Figure 3.2. Débourrement après 20 jours de la mise en culture	90

Figure 3.3. Effet de l'interaction cépage/ milieu sur le taux de débourrement	91
Figure 3.4. Effet de l'interaction (cépage/ milieu) sur la SEE	93
Figure 3.5. Aspect des pousses après 2 subcultures des cépages étudiés	94
Figure 3.6. Aspect des pousses de cépages étudiés après 60 jours d'élongation sur le milieu MS <sub>3</sub>	95
Figure 3.7. Aspect des racines des cépages étudiés sur milieu pourvu d'ANA	96
Figure 3.8. Aspect des racines des cépages étudiés sur milieu dépourvu d'ANA	97
Figure 3.9. Effet de l'interaction (Génotype/ Mode/ Milieu) sur la prolifération des racines des génotypes étudiés	98
Figure 3.10. Aspect des plantules après 1 mois d'acclimatation	100
Figure 3.11. Aspect des plantules après 3 mois d'élevage	100
Figure 3.12. Dessèchement des explants traités par la Ribavirine	108
Figure 3.13. Aspect chlorotique des feuilles de pousses régénérées sur milieu pourvu de 20 mg/l de Ribavirine	109
Figure 3.14. Effet des traitements avec (AR) et sans Ribavirine(SR) sur le nombre moyen de pousses régénérées <i>in vitro</i> des cépages étudiés après 8 semaines de culture.	110
Figure 3.15. Culture de pousses sur milieu MS <sub>3</sub> pourvu de la Ribavirine	111
Figure 3.16. Aspect des explants du cépage Ferrana sur milieu MS <sub>3</sub> pourvu d'extrait d'ail	112
Figure 3.17. Effet de différentes concentrations d'extrait d'ail sur l'élongation <i>in vitro</i> des pousses des cépages étudiés après 8 semaines de culture	115
Figure 3.18. Régénération de pousses du cépage Amghar en milieu MS' <sub>3</sub> , pourvu des 4 concentrations d'extrait d'ail	116

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Évolution des superficies, productions et rendements de la vigne en Algérie	27
Tableau 2.1. Cépages autochtones étudiés	64
Tableau 2.2. Composition minérale de la solution nutritive de KNOP	67
Tableau 2.3. Stérilisation des explants	71
Tableau 2.4. Composition des macroéléments des milieux (MS, MS1, MS2, MS4 et QL-MS)	86
Tableau 2.5. Composition en minéraux et oligo-éléments de l'ail (/100g de matière fraîche)	91
Tableau 3.1. Analyses du DAS ELISA des pieds-mères	87
Tableau 3.2. Taux de contamination et de dessèchement	88
Tableau 3.3. Assainissement par chimiothérapie après 8 semaines	106
Tableau 3.4 : Taux de phytotoxicité des explants cultivés sur milieu pourvu de 20mg/l de la Ribavirine	108
Tableau 3.5 : Assainissement par phytothérapie	113

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

CIDES : Centre d'Information et de Développement Expérimental en Serriculture

BAP : 6-benzylaminopurine

AIB : Acide Indole Butyrique

ANA : Acide 1-Naphtalène Acétique

AIA : Acide Indol acétique

GLRaV-3 : Grapevine Leafroll-Associated Virus

GFLV : Grapevine Fanleaf Virus

GVA : Grapevine : Grapevine virus A

GRSPaV : Grapevine rupestris stem pitting-associated virus

TRSV : Tobacco Ringspot Virus

GPGV : Grapevine Pinot gris virus

TMV : Tobacco Mosaic Virus

AH : Ahmar Bou Ameer (cépage de vigne autochtone algérien)

LK : Lakhzine (cépage de vigne autochtone algérien)

TD : Tadhith (cépage de vigne autochtone algérien)

ABK : Aberkane (cépage de vigne autochtone algérien)

BEK : Bezoul El Khadem (cépage de vigne autochtone algérien)

MF : Muscat de Fandouk (cépage de vigne autochtone algérien)

F : Ferrana (cépage de vigne autochtone algérien)

AG : Amghar (cépage de vigne autochtone algérien)

ISEM : Immuno Sorbent Electron Microscopy

RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction

KNOP : Milieu nutritif, Inventé par le chimiste allemand Johann Knop (1817-1891), il contient 4 éléments K (potassium), N (azote), O (oxygène), P (phosphore).

## INTRODUCTION

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est l'une des espèces des régions à climat tempéré, ayant une place socio-économique importante dans le bassin méditerranéen. Sa culture est bien ancrée dans les traditions des populations paysannes algériennes, elle existait depuis l'antiquité bien avant la colonisation française (1 ; 2).

L'Algérie possède une biodiversité très riche de cépages parmi les plus anciens du bassin méditerranéen. Leroux en 1894, décrit dans une étude ampélographique l'existence d'une gamme variétale constituée de 45 cépages indigènes dont 25 à raisins rouges et 20 blancs (3).

Les cépages autochtones représentent une ressource considérable de gènes pour la reproduction de la vigne. Cependant, ce matériel végétal inexploré n'est pas à l'abri d'érosion génétique en raison de l'introduction massive depuis les années 1970 de cépages dites à haut potentiel génétique (2). Ces ressources viticoles sont malheureusement menacées et exposées aux risques de déperdition progressive suite à la méconnaissance de leurs qualités agronomiques et technologiques (4). Cela, peut éventuellement conduire inexorablement à une perte ou à une diminution irréversible de la diversité du pool génétique avec tous les risques de vulnérabilité aux changements climatiques, aux attaques par les ravageurs et aux introductions de nouvelles maladies notamment virales (5).

Le développement de cette culture passe par la préservation des cépages autochtones adaptés aux conditions pédoclimatiques locales. Ces derniers possèdent des caractères organoleptiques appréciables (6). Cependant, la micropropagation constitue une méthode rapide et efficace pour régénérer, multiplier et conserver ces ressources viticoles en voie de disparition et/ou menacées par les aléas biotiques et abiotiques (7 ; 8 ; 9), réduisant ainsi les risques d'extinction et la perte de variabilité génétique. La propagation *in vitro* pour la conservation de la diversité génétique de la vigne (*Vitis vinifera* L.) a été largement appliquée et de

nombreux cépages ont été régénérés avec succès (10). La micropropagation est une méthode bien établie permettant de produire des plants génétiquement stables (11).

Le succès de la micropropagation de la vigne semble être influencé principalement par la composition minérale et hormonale du milieu de culture (12). En effet, il s'est avéré que la majorité des milieux à base de Murashige et Skoog (13) modifiés et développés par les auteurs (14 ; 15 ; 16 ; 17), ne donnent pas de résultats satisfaisants sur les cépages autochtones. De plus, de nombreux auteurs recommandent l'utilisation de la BAP (en raison de son efficacité sur la multiplication (18 ; 19 ; 20 ; 21) et l'ANA pour l'enracinement (20 ; 21 ; 22 ; 23). En outre, plusieurs études ont illustré les difficultés inhérentes à l'application d'un schéma directeur de micropropagation *in vitro* universel et soulignent l'hétérogénéité des réponses obtenues (24 ; 25).

Aujourd'hui la grande partie des vignobles sont sujets à des maladies dégénératives, les plus importantes sont d'origines fongiques comme des dépérissements de type Esca (26), Eutypiose (27 ; 28) et BDA (Black Dead Arm) (29), des pourritures grises causées par *Botrytis cinerea* (30). Ainsi les infections virales notamment les maladies de court-noué et l'enroulement foliaire (31).

La vigne est infectée par environ 70 espèces virales distinctes appartenant à un large éventail de groupes taxonomiques (17 familles et 27 genres) (32). Certains de ces virus étaient largement répandus dans toutes les régions viticoles du monde.

L'enroulement foliaire de la vigne est une maladie complexe qui fait partie de ces maladies virales. Elle est la plus dommageable virose sur raisin (33 ; 34 ; 35 ; 36). D'autres auteurs rapportent qu'une infection totale par GLRaV-3 d'un vignoble de Merlot peut causer des pertes de l'ordre de 2 406 dollars/ ha (37).

En plus de l'enroulement, d'autres virus notamment le GFLV, le GFkV ont été détectés dans plusieurs collections de matériel génétique de vigne (38 ; 39).

Les techniques d'assainissement sont utilisées pour l'élimination des virus néanmoins, elles présentent des difficultés dans leur mise en œuvre (40).

La culture du méristème, souvent combinée avec la thermothérapie est largement appliquée pour éliminer les virus de vigne (41 ; 42 ; 43).

De nouvelles méthodes d'assainissement ont été développées afin de protéger le patrimoine génétique viticole notamment, la chimiothérapie, la cryothérapie et la phytothérapie. Récemment, plusieurs virus dont le GLRaV-3, GVA et GRSPaV ont été éliminés des vignobles infectés par embryogenèse somatique (44).

Actuellement, l'élimination des maladies virales des plantes par des produits chimiques a pris une place dans le contrôle des cultures, cependant, un de ces agents antiviraux étant la Ribavirine, utilisée aussi dans le milieu de culture *in vitro* a fait l'objet de plusieurs travaux de recherches portant sur l'élimination des virus de la vigne (45 ; 46 ; 47).

D'autres procédés d'assainissement viral, la phytothérapie avec l'utilisation des extraits végétaux révèle des promesses considérables pour l'agriculture et les cultures économiquement importantes. Les extraits d'ail et les huiles auraient des propriétés antimicrobiennes significatives (48).

En tenant compte de ces problèmes et aux difficultés rencontrées dans la régénération et l'assainissement viral, nous avons jugé utile de mettre en place cette étude de recherche qui vise :

- La vérification et le contrôle des cépages autochtones multipliés sous serre prélevées des pieds mère des 2 collections viticoles nationales installées à l'ITAF et qui se trouvent au niveau des stations expérimentales de Benchicao (Médéa) et de Tighennif (Mascara).
- Parmi les cépages contrôlés par sérologie, 3 d'entre eux (Ahmar Bou Ameer (AH) ; Tadhith (TD) et Lakhzine (LK)) étaient sains et ont fait l'objet d'une régénération par microbouturage.
- Un essai d'assainissement par chimiothérapie à base de Ribavirine a été effectué sur 3 cépages avérés atteints de viroses notamment le GLRaV-3 et le GFLV après contrôle, il s'agit de : Aberkane (ABK) ; Bezoul El Khadem (BEK) ; Muscat de Fandouk (MF) et le cépage Farana (F) atteint seulement par le GLRaV-3.
- Un autre essai d'assainissement par phytothérapie à base d'extrait d'ail (*Allium sativum* L.) a été effectué sur 2 cépages atteints de GLRaV-3 seulement, il s'agit de : Amghar (AG) et Farrana (F).

# PARTIE 1

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1. GENERALITES SUR LA VIGNE

#### 1.1. ORIGINE ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est d'origine très ancienne, la théorie la plus largement répandue est celle de (50 ; 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55), rapportant que les premières traces de ceps de vigne remontent de 8000 à 6000 ans avant JC et sont découvertes dans la Transcaucasie (Géorgie, Arménie et Azerbaïdjan). En outre, des travaux de biologie moléculaire ont confirmé que les nouveaux cépages proviennent majoritairement du sud-ouest asiatique (56). Depuis ces régions, la culture de la vigne s'est répandue dans tous les pays de l'Inde jusqu'à l'Europe occidentale (57).

Des analyses chimiques de contenants céramiques archéologiques, attestent que la fabrication de vin a eu naissance depuis le Néolithique, au VI<sup>e</sup> millénaire avant JC., à Shulaveri-Gora (Georgie) et à Hajji Firuz Tepe, dans le nord des montagnes du Zagros (Iran) (54). Il semble que les plus anciens pépins de morphologie domestique ont été découverts dans la grotte chalcolithique d'Arménie dans le sud-est arménien vers 4000 avant JC. (58).

Par ailleurs, les premiers procédés de vinification ont été retrouvés en Egypte, datant de 3000 ans avant JC (59). Ensuite, la Grèce par le biais des échanges commerciaux avec l'Egypte, adopta la culture de la vigne et la vinification vers 2000 ans avant JC (60), plus tard, la viticulture a été introduite par les Grecs dans toute la méditerranée (61). Cependant, l'expansion de l'Empire Romain a permis de répandre la culture de la vigne dans le Sud d'Italie, Espagne et la France où ils furent les premiers à donner des noms à des cultivars de vigne.

L'extension de l'Islam en Afrique du Nord, l'Espagne et au Moyen-Orient a joué également un rôle important dans la propagation de la vigne de table (62) (figure 1.1). Actuellement, la vigne a franchi les frontières de la méditerranée pour se répartir sur tous les continents. En effet, depuis le XVe siècle, et la découverte de nouveau monde, l'aire de la culture de la vigne s'est étendu au continent Américain, Afrique de sud, Australie, Nouvelle Zélande, bordure Nord-Ouest du pacifique (figure1.2) (63).

L'Espagne et le Moyen-Orient jouent également un rôle capital dans la propagation de la vigne de table (62) (figure 1.1).

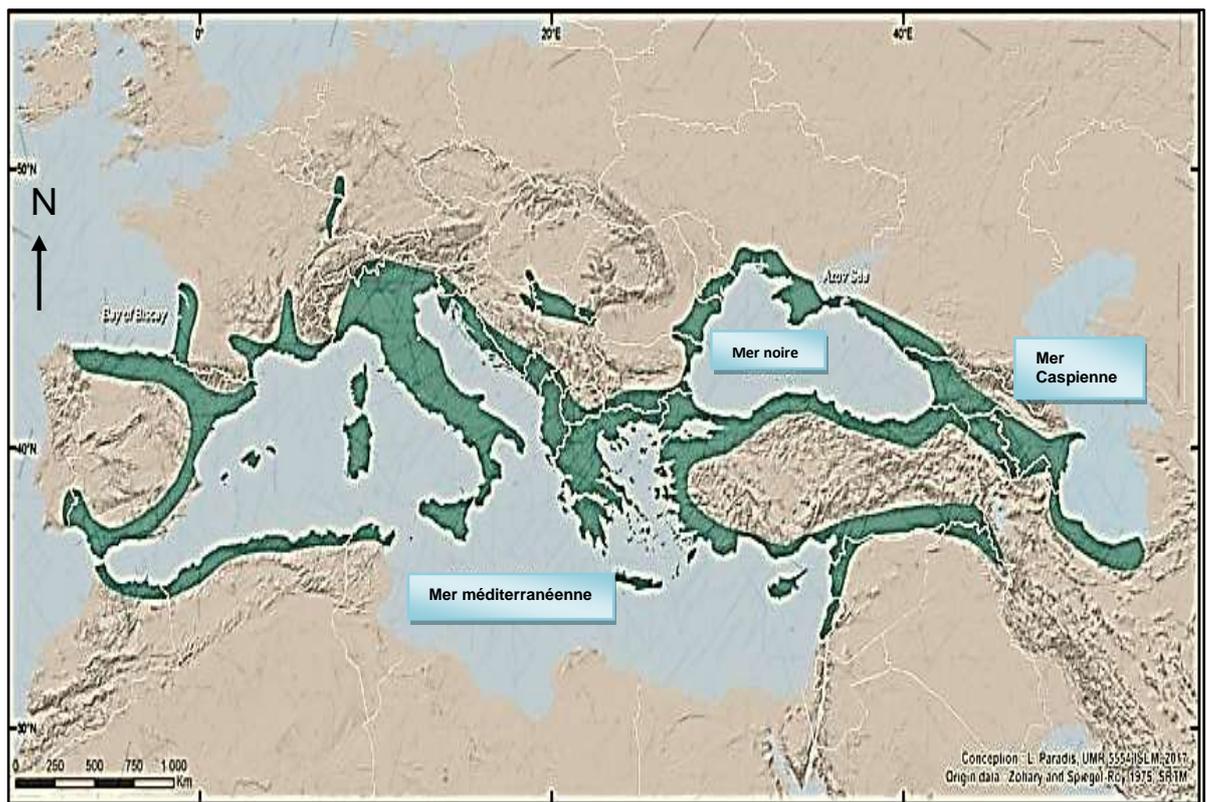


Figure 1.1. Carte de répartition de la vigne spontanée (64)

En Algérie la culture de la vigne remonte à l'antiquité (65). Le sol algérien portait des vignes spontanées où lambrusques appartenant toute à *Vitis vinifera* L. Cette richesse est due à la longue histoire de l'Algérie et au brassage de peuples et de diverses civilisations (Phénicienne, Romaine, Arabo-islamique et Latine) (66).

Des fouilles exécutées en 1925 à El-Harrach (Alger) ont mis à jour dans les formations de remblaiements de l'oued El-Harrach, des débris de vigne, de feuilles desséchées et pépins, nettement identifiés (67). Aussi, elle constituait un élément du paysage botanique de l'Algérie (2). La viticulture proprement dite entreprise en vue de la production de vin date en Algérie de l'époque phénicienne qui ont introduit des cultivars orientaux, il s'agit des cépages croisés avec les formes spontanées autochtones qui ont donné naissance à d'autres nouveaux cépages autochtones.

Le patrimoine viticole Algérien s'est enrichi de cépages provenant d'autres pays comme l'Espagne, l'Italie et la Turquie et ce durant la période du moyen-âge au 19<sup>ème</sup> siècle. Le vignoble était localisé dans les zones de montagne et dans les jardins périurbains où sa culture était destinée pour la consommation de ces raisins frais ou transformés.

La colonisation française en 1830 avait orienté cette culture vers la production vinicole dès 1860 suite à la crise phylloxérique qui avait ravagé le vignoble Français et européen, pour atteindre son apogée en 1939 avec une superficie de 400 000 ha et une production de l'ordre de 17 millions d'hl et de ce fait, l'Algérie était le 4<sup>ème</sup> pays producteur de vin après la France, l'Italie, l'Espagne et le premier exportateur de vin au monde (68).

## 1.2. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES ET CLASSIFICATION

La vigne est un spermaphyte, angiosperme qui appartient à la famille des vitaceae. Les pieds sont des lianes à tiges plus ou moins sarmenteuses, possédant des vrilles opposées aux feuilles (69). La vigne comprend 19 genres (70), parmi eux le genre *Vitis* présente une importance agronomique majeure, comportant deux sous genres (71) (figure 1.2).

Le sous-genre *Muscadinia*, originaire des Etats-Unis renferme une seule espèce cultivée (*Muscadinia rotundifolia*) connue par sa résistance à un grand nombre d'agents pathogènes (72).

Le sous-genre *Euvitis*, "vraies vignes", comprend une soixantaine d'espèces diploïdes ( $2n=38$ ) qui sont classés en quatre groupes, en fonction de leurs origines géographiques (74)

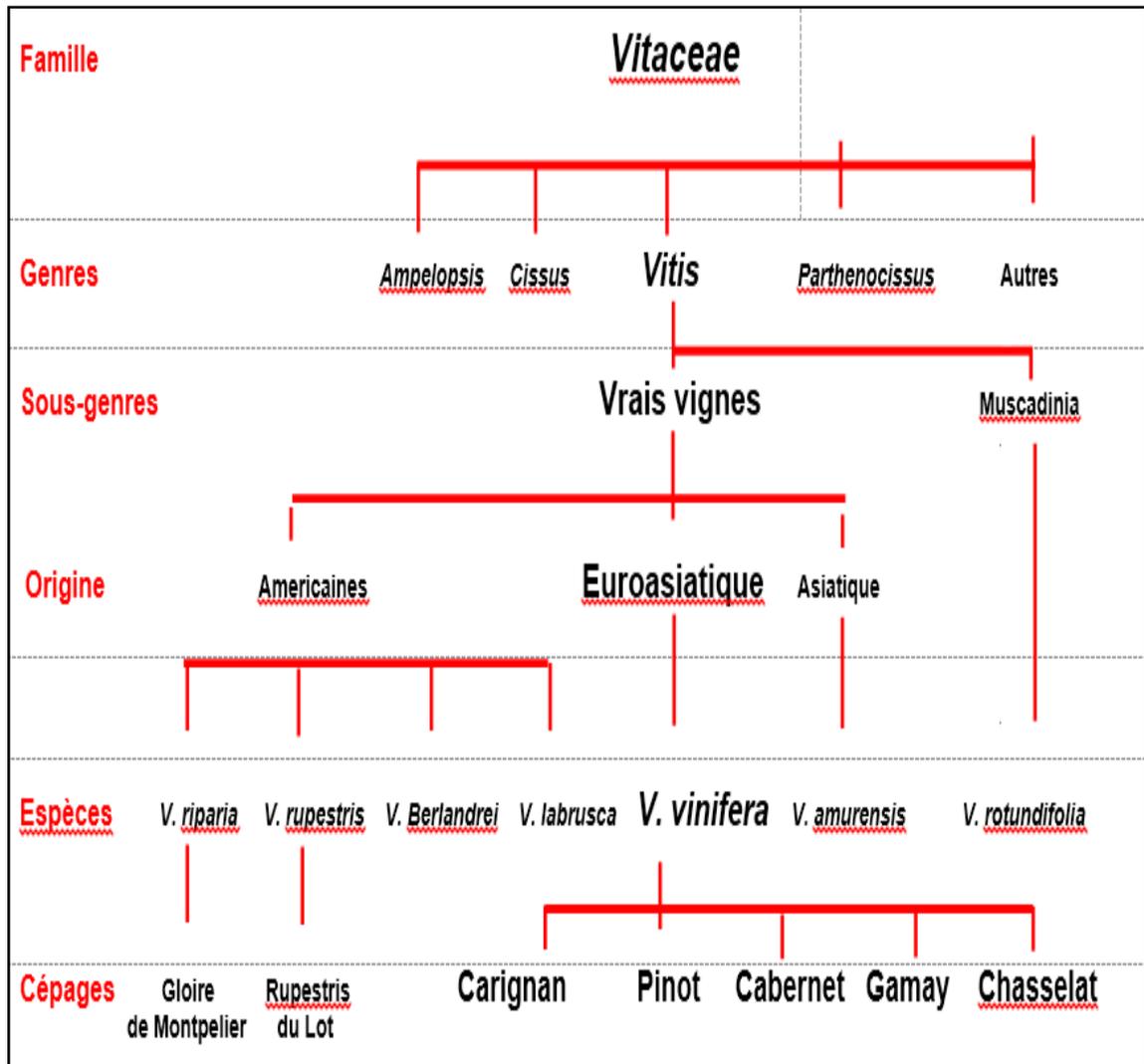


Figure 1.2. Arbre taxonomique des Vitacées (74)

- Les vignes américaines rassemblent une vingtaine d'espèces principalement, les espèces *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris* et *V. berlandieri* (75). Ces espèces présentent une bonne résistance aux ravageurs notamment au puceron phylloxera. Elles sont utilisées comme porte-greffes ou croisées avec *V. vinifera* pour produire des hybrides, leur introduction en Europe était à l'origine de l'apparition de l'oïdium (1845) (76), le phylloxera (1868) (77), le mildiou (1878) et le black rot (1885).

- Les vignes asiatiques comprennent une dizaine d'espèces non résistantes aux maladies d'origine américaine (oïdium, mildiou, black-rot...), mais résistantes au froid, raison pour laquelle certains cépages (*Vitis amurensis*) sont utilisés dans les programmes de croisement interspécifiques (70).

-Les vignes tropicales, moins communes ;

-La vigne européenne représentée par une seule espèce *Vitis vinifera* L., qui réunit la plus part des cépages de *Vitis* dans le monde. On distingue chez cette espèce la sous espèce *silvestris* (les Lambrusques), qui correspond à la vigne spontanée avant l'invasion de phylloxera, la sous espèce *vinifera* correspond à la vigne cultivée (73) où elle regroupe plusieurs cépages dont les fruits sont comestibles (raisin de table, raisin sec et raisin de cuve).

### 1.3. Importance de la viticulture dans le monde

La production mondiale de raisins frais est de 78 millions de tonnes avec 49,4 millions de tonnes destinée à la transformation (raisin de cuve) ; 27,3 millions de tonnes (raisin de table) et 1,3 millions de tonnes (raisin de séchage) correspondant à une superficie globale de 7,4 millions d'hectares. Durant la campagne 2017 /2018, la Chine est le premier pays producteur mondial de raisin, avec 11,7 millions de tonnes (15% de la production mondiale de raisins), suivie de l'Italie (8,6 millions de tonnes), des États-Unis (6,9 millions de tonnes), de l'Espagne (6,9 millions de tonnes) et de la France (5,5 millions de tonnes) (78). Les pays européens, restent prédominants au terme de production (37%) et de superficie viticole (45 %) soit 3,2 millions d'hectares (figure 1.3) (79).

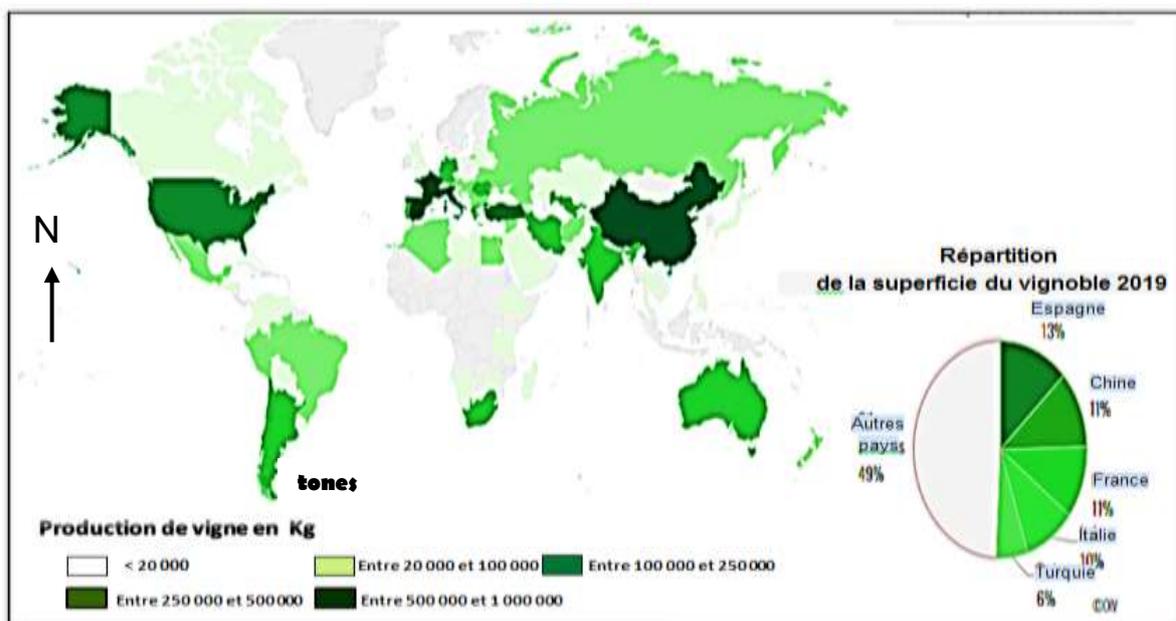


Figure 1.3. Carte des principaux pays viticoles dans le monde (79)

Le rythme d'évolution du vignoble mondial subit des variations, ceci peut être expliqué par les politiques viticoles très diversifiées selon les continents et les pays (arrachages et plantations).

Durant la période 2000/2003 l'augmentation des superficies viticoles mondiales estimée à 160 000 ha est due principalement aux nouvelles plantations dans les pays de l'hémisphère sud aux Etats-Unis (USA), Algérie, Egypte, Iran, Turquie et en Syrie.

Durant la période 2004/2011, la baisse des superficies viticoles mondiales estimée à 367 000 ha est dû au programme d'arrachage principalement dans les pays européens qui représentaient 57,5% de la superficie viticole mondiale en 2009.

Durant la période 2011/2014, la hausse de la superficie viticole mondiale estimée de 106 000 ha est dû principalement à la poursuite du développement de l'Argentine, du Chili, du Pérou et la poursuite de la croissance du vignoble américain et de la Turquie. La Chine qui étant le principal moteur de la croissance globale de la superficie des vignobles asiatiques.

Durant la période 2014/2016, on observe une chute des superficies viticoles mondiales depuis 2014, induite notamment par la diminution de la superficie viticole en Turquie, en Iran, aux États-Unis et au Portugal.

Durant la période 2016/2019, le vignoble mondial s'est stabilisé depuis 2016, principalement grâce aux programmes de restructuration des vignobles mis en place dans l'UE, qui s'élèvent pour la cinquième année consécutive à 3,2 Millions d' ha.

La production de raisins a une tendance d'une hausse (+1%/an) depuis 2000, malgré la baisse de la superficie du vignoble (-3%). Ceci est dû principalement à la hausse des rendements, suite aux progrès enregistrés par l'amélioration continue des techniques viticoles. Malgré une chute de production de 11% en 2018, la Chine conserve sa place de leader mondial avec 11,7 millions de tonnes, soit 15% de la production mondiale de raisins, suivie de l'Italie (8,6 millions de tonnes), des États-Unis (6,9 millions de tonnes), de l'Espagne (6,9 millions de tonnes) et de la France (5,5 millions de tonnes).

La production mondiale de vins (hors jus et moûts) en 2019 s'élève à 260 millions d'hl et 292,3 millions d'hl, avec une diminution de 34 millions d'hl par rapport à celle de 2018, qui représente 12% de perte (79).

En 2019, la production du vin de l'union européenne (UE) a atteint 156 millions d'hl, soit 60% de la production vinicole mondiale. Cette dernière a connu une diminution de 14,23% (25,9 millions d'hl) par rapport à 2018. Cette baisse est le résultat des conditions météorologiques défavorables dans les principaux pays producteurs européens.

Avec ses trois pays viticoles l'Italie (47,5 millions d'hl), la France (42,1 millions d'hl) et l'Espagne (33,5 millions d'hl), l'UE est considérée comme le premier producteur et exportateur du vin (79).

#### 1.4. Importance de la viticulture en Algérie

La viticulture est parmi les principales essences fruitières avec près de 7% de la superficie arboricole et viticole, soit une superficie de 68 649 ha (80). De ce fait, elle occupe une place de choix dans le processus de la relance économique dans notre pays, occupant ainsi, la quatrième place à l'échelle nationale après l'olivier, le palmier dattier et les agrumes.

Actuellement, la viticulture est très diversifiée en Algérie, elle est constituée de cépages à raisin de table (48 310 ha), à raisin de cuve (20 294 ha) et de variétés de porte greffes (62 ha) (81). Elle se répartie sur l'ensemble de territoire, nous la retrouvons aussi bien en plaine qu'en montagne, ainsi que sur les coteaux, la steppe et les zones oasiennes.

En 2019, la production du raisin table est de 5 037 396 qx pour une population de 43 000 000 habitants, ce qui représente une consommation de 11,71 kg/habitant (81).

Le vignoble de table est dominé par les cépages de saison, il se localise dans les zones littorales, les plaines antérieures et la montagne. La vigne de table se caractérise essentiellement par, une dominante de la conduite en extensif, une fluctuation des rendements, une courte période de présence sur le marché, avec une gamme de cépages peu diversifiée et insuffisamment adaptée à la demande du marché (80).

Au cours de la dernière décennie 2010/2019 la production moyenne de raisin de table est de 4 649 703,2 qx (tableau 1.1) (81).

Tableau 1.1 : Évolution des superficies, productions et rendements de la vigne en Algérie (81).

Année	Vignes de table			Vignes de séchage			Vignes de cuve		
	Sup (ha)	Prd (qx)	Rdt(qx/ha)	Sup (ha)	Prd (qx)	Rdt (qx/ha)	Sup (ha)	Prd (qx)	Rdt(qx/ha)
2010	41 511	4743 285	114,3	67	1 620	24,2	27 646	860 715	31,1
2011	45 338	3 499 150	77,7	69	1 650	23,9	26 929	525 120	19,5
2012	42 638	4 683 466	109,8	58	1 720	29,7	25 973	697 404	26,9
2013	42 981	4 829 497	112,4	38	860	22,6	25 545	878 043	34,4
2014	41 709	4 373 117	104,8	38	860	22,6	24 670	806 373	32,7
2015	42 231	4 925 640	116,6	36	700	19,7	23 712	754 350	31,8
2016	42 692	4 991 321	116,9	31	500	16,4	23 123	721 694	31,2
2017	42 067	5 000 922	118,9	00	00	00	22 415	664 865	29,7
2018	41 036	4 413 238	107,55	00	00	00	21 620	616 547	28,52
2019	41 382	5 037 396	121,7	00	00	00	20 294	460 933	22,7

Les données relatives à l'évolution du vignoble national montrent que pour la vigne de table, la production, les rendements à l'hectare et la superficie ont enregistré une évolution assez remarquable. Durant la campagne 2018/2019, elle a connu des fluctuations et le niveau de la production de raisin de table a régressé, cet état est dû aux aléas climatiques. Toutefois, la tendance annuelle de la production de raisin de table est à la hausse depuis 2012 à l'exception des années 2014 et 2018 suite aux conditions météorologiques défavorables principalement d'ordre hydriques d'un climat méditerranéen caractérisé par de faibles pluies qui sont irrégulièrement réparties au cours de l'année et souvent absentes durant les périodes critiques (besoins de la plante).

L'évolution de la vigne de cuve a connu une diminution des superficies à partir de 2010 (27 642 ha) pour arriver à 20 294 ha en 2019. Toutefois, la tendance annuelle de la production de raisin de cuve est à la baisse depuis 2014 suite aux arrachages. Cependant, le rendement à l'hectare a connu lui aussi de grandes variations, Il a atteint 19,5 qx/ha en 2011 et a plafonné 34,4 qx/ha en

2013 du fait que la vigne de cuve se localise essentiellement dans les wilayas de l'Ouest algérien (Mascara, Relizane, Tlemcen, et Mostaganem) qui se caractérisent par un climat semi-aride.

Le raisin sec a connu une dégradation depuis 2017 suite à l'abandon de sa culture par les viticulteurs, et ce malgré l'incitation des pouvoirs publics.

#### 1.4.1. Répartition géographique

La viticulture algérienne est concentrée exclusivement au niveau de 13 principales wilayas réparties dans les régions centre, Ouest et Est du pays dont six se trouvant au centre et à l'Ouest occupant une superficie de 50 682 ha soit 73,05% de la superficie total national : Boumerdes , Ain-Temouchent, Mostaganem, Mascara, Médéa et Sidi Bel Abbas.

Ces six wilayas représentent, à elles seules, plus des 2/3 de la viticulture algérienne avec des superficies respectives de 13 873 ; 12 671 ; 10 796 ; 4 746 ; 4 371 et 4 225 ha. La superficie des vignobles restants est représentée par les wilayas de Tipaza (2 685) ; Alger (2 381) ; Tlemcen (2 286) ; Tizi Ouzou (1 275) ; Chlef (1 240) et Blida (1 169 ha).

Malgré, le soutien accordé par l'Etat à travers des différents programmes de développement agricole (PNDA, FNRD), on assiste à une diminution des superficies viticoles qui passent de 69 224 ha (2009) à 68 649,27 (2019) soit (0,83%) due aux arrachages de vieux vignobles (Figure 1.4)

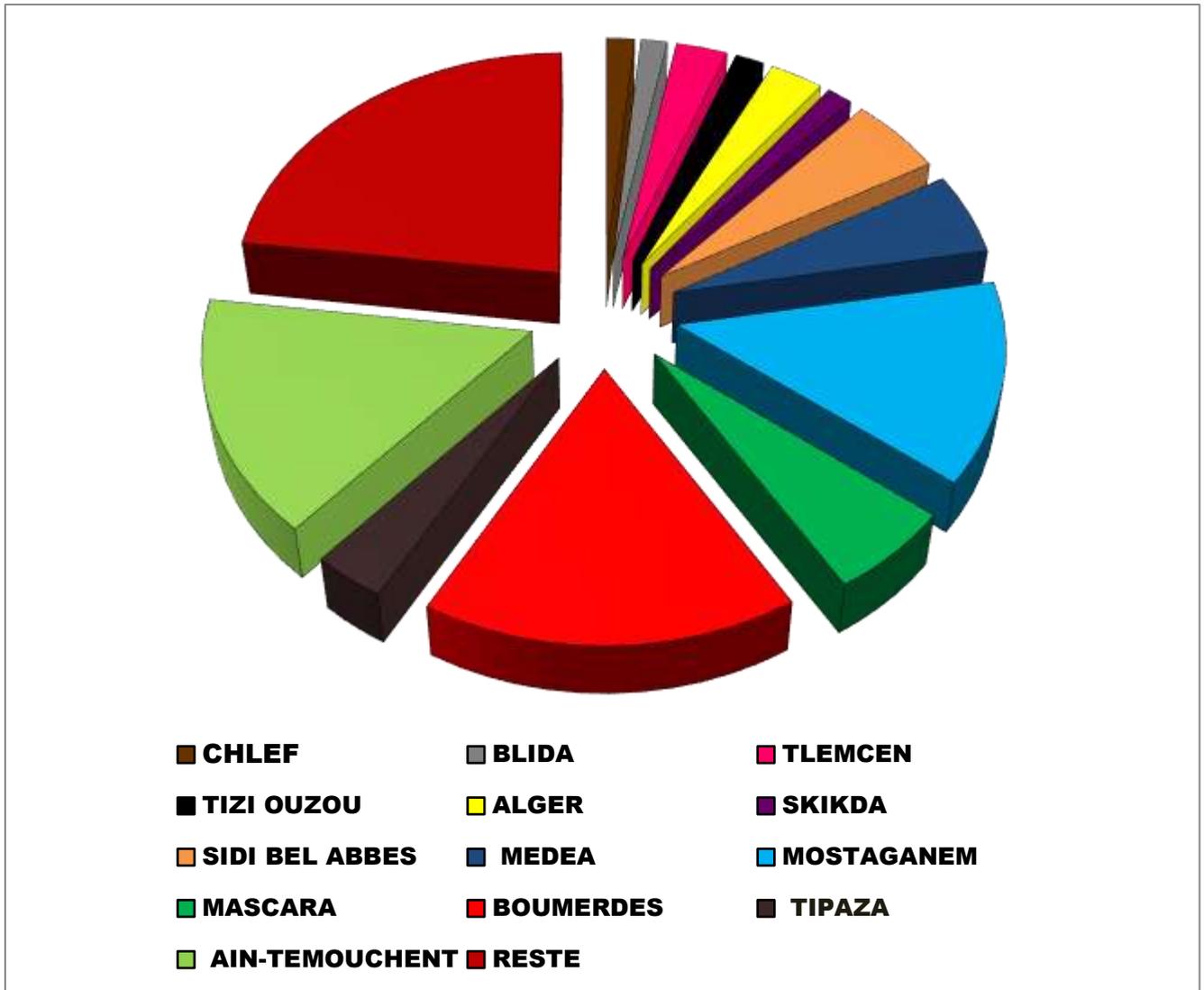


Figure 1.4. Répartition des zones viticoles algériennes (81)

#### 1.4.2. Production de plants

Durant la campagne 2018/2019, la production de plants de vigne a atteint 1 527 804, répartis comme suit : 1 198 509 plants racinées soit 78,45 %, 327 845 en greffées soudées (21,46 %) et le reste sont produit par pied franc soit 1 450 ce qui représente 0,09 % de la quantité totale de plants produits pour la même période.

Les principaux cépages multipliés sont : Cardinal, Alphonse Lavallée, Muscat d'Alexandrie, Sybel (Dabouki) et le Dattier de Beyrouth (81).

La description des cépages de vigne cultivés en Algérie ont fait l'objet de nombreuses études, il s'agit souvent des cépages introduits, des cépages autochtones et de nouvelles introductions ou croisés.

## Chapitre 2

### REPRODUCTION DE LA VIGNE

La vigne peut être reproduite par plusieurs techniques regroupées en deux modes de multiplication : conventionnelle et biotechnologique

#### 2.1. MULTIPLICATION CONVENTIONNELLE ET BIOTECHNOLOGIQUES

La vigne peut être multipliée conventionnellement par voie sexuée ou asexuée.

##### 2.1.1. Multiplication sexuée

Ce mode de multiplication se fait par semis. Tous les cépages qui existent à l'échelle mondiale sont le résultat de la domestication par voie sexuée de la vigne sous la pression sélective de l'utilisation humaine. Une plante issue de la germination d'un pépin a ses propres caractéristiques et uniques, même si elle est obtenue par autofécondation. Un pépin de vigne d'un cépage cultivé ne donne pas intégralement les caractères génétiques du plant mère (82). Ce procédé de multiplication est utilisé par les sélectionneurs et les améliorateurs dans les programmes d'amélioration génétique pour la création de nouveaux cépages et de portes greffes (83).

##### 2.1.2. Multiplication asexuée ou végétative

La multiplication végétative est un mode de reproduction permettant la production de nouveaux individus génétiquement identiques à l'individu parental à partir d'un seul organisme de la même espèce. Cependant, la multiplication végétative est possible grâce à la présence des méristèmes et la capacité d'en produire de nouveau, par la dédifférenciation des cellules vivantes (84).

Il s'agit d'un mode de multiplication qui génère de nouveaux individus possédant le même génome et sont identiques à la plante mère. Cette multiplication peut être réalisée par différentes méthodes traditionnelles (bouturage, marcottage, provignage et greffage).

Après la crise phylloxérique, le procédé de multiplication de *Vitis vinifera* L. par voie végétative a été abandonné et remplacé par l'association des deux

individus (greffon et porte greffe), ce greffage est réalisé sur table ou en plein champs (85).

## 2.2. TECHNIQUE DE MULTIPLICATION BIOTECHNOLOGIQUES

Selon Augé *et al.* (86) et Kozlowsky *et al.* (8), les techniques modernes de culture *in vitro* fournissent des outils efficaces qui sont considérés comme alternatives aux méthodes classiques de multiplication des plantes. Cependant, l'explant est choisi en fonction de la technique utilisée, de l'objectif visé et de l'espèce (87).

Une attention particulière a été accordée aux vitro-méthodes comme des alternatives viables pour la multiplication en masse, de qualité, d'homogénéité génétique et des plantes indemnes de maladies de nombreuses cultures commerciales (88).

### 2.2.1. Micropropagation

La culture tissulaire est la pratique de micropropagation *in vitro* la plus appliquée aux espèces ligneuses. La faisabilité de cette technique dépend du taux de multiplication des pousses au cours des subcultures et du pourcentage d'enracinement des pousses régénérées (89 ; 90).

La multiplication de la vigne a progressivement intégré les techniques de propagation *in vitro* dès les années 1960. Ainsi, la vigne a fait l'objet de recherches pour le développement d'un protocole idéal de multiplication *in vitro* afin d'accélérer la production des plantes issues de programme de sélection clonale et sanitaire en utilisant la culture tissulaire soit, des méristèmes préexistants soit des tissus sans structure méristimatique préexistante (91 ; 92).

Le succès de la micropropagation des cépages de vigne a été signalé dès les années 1970 jusqu'au début des années 1990, en utilisant différents explants tels que, les apex des pousses, les bourgeons axillaires, les méristèmes (93 ; 94 ; 95 ; 96). Singh *et al.* (97) soulignent que l'aspect commercial n'a pas été résolu dans la plupart des cas avec des problèmes de vitrification et de formation de cals à la base des pousses.

C'est au cours des années 2000, que la technique de multiplication rapide *in vitro* des cépages a été développée, elle a permis l'obtention de milliers de plantules par an (97).

Cette nouvelle technologie a été appliquée pour des génotypes de *Vitis* en utilisant la culture des ovules non fécondés (98), culture d'anthers (99), pollen (100), vrilles (101), culture de méristèmes d'apex apicaux, des microboutures de pousses axillaires ou par formation de bourgeons adventifs (93 ; 94 ; 95 ; 102 ; 96).

En effet, la micropropagation présente de nombreux avantages comparativement aux autres techniques de multiplication classiques, permettant de pallier aux problèmes de régénération des espèces chez lesquelles les semences sont rares, ou présentant des difficultés de germination et/ou dont les techniques de bouturage ou de greffage sont inapplicables, ce qui a conduit à une plus grande diversité des plantes commercialisées (103).

Cette technique prometteuse est utilisée comme méthode de multiplication en masse, elle permet l'obtention d'un nombre considérable de plantes génétiquement identiques à la plante mère à partir d'un seul individu. Ces plantes régénérées sont généralement conformes mais parfois des variations somaclonales sont induites entraînant une variabilité génétique qui dépend du mode de multiplication appliqué (90).

Selon, George Sherrington (104), la technique de micropropagation emprunte deux principales voies de multiplication (figure 1.5) :

- La première, dite "voie de propagation conforme", utilise des tissus méristématiques (méristème, apex ou bourgeons axillaires) conduisant à des individus pourvus du même stock d'information héréditaire que la plante dont ils sont issus, potentiellement capables de donner suite, au développement normal, un individu conforme à la plante mère (105). A partir d'un explant, cette voie aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogénèse) et de racines (rhizogénèse) (84).

Pour la caulogénèse, il s'agit à la fois de l'initiation et du développement du :

- Bourgeon terminal dérivant de la gemmule de l'embryon ;

- Bourgeon axillaire produit généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige ;
- Bourgeon adventif formé à partir d'organes différenciés de la plante (entre nœuds, tubercules, racines) comme, il peut y avoir des cellules méristématiques en masses restées ou bien d'une différenciation de certaines cellules (106) ;
- Bourgeon néoformé *in vitro* qui peut apparaître sur l'explant initial ou sur le cal qui peut être considéré comme un cas particulier de bourgeon adventif (107). Ce dernier, est induit sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne le produit pas habituellement dans les conditions naturelles (106 ; 108 ; 84).

La rhizogénèse est le phénomène d'organogénèse le plus impliqué dans la multiplication végétative. Son étude tient de plus en plus compte des interactions complexes de facteurs endogènes des tissus, mais elle reste dominée par le problème de régulation hormonale et en particulier par le taux des auxines (84).

-La seconde voie, dite "propagation non conforme", c'est l'ensemble de techniques qui utilisent des tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons) afin d'aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines (organogénèse), ou des structures ressemblant aux embryons zygotiques (embryogénèse somatique).

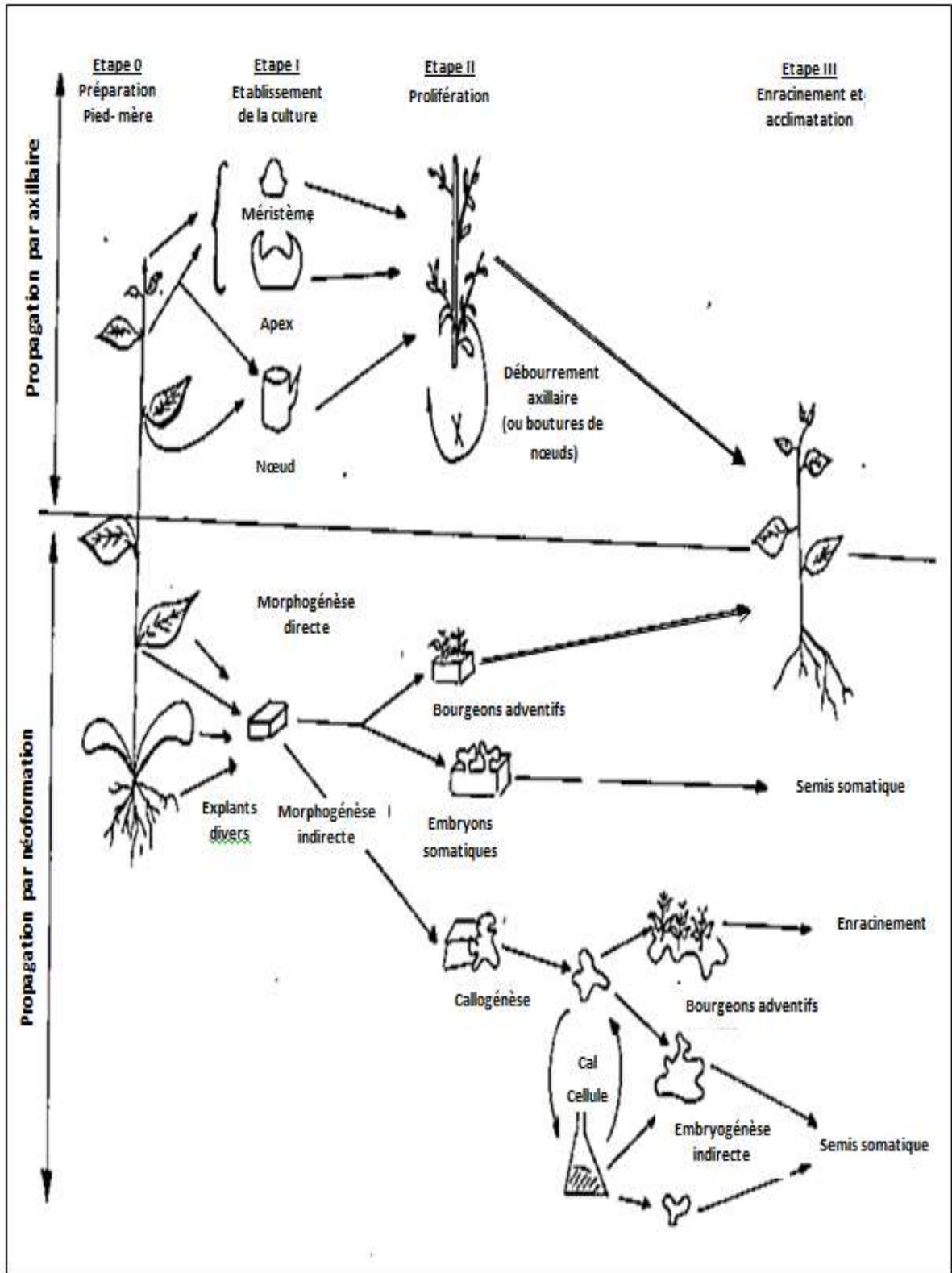


Figure 1.5. Principales voies de la micropropagation (104)

### 2.2.1.1. Microbouturage

La technique de microbouturage utilise des tissus différenciés, elle est potentiellement capable de donner suite, au développement normal d'un individu ou des cellules génétiquement très stables (89 ; 107).

Cette technique offre la possibilité de reproduire des plantules authentiques à la plante mère soit par la stimulation des capacités naturelles de multiplication végétative de l'espèce, ou par l'induction d'une organogénèse de bourgeons et de racines (86).

Elle permet la régénération et la production en masse efficace et rapide de tout génotype (109). Elle constitue non seulement une alternative aux méthodes de multiplication conventionnelles mais présente aussi un outil important pour les programmes de sélection (110 ; 111).

Pour maintenir la conformité génétique de clones des ligneux, la mise en culture des microboutures, puis la stimulation des bourgeons axillaires et leur prolifération, constituent la méthode la plus généralement appliquée en propagation *in vitro* (112).

Selon Skiada *et al.* (10), la prolifération des bourgeons axillaires est considérée comme réussie et plusieurs protocoles de propagation *in vitro* de la vigne ont été mis au point, permettant ainsi une multiplication rapide de plantes. Il s'est avéré que les plantes auto-enracinées *in vitro* sont plus vigoureuses et plus résistantes aux maladies (113).

En effet, l'avantage d'utiliser la culture de bourgeons nodaux ou la prolifération des bourgeons axillaires est que la pousse régénérée *in vitro* s'est déjà différenciée *in vivo*, seuls un allongement des pousses et une différenciation des racines sont nécessaires pour établir une plante complète. Le taux de multiplication peut théoriquement atteindre un million de plantules à partir d'un seul explant en une seule année (105). Alors que, pour la prolifération des bourgeons axillaires, on peut s'attendre à une production d'environ 75 millions par an (114), cette technique représente donc sans contexte un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes (115 ; 107).

Généralement, la régénération des bourgeons axillaires de vigne peut être obtenue à partir de l'organogénèse des pousses (116 ; 117 ; 118 ; 119 ; 120).

Pour la croissance et le développement de ces pousses régénérées *in vitro*, les explants mis en culture passent par plusieurs phases :

#### 2.2.1.1.1. Conditionnement et préparation des plants mères

Elle consiste à préparer les pieds-mères, cette étape primordiale sert à garantir l'état nutritionnel et sanitaire des plantes mères, qui devraient être dépourvues de toute carence en minéraux et sans aucun stress hydrique (121).

Au cours de cette phase, les pieds-mères doivent être cultivés en conteneurs sous conditions contrôlées, irrigués, fertilisés et traités de façon appropriée pour les principaux agents pathogènes externes (103).

#### 2.2.1.1.2. Etablissement de la culture et prolifération des bourgeons

L'établissement de cultures indemnes de contaminants est parfois difficile à réussir. Les contaminants de surface peuvent être éliminés par des agents désinfectants tels que l'hypochlorite de calcium ( $\text{CaOCl}$ ) ou de sodium ( $\text{NaOCl}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) (122), cependant les microorganismes endogènes, notamment les bactéries sont en générale difficile à éliminer. La prolifération de ces contaminants n'apparaissent parfois qu'après plusieurs subcultures et entraînent ainsi des pertes considérables.

La mise en culture par bourgeon axillaire de 0,5 à 1,0 cm de long ont été utilisés pour la micropropagation rapide de vigne à partir de matériel végétal jeune (123 ; 94 ; 95 ; 124 ; 125 ; 126) et adulte (127 ; 128). Hartl et Males (129), ont rapporté que pour l'établissement de la culture, les boutures vertes à un nœud des plants de vigne étaient les plus réactives. L'établissement de la culture *in vitro* privilège l'emploi des organes végétatifs les plus jeunes, leur état juvénile favorise plus de possibilités de régénération (89).

Cependant, tous les cépages de vigne ne donnent pas des réponses similaires pour une composition de milieu spécifique. Par ailleurs, le degré de réponse de *Vitis* vis à vis le microbouturage dépend de plusieurs facteurs particulièrement du génotype, de l'environnement (130) et de la composition hormonale et minérale du milieu de culture (131 ; 19 ; 132 ; 111).

Plusieurs chercheurs en culture de bourgeons axillaires des cépages de *Vitis* lors de l'établissement de la culture ont utilisé le milieu de Murashige et Skoog (13) (133 ; 134 ; 135 et 136 ; 137). Les chercheurs continuent de formuler une composition minérale de milieu de culture définie pour la multiplication *in vitro* des cépages de vigne qui nécessitent une formulation de base différente qui ont utilisé les milieux MS modifiés (138 ; 15 ; 16 ; 17 ; 10 ; 20 ; 139 ; 111). En effet, lors de la phase de l'établissement de la culture, Gray et Benton (96) ont constaté que le taux de prolifération des pousses sur milieu MS était meilleur que celui à demi-réduit ( $\frac{1}{2}$  MS) ou sur le milieu WPM (138).

Ces milieux de base sont enrichis en vitamines et régulateurs de croissance en particulier la cytokinine BAP en raison de son efficacité sur la multiplication de cépages de vigne (18 ; 20 ; 21 ; 19) et l'auxine ANA sur l'enracinement (20 ; 21 ; 22 ; 23).

En effet, selon Harris et Stevenson (94), la BAP favorise la plus grande multiplication des pousses pour des concentrations allant de 5 à 10  $\mu\text{M}$  alors que la kénitine et la N-diméthylallyl-adénine (2ip) sont moins efficaces (95 ; 140). La croissance des pousses a été induite par la BAP seule et en combinaison avec une auxine (141).

L'apport de l'ANA à faibles concentrations (0,5  $\mu\text{M}$ ) dans le milieu de l'établissement de la culture a amélioré le taux de prolifération de pousses (124). Par contre, Novak et Jovova (95), ont rapporté que l'ajout de l'AIB au milieu enrichis de BAP a inhibé la prolifération des bourgeons axillaires suite à la formation de cals. Cependant, une prolifération maximale de pousses a été obtenue lors de l'ajout de 2mg/l de BAP et de Zeatine en combinaison (142 ; 143).

L'efficacité du milieu de culture est étroitement liée au génotype, ce qui nécessite l'adaptation de la composition minérale du milieu au cépage à multiplier. Cette différence serait probablement liée à des exigences nutritionnelles variables au sein de génotype.

En effet, selon certains auteurs, la modification de la formulation minérale du milieu de culture a permis une augmentation du taux de multiplication de pousses allant de 40 à 350% selon le génotype (15). Cette modification réside dans la substitution de chlorure de calcium par le nitrate de calcium, l'élimination de

l'iodure de potassium et la diminution de la concentration en sulfate de manganèse de 5 à 100  $\mu\text{M}$ .

La nature de la source carbonée influence aussi les réponses au microbouturage de la vigne. Généralement, l'hydrate de carbone le plus employé est le saccharose, bien que ses effets dépendent du cépage (144). Cette source carbonée est utilisée à la concentration de 3% (145 ; 146).

#### 2.2.1.1.3. Rhizogénèse

La rhizogénèse de certains cépages de vigne ne nécessitent pas toujours la présence d'auxines (147 ; 117). L'ajout d'AIA, ANA ou AIB pour des concentrations allant de 0,1 à 2 mM était suffisant pour l'induction primordiale des racines. Cependant, quel que soit la formulation minérale du milieu de culture MS l'enracinement a été induit pour les cépages de vigne. En effet, son emploi à pleine concentration (145),  $\frac{3}{4}$  MS (148),  $\frac{1}{2}$  MS (95 ; 149 ; 150) ou  $\frac{1}{4}$  MS (Harris et Stevenson, 1982) ont donné des résultats satisfaisants pour l'enracinement des pousses régénérées *in vitro*, mais la croissance des racines était améliorée lorsque la concentration en sels était réduite dans le milieu (124 ; 147 ; 151).

La concentration du saccharose dans le milieu est généralement réduite à 1% et la BAP est remplacée par l'ANA (124). En outre, l'utilisation d'une concentration d'ANA supérieure ou égale à 0,3 mg/l produit, un gros cal basal avec un nombre réduit de racines. Par contre les faibles concentrations d'ANA augmentent le nombre de racines. En effet, Chee et Pool (124) a obtenu un enracinement maximum pour les 15 cépages de la vigne étudiés à une concentration d'ANA de 0,4  $\mu\text{M}$ .

L'initiation racinaire a été obtenue sur un milieu MS réduit de moitié (Macro éléments) avec ou sans l'apport d'ANA (0,5  $\mu\text{M}$ ) selon les cépages, les pousses qui ont induit les racines sur milieux enrichi d'ANA sont transférées sur le même milieu sans hormones (152). Par ailleurs, Gok *et al.* (153) rapportent que l'enracinement a été obtenu pour tous les cépages avec un milieu sans auxines.

### 2.2.1.2. Embryogenèse somatique

L'embryogénèse somatique est l'aptitude des cellules végétales à se développer en embryons somatiques, c'est un processus par lequel les cellules somatiques se développent en plantes (154). Cette technique permet de produire une grande quantité de plantes qui peuvent être génétiquement identiques à la plante mère (155 ; 156).

L'embryogenèse somatique est souvent obtenue sur un milieu de culture dit d'induction, connu pour sa richesse en auxines. Une fois l'induction faite, les cellules se divisent et se développent en cals nommés embryogénèse qui donnent naissance à des embryons somatiques (121).

La culture d'anthères était la plus utilisée pour la micro propagation par l'embryogenèse somatique chez plusieurs cépages de vigne.

Des cals ont été obtenus pour la première fois chez la vigne par Morel en 1944, plus tard, Jona et Webb (157), ont obtenu des cals à partir des pousses jeunes, pétioles et des vrilles sur vigne spontanée sans induire l'organogénèse.

La régénération de plantes de *Vitis vinifera* L. par embryogenèse somatique a été obtenue pour la première fois par Mullins et Srinivasan (158), sur des ovules non fécondés du cultivar Cabernet-Sauvignon et Hirabayashi *et al.* (99) sur culture d'anthères de *Vitis thumbergii*. Plus tard, Krul et Worley (159), ont obtenu des plantules de l'hybride interspécifique Seyval à partir de cals dérivés de la culture d'étamines. Rajasekaran et Mullins (119) ont obtenu des plantes de l'hybride interspécifique (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) par la culture d'anthères. De même, que sur *Vitis vinifera* (160 ; 161) et différents cultivars de porte-greffes (162).

Plusieurs travaux de recherches ont rapporté l'efficacité de l'embryogénèse pour la régénération de la vigne. En effet, plusieurs cépages de *Vitis vinifera* L. ont été régénérés via l'embryogénèse somatique à partir d'explants de différents tissus végétaux (163), Cependant, l'induction de l'embryogénèse somatique reste limitée par le génotype (164).

Cette technique de régénération a été utilisée non seulement pour le génie génétique (165), mais aussi comme méthode d'assainissement virale (166 ; 167).

Malgré, les succès obtenus pour certains cépages, l'embryogénèse somatique reste difficile à obtenir ou à élargir sur l'ensemble des cépages qui demeurent très récalcitrants à ce processus morphogénétique (168). Néanmoins, elle a été largement appliquée dans les programmes de la sélection. et sans conteste l'outil le plus approprié pour la transformation génétique (169 ; 170 ; 171 ; 172 ; 173 ; 174).

La micropropagation par embryogénèse somatique peut induire la variabilité génétique, ceci ne peut pas garantir le maintien de l'intégrité génétique des plants régénérés *in vitro*. Ainsi, l'embryogénèse somatique n'est pas souhaitable pour la multiplication à grande échelle de la vigne (174), malgré le taux important de multiplication des embryons et des plantules chez certains génotypes vue les mutations constatées.

## CHAPITRE 3

### ASSAINISSEMENT DE LA VIGNE

La culture de la vigne est sujette à certaines attaques de bioagresseurs principalement les ravageurs, champignons, bactéries, nématodes, phytoplasmes et virus ou viroïdes qui peuvent menacer la longévité du vignoble et touchent tous les organes, ces agents pathogènes entraînent des pertes inestimables de rendements (175) et perte de patrimoine génétique.

Parmi ces bio-agresseurs, les ravageurs constituent une sérieuse menace pour la vigne (176), ce sont principalement des insectes et des acariens dont le phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), est l'insecte le plus dangereux et redoutable (177).

Le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise, représentent les maladies fongiques les plus répandues (178). La maladie de Pierce causée par *Xylella fastidiosa* et la nécrose bactérienne due à *Xylophilus ampelinus* sont les deux principales maladies bactériennes qui affectent l'état sanitaire des vignobles dans le monde. La flavescence dorée est une maladie de quarantaine à phytoplasme incurable, transmis par la cicadelle (*Scaphoideus titanus*), vectrice provoquant des dégâts irréversibles (179).

Parallèlement, le vignoble est exposé à des maladies virales qui préoccupent de plus en plus, les viticulteurs. Il existe environ 70 virus appartenant à 17 familles et 27 genres, dont les plus néfastes et dommageables sont :

le complexe du bois strié, l'enroulement foliaire et la dégénérescence infectieuse (180).

### 3.1. Maladies à virus

La vigne est l'espèce ligneuse qui peut héberger le plus grand nombre de virus (181), Cependant, les maladies virales présentent une perte considérable avec une baisse de la longévité des ceps entraînant sont affaiblissement et l'altération de la qualité organoleptique et physique des raisins et une perte des récoltes. Les plus redoutables sont, le GLRaVs (grapevine leafroll-associated virus) et le GFLV (grapevine fanleaf virus) (182).

#### 3.1.1. Enroulement foliaire de la vigne

Les virus de l'enroulement de la vigne (GLRaVs) sont répandus mondialement, ils touchent principalement les vignobles méditerranéens et américains, transmis à la vigne par les cochenilles, famille (Coccoideae) (33). Les vignes américaines ne montrent pas de symptômes d'enroulement. Cependant, leur utilisation comme porte greffes pour pallier les dégâts causés par le *Phylloxera* ont été à l'origine d'une dissémination massive de virus de l'enroulement foliaire en Europe.

L'enroulement foliaire de la vigne semble connu depuis la fin du XIXème siècle, sous le terme d'antracnose déformante (Planchon, 1884), décrit de façon plus précise par Sanino (183) au début du XXème siècle, désigne l'enroulement sous le terme de "rossore" en Italie et de "rougeau" en France, caractéristique de rougissement prématuré des feuilles, leur enroulement, ainsi que l'incurvation des limbes vers l'intérieur (184).

L'enroulement foliaire peut être induit par un complexe de virus GLRaV-1 à 6 dont la majorité appartient à la famille des Closteroviridae, au groupe Closterovirus (185 ; 186 ; 187 ; 188 ; 189).

Le nombre de virus identifiés associés à l'enroulement de la vigne a doublé grâce aux différentes méthodes moléculaires dans les années 2000 (190). Le GLRaV-7 (191) et GLRaV-9 (192) ont été identifiés respectivement en Italie et aux États-Unis. Deux autres virus GLRaVs ont été identifiés en Grèce GLRaV-Pr et

GLRaV-De (193 ; 194) et un en Californie GLRaV-Car (195) et un treizième le GLRaV-13 (196).

#### 3.1.1.1. Enroulement foliaire de type 3 (GLRaV-3)

Le GLRaV-3, virus de l'enroulement foliaire est l'espèce prédominante dans les vignobles mondiaux, particulièrement dans le bassin méditerranéen (197 ; 33) et les pays viticoles émergents (Afrique du Sud, Argentine, Australie, Chili, Nouvelle-Zélande et Etats-Unis) (198).

##### 3.1.1.1.1. Taxonomie et propriétés physiques

Le GLRaV-3 appartient à la famille des Closteroviridae, genre Ampelovirus et membre du sous-groupe II (199). Il constitue l'espèce la plus répandue dans le monde (200).

Il possède le second plus long génome parmi les phytovirus (18 kb ou précisément 18798 nt) après celui du Citrus tristeza virus (CTV, 19 296 nt). Son génome possède 13 ORFs et les particules de GLRaV-3 ont une longueur approximative de 2000 nm (200).

Le GLRaV-3 présente des particules sous forme des corpuscules filamenteuses flexueuses de 1 800 × 12 nm (figure 1.6), montrant des bandes croisées distinctes, composé en hélice, chaque tour d'hélice renferme environ 10 sous-unités de protéines (201).

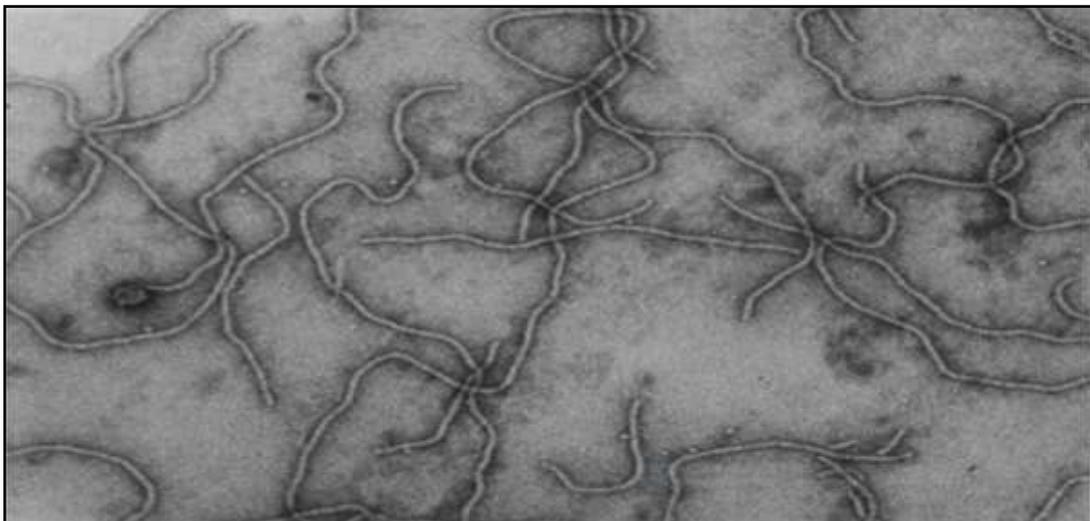


Figure 1.6. Micrographie électronique de particules de GLRaV-3 purifiées, colorées négativement (Kasdorf, 1990)

### 3.1.1.1.2. Symptômes

Le GLRaV-3 montre des symptômes qui peuvent varier considérablement selon la saison, le génotype et les conditions climatiques (202). Cependant, les cépages de *Vitis vinifera* atteints par l'enroulement viral se manifestent par des symptômes spécifiques (33). Certains cépages, ne manifestent aucun symptôme, comme le cas de quelques porte greffes et cultivars de *Vitis vinifera* (203), qui peuvent être une source de contamination à partir du quel le GLRaV-3 peut être transmis. Les travaux effectués sur le cépage Chardonnay a montré des symptômes caractéristiques du l'enroulement foliaire lors de la récolte, tandis que les cépages Thompson Seedless et Sauvignon blanc sont asymptomatiques, ce qui rend impossible la détection visuelle du virus (203).

Au début de la saison végétative, on observe des ponctuations sur les limbes dans la partie inférieure des sarments des ceps les plus touchés, des tâches rougeâtres sur les cépages rouges et le changement de coloration du vert au jaune blanchâtre sur les cépages blancs. Ces symptômes sont dus à la présence du virus dans les tissus phloémiens et l'accumulation des produits photosynthétiques dans les cellules végétales infectées (33).

Lors de la période végétative active, les parties colorées fusionnent et s'étendent pour occuper toute la surface du limbe, seules les nervures primaires et secondaires restent vertes (204), on assiste à un enroulement du limbe vers l'intérieur, caractéristique de l'enroulement foliaire. Par la suite, les rougissements ou jaunissements s'étendent de façon systémique vers la partie supérieure des rameaux. Cette coloration peut varier du rouge sang au rouge violacé selon les cépages (figure 1.7). Chez les cépages blancs, les variations de la couleur sont moindres, et c'est surtout l'association de l'aspect chlorotique, de l'épaississement du limbe et de l'enroulement des feuilles qui confirment sa présence (205).

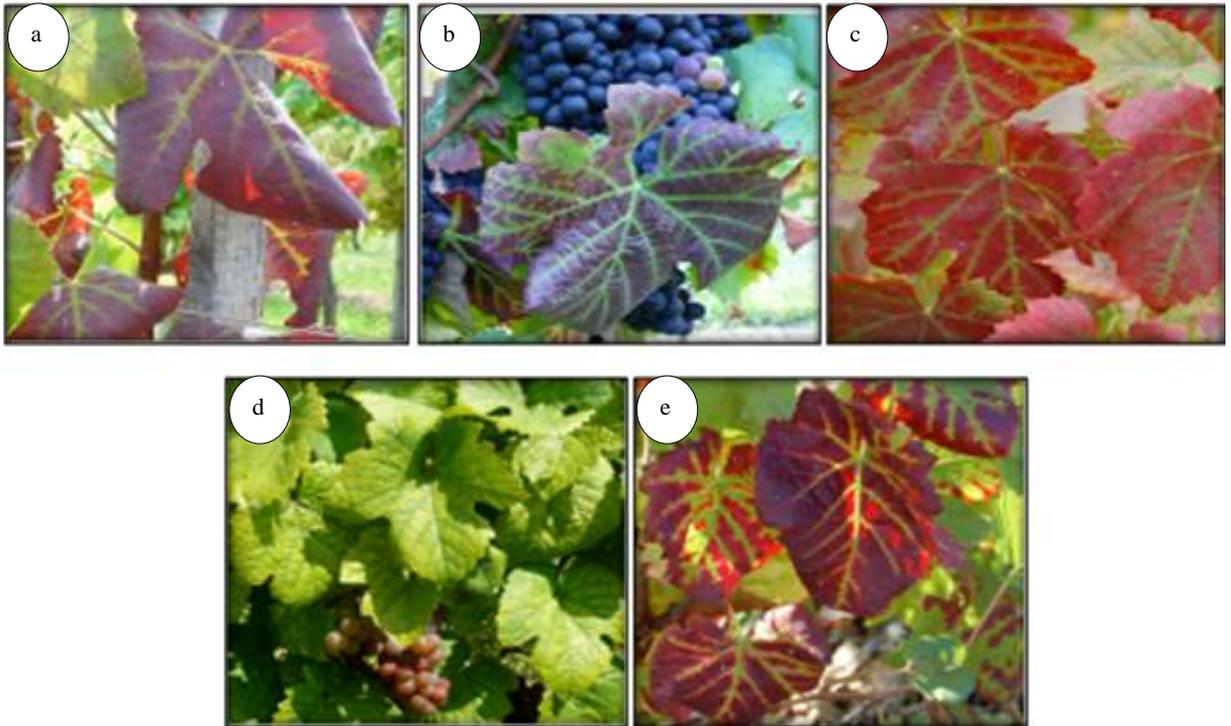


Figure 1.7. Symptômes de l'enroulement viral (205)  
 (a) "Pinot noir", (b) "Einuni", (c) "Pinotmeunier",  
 (d) "Gamay " (e) "Gewurztraminer"

L'ensemble des cépages atteints de l'enroulement présente des grappes de raisins plus chétives avec un nombre réduit par souche par conséquence, un faible rendement (206 ; 207 ; 208 ; 209 ; 210) et une diminution du taux de sucres ainsi qu'une augmentation de l'acidité totale (206 ; 211 ; 212 ; 213 ; 214). Comme, ils présentent une maturation retardée et irrégulière des baies au niveau de la grappe (215). Sur les cépages à raisin noir, la couleur des baies est faible, mais prononcée sur les autres cépages (216). Les cépages blancs comme 'Melon', 'Riesling', 'Sylvaner' ou 'Sultanine' atteints de l'enroulement présentent des baies jaunâtres. L'enroulement viral ne provoque pas de symptômes sur bois, ni de défaut d'aoûtement des rameaux (200).

### 3.1.2.3. Transmission du virus

Ce sont des virus du phloème qui persistent dans le matériel végétal. La transmission se fait, par voie de vecteur et greffage.

Des études menées ont indiquées que la transmission des *Ampelovirus* est caractérisée par un mode semi-persistant (217 ; 218 ; 219). Le GLRaV-3 se transmet uniquement par cochenilles (*Planococcus ficus*, *Phenacoccus aceris* et *Heliococcus bohemicus*) (figure 1.8) (220 ; 221 ; 222).

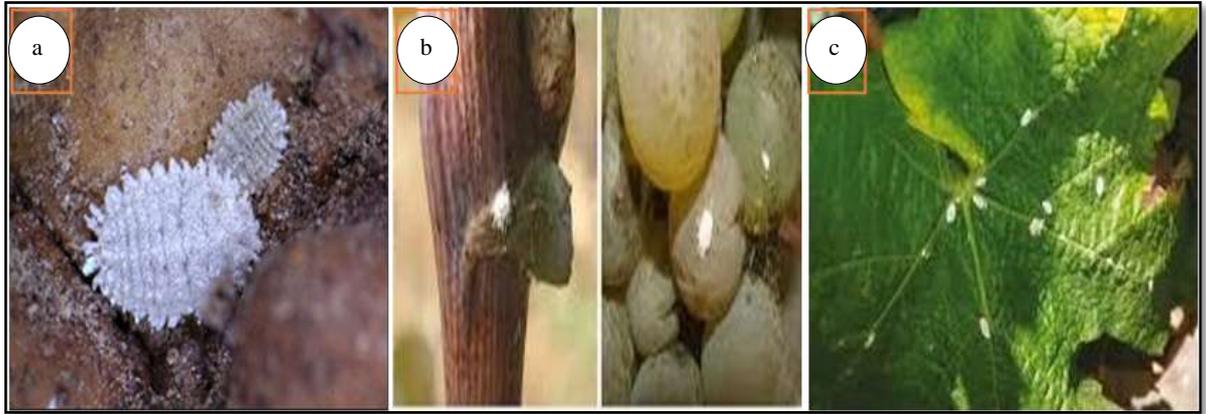


Figure 1.8. Vecteurs de GLRaV-3

- (a) *Phenacoccus aceris*
- (b) *Heliococcus bohemicus*
- (c) *Planococcus ficus*

### 3.1.2. Court-noué (GFLV)

Le virus du court-noué (GFLV) est l'une des maladies virales de dégénérescence les plus sévères infectant la vigne dans le monde (Yobregat, 2014), décrite pour la première fois en Europe par Casalis-Allut en 1865. Puis, son origine tellurique de la transmission de la maladie a été signalée par Rathay, 1882 (223). Elle apparaît en 1950 aux Etats-Unis dans un vignoble de Californie (224). En 1962, ce même auteur a pu inoculer le virus du GFLV d'une vigne à une plante indicatrice herbacée *Chenopodium amaranticolor* pour le transmettre ensuite à la vigne par le nématode *Xiphinema index*.

Depuis les années 60, la recherche sur le GFLV est de plus en plus active. Plus tard avec la détection moléculaire de la relation spécifique de l'interaction entre le GFLV et *Xiphinema index* (225 et 226), ce virus s'est propagé pour se disséminer et contaminer tous les vignobles du monde (227 ; 228).

La maladie du court-noué est décrite comme étant la plus virulente sur le plan économique et sanitaire des vignobles (229 ; 230 ; 231 ; 232 ; 233).

### 3.1.2.1. Taxonomie

Le virus du GFLV appartient au groupe I, famille des Comoviridae, au genre Nepovirus. Le GFLV fait partie de sous groupe A représenté par Le TRSV (Tobacco ringspot virus) (235 ; 33). Il figure parmi ceux dont la structure et l'expression du génome sont les mieux caractérisés, la souche F13 du GFLV fut la première à être entièrement identifiée (236 ; 236 ; 237). Elle est considérée comme souche de référence (GLFV-F13) utilisée au laboratoire (238). Plus tard, une nouvelle souche GFLV-GHu a été obtenue par l'INRA de Colmar qui se caractérise par sa capacité à induire des symptômes sur le tabac (*Nicotiana Tabaccum*) (239).

Le GFLV possède un génome bipartite, comprenant deux molécules d'ARN simple, brin de polarité positive, protégée généralement par une capsid protéique icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre (240), ces deux ARNs génomiques sont nécessaires à l'infection systémique de la plante hôte (241). Chaque ARN est composée d'un cadre de lecture ouvert ou ORF (Pour Open Reading Frame) unique qui code pour une polyprotéine (225). L'ARN 1 (7342 nt pour la souche F13) code pour la protéine P1 (253 KDa). L'ARN 2 (3774 nt pour la souche F13), code pour la polyprotéine P 2 (122 KDa) (242 ; 243).

### 3.1.2.2. Symptômes

Le court-noué attaque tous les organes du cep, cependant, les symptômes sont variables selon la virulence de la souche, la sensibilité du cépage infecté et les conditions pédoclimatiques.

Les symptômes foliaires se traduisent par une panachure ordinaire du limbe, d'un aspect de couleur jaune à jaune blanchâtre et de forme très variable, parfois petites et dispersées qui apparaît à la fin du printemps, persiste tout au long de la période végétative et s'estompent lors des fortes chaleurs (204).

Le terme de (Fanleaf) en anglais désigne l'asymétrie des limbes foliaires donnant à la feuille une allure d'éventail, de déformation et la décoloration des feuilles. Une nervation irrégulière d'où le nom de dégénérescence progressive du cep. Le terme de court-noué est donné suite aux symptômes observés sur les

rameaux qui se manifestent principalement par des malformations, se traduisant par un raccourcissement des entre-nœuds (244 ; 245 ; 246), rameaux en zigzag présentant une fasciation et des bifurcations anormales (182 ; 247).

Les ceps infectés présentent des grappes moins nombreuses et plus petites comparées à celles des ceps sains (248), entraînant souvent le millerandage qui est dû à une absence ou à une mauvaise fécondation des fleurs et la coulure des fleurs non fécondées (134).

D'autres symptômes se manifestent par une panachure dite réticulée "Vein banding" qui se distingue de la première par un jaunissement se produisant le long des nervures principales et secondaires, mais n'affecte pas les sarments et les grappes. Ces symptômes sont plus apparents en été et en automne (249).

### 3.1..2.3. Transmission du virus

La dissémination du court-noué dans les vignobles s'effectue principalement par les nématodes, mais leur extension en foyer reste limitée du faite de leur capacité de déplacement réduite (>1,5m/an). Par ailleurs, la distribution verticale de ces nématodes est liée à l'émergence des racines (250), la porosité et l'hygrométrie du sol (251). Plusieurs nématodes ont été identifiés comme étant vecteurs de virus de la vigne, cependant, *Xiphinema index* reste le vecteur majeur responsable de la maladie du court-noué. L'association entre GFLV et le nématode *X. index* a été prouvée en 1958 (224). Plus tard, les particules virales du GFLV ont été isolées de la vigne et purifiées par Dias et Harrison (252). Par ailleurs, Cohn *et al.* (253) ont montré aussi que *X. italiae* est un vecteur de GFLV et que la femelle adulte et les larves sont capables de transmettre cette maladie 4 à 8 semaines après l'acquisition des particules virales.

Selon Martelli et Taylor (254), les particules virales sont retenues par les nématodes du genre *Xiphinema* pendant une longue période. En effet, selon plusieurs auteurs Taylor et Robertson (255); Raski *et al.* (256), l'acquisition du virus est 515 minutes et persiste pendant 8 à 11 mois dans le nématode en l'absence de la plante hôte et pendant plus de trois mois si le nématode se nourrit sur des hôtes immunisés au virus Brown *et al.* (257). Le virus est acquis par la femelle adulte et les larves du vecteur au cours des

activités trophiques sur les racines des vignes infectées. De même, les vignes saines seront infectées par le même mode à partir de vignes infectées (247).

### 3.1.3. Méthodes de détection

Le contrôle des virus qui infectent la vigne est basé essentiellement sur la détermination de l'état sanitaire des ceps (258). Les symptômes des virus peuvent être confondus à des carences minérales (Bor et Fer) ou à des troubles physiologiques causées par les intempéries (244). Par ailleurs, selon le même auteur, la symptomatologie visuelle ne permet pas de confirmer la présence de la maladie d'autant plus que le virus peut être latent chez certains cépages.

La symptomatologie reste insuffisante aussi pour détecter les virus vu la difficulté de distinguer les symptômes spécifiques pour chaque virus surtout en présence d'infection mixte (259).

Pour cela, les différentes techniques de diagnostic pour le dépistage des maladies virales basées sur les propriétés morphologiques, sérologiques, moléculaires et biologiques des phytovirus s'avèrent nécessaires (260).

#### 3.1.3.1. Biologiques

L'indexage est une méthode de diagnostic biologique consistant à vérifier la présence de virus en greffant les plants à tester sur des plantes sensibles spécifiques pour les maladies virales à contrôler dites "indicatrices".

Un indicateur ligneux idéal doit être exempt de virus, facile à cultiver, spécifique et ayant une réaction rapide à un virus donné. Cette technique de diagnostic représente une étape obligatoire dans les programmes de certification de la vigne (261).

Pour réaliser cette méthode plusieurs cépages, portes greffe et hybrides de vigne ont été identifiés pouvant extérioriser pendant une période courte les symptômes caractéristiques de chaque maladie, tels que *Vitis rupestris*, Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Pinot noir, Merlot, l'hybride Ln33 Mataro ou Mission (262).

La plante à tester est associée par greffage à une plante indicatrice (greffe en fente, en oméga ou en écusson) (figure. 1.9).

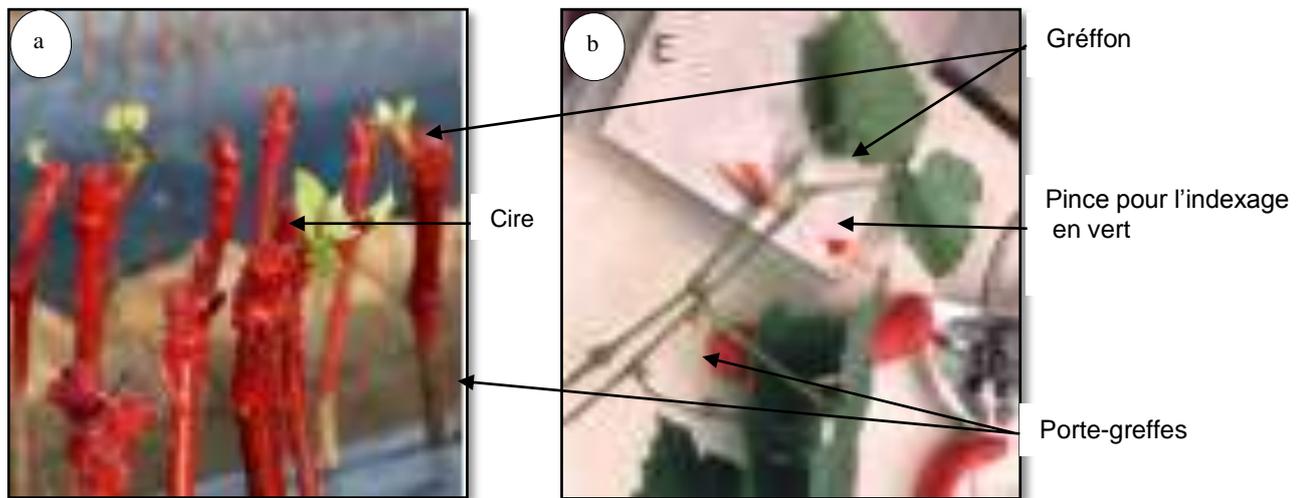


Figure 1.9. Technique d'indexage (263).

(a) en gréffé-soudés ligneux et parafinés

(b) Greffage en vert en ecusson

Les boutures greffées sont placés à 30°C pour permettre la formation de cals au niveau du point du greffe, elles sont ensuite placées en pépinière d'indexage après l'acclimatation et l'apparition de symptômes, observés sur une période de 2 à 3 ans. Plus tard, la période de lecture des symptômes a été réduite à une période allant de 6 à 18 mois par la méthode dite "indexage en vert" développé à l'INRA de Colmar (263).

La période d'extériorisation des symptômes a été beaucoup plus courte (3 à 4 semaines de culture) en plaçant les sujets greffés en chambre climatique d'indexage pour favoriser la reprise de la greffe. En plus, des plantes indicatrices ligneuses, les virus peuvent être inoculés à une gamme d'hôtes herbacées comme *Chenopodium quinoa* ou *Nicotiana Benthamiana* à partir de virus purifiés ou d'extraits de plantes infectées (263 ; 222). Ces virus induisent des mosaïques ou des tâches jaunes, lésions nécrotiques au niveau des feuilles et un éclaircissement ou un jaunissement des nervures (figure 1.10) (262).

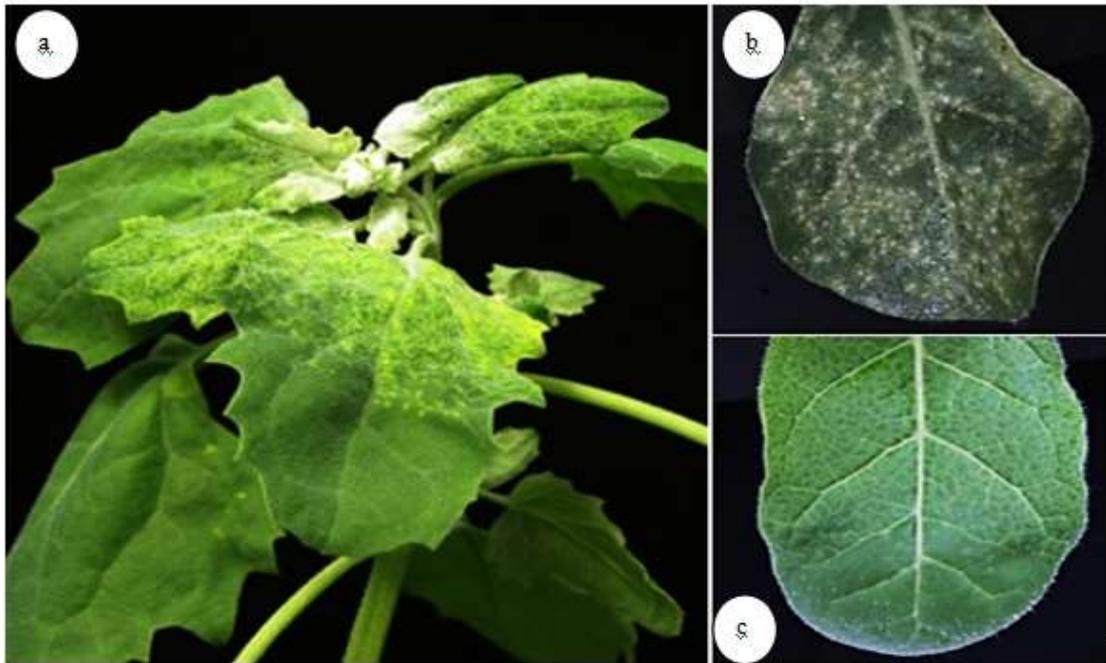


Figure 1.10. Symptômes du virus du court- noué (GFLV) (263).

(a) *Chenopodium quinoa* (b et c) *Nicotiana occidentalis*

### 3.1.3.2. Microscopie optique

Le test de la recherche des cordons endovasculaires au niveau des bois de vigne par le biais de la microscopie optique étant la méthode la plus ancienne utilisée pour confirmer le diagnostic des maladies à virus comme le court-noué. Les vignes atteintes par cette maladie, développent des filaments ressemblant à des fils de verre disposés en fils radiaux dans le bois (244). Cette méthode utilisée aléatoirement, n'est plus utilisée actuellement.

### 3.1.3.3. Microscopie électronique

Cette méthode à transmission (MET) fournit des informations sur la morphologie et la dissémination des particules virales.

La visualisation des phytovirus peut être observée au niveau des différents organes d'une plante, On peut observer les particules virales à l'intérieur de tubules formées par la protéine permettant le passage des virions d'une cellule infectée à une cellule saine voisine.

De même, pour l'Immuno Sorbent Electron Microscopy (ISEM) en permettant la capture de particules virales grâce à des anticorps spécifiques fixés sur la grille de microscopie (264). La microscopie électronique a permis de mettre en évidence un certain nombre de virus de la vigne est en particulier celui du GFLV (265). Mais, la microscopie électronique reste une technique de diagnostic non courant vue les difficultés techniques rencontrées lors des manipulations (244).

#### 3.1.3.4. Sérologiques

La sérologie englobe les méthodes de diagnostic qui reposent sur l'utilisation des anticorps, appliqués dans le cas des virus pour lesquels il existe des Immun sérums spécifiques.

Plusieurs variantes de méthodes sérologiques sont utilisées en diagnostic des phytovirus dont la plus communément utilisée est l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. La technique ELISA est une technique immuno enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. L'utilisation de la DAS ELISA nécessite de posséder 2 anticorps reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène.

Grâce à sa grande sensibilité, la technique ELISA s'est révélée très utile pour la détection sérologique de GFLV de la vigne tant chez les hôtes herbacés que chez la vigne elle-même à condition de concentrer suffisamment les extraits (266), la méthode ELISA la plus utilisée est la méthode sandwich directe (267), l'immunofluorescence (IF) et les tests d'immuno-bandelettes (268).

Les premières utilisations de la méthode ELISA pour la détection des virus associées à l'enroulement foliaire de la vigne remontent à 1976 (269).

Le test ELISA reste l'une des techniques les plus couramment utilisées grâce à sa facilité et sa rapidité pour l'obtention des résultats, cependant, il présente des limites lorsqu'il s'agit de faible concentration des particules virales ou de virus latents dans les échantillons testés.

### 3.1.3.5. Moléculaires

Le développement des techniques moléculaires à base d'acides nucléiques a permis la détection efficace des particules virales déjà connues et la détection de nouvelles espèces et souches virales responsables des maladies de la vigne. (270 ; 271 ; 258). En effet, selon Pacifico (272), cette nouvelle technique est plus efficace pour la détection des virus de la vigne comparée aux méthodes sérologiques et biologiques.

Différents protocoles de RT-PCR ont été développés pour la détection des virus de la vigne (273 ; 274), cependant, la vigne, renferme dans ces tissus des taux élevés en composés phénoliques et polysaccharides qui ont toujours présenté une limite pour la RT-PCR puisqu'ils peuvent inhiber les enzymes utilisées (275 ; 276).

### 3.1.4. Méthodes de lutte

Actuellement, il n'existe aucune méthode stratégique efficace de lutte contre les virus. La lutte efficace contre les maladies virales est concentrée principalement sur la lutte contre les vecteurs, la prévention de l'infection, la résistance variétale et le respect de l'itinéraire technique (276), en s'appuyant sur la certification sanitaire du matériel végétal et la plantation dans des sols contrôlés, indemnes de nématodes (277).

#### 3.1.4.1. Sélection sanitaire

Elle est l'une des voies de la sélection clonale de la vigne qui complète la sélection pomologique et sur laquelle repose la procédure de la certification du matériel végétal.

L'échange du matériel non certifié en absence de mesures de contrôle, ainsi que la multiplication classique (greffage et bouturage) ont toujours contribué en grande partie à la dissémination des virus.

Pour une stratégie de lutte, l'utilisation du matériel indemne de virus demeure le moyen le plus efficace pour lutter contre les virus obtenus par sélection sanitaire (278). En effet, l'adoption du schéma de certification du

matériel viticole chez certains pays viticoles comme méthode préventive contre la présence des virus a été bénéfique (279).

#### 3.1.4.2. Lutte culturale

Certains vecteurs notamment les cochenilles sont capables de s'heberger sous l'écorce, à l'aisselle des feuilles et au niveau des racines à l'abri des insecticides, des ennemis naturels et des conditions environnementales, diverses mesures culturales permettent la réduction de ces populations (280).

En effet, la diminution des formes hivernantes de ces cochenilles sous l'écorce, l'élimination des déchets et des mauvaises herbes, le suivi permanent de leurs populations afin d'identifier précocement les stades les plus sensibles aux traitements, sont nécessaires pour la lutte contre la dissémination des virus.

De plus, il s'avère nécessaire d'utiliser une dose équilibrée d'azote car son excès incontrôlé provoque l'augmentation de la taille des femelles qui contribuent à l'augmentation du nombre d'œufs (280).

Pour les nématodes cas de *Xiphinema index*, les sols infectés ou susceptibles d'héberger ces vecteurs, doivent être laissés au repos au minimum (7 à 10 ans) (281 ; 250) ou mettre en place des cultures intercalaires annuelles qui développent un antagonisme vis à vis du *Xiphinema index* (282). Kumar *et al.* (283) mentionnent d'autres techniques comme la solarisation des sols.

#### 3.1.4.3. Lutte chimique

Les *Pseudococcidae* et les *Coccidae* sont contrôlés par les composés organophosphorés et certains nouveaux insecticides tels que les néonicotinoïdes et les inhibiteurs de biosynthèse. Ces insecticides possèdent des propriétés systémiques qui leur donnent la capacité d'irradier les cochenilles quel que soit leur forme d'hibernation, toutefois, la lutte chimique contre les cochenilles demeure inefficace vue le spectre d'action limité des produits chimiques utilisés (276).

Les populations de nématodes peuvent être contrôlées plus au moins efficacement par l'utilisation de nématodes (223). Mais vue leur toxicité aigüe et leur rémanence, ils ont été interdits en Europe depuis 2007 (223).

#### 3.1.4.4. Lutte biologique

La diminution des populations des cochenilles nécessite l'utilisation des ennemis naturels tels que les prédateurs et les parasitoïdes (279).

La coccinelle australienne *Cryptoloemus montrozieri* (Mulsant) est l'un des prédateurs les plus performants utilisés contre la présence des cochenilles.

L'utilisation du prédateur *Diadiplosis kaebelei* (Koebele) lors des études conduites en Nouvelle Zélande, a réussi la réduction de la population de *P. longispinus* de 30% (284 ; 276).

Le parasitoïde *Anagynus pseudococci* (Girault) a été utilisé dans des programmes de lutte biologique contre les deux cochenilles farineuses *P. ficus* et *P. citri* et il s'est avéré très efficace dans l'élimination de ces deux espèces (285).

Des champignons nématocides ont été utilisés comme biofumigants pour lutter contre les nématodes de la vigne (286 et 287).

#### 3.1.4.5. Lutte génétique

La lutte contre les virus par introgression d'une résistance à *Xiphinema index* chez l'espèce sauvage *Muscadinia rotundifolia* dans un cépage *Vitis vinifera* a permis l'obtention d'un nouveau porte-greffe nommé Némadex Alain Bouquet clone 1163, freinant la contamination par le GFLV (288 ; 289). Mais ce porte greffe présente certains inconvénients notamment la difficulté d'enracinement, la sensibilité à la chlorose calcaire et l'incompatibilité au greffage avec *Vitis vinifera* (290).

Par la suite, le développement de vignes transgéniques résistantes au virus par la stratégie de résistance dérivée du pathogène a été envisagée et permettrait un retard d'apparition de la maladie (232 ; 291 ; 292 ; 293).

#### 3.1.4.6. Culture de méristèmes

Une fois que les virus s'installent dans les plants de vignes, la lutte chimique deviendra inefficace et par conséquent, il faut faire recours aux méthodes

d'assainissement (thermothérapie, microgreffage d'apex, culture de méristèmes, chimiothérapie, cryothérapie, embryogenèse somatique) (276).

La diversité de ses techniques d'élimination des virus et leurs association ont été utilisées dans la production de matériel végétal sain de nombreuses cultures (294 ; 295 ; 296 ; 297).

C'est grâce aux études de White (298) qui a observé une réduction régulière du nombre de particules virales de la base des racines isolées de plantes infectées vers les parties apicales, que l'utilisation de la culture de méristèmes pour l'assainissement a été découverte.

De même, Limasset et Cornuet (299) ont remarqué le même principe dans les tiges. Le dôme apical était la seule partie de la plante indemne de virus. En effet, les méristèmes sont des structures indemnes de virus qui possèdent la capacité de produire des plantes saines (300).

Cependant, la culture de méristèmes a été exploitée à grande échelle, principalement en raison de son application dans divers disciplines, telles que la multiplication rapide par clonage de plantes cultivées, la conservation du matériel génétique et l'élaboration de protocoles de transformation génétique pour l'amélioration des cultures (301) et l'élimination des virus (302 ; 303 ; 304 ; 276 ; 44).

#### 3.1.4.7. Thermothérapie

Les protocoles d'assainissements sont le plus souvent basés sur l'utilisation de la thermothérapie comme une méthode curative efficace (294).

Galzy (305 et 306), fut le premier à mettre en évidence cette technique appliquée à des cultures de la variété Rupestris, porté sur l'élimination du virus du court noué, cette technique consiste à cultiver progressivement le matériel végétal virosé à des températures élevées comprise entre 37 et 39° C pendant trois mois.

Elle a un grand succès contre différents genres de virus de vigne (*Ampelovirus*, *Foveavirus*, *Nepovirus*) grâce à son efficacité dans la réduction de la réplication virale et l'activation des cellules méristématiques et à l'obtention des

plants sains. En effet cette technique a permis d'assainir les plants de vigne infectés par le virus GFLV (72,2%) et le GLRaV-3 (24,7%) (307).

La thermothérapie *In vivo* ou *in vitro* associée à la culture de méristèmes a permis d'assainir un grand nombre de clones de divers cépages infectés par différentes viroses (308 ; 309 ; 194).

Ainsi, la combinaison des deux techniques s'est avérée efficace contre le court noué (311 ; 312), l'enroulement foliaire (112 ; 313).

#### 3.1.4.8. Cryothérapie

Cette technique repose essentiellement sur la cryoconservation en combinaison avec les vitro cultures qui consiste, à exposer le matériel végétal à l'azote liquide à -196 °C pendant une période donnée (314). Dans ces conditions, l'élimination des cellules infectées est obtenue par l'effet ultra-basse température, en gardant les cellules méristématique vitales.

La cryothérapie a été utilisée avec succès pour lutter contre les viroses de plusieurs espèces d'importance économique telles que le prunier, le bananier, le fraisier, la pomme de terre, l'ail et la vigne (315 ; 316 ; 317). Cependant, cette technique a permis l'élimination de GVA à un taux de 97% (318) et du GLRaV-1, 2 et 3 (319).

#### 3.1.4.9. Chimiothérapie

La chimiothérapie s'avère une méthode moins répandue et peu connue pour l'élimination des virus comparée à la thermothérapie et à la culture de méristèmes.

Plusieurs auteurs ont révélé l'efficacité de la chimiothérapie pour l'élimination totale de différents virus de la vigne notamment le GFLV et le GLRaV-3 et le GFkV (45 ; 320 et 321 ; 322 ; 323 ; 324 ; 325).

Chez la vigne, les produits chimiques les plus utilisables dans l'élimination des virus sont la Ribavirine et l'Oseltamivir. La Ribavirine utilisée comme médicaments chez les humains a été aussi testée avec succès pour l'élimination du virus GVA de la vigne (320), le virus du court noué GFLV (45), les virus associés au bois strié GRSPaV (323 ; 326). L'Oseltamivir (3R, 4R, 5S)-4-

(Acetylamino)-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid ethyl ester phosphate) pour l'élimination du GLRaV-3 (320). L'utilisation de viricides dans les milieux a conduit à une élimination de 37,5% de GFkV avec une dose de 10 mg/l de Ribavirine et 25% d'élimination du virus en présence de 40 mg/l d'Oseltamivir, soit le taux d'assainissement le plus élevé atteint après une subculture pour chaque cas (327).

La Ribavirine (1-β-D-ribofuranosyl-1,2, 4-triazole-3-carboxamide) est un analogue de nucléoside de synthèse possédant une action viro-inhibitrice vis à vis d'une grande gamme de virus pathogènes des plantes. Ce médicament n'est pas viricide, mais c'est un inhibiteur de réplication d'ARN virale (328 ; 329 ; 330).

Ce produit est un agent antiviral qui peut être toxique. En effet, Guta *et al.* (324) ont rapporté la toxicité de la Ribavirine sur la culture de tissus de vigne. Ainsi, le processus d'élimination du virus impliquait souvent l'évaluation de la phytotoxicité des viricides à diverses concentrations et périodes d'exposition (331). Cet effet de phytotoxicité de la Ribavirine s'exprime par un taux de multiplication et une mortalité des plants plus prononcés comparativement à l'Oseltamivir (331).

#### 3.1.4.10. Phytothérapie

Durant les deux dernières décennies, la biotechnologie des produits naturels a pris de l'essor du fait des énormes avantages fournis par la bioconversion par rapport aux méthodes chimiques.

Cependant, une grande variété de composés chimiques à activité anti-microbienne, sont produits par les plantes supérieures. Ces composés naturels sont souvent impliqués dans la défense des plantes contre les ravageurs et les agents pathogènes (332).

Par ailleurs, la diversité phytochimique de ces composés anti-microbiens a fait l'objet de plusieurs études concernant leur implication dans les défenses constitutives (333) et inductibles (334), les mécanismes de résistance des plantes (335) et le coût de la valeur adaptative (336).

L'ail (*Allium sativum* L.) est l'un des légumes les plus anciennement utilisés dans la médecine traditionnelle pour ces propriétés thérapeutiques recherchées et

culinaires. Il est aussi utilisé pour ses effets phytothérapeutiques comme, anti-tumoraux, anti-cholestérol, anti-fongiques, anti-bactériens, anti-viraux, anti-parasitaires, anti-oxydants et hypoglycémifiants (337 ; 338 ; 339).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des propriétés antimicrobiennes et anti-septiques notamment les substances bioactives de cette plante et leur mode d'emploi (340 ; 48).

L'ail est composé de l'alliine, molécule majoritaire du bulbe (24% du poids total) (341), qui se produit suite à l'hydrolyse et l'oxydation des composés de réserve de l'ail ou bien de sa conservation à température ambiante. Dans le cas où les tissus de l'ail sont écrasés ou endommagés, Cette molécule naturelle et stable se converti en composé soufré de diallyl thiosulfinate, appelé allicine par l'action de l'alliinase (342). Ce produit est le principal composant anti-microbien de l'huile d'ail (343 ; 344).

L'allicine est une molécule volatile qui est rapidement oxydée pour donner naissance aux composés organo-soufrés, notamment les thiosulfates (342). L'allicine est nettement majoritaire car elle représente 60 à 90% (345) du total des thiosulfates de l'ail (346).

Ces thiosulfates sont très instables et par l'action de l'alliinase donnent des composés soufrés. En plus de ces composés, l'ail renferme aussi des saponines, des sapogénines, certains flavonoïdes ainsi que des composés phénoliques.

Plusieurs auteurs ont décrit l'effet de l'activité antivirale de l'ail sur différents virus végétaux (347 ; 348 ; 349 ; 350 ; 351 ; 352 ; 353 ; 354 ; 355 ; 356 ; 357 ; 358 ; 359 ; 360 ; 361).

D'autres études ont également signalé l'efficacité de l'extrait d'ail contre le virus TMV (262), bactéries pathogènes, champignons et oomycètes (363).

Activité antivirale de l'extrait d'ail brut contre les virus de la vigne a été démontrée par plusieurs auteurs chinois. En effet, l'application de l'extrait d'ail dilué inhibe de manière significative la réplication de l'ARN des virus de GLRaV-3, GLRaV-2, GVA, GFLV, GPGV, GRSPaV et GFkV dans les plants de vigne du cultivar Shine Muscat cultivés en pot (364).

## PARTIE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### OBJECTIFS

La présente étude consiste en une vérification et un contrôle des cépages autochtones multipliés sous serre prélevées des pieds mère des 2 collections viticoles nationales installées à l'ITAF et qui se trouvent au niveau des stations expérimentales de Benchicao (Médéa) et de Tighennif (Mascara).choisis pour la régénération et l'assainissement, situés dans la serre d'élevage de l'ITAF (figure 2.1) et (appendice A ; annexe 1).



Figure 2.1. Pieds-mères des cépages autochtones étudiés multipliés sous serre

- Le premier volet est une approche de régénération par microbouturage de 3 cépages contrôlés par sérologie et révélés indemnes de virus. Ces 3 cépages ont fait l'objet d'une régénération par microbouturage, il s'agit de (figure 2.2.).

- ✓ Ahmar Bou Aneur (AH)
- ✓ Tadhith (TD)
- ✓ Lakhzine (LK)

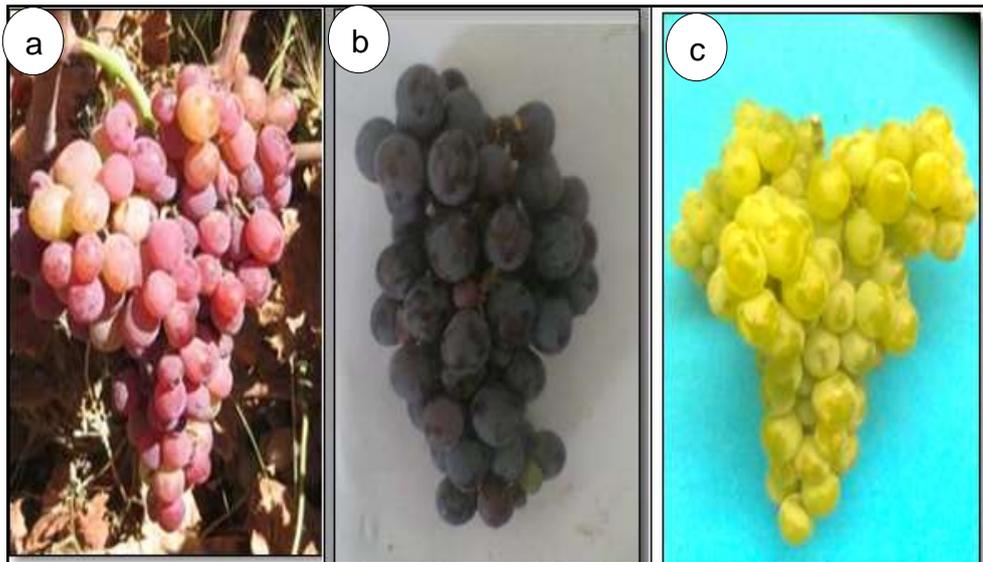


Figure 2.2. Cépages autochtones utilisés pour le microbouturage  
(365)

- (a) Ahmar Bou Aneur (AH)
- (b) Tadhith (TD)
- (c) Lakhzine (LK)

- Pour cela, un protocole expérimental efficace a été établi permettant d'optimiser le taux de régénération de ces cépages de vigne (*Vitis vinifera* L.). Six différents milieux de cultures ont été testés en modulant leur formulation minérale en macroéléments, il s'agit de :

- QL-MS : (Quoirin et Lepoivre, 1977) modifié par Bottalico *et al.* (1997)
- MS : (Murashige et Skoog, 1962)
- 4 milieux dérivés du MS : MS1, MS2, MS3 et MS4, où nous avons varié leur balance en macroéléments.

- Un essai d'assainissement par chimiothérapie à base de Ribavirine utilisé comme agent antiviral a été effectué sur 4 cépages avérés atteints de viroses après contrôle sérologique, dont 3 sont atteints des deux virus (GLRaV-3 et le GFLV), il s'agit de :

- ✓ Aberkane (ABK)
- ✓ Bezoul El Khadem (BEK)
- ✓ Muscat de Fandouk (MF)

Et le cépage Ferrana atteint seulement par le GLRaV-3 (figure 2.3).



Figure 2.3. Cépages autochtones utilisés pour la chimiothérapie  
(365)

- (a) Aberkane (ABK)
- (b) Bezoul El Khadem (BEK)
- (c) Muscat de Fandouk (MF)
- (d) Ferrana (F)

- Parallèlement, un autre essai d'assainissement par phytothérapie en utilisant des gousses d'ail (*Allium sativum* L.) comme bioviricide, a été effectué pour 2 cépages noirs :

- ✓ Amghar (AG)
- ✓ Ferrana (F)

Pour cela, nous avons testé 04 concentrations de l'extrait d'ail :

- ✓ solution mère (100%)
- ✓ 3 solutions filles dérivées de la solution mère (75 ; 50 et 25%).

Ces deux agents antiviraux ont été associés au milieu de culture développé lors du microbouturage.

## 2.1. SITE EXPERIMENTAL

L'expérimentation s'est déroulée au sein du service de culture *in vitro* du laboratoire central de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF) à Tessala El Merdja (Alger), durant la période allant de 2015 à 2020.

Les analyses sérologiques du DAS-ELISA ont été effectuées au niveau du Centre National de Contrôle et de Certification des Semences et Plants (CNCC) à Hassan Badi, El-Harrach (Alger).

## 2.2. MATERIEL VEGETAL UTILISE

Les plants-mères ayant servi au prélèvement du matériel végétal utilisé, lors de cette étude, appartiennent à des pousses herbacées de la vigne (*Vitis vinifera* L.), de certains cépages autochtones étudiés (tableau 2.1) et (figure 2.4).

Tableau 2.1. Cépages autochtones étudiés

Essais	Cépages	Origine
Microbouturage	A. Bou Aneur <b>(AH)</b> Tadlith <b>(TD)</b> Lakhzine <b>(LK)</b>	Collections ITAF (figure 2.5), Benchicao, Médéa et Tighennif, Mascara
Chimiothérapie et Phytothérapie	Aberkane <b>(ABK)</b> B. El-Khadem <b>(BEK)</b> M. de Fandouk <b>(MF)</b> Ferana <b>(F)</b> Amghar <b>(AG)</b>	Collection ITAF, Benchicao ,Médéa

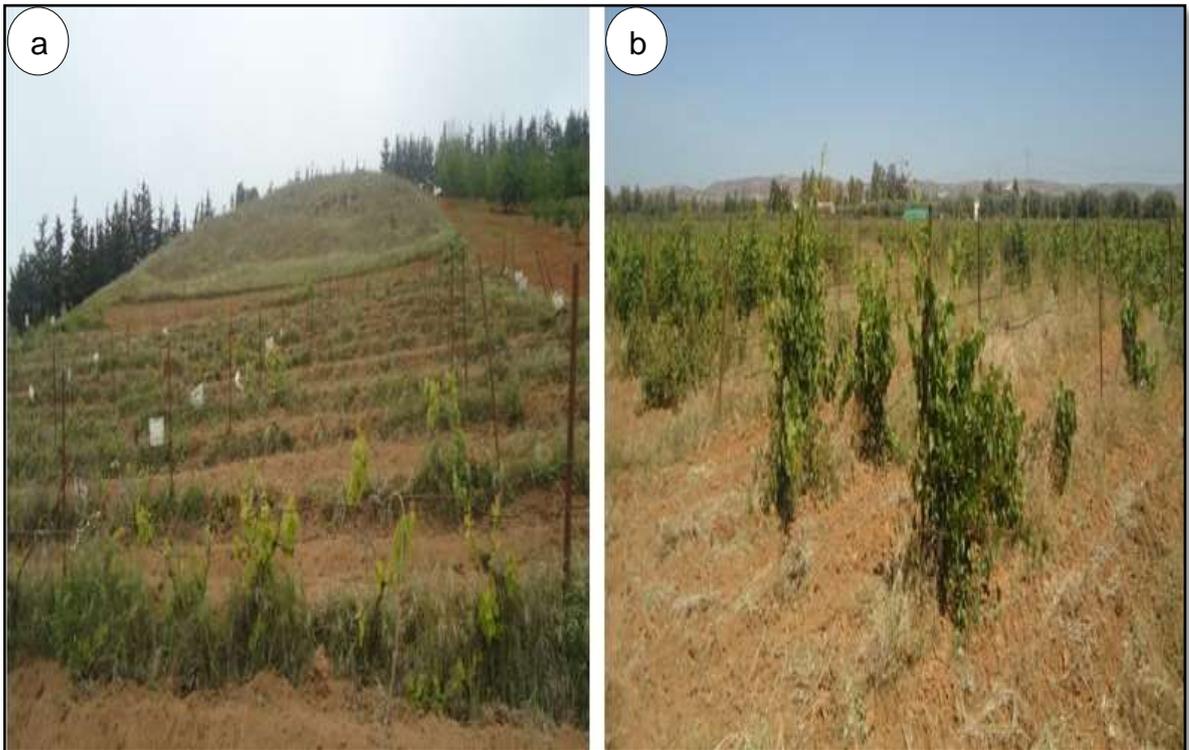


Figure 2.4. Collections des cépages autochtones de vigne (photo original)  
 (a) Benchicao (Médéa)  
 (b) Tighennif (Mascara)

Ces cépages ont fait l'objet d'une évaluation sanitaire pendant le repos végétatif vis à vis de 2 principales maladies le GLRaV-3 et le GFLV par analyse sérologique.

Les pieds-mères sont testés à partir du phloème extrait des sarments ligneux récoltés pendant la période de repos végétatif, ces sarments sont débarrassés de l'écorce et grattés à l'aide d'un greffoir afin de récupérer le phloème. Nous avons prélevé 1g de cette substance considérée comme un échantillon pour l'analyse sérologique par le DAS- ELISA.

Les plantules assainis par chimiothérapie et phytothérapie sont testées à partir des feuilles de l'année.

Le choix d'un matériel végétal juvénile pour l'étude du microbouturage des ligneux a été recommandé par plusieurs auteurs et ce par l'enracinement des boutures de pieds-mère (366). La juvénilité des organes présente des performances de régénération et secrète de faibles quantités de composées

phénoliques comparés aux organes adultes qui ralentissent le développement et la croissance des explants ligneux mis en culture (108 ; 84 ; 367).

### 2.3. PREPARATION DES PIEDS-MERES

Pour l'obtention d'un matériel végétal jeune et performant nous étions amenés à pratiquer un bouturage ligneux précédé de la stratification. Pour cela, des boutures ligneuses de 20 cm de long ont été récoltées des pieds-mères des cépages étudiés (tableau 2.1).

Ces boutures âgées d'1 an ont été trempées dans un fongicide (Curzate M à 40% de Mancozebe et 4% de Cymoxanil) durant toute la nuit. Elles sont ensuite segmentées à raison de 2 à 3 bourgeons, façonnées à la base, trempées dans une solution hormonale (AIB) à 2000ppm, stimulant la rhizogenèse et mises dans des sachets d'échantillonnage transparents contenant de la tourbe humide remplis de moitié. Les sachets ainsi préparés, sont tassés et mis dans des caisses de stratification. Ces derniers sont fréquemment arrosés pour garder une humidité saturée (figure 2.5)



Figure 2.5. Étapes d'obtention des plants mères.

- (a) Récolte et triage des sarments
- (b) Boutures façonnées
- (c) Stratification des boutures
- (d) Boutures enracinées après 3 mois

Après 3 mois, les plants débourrés et enracinés, sont débarrassés des sachets transparents et repotés dans des sachets noirs de 5 kg contenant un mélange de substrat tourbe, sable et de terre franche (1/3, 1/3 et 1/3), traités de façon appropriée pour le contrôle des principaux insectes et agents pathogènes. Les plants ont été maintenus sous des conditions de température ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et d'humidité ( $> 60\%$ ) contrôlés de serre et une photopériode constante de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité, la lumière est assurée grâce à un éclairage de  $10 \text{ W/m}^2$ .

Pour accélérer le débourrement de nouveaux bourgeons axillaires et la formation de nouvelles pousses, nous avons activé les plants en les arrosant par une solution nutritive (KNOP) à raison d'une fois par semaine et cela pendant 3 mois avant la phase d'établissement de la culture *in vitro* (tableau 2.2) (figure 2.6 a et b).

Tableau 2.2. Composition minérale de la solution nutritive de KNOP

Sels minéraux	Formule chimique	Quantité/ litre d'H <sub>2</sub> O distillée
Nitrate de calcium	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1,00 g
Nitrate de potassium	KNO <sub>3</sub>	0,25 g
Sulfate de magnésium	MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
Phosphate mono potassique	KH <sub>2</sub> PO	0,25 g
Sulfate ferrique (sulfate de fer (III))	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	1,00 mg



Figure 2.6. Elevage des plants des cépages autochtones sains sous serre



Figure 2.7. Elevage des plants des cépages infectés par le GLRaV-3 et le GFLV sous serre

## 2.4. MICROBOUTURAGE DE LA VIGNE

Les cépages révélés indemnes de virus après les tests sérologiques ont été utilisées pour le microbouturage, il s'agit de :

- ✓ Ahmar Bou Ameur (AH)
- ✓ Tadhith (TD)
- ✓ Lakhzine (LK)

Cette technique nécessite obligatoirement une asepsie totale (conditions de culture, matériel végétal) et un milieu adéquat.

L'efficacité de la désinfection du matériel végétal représente une condition primordiale dans la réussite de l'établissement de la culture *in vitro*. Le protocole de désinfection vise obligatoirement à maintenir la physiologie et la vitalité des explants mis en culture et à éliminer tout champignon susceptible de causer des contaminations (368).

Cependant le choix de l'agent désinfectant est indispensable, sa nature, sa concentration ainsi que la durée de trempage sont des facteurs clés pour la réussite de la technique *in vitro*, des traitements désinfectants peuvent dans beaucoup de cas affecter la reprise de croissance ultérieure des explants.

La désinfection des explants se déroule en deux étapes essentielles :

### 2.4.1. Désinfection en conditions septiques

Les pousses herbacées indemnes des 2 virus testés, le GLRaV-3 et le GFLV sont prélevées de la serre d'élevage de laboratoire central de l'ITAF. Elles sont d'abord soigneusement lavées trois fois à l'eau courante pour éliminer le maximum d'agents externes. Elles sont défeuillées et mises dans des béciers, lavées trois fois à l'eau courante, additionnée de quelques gouttes de l'hypochlorite de sodium (NaOCl à 12°) et de deux gouttes de détergent pendant 5 mn chacune. Elles sont rincées par la suite à l'eau courante pendant 15 mn et trempées dans de l'eau distillée stérile pendant 30 mn (figure 2.7).

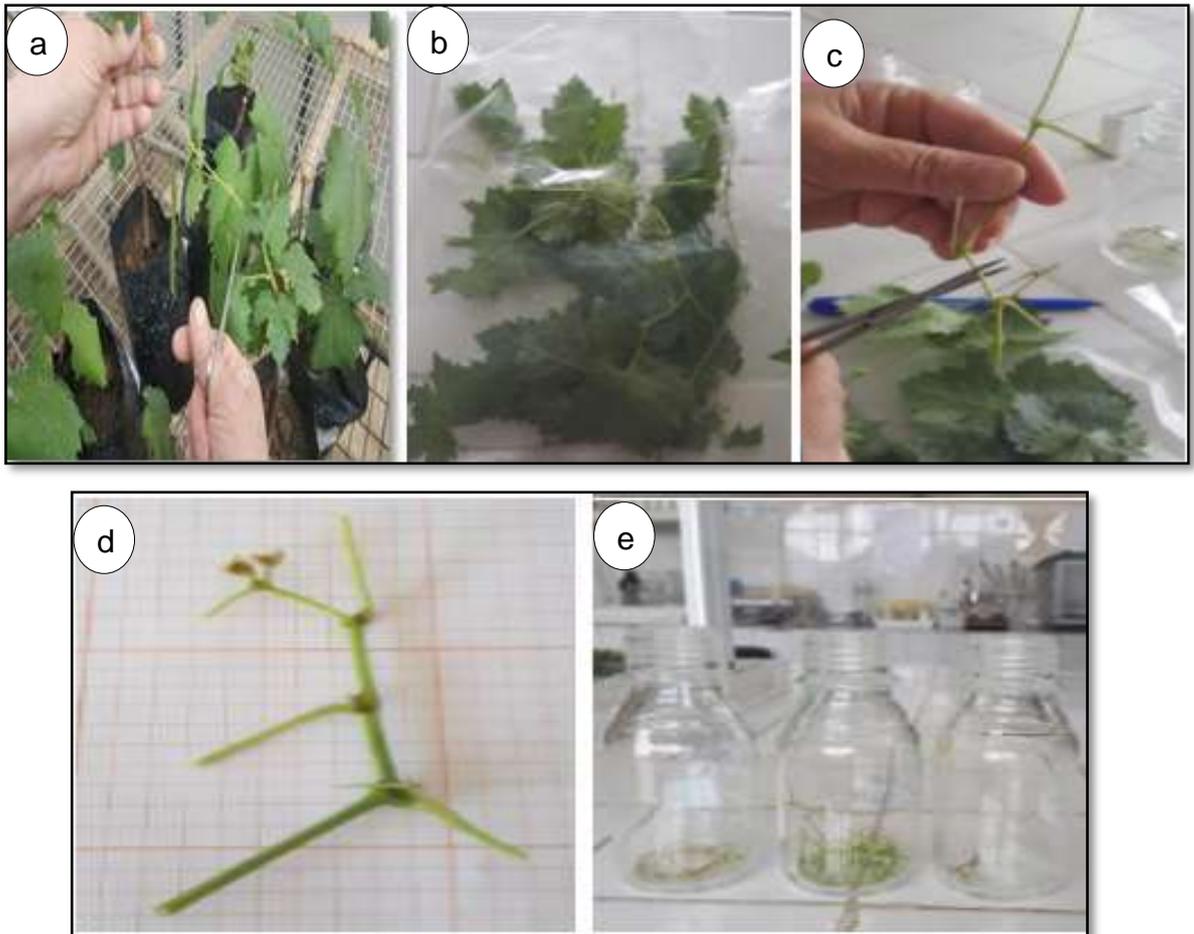


Figure 2.8. Désinfection du matériel végétal sous conditions septiques

- (a) Prélèvement de pousses
- (b) Mise en sachet
- (c) Découpage des feuilles à environ 3 mm du pétiole
- (d) Pousse défeuillée
- (e) Désinfection des pousses dans des bocaux ( $\text{NaOCl}$  12°)

#### 2.4.2. Stérilisation

L'élimination des contaminations microbiennes nécessite aussi la stérilisation des explants mis en culture. Plusieurs produits chimiques sont utilisés pour éliminer les contaminations.

Cette étape est obligatoire, elle s'effectue sous hotte à flux laminaire horizontale dans un environnement aseptique. 50 explants désinfectés sous conditions aseptiques sont trempés dans 3 solutions stérilisantes de l'hypochlorite de sodium ( $\text{NaOCl}$ ), l'hypochlorite de calcium ( $\text{CaOCl}$ ) et le bichlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) (figure 2.8) (tableau 2.3).

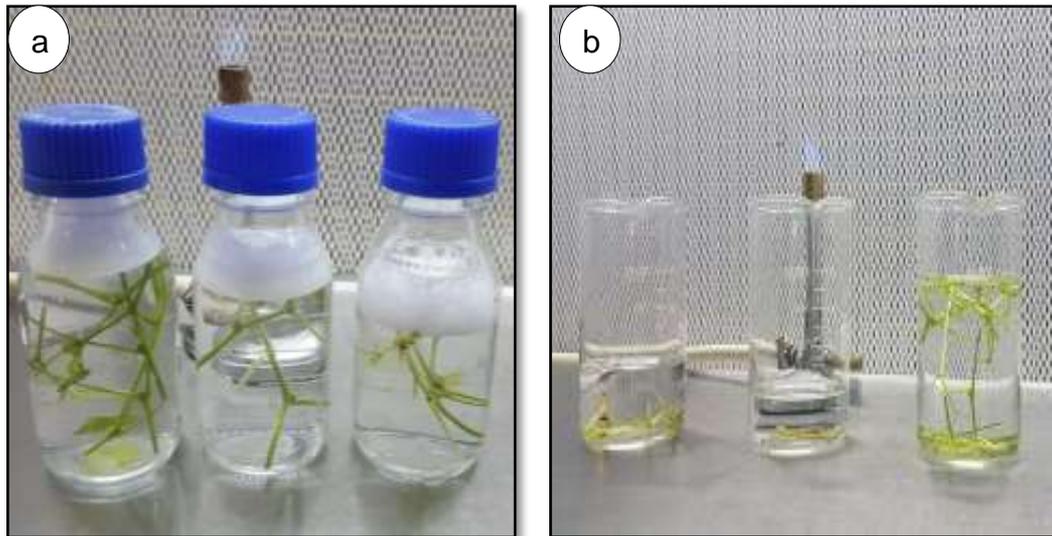


Figure 2.9. Stérilisation sous hotte à flux laminaire horizontal

(a) Explants émergés dans la solution stérilisante

(b) Rinçage avec H<sub>2</sub>O distillée stérile

Tableau 2.3. Stérilisation des explants.

Essais de désinfection	Agent désinfectant	Concentration (%)	Temps de trempage (mn)
1 <sup>er</sup> essai	NaOCl	6	15
2 <sup>eme</sup> essai			20
3 <sup>eme</sup> essai			30
4 <sup>eme</sup> essai	CaOCl	6	15
5 <sup>eme</sup> essai			20
6 <sup>eme</sup> essai			30
7 <sup>eme</sup> essai	HgCl <sub>2</sub>	0,7	3

Malgré toutes les précautions prises dans notre expérimentation soit la désinfection du matériel végétal en conditions septiques ou bien la stérilisation en conditions d'asepsie totale par les deux désinfectants (NaOCl, CaOCl) pour différentes durées de trempage : 15 ; 20 et 30 mn, les contaminations ont continué à se manifester.

Le stérilisant le plus efficace testé vis à vis des contaminations et des brunissements est le HgCl<sub>2</sub> à une concentration de 0,7 % et un temps de trempage de 3 mn. Suite à ce résultat satisfaisant, nous avons opté pour cette technique de désinfection et nous l'avons appliqué pour tout le matériel végétal utilisé et ce durant notre expérimentation.

#### 2.4.3. Milieux de culture

Les essais de microbouturage ont été effectués sur trois cépages autochtones AH, TD et LK en testant six différents milieux de culture (tableau 2.4) :

- QL-MS : (49) modifié par Bottalico *et al.* (17)
- MS : (13) (appendice A, annexe 2)
- 4 milieux (MS1, MS2, MS3 et MS4), dérivés du MS ont été testés où nous avons varié leur balance en macroéléments (tableau 2.4).

Tableau 2.4. Composition des macroéléments des milieux  
(MS, MS1, MS2, MS4 et QL-MS)

Composition	MS (mg/l)	MS <sub>1</sub> (mg/l)	MS <sub>2</sub> (mg/l)	MS <sub>3</sub> (mg/l)	MS <sub>4</sub> (mg/l)	QL-MS (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	1900	1900	1900	2100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	825	412.5	412.5	400
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	370	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170	170	170	170
Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	--	--	1200	1200	--	1200
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	1200	--	--	1200	--

Les six milieux ont été additionnés de microéléments, vitamines, chélates de fer et enrichis de 2,66 µM (BAP) et de 0,054 µM (ANA) et complétés par 30 g de saccharose et 7 g/l d'agar agar. Le pH a été ajusté entre 5,7 - 5,8 avant leur stérilisation soit, avec une solution de NaOH (0,1N) ou avec du HCl (0,1N). Le milieu a été ensuite versé dans des bocaux de 250 ml contenant 100 ml chacun

puis, stérilisés par autoclavage à une température de 121°C et une pression de 1 bar pendant 20 mn.

#### 2.4.4. Etablissement de la culture

La technique de microbouturage du matériel végétal nécessite le passage par quatre phases essentielles dans l'établissement de la culture :

- Phase d'initiation ;
- Phase de multiplication et d'élongation ;
- Phase d'enracinement ;
- Phase d'acclimatation et de durcissement.

##### 2.4.4.1. Phase d'initiation

Au cours de cette phase, des pousses apicales de (15 à 20 cm) de long des 3 cépages utilisés (AH, TD et LK), ont été collectées pendant la période végétative et coupées en segments uni-nodaux de (1 à 1,5 cm) de long, qui ont été soigneusement lavées sous conditions septiques.

Les fragments d'explants sont ensuite stérilisés au chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) à 0,7% (369). Ces portions sont ensuite excisées en segments comprenant un bourgeon axillaire et repiqués dans des bocaux en verre de 250 ml à raison de 5 explants par bocal. 20 explants ont été utilisés par milieu soit au total 360 explants (figure 2.9).

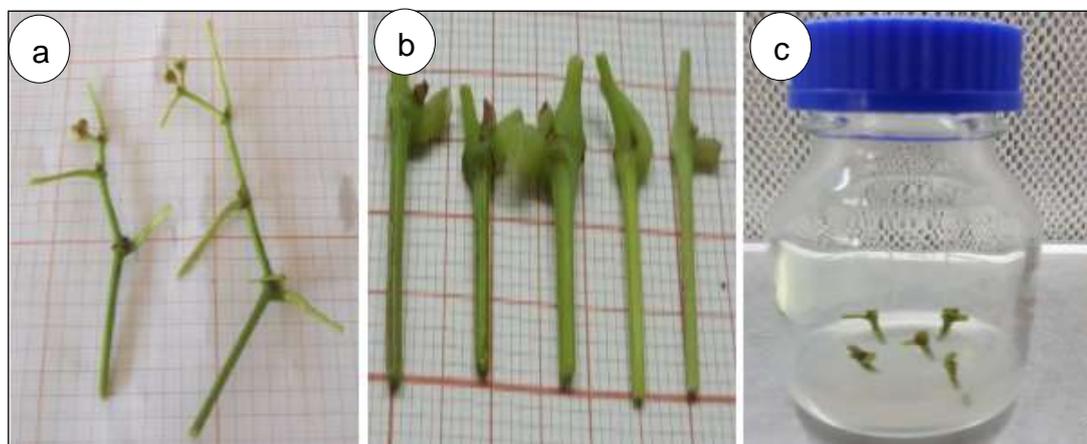


Figure 2.10. Etablissement de la culture

- (a) Bouture désinfectée
- (b) 5 explants contenant chacun un bourgeon nodal
- (c) Repiquage de 5 explants dans le milieu de culture

Les explants mis en culture ont été maintenus en chambre de culture à une température de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  et une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité à un flux de photons photosynthétiques de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fourni par les lampes fluorescentes (Osram blanc froid 18 W). Ces explants ont été maintenus dans ce milieu de culture pour une période de 20 jours.

#### 2.4.4.2. Phase de multiplication et d'élongation

Au bout de 20 jours, les explants ayant survécu à la phase d'initiation sont transférés dans les mêmes milieux frais pour 2 subcultures successives de 20 jours chacune, maintenus dans les mêmes conditions de culture dans des flacons en verre de 250 ml contenant 100 ml de milieu à raison de 5 explants par flacon (figure 2.10). Les mêmes milieux de la phase de l'établissement de culture ont été testés pour la phase de multiplication et d'élongation.



Figure 2.11. Multiplication et élongation des pousses  
 (a) Explants débouffés après 20j de culture  
 (b) 1<sup>ère</sup>subculture  
 (c) 2<sup>ème</sup>subculture

#### 2.4.4.3. Phase d'enracinement

Le processus d'enracinement passe par trois phases distinctes : l'induction, l'activité cellulaire et l'organisation des primordiaux et l'expression racinaire (112).

Les pousses en croissance active provenant d'explants cultivés pendant au moins 2 cycles de multiplication ont été excisées et utilisées pour l'enracinement *in vitro*. Lors de cette phase nous avons mené 2 différents essais :

Le premier consiste à cultiver des pousses individuelles sur les mêmes milieux dont les macroéléments (nitrates d'ammonium) ont été réduits de moitié (369), additionné de 20 g/l de saccharose et enrichi de 5,4  $\mu\text{M}$  d'ANA pendant 5 jours à l'obscurité, puis transférés en lumière sur les mêmes milieux mais dépourvus d'ANA (370 ; 371).

Le deuxième essai consiste à les cultiver directement en phase lumière sur les mêmes milieux de multiplication mais dépourvus d'ANA (figure 2.11).

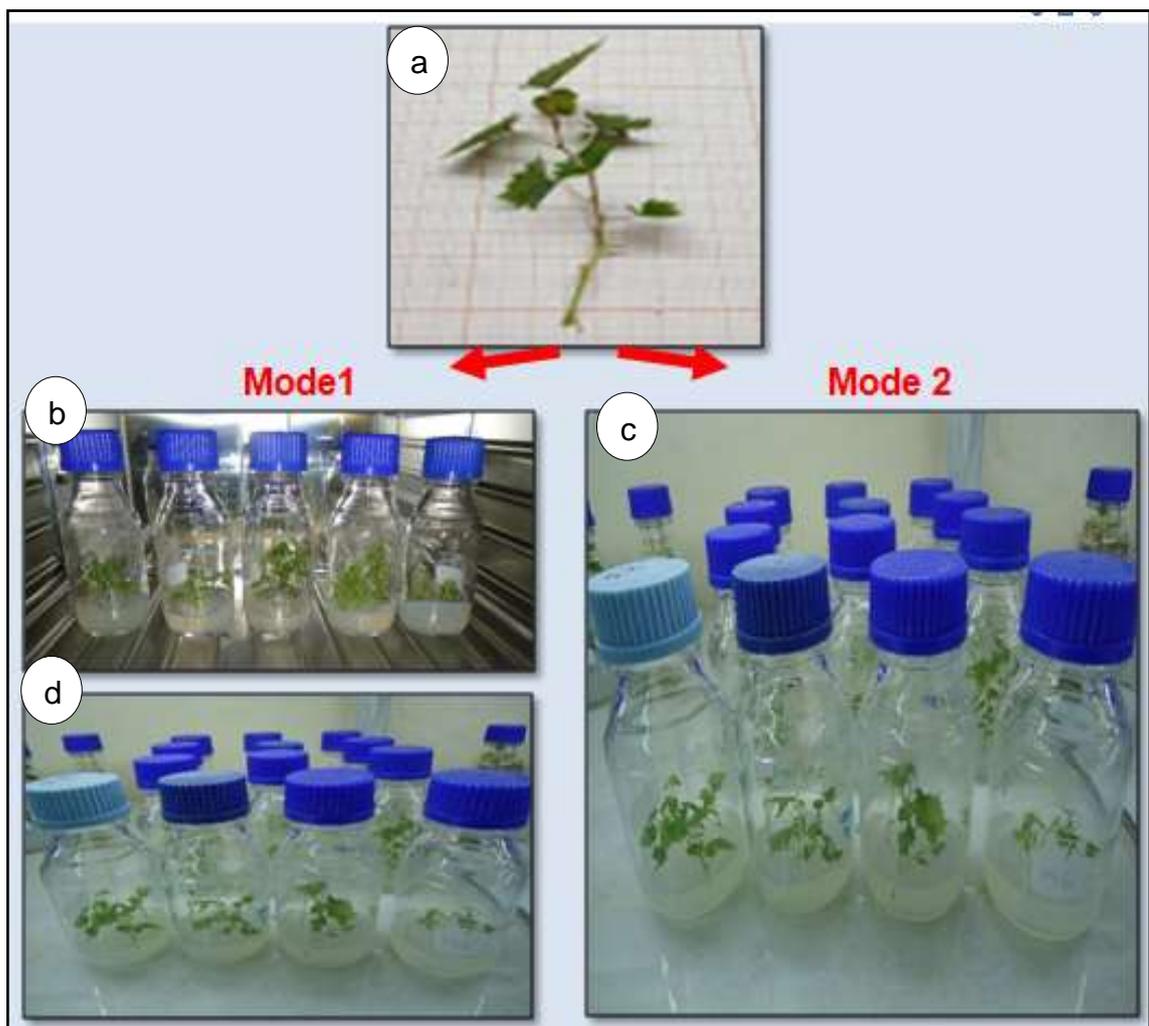


Figure 2.12. Etapes de préparation des pousses pour l'enracinement

- (a) Pousse prêt à l'enracinement
- (b) Mise des pousses à l'obscurité
- (c et d) Mise des pousses en phase lumière

#### 2.4.4.4. Phase d'acclimatation

Après 30 jours en phase d'enracinement, les vitroplants enracinés sont retirés des bocaux, débarrassés soigneusement de la gélose. Les racines des plantules sont réduites de 2/3 et repiquées dans des pots noirs en plastique (250 ml), remplis du substrat constitué de tourbe perlite, stérilisé à sec à 200°C pendant 2 h. Ces pots sont placés en chambre de croissance contrôlée. Afin d'éviter le dessèchement, les plantules sont placées en atmosphère confinée ( $H > 80\%$ ) par la couverture des pots avec un sac en polyéthylène transparent qui est par la suite, perforé et retiré progressivement dès l'apparition de nouvelles pousses. Cette phase dite de pré-acclimatation dure 30 jours. Un suivi régulier sur l'état nutritionnel et sanitaire des vitroplants est entrepris (figure 2.12).

L'arrosage se fait 1 fois par semaine selon les besoins, les vitroplants peuvent alors être progressivement traités. Après 30 jours d'acclimatation, les plantules sont débarrassées des sachets en plastique et exposées aux conditions normales de température et d'humidité. Ces dernières sont transférées par la suite pour élevage dans des conteneurs en plastique de 4 litres de substrat stérile sous des conditions de serre contrôlées.



Figure 2.13 : Pré acclimatation des plantules

- (a) Début de la pré-acclimatation,
- (b) après 1 mois d'acclimatation

#### 2.4.5. Paramètres évalués

Au cours des différentes phases de l'essai du microbouturage, nous avons évalué l'effet des différents milieux sur :

- Taux de contamination, de dessèchement, de débourement et de pousses régénérées *in vitro* ;
- Longueur, nombre moyen de pousses et de feuilles régénérées par explant ;
- Efficacité de l'élongation des pousses (SEE) ;
- Taux d'enracinement ;
- Longueur et nombre de racines par pousse ;
- Efficacité de l'élongation des racines (REE).

Nous avons sélectionné 20 explants uniformes pour chaque traitement (4 bocaux, contenant chacun 5 explants) pour l'analyse statistique.

Les trois paramètres (taux de pousses régénérées *in vitro*, longueur et le nombre moyen de pousses par explant), nous ont permis de calculer l'efficacité de l'élongation des pousses (SEE), afin d'évaluer la performance de croissance des cépages autochtones cultivés *in vitro* (372).

Ce paramètre, représente la longueur totale moyenne, exprimée en cm, de la masse végétative produite *in vitro* à partir d'un explant, calculée selon la formule :

$$SEE = (\text{Pourcentage d'explants produisant des pousses} \times \text{Nombre de pousses par explant} \times \text{Longueur moyenne de pousse}) / 100$$

L'aptitude à l'enracinement des pousses régénérées *in vitro* a été évaluée à 1 mois du transfert sur les milieux d'enracinement. Les 3 paramètres évalués, nous ont servi d'évaluer l'efficacité de l'élongation des racines (REE), rapportée par Haddad (372), afin de déterminer la performance de croissance racinaire des cépages autochtones cultivés *in vitro*. Ce dernier paramètre représente la longueur totale moyenne, exprimé en cm de la masse racinaire produite *in vitro* à partir d'une pousse régénérée par explant, il est calculé selon la formule

$$REE = (\text{Taux de pousses ayant produit de racines} \times \text{Nombre moyen de racines par pousse} \times \text{Longueur moyenne des racines}) / 100$$

## 2.5. ASSAINISSEMENT DE LA VIGNE

Peu de recherches sur l'état phytosanitaire de la vigne en Algérie vis à vis les viroses ont été réalisées. L'absence d'études détaillées sur les virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne nous a incité à rechercher encore d'autres techniques d'assainissement. Afin d'assainir les cépages autochtones détectés positifs, nous avons utilisé deux techniques, l'une repose sur la chimiothérapie et l'autre sur la phytothérapie. Il s'agit des cépages :

- (a) Aberkane (ABK)
- (b) Bezoul El Khadem (BEK)
- (c) Muscat de Fandouk (MF)
- (d) Amghar (AG)
- (e) Ferrana (F)

### 2.5.1. Symptomatologie

Les pieds-mères élevés sous serre présentent plusieurs symptômes de viroses (figure 2.13).

La symptomatologie reste insuffisante aussi pour détecter les virus vu la difficulté de distinguer les symptômes spécifiques pour chaque virus surtout en présence d'infection mixte (258).

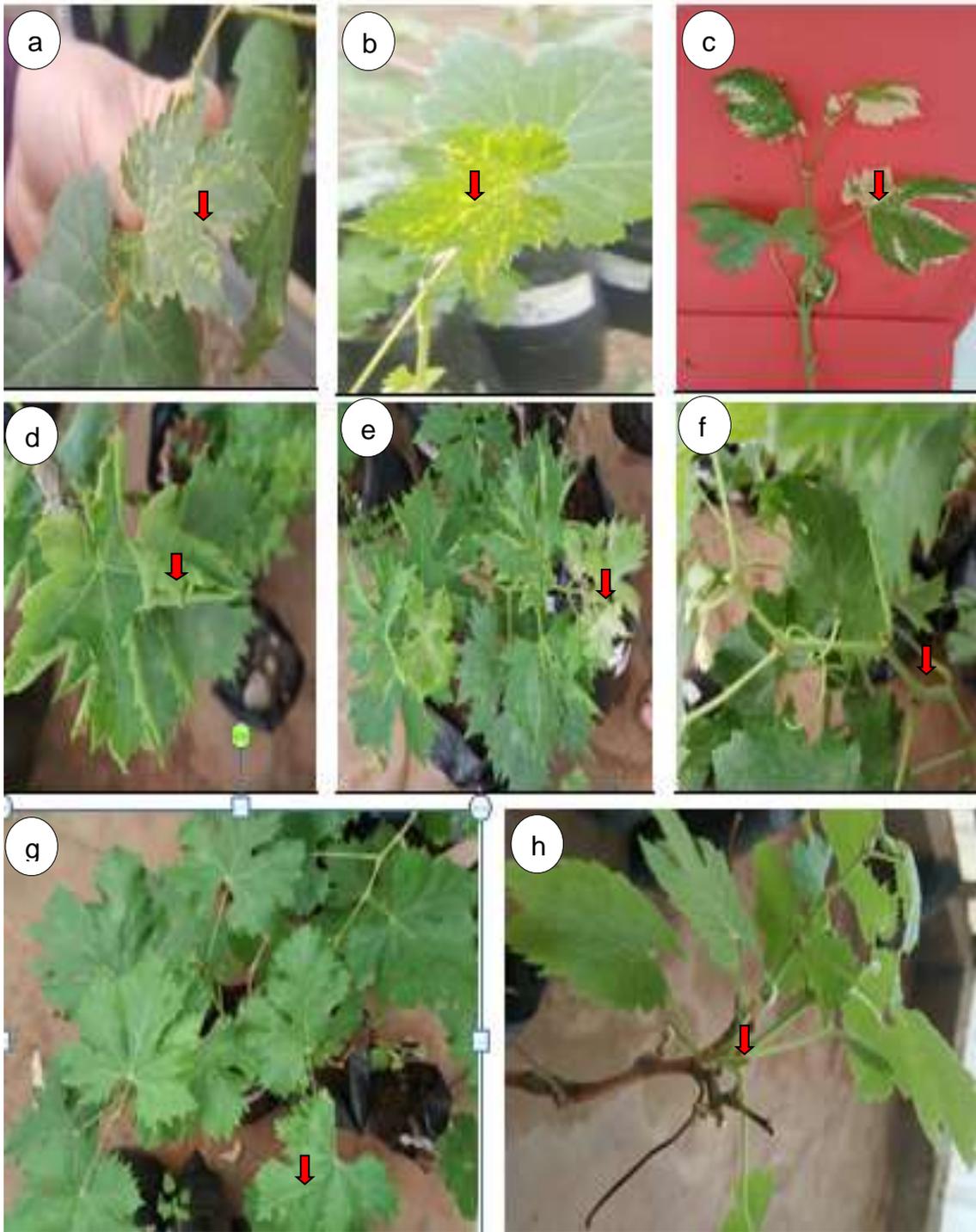


Figure 2.13. Symptômes observés sur les cépages étudiés

- (a, b et c) Marbrure et panachure sur feuilles
- (d) Enroulement des feuilles vers l'extérieur
- (e) Raccourcissement des entre-nœuds
- (f) Sarment en zigzag
- (g) Feuilles en éventail
- (h) Fasciation

### 2.5.2. Chimiothérapie

Nous avons utilisé cette technique pour tester l'assainissement de 4 cépages autochtones de la vigne (*Vitis vinifera* L.) (AB, BEK, MF et F) révélés positifs pour 2 virus (GLRaV3 et GFLV) par la méthode DAS-ELISA. Pour ce faire, nous avons utilisé la Ribavirine, agent chimique antiviral (1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-1, 2,4-triazole-3-carboxamide), utilisé en tant qu'en agent chimique à large spectre antiviral dans le domaine de la médecine humaine contre l'hépatite et la phytothérapie contre certains virus.

#### 2.5.2.1. Techniques de culture

La technique d'assainissement par la chimiothérapie consiste à cultiver les explants des 4 cépages sur le milieu MS (13), modifié lors de l'essai du microbouturage (MS<sub>3</sub>) qui a donné une meilleure prolifération des bourgeons ainsi qu'un taux de multiplication important dans l'essai de micropropagation. Ce milieu a été maintenu pour tous les essais d'assainissement. Pour cela, la Ribavirine a été additionnée au milieu après autoclavage. Par ailleurs, une dose de 200mg de Ribavirine est diluée dans 200 ml d'eau distillée stérile, stérilisée par des filtres de 0,22  $\mu$ m de diamètre et ajoutée au milieu de culture à raison de 20ml/l (figure 2.14).

Cette concentration est choisie suite aux recommandations de plusieurs auteurs pour l'assainissement viral des végétaux (374). Elle est également peu toxique pour la plante (324)

#### 2.5.2.2. Mise en culture des explants

Des bourgeons axillaires de 1 cm des 4 cépages autochtones, prélevés sur des pieds mères infectés au cours de la saison de croissance, ont été cultivés sur milieu de prolifération MS modifié (MS<sub>3</sub>) enrichi de 20 mg/l de Ribavirine pendant 8 semaines (figure 2.14).

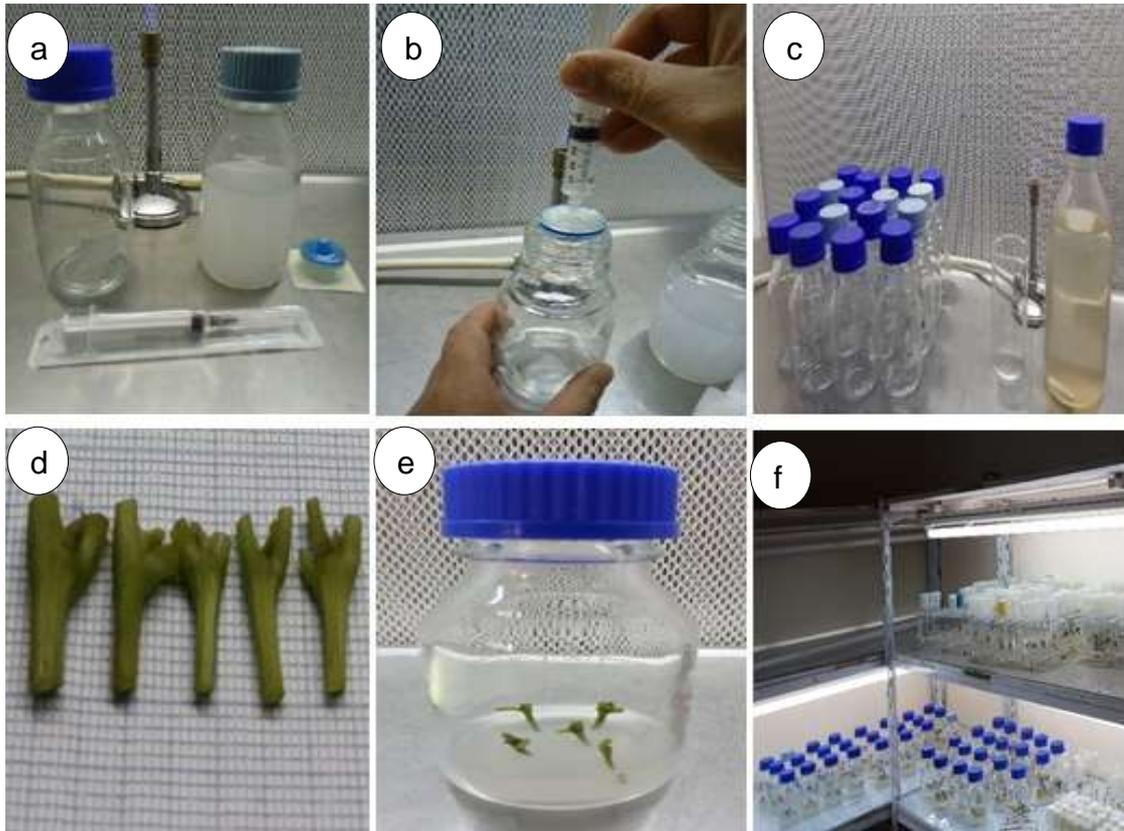


Figure 2.14. Etapes de l'établissement de la culture

- (a) et (b) Préparation et stérilisation de la solution de Ribavirine
- (c) Versement du milieu
- (d) 5 explants désinfectés contenant un bourgeon axillaire
- (e) Mise en culture des explants
- (f) Mise des bocaux dans la chambre de culture ( $T^{\circ}$  et H contrôlées)

### 2.5.2.3. Suivi de la culture

Après 4 semaines de l'établissement de la culture des 4 cépages autochtones (ABK, BEK, MF et F) les explants ayant développé des pousses sont retirés de leurs milieux de culture, débarrassés de la partie végétale. Ils sont transférés sur les mêmes milieux frais pour une durée de 4 semaines.

Les vitroplants obtenus après 8 semaines de traitement par Ribavirine ont été transférés sur le même milieu de multiplication sans viricide, pour les 3 repiquages successifs. Au fur et à mesure que les pousses régénérées *in vitro* se différencient, elles sont cultivées sur un milieu d'enracinement sans auxines. Deux témoins positifs de la plante mère infectée pour chaque cépage ont été régénérés *in vitro* sur un milieu sans Ribavirine. Les explants ont été maintenus dans des conditions contrôlées ( $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  et 16 h de photopériode).

### 2.5.3. Phytothérapie

La technique de phytothérapie concerne seulement deux cépages autochtones Ferrana (F) et Amghar (AG) qui se sont révélés positifs lors des tests sérologiques notamment le GLRaV-3. Pour cela, nous avons utilisé comme bioviricide à base de plantes, l'extrait d'ail (*Allium sativum* L.) en tant que produit naturel thérapeutique ne présentant aucun effet néfaste pour l'environnement.

Ce produit dont sa composition minérale a été additionné au milieu de culture MS<sub>3</sub> (tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Composition en minéraux et oligo-éléments de l'ail (/100g de matière fraîche) (344).

Elément	Taux en (%)
Sodium ( <b>Na</b> )	8,0mg ±2%
Potassium ( <b>K</b> )	373,0 mg± 9%
Calcium( <b>Ca</b> )	18,0mg ± 3%
Phosphore ( <b>P</b> )	64,0mg± 3%
Fer ( <b>Fe</b> )	2,2mg± 5%
Magnésium ( <b>Mg</b> )	8,0mg± 4%
Manganese ( <b>Mn</b> )	1,3mg± 2%
Zinc ( <b>Zn</b> )	0.9mg± 5%
Cobalt( <b>Co</b> )	0.9µg± 3%
Sélénium ( <b>Se</b> )	77,1µg ± 2%
Iode ( <b>I</b> )	94,0 µg ± 4%

### 2.5.3.1. Techniques de culture

La technique d'assainissement par la phytothérapie consiste à cultiver les explants des deux cépages autochtones (F) et (AG) sur le milieu MS, modifié (MS<sub>3</sub>). Pour cela, 5g de matière fraîche provenant de gousses d'ail, ont été manuellement séparées des bulbes, puis éplucher avec un couteau pour retirer l'épiderme restant. Le bulbe d'ail a été broyé dans 100 ml d'eau distillée stérile afin d'obtenir un mélange homogène (F), après centrifugation à 3000 tours pendant 10 min, le filtrat est stérilisé sous hotte à flux laminaire horizontale par des filtres de 0,22 µm, puis additionné à 1 litre du milieu de culture après autoclavage à raison de 20 ml du filtrat. Sous hôte à flux laminaire horizontal et à partir du filtrat de la solution mère (F), 3 dilutions D1 (75%), D2 (50%) et D3 (25%) ont été prélevées à raison de 20 ml/l de chaque et ajustées au milieu de culture, on obtient donc 4 différents milieux (figure 2.15).

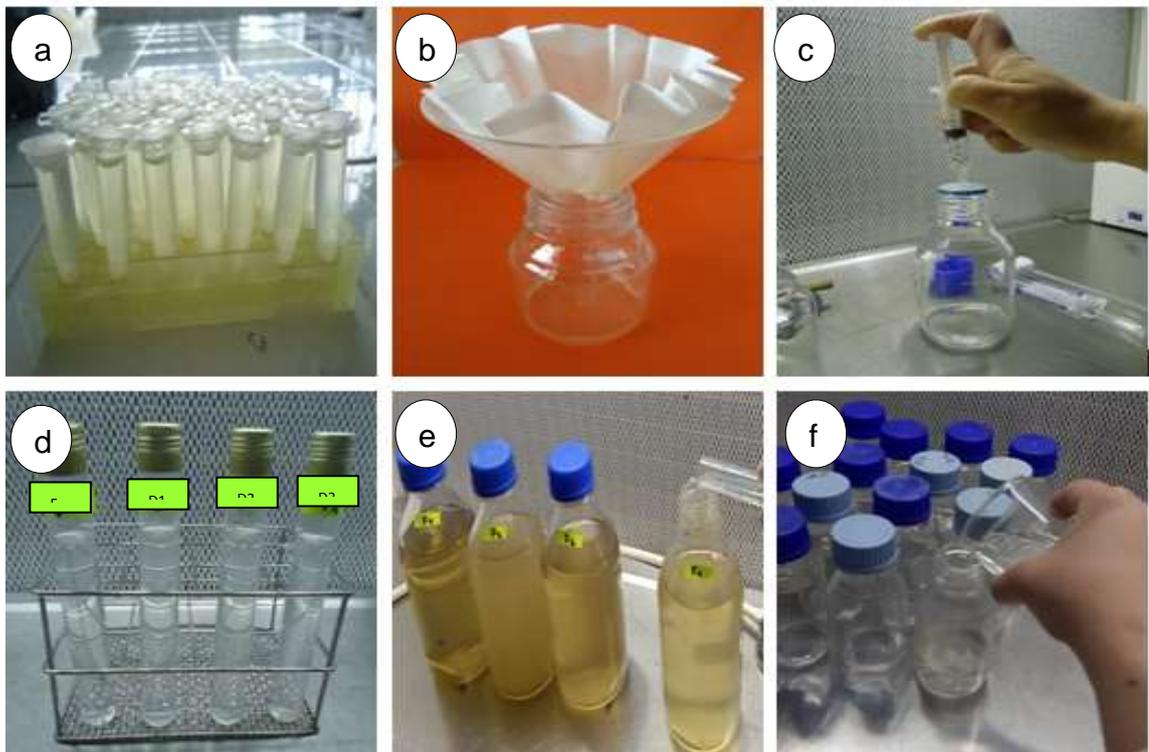


Figure 2.15 : Préparation des milieux de culture enrichis d'extrait d'ail

- (a) Récupération de l'extrait d'ail
- (b) Récupération de la solution mère (F)
- (c) Stérilisation du filtrat,
- (d) Préparation des quatre filtrats F, D1, D2 et D3
- (e) Ajout de 20ml/l du filtrat au milieu
- (f) Milieux préparés

### 2.5.3.2. Mise en culture des explants

Afin de mettre en évidence l'effet combiné du milieu MS<sub>3</sub> et de l'extrait de l'ail sur la prolifération et la croissance des pousses. Deux essais ont été entrepris, sur les deux cépages Ferrana (F) et Amghar (AG).

Le premier essai consiste à cultiver des explants de 1cm de ces 2 cépages sur milieu MS<sub>3</sub> enrichis de 20 ml/l d'extrait d'ail (F, D1, D2 et D3), nous obtenons 4 différents milieux MS<sub>3</sub>F, MS<sub>3</sub>D1, MS<sub>3</sub>D2, MS<sub>3</sub>D3.

Le deuxième consiste à cultiver des explants de 1cm de ces 2 cépages sur milieu MS'<sub>3</sub> (MS<sub>3</sub>/2) où les macroéléments ont été réduits de moitié et dépourvu de régulateurs de croissance, enrichis toujours de la même dose d'extrait d'ail (F, D1, D2 et D3). Les 4 milieux MS'<sub>3</sub>F, MS'<sub>3</sub>D1, MS'<sub>3</sub>D2, MS'<sub>3</sub>D3 sont utilisés pour prolifération des pousses *in vitro* durant 8 semaines de culture.

### 2.5.3.3. Suivi de la culture

Après 4 semaines de l'établissement de la culture, les explants ayant développé des pousses sont retirés de leurs milieux, Ils sont transférés sur les mêmes milieux frais pour 4 semaines de culture.

Les vitroplants obtenus après 8 semaines de traitement, sont transférés sur le même milieu de multiplication mais dépourvu d'extrait d'ail, pour 2 repiquages successifs. Au fur et à mesure que les pousses régénérées *in vitro* se différencient, Deux plantules témoins positives de la plante mère infectée pour chaque cépage ont été régénérées *in vitro* sur un milieu sans extrait d'ail. Les explants ont été maintenus dans des conditions contrôlées (24±1°C, 16 h de photopériode).

### 2.6.3.4. Analyse immuno-enzymatique

Les plantules assainis par chimiothérapie et phytothérapie sont testées par immuno-enzymatique réalisé grâce au sérum polyclonaux fournis par le Kit de BIOREBA contre le GLRaV-3 et le GFLV à une concentration de 1/1000, selon le protocole décrit par Clark et Adams (266), selon les étapes suivantes :

- 1- Sensibilisation de la plaque, dépôt de l'anticorps spécifique dilué au 1/1000 dans le tampon carbonate bicarbonate ;
- 2- Incubation de la plaque, 3 heures à 37°C ;
- 3- Lavage 3 fois, 5 minutes avec le PBS-Tween ;
- 4- Dépôt de l'antigène, extrait à raison de 1g/4ml dans le PBS (0,1M pH 7,4) ;
- 5- Incubation pendant toute la nuit à 4°C ;
- 6- Lavage 3 fois, 5 minutes avec le PBS-Tween. ;
- 7- Dépôt de l'anticorps spécifique conjugué à la phosphatase alcaline, dilué au 1/1000 dans le PBS (0,1M pH 7,4) ;
- 8- Incubation 3 heures à 37°C ;
- 9- Lavage, 3 fois 5 minutes avec le PBS-Tween ;
- 10- Dépôt du substrat, PNPP dilué (1 mg/1ml) dans du tampon du substrat ;
- 11- Incubation à température ambiante ;
- 12- 1<sup>ère</sup> lecture au bout de 15 minutes d'incubation ;
- 13- Arrêt de la réaction par addition de NaOH 1N. 2<sup>ème</sup> lecture au bout de 24 heures.

Les lectures de l'absorbance ont été obtenues à 405 nm avec un lecteur de microplaquette automatique (METERTECH Σ960). Le niveau d'infection est mesuré en fonction de la densité optique (le degré de coloration) de réaction ELISA.

#### 2.5.4. Paramètres évalués

Pour l'assainissement, le pourcentage des réponses des explants assainis par chimiothérapie et phytothérapie a été sensiblement évalué pour étudier l'effet des deux traitements sur :

- Taux de phytotoxicité exprimé en pourcentage (%)
- Nombre et la longueur moyenne des pousses régénérées.

Nous avons sélectionné 15 explants uniformes pour chaque traitement (3 bocaux, contenant chacun 5 explants).

## 2.6. Expression des résultats

Le dispositif expérimental adopté est en randomisation totale, les données ont été évaluées par une analyse de variance à l'aide d'un logiciel statistique (STATISTICA version 12).

Les différences au sein et entre les traitements ont été estimées par une analyse de la moyenne de séparation, en utilisant le test le moins significatif de différence (LSD) avec un risque de niveau de signification de 0,05 %.

Avant l'analyse, les données en pourcentage, ont été transformées en arc sin-racine carrée. Durant toute notre expérimentation, différentes lettres indiquent des différences significatives ( $P \geq 0,05$ ).

## PARTIE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. EVALUATION SANITAIRE DES PIEDS-MERES

Les analyses sérologiques des pieds mères des cépages choisis situés dans la serre d'élevage ont révélé des sensibilités différentes.

Les cépages Ahmar Bou Ameer (AH), Tadhith (TD) et Lakhzine (LK), ont révélé des résultats négatifs vis à vis le GLRaV-3 et le GFLV. Ces trois cépages sains et indemnes de ces deux virus ont fait l'objet d'une étude de régénération par microbouturage.

Ce contrôle, nous a permis de montrer que les cépages Aberkane (ABK), Bezoul El Khadem (BEK), Muscat de Fandouk (MF) sont positifs vis à vis ces deux virus les plus virulents. Les deux cépages Ferrana (F) et Amghar (AG) se sont révélés positifs uniquement pour le GLRaV-3 (tableau 3.1).

Tableau 3.1. Analyses du DAS ELISA des pieds-mères

Cépages	Résultats	
	GLRaV-3	GFLV
Ahmar Bou Ameer ( <b>AH</b> )	-	-
Tadhith ( <b>TD</b> )	-	-
Lakhzine ( <b>LK</b> )	-	-
Aberkane ( <b>ABK</b> )	+	+
B. El-Khadem ( <b>BEK</b> )	+	+
M. Fandouk ( <b>MF</b> )	+	+
Ferana ( <b>F</b> )	+	-
Amghar ( <b>AG</b> )	+	-

### 3.2. DESINFECTION DU MATERIEL VEGETAL

Les essais entrepris sur la désinfection du matériel végétal du cépage Ahmar Bou Aneur (AH), nous ont montré des variations de contamination et de dessèchement (tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Taux de contamination et de dessèchement

Essais de désinfection	Temps de trempage	Taux de contamination	Taux de dessèchement
NaOCl	15	90%	55%
	20	78%	60%
	30	65%	90%
CaOCl	15	90%	32%
	20	70%	45%
	30	65%	60%
HgCl <sub>2</sub>	3	0%	2%

Nous remarquons, que la désinfection avec l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et de calcium (CaOCl) avec un temps de trempage de 15, 20 et 30 min, n'ont pas donné des résultats escomptés sur les contaminants externes et ont engendré un taux important d'explants desséchés.

Les taux de contamination les plus importants (90%), ont été enregistrés pour les explants traités par NaOCl et de sodium CaOCl durant 15 min.

Ceci peut s'expliquer par l'abondance des microorganismes (champignons, bactéries) exogènes et endogènes liés aux plants de vigne cultivés à partir des collections de pieds adultes en plein champ. Notons que les taux de contaminations cryptogamiques demeurent majoritaires.

Par ailleurs, la désinfection par CaOCl et NaOCl a donné les taux de brunissement les plus élevés (60 et 90 %) respectivement et ce pour une durée de 30 min de trempage.

Par contre, les explants traités par le bichlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) sont totalement stériles. Celui-ci a donné un taux de contamination nul et un faible taux de dessèchement estimé à 2% comparé aux autres essais.

### 3.3. MICROBOUTURAGE

#### 3.3.1. Phase d'établissement de la culture

Le débourrement est le moment où les écailles protectrices qui recouvrent le bourgeon s'écartent, laissant apparaître la bourre. Il marque la fin de la dormance des bourgeons et le début du réveil végétatif avec l'apparition du rameaux vert et les nouveaux organes (84).

Après 5 jours de l'ensemencement des explants des trois cépages contrôlés indemnes des 2 virus (GLRaV-3 et GFLV) sur les 06 milieux de culture testés, les bourgeons axillaires ont commencé à débourrer. Aucune contamination, qu'elle soit d'origine bactérienne ou fongique n'a été observée durant cette phase (figure 3.1).



Figure 3.1 : Débourrement après 5 jours de la mise en culture sur milieu MS3

- (a) Ahmar Bou Ameer (AH)
- (b) Tadhith (TD)
- (c) Lakhzine (LK)

Au bout de 20 jours, tous les explants ont débourré et sont dépourvus de contaminants endogènes (figure 3.2).

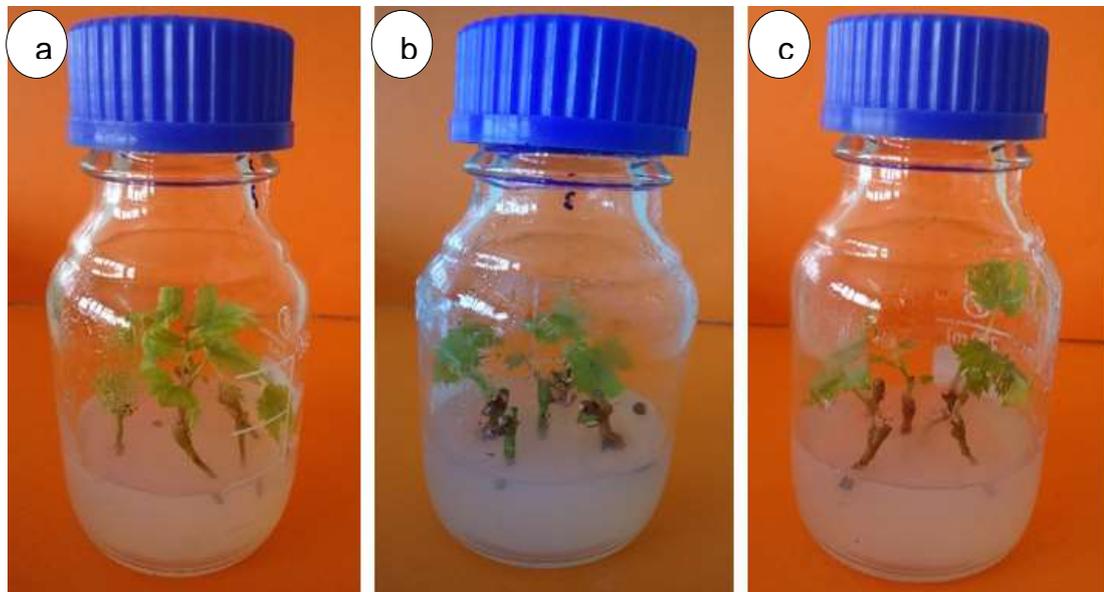


Figure 3.2. Débourement après 20 jours de la mise en culture sur milieu MS3

- (a) Ahmar Bou Ameer (AH)
- (b) Tadhith (TD)
- (c) Lakhzine (LK)

En effet, pour l'entrée en activité des bourgeons axillaires, Le milieu MS<sub>2</sub> a donné un taux de débourement de 100% pour le génotype Tadhith uniquement, tandis que, le milieu MS<sub>3</sub> a enregistré le plus important taux de débourement avec 100% pour les trois génotypes étudiés (figure 3.3).

Les résultats obtenus après 20 jours De repiquage ont révélé des réactions très différentes du comportement des explants vis-à-vis des milieux de prolifération et des cépages testés. Le taux de débourement des explants varie significativement ( $p=0,0106$ ) (appendice B, annexe 1). La comparaison des moyennes montre 3 groupes homogènes (a, b et c) (appendice B, annexe 2).

Le milieu MS<sub>3</sub> testé dont les nitrates d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) sont réduits de  $\frac{1}{4}$  et le ( $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ) est substitué par le ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$ ) a enregistré le plus important taux de débourement soit (100%) pour les trois génotypes étudiés. Le milieu MS<sub>2</sub> dont les nitrates d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) sont réduits de  $\frac{1}{2}$  et le ( $\text{CaCl}_2,$

2H<sub>2</sub>O) est substitué par le (Ca(NO<sub>3</sub>), 4H<sub>2</sub>O) a donné le même taux (100%) pour le génotype Tadrith (TD) (figure 3.3).

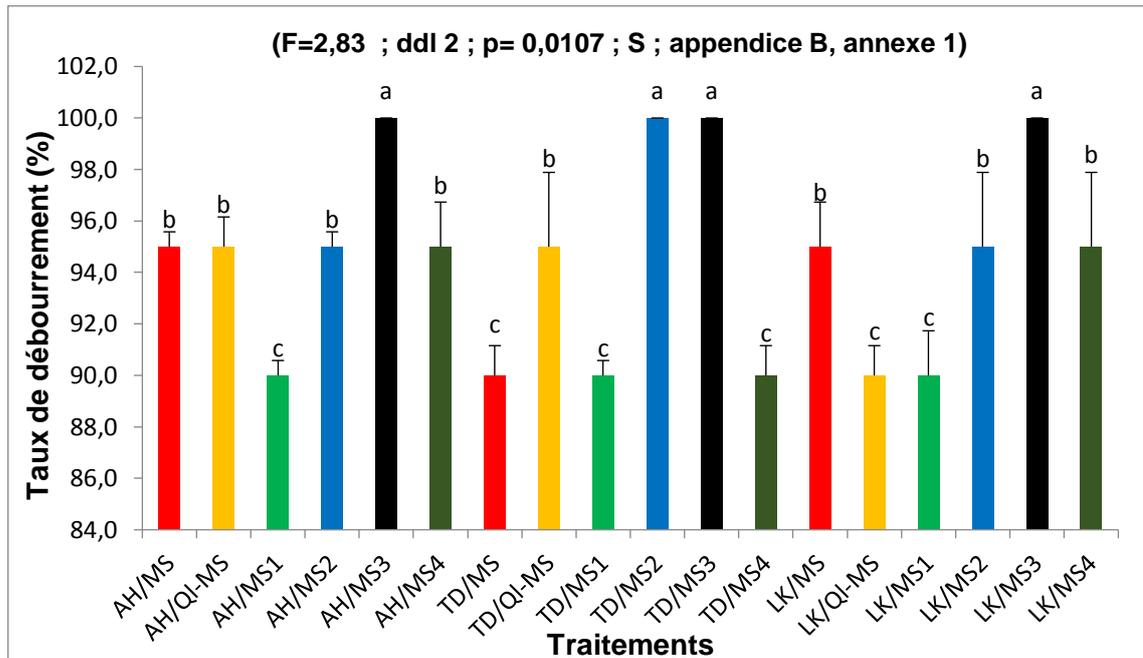


Figure 3.3. Effet de l'interaction cépage/ milieu sur le taux de débournement

(AH) Ahmar Bou Aneur  
 (TD) Tadrith  
 (LK) Lakhzine

### 3.3.2. Phase de multiplication

Les explants provenant des 3 cépages ont révélé des réponses différentes vis à vis le microbouturage.

Les résultats de la multiplication montrent que la réponse de la régénération des pousses varie en fonction de la composition minérale et du cépage testé. L'effet de chaque traitement a été vérifié suite à deux subcultures (2 mois) après transfert sur milieu de multiplication

#### 3.3.2.1. Taux de reprise des explants

Le taux d'explants survécus influe significativement ( $p=0,0382$ ) et varie de 80% pour le cépage AH sur les milieux (MS, MS<sub>1</sub>, MS<sub>4</sub>, QL-MS) et MS<sub>1</sub> pour le cépage TD à 95% pour les deux cépages AH et TD sur milieux (MS<sub>2</sub> et MS<sub>3</sub>). Ce même taux est obtenu uniquement sur milieu MS<sub>3</sub> pour le cépage LK. La

comparaison des moyennes montre 2 groupes homogènes (a et b) avec un autre groupe intermédiaire (ab) (appendice B, annexes 3 et 4).

#### 3.3.2.2. Développement de pousses

Le nombre moyen de pousses formées a significativement été affecté par le milieu de culture. Le nombre le plus élevé a été obtenu avec le cépage (LK) cultivé sur milieu MS<sub>3</sub> formant 2 pousses. Cependant, le plus faible nombre de pousse régénérée *in vitro* par explant a été donné par tous les autres traitements avec 1 pousse chacune. La comparaison des moyennes montre 2 groupes homogènes (a et b) (appendice B, annexes 5 et 6).

#### 3.3.2.3. Longueur des pousses

Indépendamment du cépage étudié, le milieu de culture a aussi affecté significativement la longueur de pousses ( $p= 0,0481$ ). Le milieu MS<sub>3</sub> a permis un allongement de 2,7 ; 2,54 et 2,33 cm respectivement sur les trois cépages (LK, AH et TD). La comparaison des moyennes montre 6 groupes homogènes et (a, b, c, d, e et f,) et 3 intermédiaires (ab, cde et def) (appendice B, annexes 7 et 8).

#### 3.3.2.4. Efficacité de l'Elongation des Pousses (SEE)

La SEE a montré clairement qu'indépendamment du cépage, le MS<sub>3</sub> a été très performant sur la multiplication des pousses par rapport aux autres milieux. En effet, les trois meilleurs longueurs moyennes obtenues selon la formule SEE avec 2,55 ; 2,90 et 4,20 cm sont celles repiquées sur le milieu MS<sub>3</sub> pour les trois cépages (TD, AH et LK) respectivement (figure 3.4).

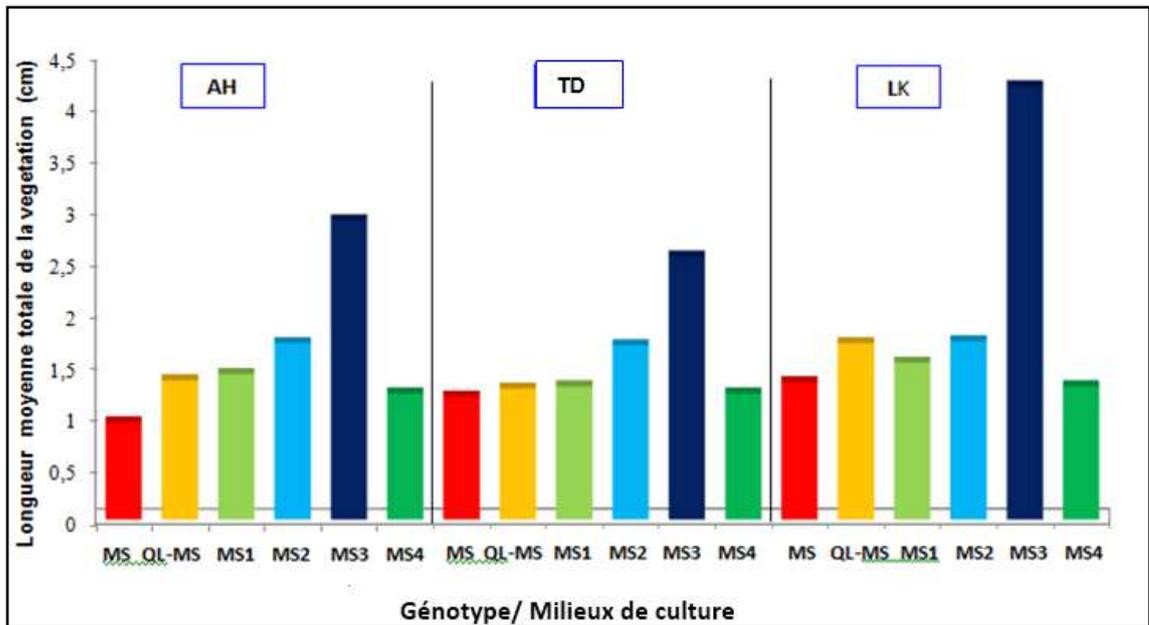


Figure 3.4. Effet de l'interaction (cépage/ milieu) sur la SEE

(AH) Ahmar Bou Ameur

(TD) Tadhith

(LK) Lakhzine

Le milieu (MS<sub>3</sub>) a donné les meilleurs résultats de croissance avec des pousses vigoureuses. Le milieu MS<sub>2</sub> a montré des résultats intermédiaires, alors que le milieu MS a induit la plus faible performance d'allongement de pousses (appendice B, annexe 11).

### 3.3.2.5. Nombre de feuilles

Le milieu de culture n'a pas affecté significativement le nombre de feuilles ( $p= 0,8131$ ) Cependant, quel que soit le cépage étudié, le milieu MS<sub>3</sub>, a permis la production d'un grand nombre de feuilles avec environ de 4 à 5 respectivement pour les trois cépages (AH, TD et LK) (appendice B, annexes 9 et 10).

Après 60 jours d'élongation sur le milieu MS<sub>3</sub>, les cépages étudiés (AH, LK et TD) présentent des pousses bien développées, vigoureuses avec des entrenœuds distincts et un feuillage important de couleur vert foncé (figure 3.5 et 3.6).

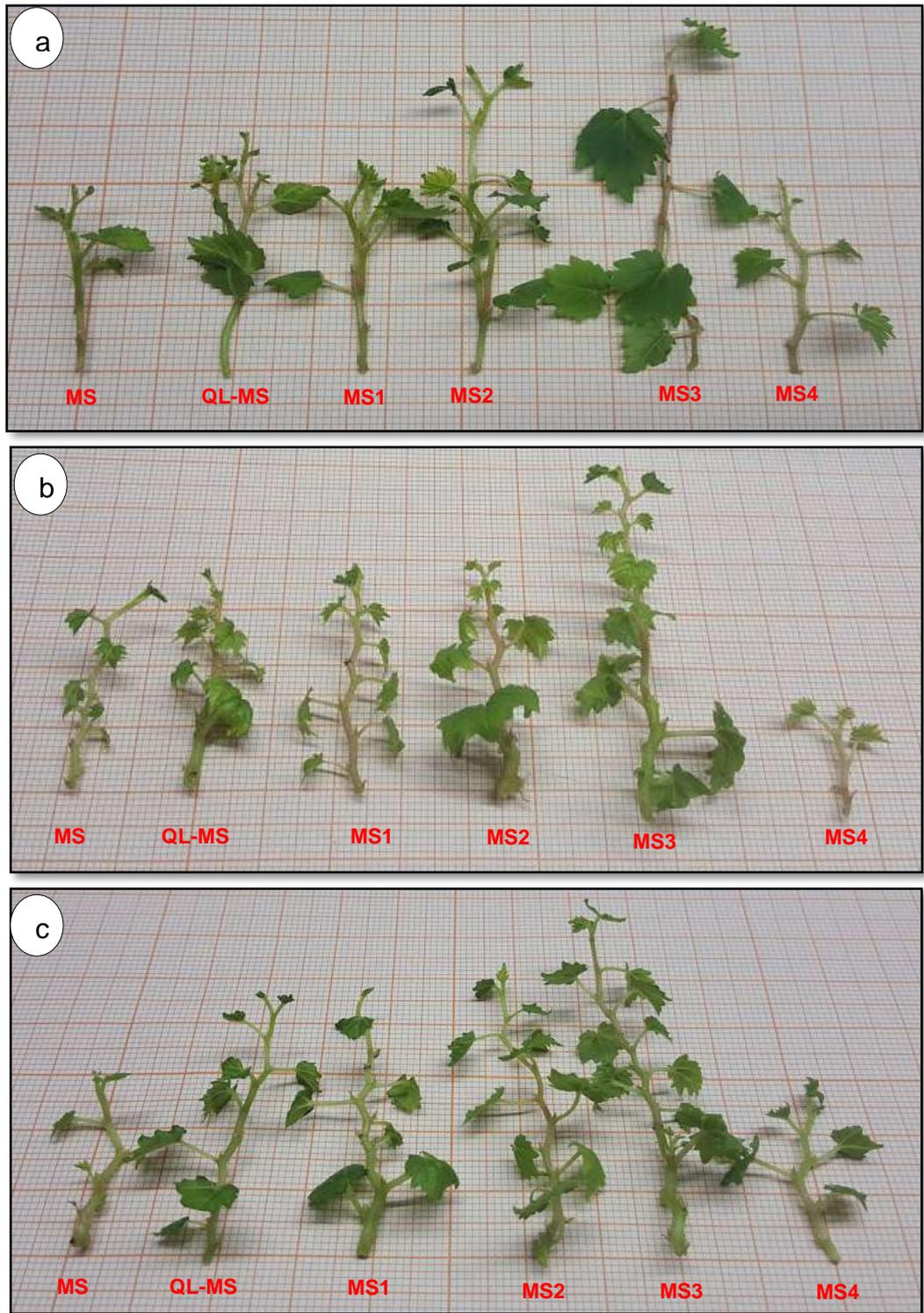


Figure 3.5. Aspect des pousses après 2 subcultures des cépages étudiés

- (a) Ahmar Bou Aneur (AH)
- (b) Tadhith (TD)
- (c) Lakhzine (LK)

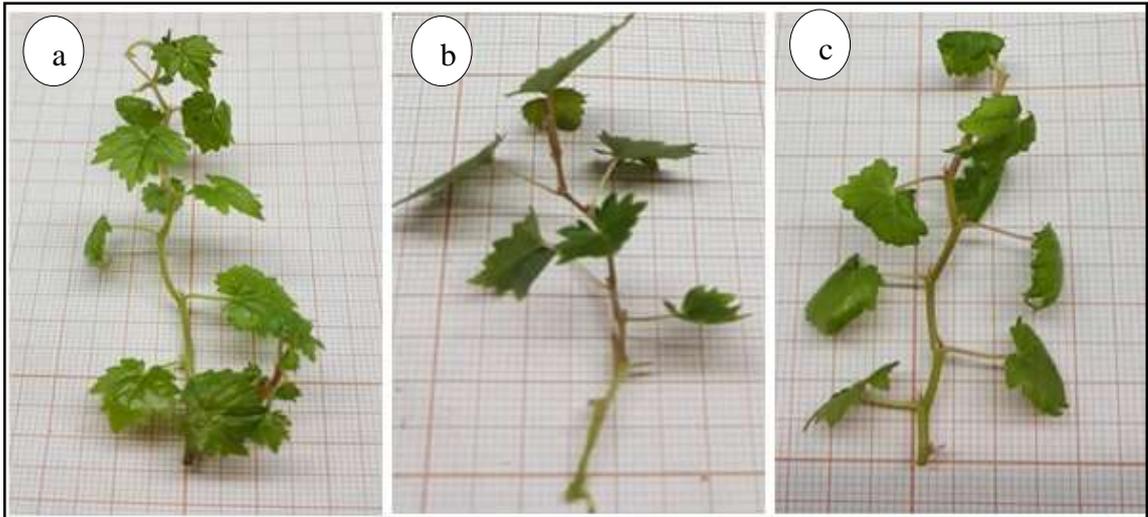


Figure 3.6. Aspect des pousses de cépages étudiés après 60 jours d'élongation sur le milieu MS<sub>3</sub>

- |     |                 |      |
|-----|-----------------|------|
| (a) | Ahmar Bou Ameer | (AH) |
| (b) | Tadhith         | (TD) |
| (c) | Lakhzine        | (LK) |

### 3.3.3. Phase d'enracinement

La phase d'enracinement a été réalisée sur milieu MS<sub>3</sub> réduit de moitié ( $\frac{1}{2}$  MS<sub>3</sub>) et le saccharose est réduit de 30 à 20 g, pourvu ou pas d'hormone stimulante ANA.

Lors de cette étude, la réalisation de la phase d'enracinement est conduite sur des pousses bien développées, obtenues lors de la phase d'élongation. L'induction s'est déroulée selon les deux modes.

#### 3.3.3.1. Induction racinaire

Les résultats montrent que au cours du mode 1 (phase obscure / lumière), l'apparition des premières ébauches racinaires au bout de 10 jours de la mise en place sur le milieu d'enracinement. Les racines observées sont courtes, peu vigoureuses et dépourvues de chevelus racinaires (figure 3.7).

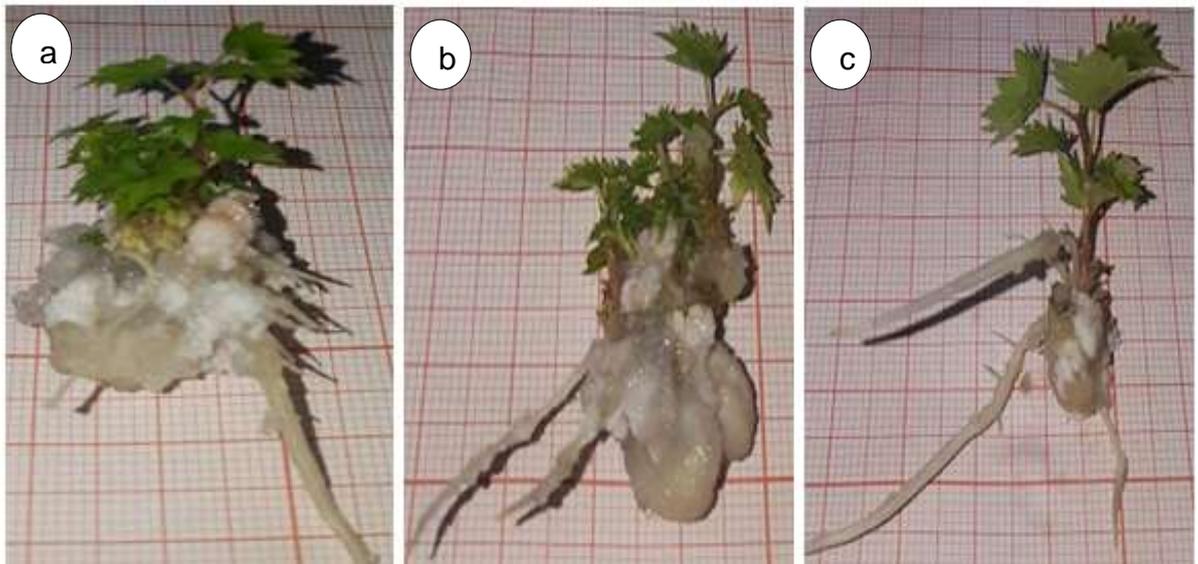


Figure 3.7. Aspect des racines des cépages étudiés sur milieu pourvu d'ANA

- (a) Ahmar Bou Ameer (Cal avec racine vigoureuse et quelques racines latérales)
- (b) Tadhith (cal avec 2 racines vigoureuses)
- (c) Lakhzine (petit cal avec racines assez vigoureuses)

La 2<sup>ème</sup> phase uniquement en présence de lumière montre que les ébauches racinaires sont apparues au bout de 5 jours seulement de la mise en place sur milieu d'enracinement.

Notre étude a montré que l'hormone ANA n'a pas d'effet stimulant pour induire l'enracinement des pousses régénérées *in vitro* et ce quel que soit le cépage testé. Nous avons obtenu des résultats similaires sur des milieux dépourvus en cette hormone, avec des pousses plus vigoureuses et abondantes et présentant des chevelus racinaires bien développés (figure 3.8).

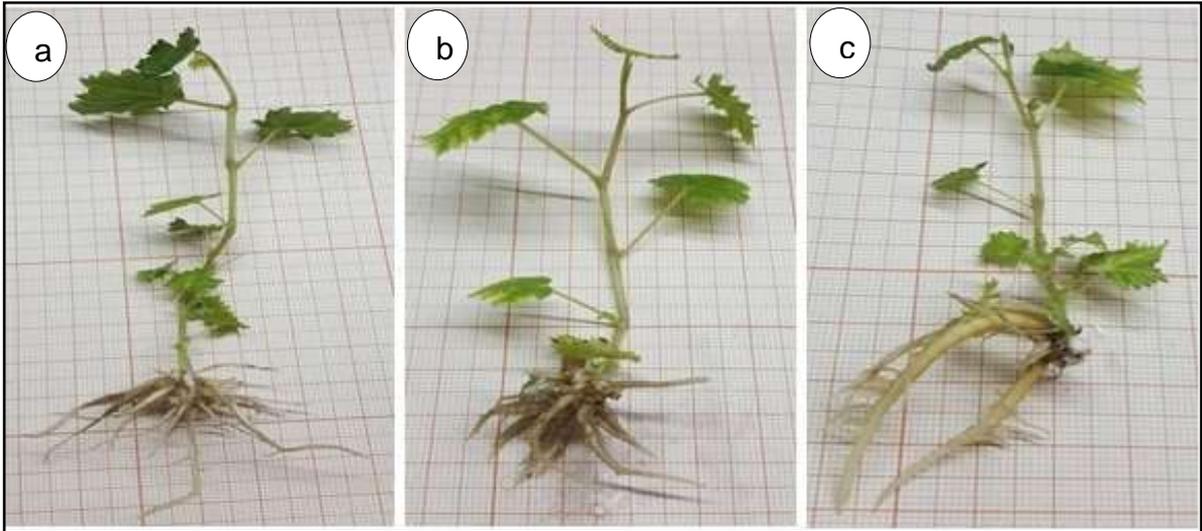


Figure 3.8. Aspect des racines des cépages étudiés sur milieu dépourvu d'ANA  
 (a) Ahmar Bou Aneur (racines fasciculées, filiformes, réparties autour du talon  
 (b) Tadhith (racines vigoureuses et courtes)  
 (c) Lakhzine (racines très vigoureuses autour du talon)

### 3.3.3.2. Taux d'enracinement, nombre et longueur moyenne des racines

Nos résultats montrent que l'ensemble paramètres d'enracinement respectivement le taux d'enracinement, la longueur moyenne et le nombre moyen des racines pour le mode 1 et 2, varie significativement respectivement ( $p= 0,0292$  ;  $p= 0,0018$  ;  $p= 0, 0027$ ) (appendice B, annexes 12, 14 et 16), en induisant une rhizogénèse à la base des pousses régénérées *in vitro*. L'intensité de celle-ci varie selon la présence et l'absence d'ANA. En effet, indépendamment des cépages testés, les milieux dépourvus d'ANA se révèlent très efficaces vis à vis l'enracinement des pousses développées *in vitro*.

Cependant, le milieu MS<sub>3</sub> a permis pour les trois cépages testés (TD, AH et LK) les meilleures aptitudes à l'enracinement.

### 3.3.3.3. Génotype

Un effet génotypique sur l'enracinement en absence d'ANA a été observé (appendice B, annexe 18). En effet, avec l'usage de la même balance minérale du milieu MS<sub>3</sub>, le meilleur taux d'enracinement a été enregistré par le cépage (TD) avec 81,67%, tandis que pour l'élongation racinaire, les meilleurs résultats ont été

obtenus par le cépage AH avec 7,68 cm, quant au nombre moyen de racines par pousse régénérée *in vitro*, le meilleur résultat a été obtenu sur le même milieu par le cépage LK avec environ 6 racines (appendice B, annexes 13, 15 et 17)

#### 3.3.3.4. Efficacité de l'élongation racinaire (REE)

Le REE nous a permis de déduire l'effet que peut avoir le mode d'enracinement, le génotype et le milieu de culture sur la rhizogénèse. Nous signalons que le mode 2 (milieu sans ANA) a donné les meilleurs performances en allongement avec 27,8 ; 25,8 et 21,25 cm pour les trois cépages étudiés (TD, AH et LK) respectivement, cultivés sur milieu MS<sub>3</sub> (figure 3.9).

Les résultats du REE confirment les conclusions que nous avons faites précédemment en analysant les trois paramètres séparément (taux d'enracinement, longueur moyenne et le nombre moyen de racines par pousse régénérée *in vitro*).

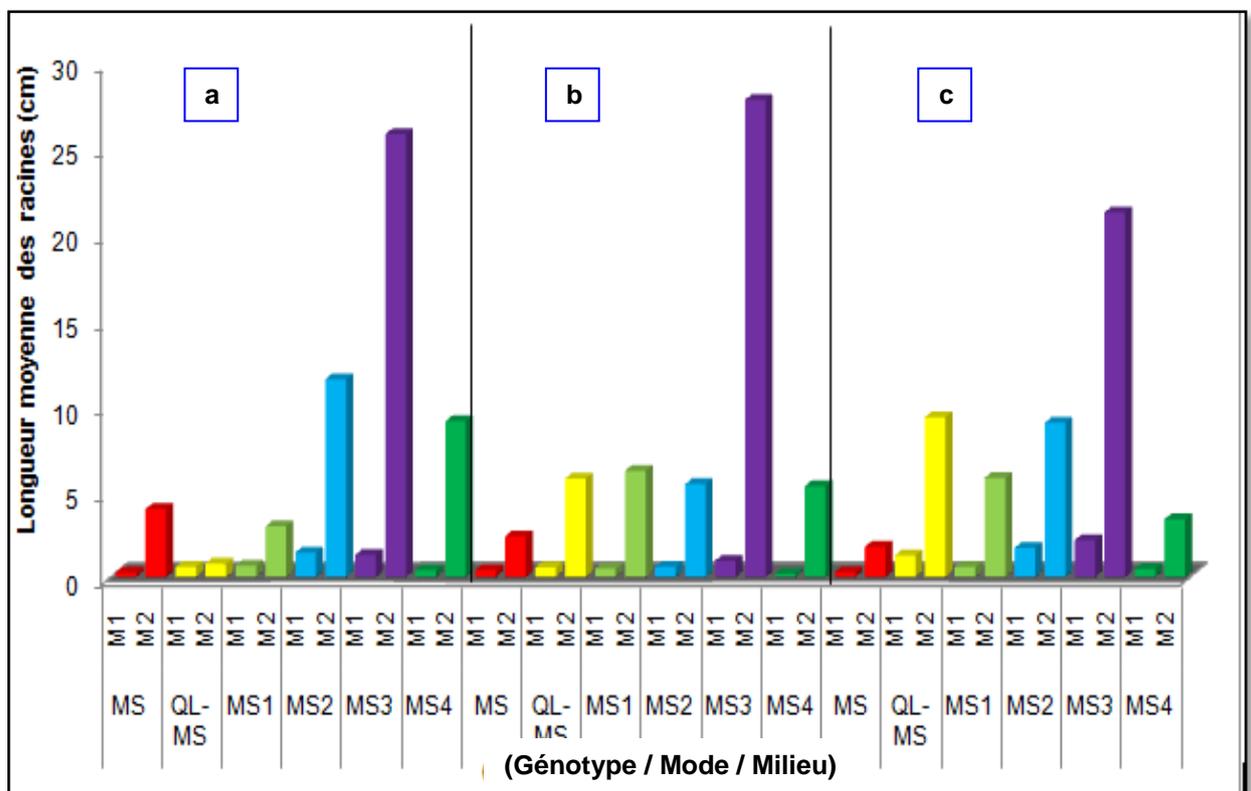


Figure 3.9. Effet de l'interaction (Génotype/ Mode/ Milieu) sur la prolifération des racines des génotypes étudiés

- (a) Ahmar Bou Ameer (AH)  
 (b) Tadhith (TD)  
 (c) Lakhzine (LK)

### 3.3.4. Phase d'acclimatation

Durant cette phase, nous remarquons que les plantules pré-acclimatées ont atteint environ 20 cm de hauteur, présentant un port bien dressé et une végétation assez dense (figure 3.10).

Aussi, les plantules élevées après 3 mois de repotage dans des pots de 4 litres de substrat présentent toujours une partie aérienne bien développée (figure 3.11).

#### 3.3.4.1. Taux de reprise à l'acclimatation

Les plantules acclimatées obtenues selon les 2 modes d'enracinement (sans et avec l'hormone stimulante ANA) sont acclimatées avec succès, révélant des différences significatives ( $p= 0,0369$ ) (appendice B, annexe 19).

Au cours de cette phase finale, nous avons observé que les plantules enracinées avec l'ajout d'ANA ont enregistré des taux d'acclimatation allant de 77 à 82 % tandis que celles obtenues sans l'incorporation de l'hormone ANA ont été plus performantes lors de cette étape et ont enregistré des taux allant de 82 à 86 % (appendice B, annexe 18 et 20).

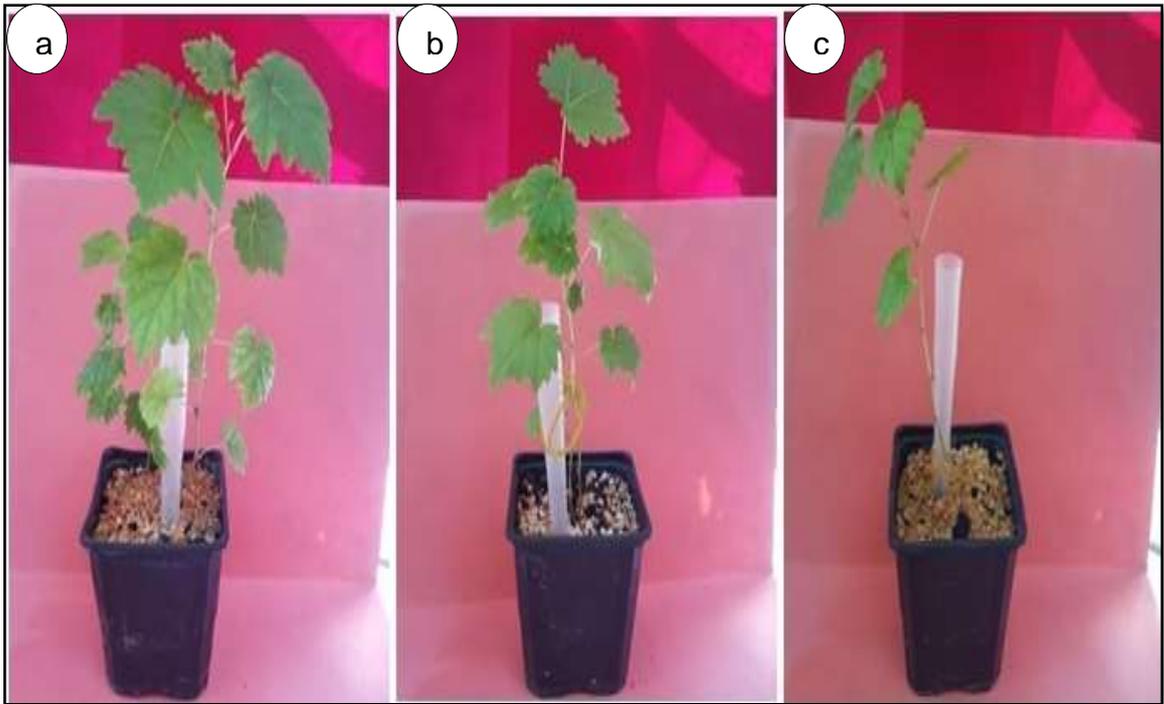


Figure 3.10 : Aspect des plantules après 1 mois d'acclimation

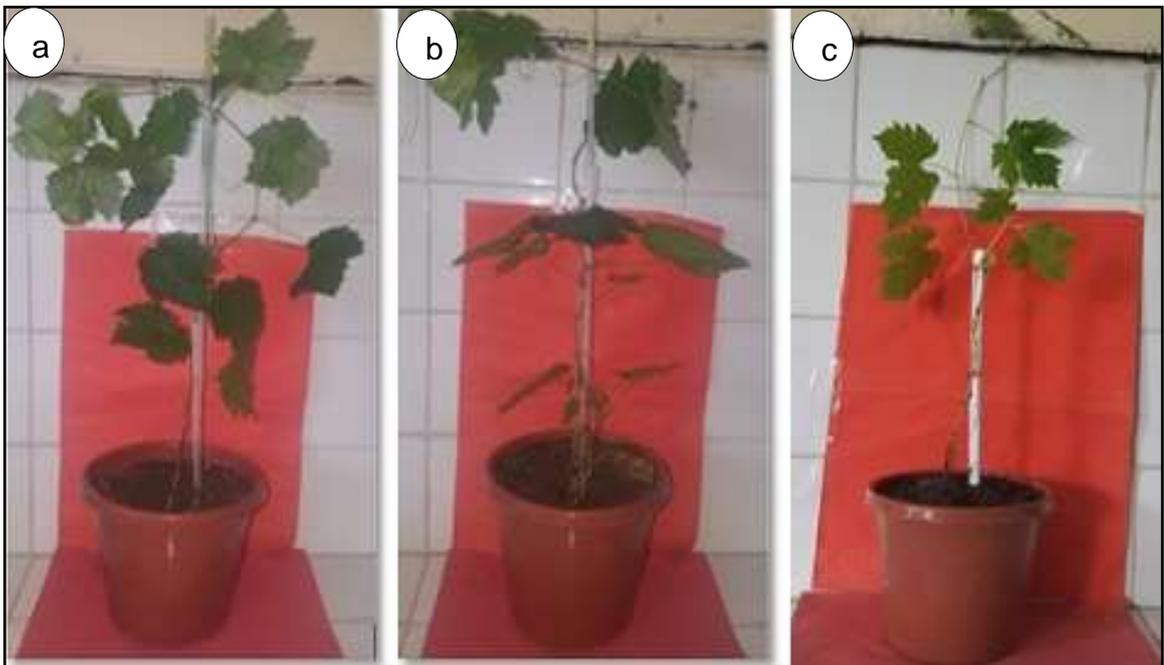


Figure 3.11 : Aspect des plantules après 3 mois d'élevage

- (a) Ahmar Bou Aneur (AH)
- (b) Tadhith (TD)
- (c) Lakhzine (LK)

### 3.4. DISCUSSION

La réussite du protocole de microbouturage dépend de plusieurs facteurs tels que la désinfection du matériel végétal, l'asepsie, la formulation minérale du milieu de culture, le génotype et l'acclimatation, étape cruciale et importante pour la reprise des cépages rares et endémiques.

#### 3.4.1. Désinfection du matériel végétal

La reprise des plantes d'espèces ligneuses dépend étroitement de l'état physiologique de l'explant au moment de leur mise en culture, plusieurs chercheurs ont signalé les difficultés et les obstacles rencontrés lors de l'introduction *in vitro* à partir d'un matériel ligneux collecté des pieds mères cultivés en plein champ et ils ont montré que la stérilisation par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) ou de calcium (CaOCl) n'a pas réduit les contaminations externes du matériel végétal (375 ; 376).

Les nécroses des tissus des espèces ligneuses en culture *in vitro* provoquent leurs brunissements et par conséquent le dessèchement des explants ce qui représente un handicap sérieux pour la réussite de la culture. Ce phénomène étant le résultat de l'oxydation par les composés phénoliques excrétés par l'explant.

Les taux importants de contamination enregistrés lors de la désinfection par NaOCl comparés à ceux de CaOCl peuvent s'expliquer par les ions Na qui peuvent dans certains cas gêner la croissance, d'où le brunissement et le dessèchement des tissus constatés lors de leur mise en culture *in vitro*. Ces mêmes résultats ont été rapportés par Margara (84) et Ahanhanzo *et al.* (377 et 378). De plus, Augé et Boccon-Gibod (86) préconisent l'utilisation de CaOCl qui reste un produit désinfectant ayant donné des résultats satisfaisants.

Cependant, ces deux désinfectants n'ont pas réduits les contaminations externes. L'emploi du bichlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) semble plus efficace contre les contaminants externes du matériel végétal collecté en plein champ et potentiellement infecté, cela confirme les résultats des travaux de Rugini (122) et Margara (84), les mêmes résultats ont été obtenus pour l'olivier par Grigoriadon (365) et Brahada (379). De même, Benmahioul (380), rapporte que plusieurs protocoles développés ont été basés sur l'utilisation du HgCl<sub>2</sub> (381 ; 382 ; 383 ;

384) et/ou en association avec NaOCl pour des résultats plus conséquents et prometteurs (385).

### 3.4.2. Formulation minérale du milieu de culture développé

En plus de la réussite du protocole d'asepsie et de désinfection du matériel végétal, la composition du milieu de culture est un facteur important dans la réussite de l'établissement de la culture *in vitro*. Chaque type de tissu a besoin d'une formulation minérale différente selon l'objectif recherché, la croissance optimale ou l'induction d'une organogenèse (386).

Notre recherche nous a permis d'établir un protocole expérimental qui a été retenu pour la régénération *in vitro* des cépages autochtones testés et qui sont menacés de régression. Ce dernier a permis d'évaluer l'influence de six compositions minérales différentes en macroéléments (MS, MS<sub>1</sub>, MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub>, MS<sub>4</sub> et QL-MS) sur leur multiplication *in vitro* et leur capacité rhizogène.

Les milieux de cultures testés durant notre expérimentation diffèrent principalement par la quantité et la forme d'azote apporté. En effet, les milieux MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub> et QL-MS sont plus riches en azote que les milieux MS<sub>1</sub> et MS<sub>4</sub> alors, que le milieu MS est très riche en sels totaux particulièrement en nitrates d'ammonium, efficace pour stimuler l'organogenèse *in vitro* (387).

Cependant, les résultats obtenus lors de la phase de débourrement, nous ont permis de mettre en évidence l'effet révélateur des différents milieux testés sur le débourrement des explants des trois cépages étudiés. En effet, plusieurs auteurs rapportent que les interactions des différents éléments que compose le milieu de culture sont à l'origine de la multiplication et la croissance *in vitro* des espèces végétales. Certains stimulent le processus du développement *in vitro*, d'autres par contre ont peu d'influence sur le débourrement (388 ; 95 ; 148).

Lors de cette phase d'expérimentation, quel que soit le cépage étudié, le milieu MS modifié (MS<sub>3</sub>) dont NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> sont réduits à ¼ s'est révélé le plus efficient pour tous les paramètres de multiplication étudiés, suivi du milieu MS<sub>2</sub> dont NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> sont réduits à ½. Ces résultats sont probablement liés à la composition équilibrée de ces deux milieux notamment en quantité d'azote et la forme de nitrates apportés (CaCl<sub>2</sub> est substitué par Ca(NO<sub>3</sub>), 4H<sub>2</sub>O). Des résultats similaires ont été rapportés sur vigne lorsque certaines modifications ont été introduites dont la réduction des

nitrate  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , l'augmentation des concentrations de  $\text{KNO}_3$  et l'apport supplémentaire de  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$  (17). De même, Haddad *et al.* (90) ont obtenu des résultats similaires sur l'olive de Laperrine.

#### 3.4.2.1. Débourrement des explants

Les milieux MS et ses dérivés  $\text{MS}_1$  et  $\text{MS}_4$  ont induit un développement important de cals et une réduction de la croissance des pousses entraînant une hyperhydricité se traduisant par une vitrification de l'ensemble des cépages testés. En effet, certains auteurs, ont souligné que l'apparition de ce phénomène induit par le dégagement d'éthylène dû à des concentrations élevées en ions  $\text{NH}_4^+$  (389 ; 10).

Comparativement aux autres milieux testés, les milieux dérivés  $\text{MS}_3$  et  $\text{MS}_2$  sont caractérisés par l'apport ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sous forme de nitrate de calcium au lieu de chlorure de calcium. Ces résultats corroborent à ceux de (15 ; 17 ; 49) qui ont signalé que la substitution du chlorure de calcium par du nitrate de calcium améliore la qualité de pousses de vigne produites *in vitro*.

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont signalé l'importance des ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sur l'organogénèse. En effet, cet élément joue un rôle important dans la stimulation de l'activité méristématique de la partie apicale de la pousse nouvellement formée (390).

#### 3.4.2.2. Multiplication des pousses régénérées

Les trois cépages autochtones testés ont eu des réactions différentes, ceci révèle l'effet du génotype pour tous les paramètres de multiplication évalués. Le cépage Lakhzine (LK) cultivé sur milieu  $\text{MS}_3$  s'est montré plus réactif, comparé aux autres cépages. Ceci peut s'expliquer qu'au sein du genre *Vitis*, il existe des différences génétiques dans la capacité d'absorption des ions notamment ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) (391 ; 392).

Ces constatations indiquent que le génotype est déterminant dans le choix du milieu de culture à utiliser et qu'aucun schéma directeur ne peut s'appliquer à toutes les variétés. Cette différence serait probablement liée à des exigences nutritionnelles variables selon le cépage (393 ; 10 ; 378).

### 3.4.2.3. Rhizogénèse

Lors de notre étude, la capacité d'enracinement des cépages utilisés dépendait de la composition minérale du milieu. Ces résultats ont été apportés par (393) qui montrent qu'une forte réponse rhizogène est étroitement liée à la composition minérale du milieu de culture.

#### 3.4.2.3.1. Milieu avec auxine

Le succès des méthodes de multiplication végétative *in vitro* dépend de la capacité des boutures à former des racines adventives (367). Lors de la micropropagation de la vigne, les auxines les plus utilisées AIA, AIB et ANA se sont avérées efficaces pour induire l'enracinement *in vitro* (23). Cependant, l'ANA est considérée comme l'hormone stimulante la plus efficace pour induire l'enracinement *in vitro* principalement en raison de sa plus grande stabilité à la lumière (395 ; 394 ; 396). Néanmoins, l'induction de l'enracinement dans cette étude a été réalisée dans l'obscurité, rendant ainsi la destruction de l'auxine par la lumière quasi-nulle.

Les milieux contenant de l'ANA développent des cals très importants ralentissant la différenciation racinaire (95). Ces faibles taux d'enracinement marqués sur le milieu MS enrichi d'ANA provoquent une importante calogénèse à la base des vitroplants, ce phénomène peut s'expliquer par la richesse du milieu de culture en éléments minéraux. En effet, les peroxydases basiques des plantes vitreuses montrent une augmentation d'activité ce qui indiquerait une baisse du niveau auxinique endogène (397). Si l'on considère que l'auxine est un élément clé de la différenciation cellulaire, cette diminution du taux en auxine endogène pourrait expliquer l'hypo lignification des plantes vitreuses.

Lors de notre expérimentation nous signalons que l'ajout de l'auxine ANA a réduit l'induction racinaire ce qui ne corrobore pas avec certains chercheurs qui ont souligné qu'un supplément de l'auxine dans le milieu de culture est nécessaire pour induire l'enracinement (10).

#### 3.4.2.3.2. Milieu sans auxine

Les milieux dépourvus d'ANA ont été plus favorables à l'enracinement. En effet, en absence d'auxines dans le milieu de culture, les vitroplants synthétisent et

sont les centres actifs de biosynthèse de l'auxine, ces cépages s'enracinent facilement comme signalé dans la littérature (18).

Les différences de croissance optimale de racines obtenues pour les trois cépages sur les milieux testés, peuvent s'expliquer par l'effet génétique. En effet, certains cultivars peuvent proliférer des racines sans régulateurs de croissance. Nos résultats concordent avec ceux de certains auteurs (398 ; 11) qui ont obtenu un taux d'enracinement de 78% sur milieu dépourvu d'ANA, comparé à celui enregistré lors de notre essai avec 82 %

#### 3.4.2.4. Acclimatation

L'acclimatation des plantes régénérées *in vitro* est une étape critique. Les plantules régénérées ne s'adaptent pas toujours aux conditions extérieures, une fois transférées dans la serre, elles montrent des signes de stress dus à une humidité relative plus faible, à un niveau de lumière plus élevé et à un environnement septique.

Hazarika, (398) souligne qu'un nombre important de vitroplants ne survivent pas au transfert dans de conditions *in vivo*.

Lors de notre étude, nous avons constaté que les plantules racinées des cépages testés *in vitro* ont été transplantées avec succès dont plusieurs d'entre elles régénérées ont survécu à l'acclimatation.

Les taux importants d'acclimatation (82 à 86%) des vitroplants cultivés sur milieux dépourvus d'ANA peuvent s'expliquer par la qualité des racines obtenues qui ont permis de surmonter les contraintes de l'acclimatation.

En effet, Chee *et al.* (15) et Skiada *et al.* (10), rapportent que la survie des plantules *in vivo* dépend étroitement de l'état physiologique des racines produites lors de la phase d'enracinement *in vitro*.

Nous soulignons que la présente stratégie de microbouturage appliqué dans notre étude, à partir de génotypes différents, basé sur la modification de la formulation minérale du milieu de base Murashige et Skoog (13), révèle que le protocole utilisé est une approche efficace et précise pour la micropropagation des cépages autochtones étudiés.

### 3.5. ASSAINISSEMENT

#### 3.5.1. Chimiothérapie

Les pieds-mères des cépages Aberkane (ABK), Bezoul El Khadem (BEK), Muscat de Fandouk (MF) contrôlés et révélés positifs pour les deux virus du GLRaV-3 et du GFLV ainsi que ceux du cépage Ferrana (F) positifs pour le GLRaV-3 uniquement sont assainis par chimiothérapie.

##### 3.5.1.1. DAS ELISA des plants régénérées *in vitro*

Les résultats de l'assainissement par chimiothérapie avec l'agent antiviral, la Ribavirine ont montré que les vitroplants obtenus sont assainis. Ainsi, nous pouvons déduire que le test DAS ELISA a eu une réaction négative pour les 8 vitroplants testés. Deux explants témoins positifs pour chaque cépage, infectés par le GLRaV-3 et GFLV ont été cultivés *in vitro* dans un milieu sans Ribavirine. Après 8 semaines de culture, les explants sont restés infectés (tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Assainissement par chimiothérapie après 8 semaines

Cépage	Nombre de vitroplants		Plants virucides free		DAS-ELISA	
	Assainis (négatifs)		Nombre testé	Résultat	Taux d'assainissement (%)	
	GLRaV-3	GFLV			GLRaV-3	GFLV
Aberkane <b>(ABK)</b>	8	2	2	2	100	75
B.El khadem <b>(BEK)</b>	8	7	2	2	100	87.5
M.de Fandouk <b>(MF)</b>	8	5	2	2	100	62,5
Ferrana <b>(F)</b>	8	-	2	2	100	-

Les résultats obtenus de l'assainissement des quatre cépages de vigne testés (ABK, BEK, MF et F), montrent qu'au bout de 8 semaines de culture sur un milieu MS modifié (MS<sub>3</sub>) additionné à 20ml/l de la Ribavirine, les vitroplants sont totalement assainis vis à vis du GLRaV-3 et partiellement assainis avec des taux dépassant les 60% pour le GFLV (tableau 3.3).

Nous pouvons donc déduire que la méthode de chimiothérapie par l'ajout de 20 mg/l dans le milieu de culture s'avère efficace et prometteuse pouvant être confirmé dans d'autres protocoles d'assainissement de la vigne.

### 3.5.1.2. Effet de la Ribavirine sur la phytotoxicité des explants

Après une semaine, nous avons observé le débourrement des bourgeons pour la totalité des explants suivie d'une mortalité avec un taux de survie de 53,33 ; 47 ; 47 et 40% pour les cépages respectivement (MF, ABK, F et BEK). L'apparition des feuilles a été observée après la deuxième semaine pour la plupart des vitroplants qui ont pu avoir une croissance normale. Au total, 8 vitroplants ont pu survivre après une période de 8 semaines de traitement chimique avec l'agent antiviral, la Ribavirine (tableau 3.4).

Nous avons rencontré, le problème de phytotoxicité qui se manifeste par une mortalité entraînant un dessèchement total des explants. En effet, nous avons enregistré après 8 semaines de traitement le taux de mortalité le plus important pour le cépage Bezoul El Khadem (BEK) (60%) suivi de Ferrana (F) et Aberkane (ABK) avec 53%. Le plus faible (46,66%) a été enregistré pour le cépage Muscat de Fandouk (MF) (tableau 3.4).

Cette phytotoxicité est due essentiellement à l'absorption élevée de la Ribavirine à chaque transplantation réalisée, ce qui rend les vitroplants affaiblis et cause aussi leur mortalité (figure 3.12).

Tableau 3.4 : Taux de phytotoxicité des explants cultivés sur milieu pourvu de 20mg/l de la Ribavirine

Cépage	Nbre d'explants mis en culture	Phytotoxicité (%)
ABK	17	53
BEK	20	60
MF	15	46,66
F	17	53

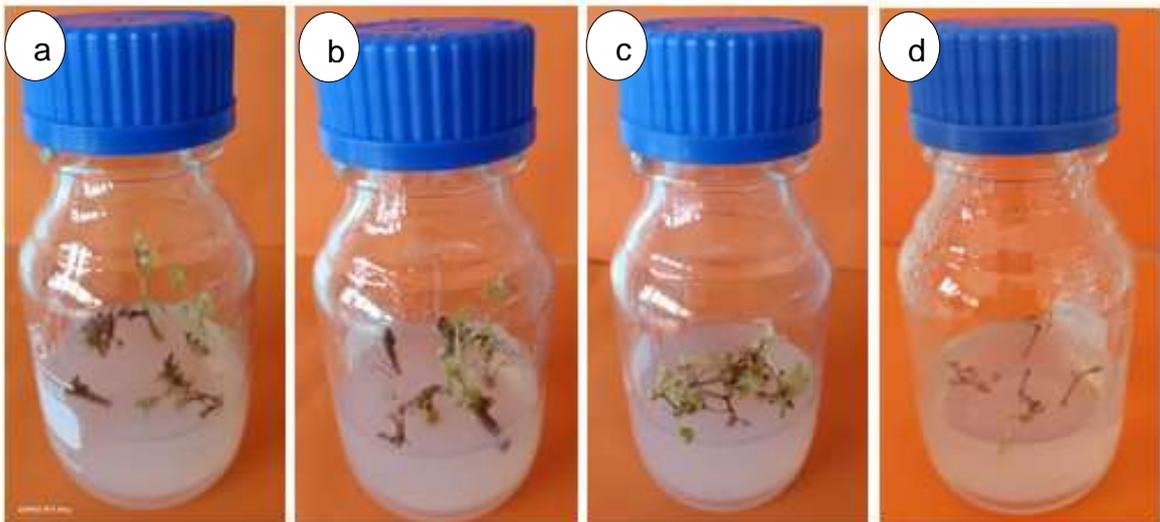


Figure 3.12. Dessèchement des explants traités par la Ribavirine

- |                       |       |
|-----------------------|-------|
| (a) Aberkane          | (ABK) |
| (b) Bezoul El Khadem  | (BEK) |
| (c) Muscat de Fandouk | (MF)  |
| (d) Ferrana           | (F)   |

### 3.5.1.3. Aspect chlorotique des plantes régénérées

De plus, l'effet de la Ribavirine sur la croissance des pousses a été marqué par un jaunissement des feuilles dû à l'absorption de celle-ci par les explants à chaque transplantation. Une chlorose des feuilles a été constatée suite au traitement prolongé de l'agent antiviral (figure 3.13).



Figure 3.13. Aspect chlorotique des feuilles de pousses régénérées sur milieu pourvu de 20 mg/l de Ribavirine

#### 3.5.1.4. Effet de la Ribavirine sur la prolifération des pousses

Une augmentation progressive de taux de multiplication des bourgeons a été constatée après 2 semaines de culture en présence de Ribavirine avec un allongement marquant des plants ayant atteint une longueur moyenne de 7,25 cm pour Aberkane (ABK), comparé au milieu de microbouturage déjà établi (figure 3.14).

L'évaluation de la croissance des pousses a révélé la formation de nombreux bourgeons adventifs à la base des pousses en croissance (figure 3.15 a et b), En effet, les observations menées durant les deux subcultures *in vitro* ont révélé la formation d'un cal sur lequel prennent naissance de nouvelles micro-pousses. Par ailleurs, l'analyse de la variance a révélé des effets significatifs sur le nombre de pousses cultivées dans les milieux pourvus et dépourvus de Ribavirine et ce pour tous les cépages testés ( $p=0,0172$  ; appendice C, annexe 1).

Le génotype a influence sur la multiplication des pousses régénérées *in vitro* sur milieu pourvu de Ribavirine. Nous enregistrons un nombre important de prolifération chez le cépage Aberkane (ABK) avec une moyenne de 7pousses suivi respectivement des cépages Bezoul El Khadem (BEK) et Muscat de Fandouk (MF) avec un nombre moyen légèrement plus faible estimé à 6 pousses. Le plus faible nombre moyen de pousses a été enregistré pour le cépage Ferrana (F) avec 4 pousses (appendice C, annexe 2) (figure 3.14 et 3.15).

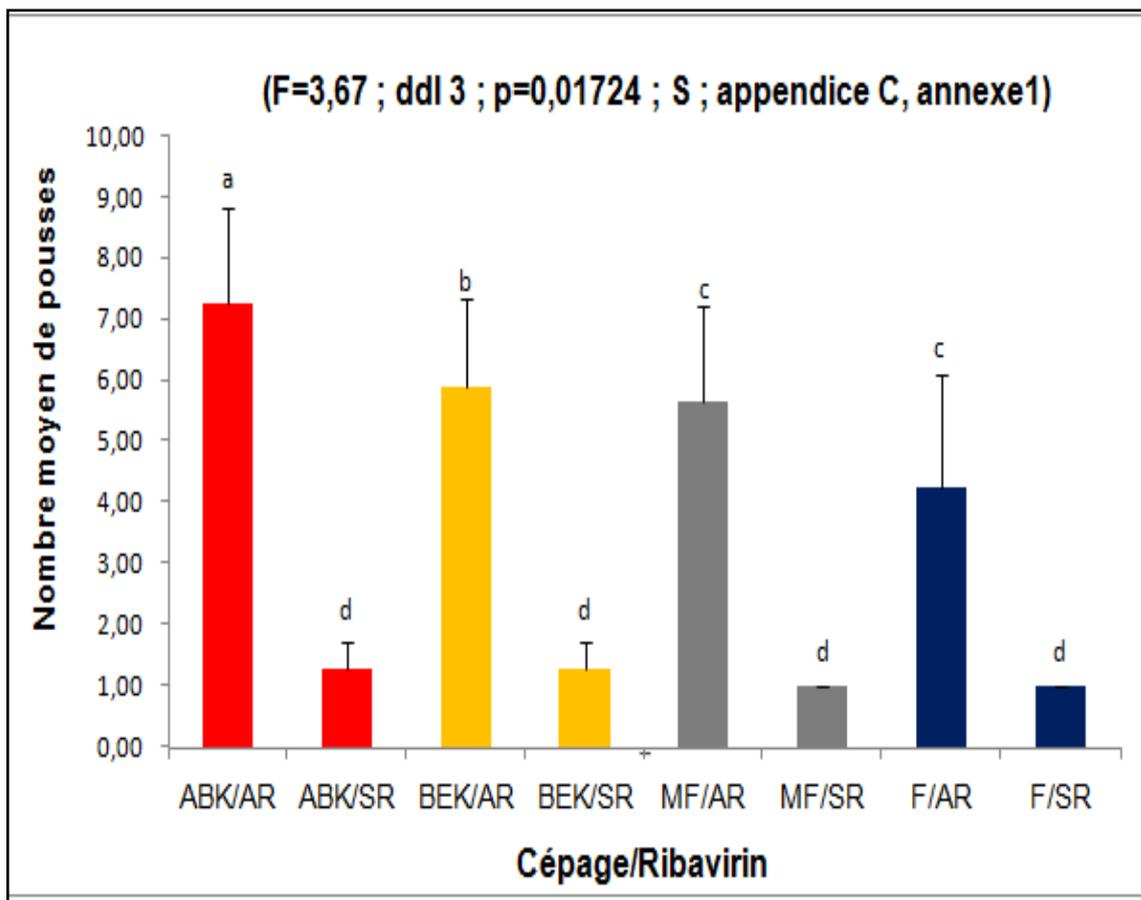


Figure. 3.14. Effet des traitements avec (AR) et sans Ribavirine(SR) sur le nombre moyen de pousses régénérées *in vitro* des cépages étudiés après 8 semaines de culture.

(ABK) Aberkane

(BEK) Bezoul El Khadem

(MF) Muscat de Fandouk

(F) Ferrana



Figure 3.15. Culture de pousses sur milieu  $MS_3$  pourvu de la Ribavirine

- (a) Multiplication des pousses
- (b) Croissance des pousses et différenciation des bourgeons adventifs
- (c) Enracinement des pousses après 10 jours
- (d) Enracinement des pousses après 40 jours
- (e) Pré-acclimatation
- (f) Acclimatation des plantules après 3mois

### 3.5.2. Phytothérapie

L'étude préliminaire de l'assainissement par l'extrait d'ail avec quatre concentrations (100, 75, 50 et 25%) testées, incorporées sur milieu MS<sub>3</sub> pour les deux cépages Ferrana (F) et Amghar (AG) a manifesté de gros cals à la base empêchant la différenciation des bourgeons et ce pour toutes les concentrations utilisées, elle est néanmoins plus marquée pour la concentration de 100% (figure 3.16). Ce résultat nous a orienté vers un autre essai où nous avons opté pour une diminution de moitié ( $\frac{1}{2}$ ) les macroéléments du MS<sub>3</sub> et en éliminant les hormones de croissance (MS'<sub>3</sub>), afin de remédier aux problèmes de calogénèse (multiplication intense sans différenciation).

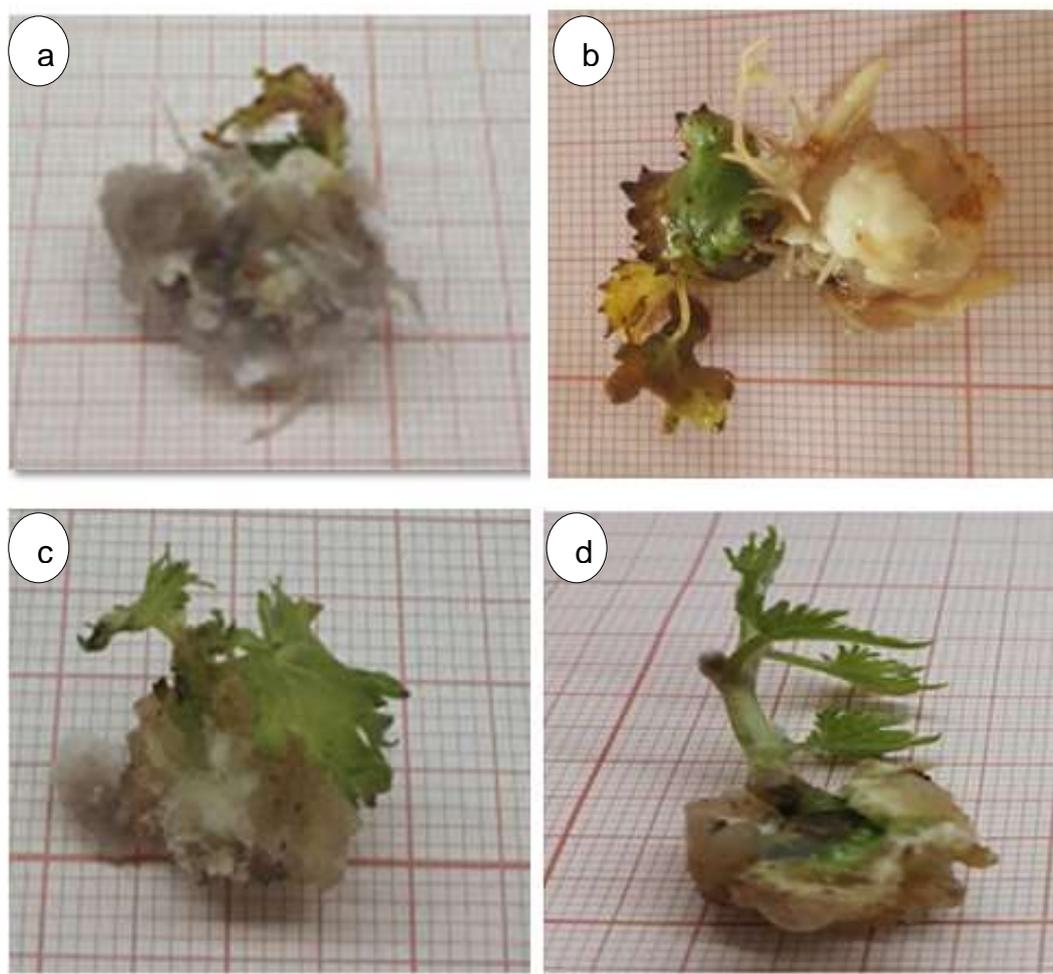


Figure 3.16. Aspect des explants du cépage Ferrana sur milieu MS<sub>3</sub> pourvu d'extrait d'ail  
(a) Solution mère F (100%)  
(b) Dilution D1 (75%)  
(c) Dilution D2 (50%)  
(d) Dilution D3 (25%)

### 3.5.2.1. DAS ELISA des plants régénérées *in vitro*

Les résultats du test DAS ELISA ont montré une réaction négative vis à vis le GLRaV-3 pour les plants régénérés *in vitro* sur milieu MS<sub>3</sub> additionné de 20mg/l de chaque concentration d'extrait d'ail préparée (tableau 3.16).

Les 2 explants infectés par le GLRaV-3 pour les deux cépages (AG et F) cultivés comme témoins positifs dans le même milieu MS<sub>3</sub> sont restés infectés après 8 semaines de culture (tableau 3.16).

Les résultats obtenus lors de notre étude montrent que, l'ajout de 20 ml/l de l'extrait d'ail à différents concentrations (100, 75, 50 et 25 %) dans le milieu de culture dilué MS<sub>3</sub>, a permis l'assainissement total du virus GLRaV-3 des explants des 2 cépages autochtones étudiés de vigne Ferrana (F) et Amghar (AG) (tableau 3.16).

Cette technique a montré un résultat remarquable du faite de l'utilisation d'un bioviricide présentant des vertus thérapeutiques importantes et riche en éléments pouvant enrichir le milieu de culture en minéraux sans recourir à des substances de synthèse.

Tableau 3.5. Assainissement par phytothérapie

Cépages testés	Concentration d'extrait d'ail (%)	Nombre de vitro plants testés	DAS-ELISA		
			Nombre de vitro plants assainis (négatifs)	Nombre de plants virucides Free	Résultats pour les plants virucides Free
Amghar	100 (F)	8	8	2	2
	75 (D1)	8	8	2	2
	50 (D2)	8	8	2	2
	25 (D3)	8	8	2	2
Ferrana	100 (F)	8	8	2	2
	75 (D1)	8	8	2	2
	50 (D2)	8	8	2	2
	25 (D3)	8	8	2	2

Lors de cet essai, les différentes concentrations de l'extrait d'ail utilisées n'ont induit aucune phytotoxicité des vitroplants régénérées *in vitro* et ce après 8 semaines de traitement comparée à la chimiothérapie appliquée.

### 3.5.2.2. Effet de l'extrait d'ail sur la prolifération et l'élongation des pousses

La régénération de pousses multipliées *in vitro* a été obtenue pour toutes les concentrations d'ail testées (F, D1, D2, D3) cependant, la réponse varie en fonction de la concentration et du cépage utilisé.

Le nombre moyen de pousses formées n'a pas induit un effet significatif de la concentration de l'extrait d'ail additionné au milieu de culture MS<sub>3</sub> et ce quel que soit le cépage utilisé ( $p= 0,8985$  ; appendice c, annexe 2).

En évaluant l'activité de l'extrait d'ail sur la prolifération des pousses, une augmentation progressive de la longueur a été constatée après 2 subcultures successives de 4 semaines chacune avec un allongement marqué des plants régénérés *in vitro*. Cependant, la transplantation de ces explants dans les mêmes milieux frais après 4 semaines de mise en culture a amélioré considérablement la croissance de ces pousses. En effet, indépendamment du cépage étudié, la concentration de l'extrait d'ail utilisée pour l'assainissement a affecté indirectement et significativement la longueur de pousses ( $p= 0,00$  ; appendice C, annexes 3). Le milieu MS<sub>3</sub> enrichi de quatre concentrations d'extrait d'ail a permis l'élongation de pousses de 5,84 et 3,37 cm respectivement pour les deux cépages Amghar (AG) et Ferrana (F) (figure 3.17).

Nous pouvons déduire que quel que soit la concentration d'extrait d'ail, le milieu MS<sub>3</sub> a donné de meilleurs résultats de croissance comparé au MS<sub>3</sub>. Cependant, la concentration D3 (25%) est révélée la plus efficiente (figure 3.17).

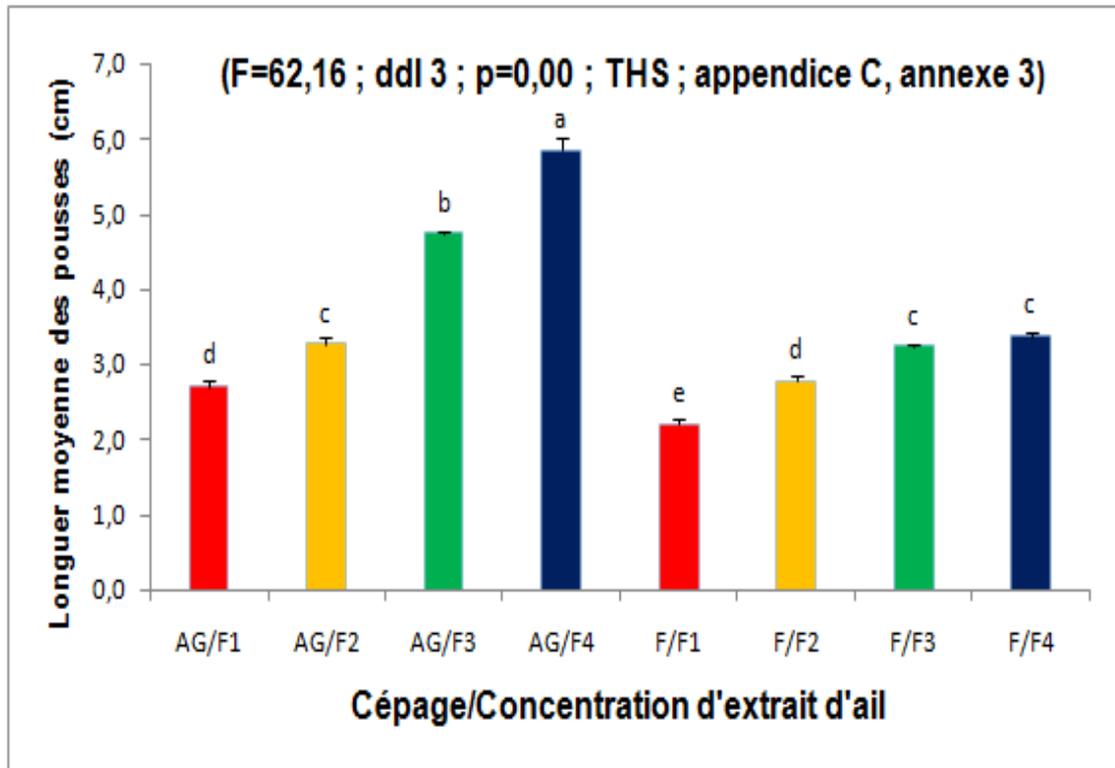


Figure 3.17. Effet de différentes concentrations d'extrait d'ail sur l'élongation *in vitro* des pousses des cépages étudiés après 8 semaines de culture  
 (AG) Amghar  
 (F) Ferrana

Durant l'essai de phytothérapie et pour toutes les concentrations testées, les plants multipliés sur milieu MS<sub>3</sub> enrichi d'extrait d'ail ont suivi les mêmes étapes de multiplication *in vitro* que celle de la chimiothérapie.

Les plants enracinés obtenus ont survécu à l'acclimatation avec succès et présentent un port végétatif dressé avec un feuillage abondant d'une couleur vert vif et des pousses bien développées, comparés à ceux obtenus après l'application de la chimiothérapie (figure 3.18).

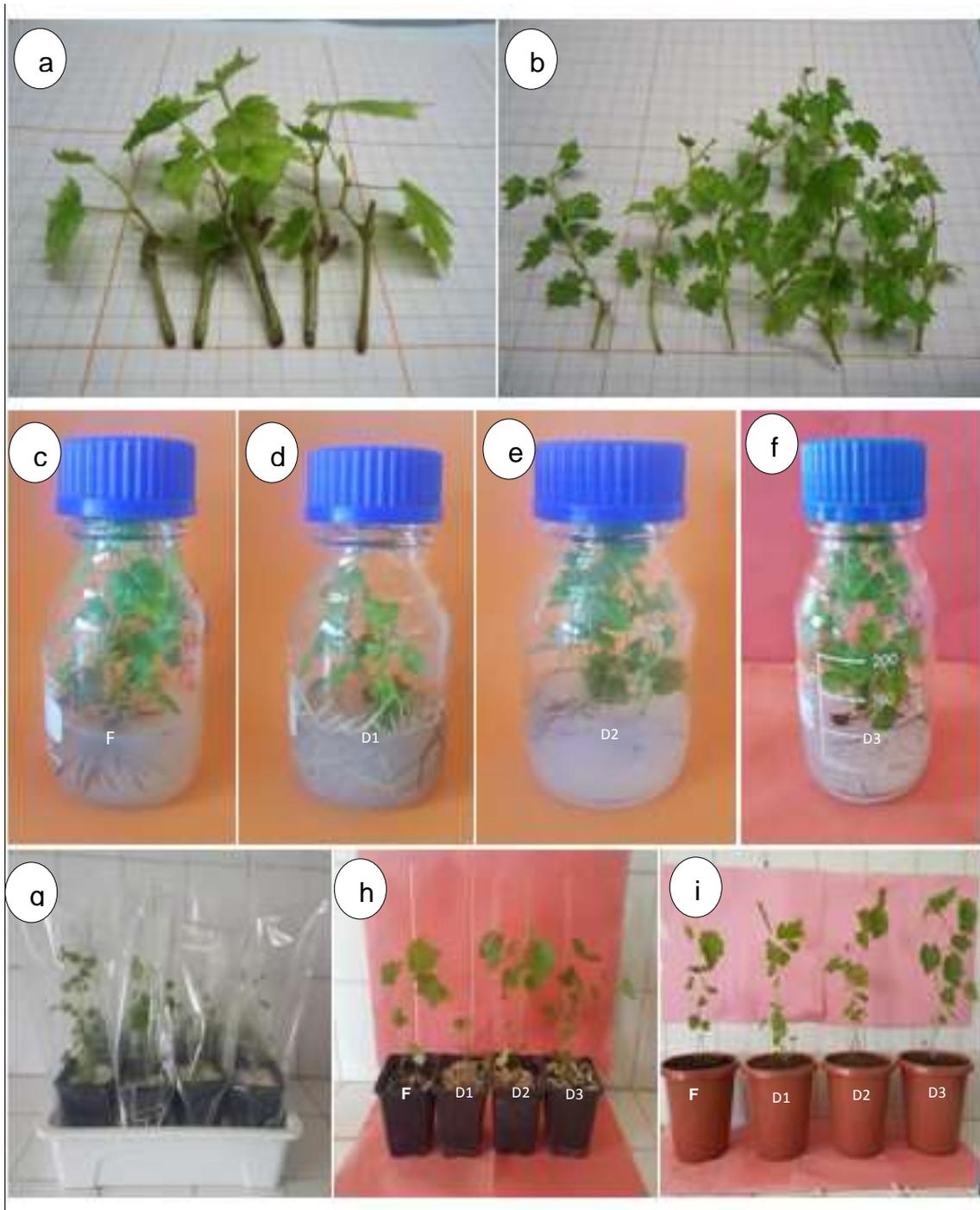


Figure 3.18. Régénération de pousses du cépage Amghar en milieu MS'<sub>3</sub> pourvu des 4 concentrations d'extrait d'ail

- (a) 1<sup>ère</sup> subculture
- (b) 2<sup>ème</sup> subculture
- (c, d, e, f) Enracinement des pousses
- (g) Pré-acclimatation des plantules
- (h) Acclimatation après 1 mois
- (i) Acclimatation des plantules après 2 mois

### 3.6. DISCUSSION

Les études entreprises sur l'utilisation des agents antiviraux pour l'assainissement sont en nette progression avec les nouvelles méthodes technologiques (48 ; 361 ; 364).

Nous confirmons lors de cette étude que les deux collections de matériel génétique installées à l'ITAF sont également infectées par le GFLV, alors que Lehad *et al.* (39) ont signalé que ces mêmes collections n'étaient infectées que par le GLRaV-3.

Plusieurs techniques de culture *in vitro* sont considérées comme des méthodes efficaces appliquées pour l'assainissement des cépages de vigne infectés de viroses.

#### 3.6.1. Effet de la Ribavirine

##### 3.6.1.1. Sur l'assainissement viral

Durant notre recherche, la chimiothérapie par l'utilisation de la Ribavirine à 20 mg/l comme viricide et la phytothérapie par l'utilisation de l'extrait d'ail comme bioviricide à différentes concentrations (100, 75, 50 et 25%) ont été appliquées pour évaluer leur efficacité sur l'assainissement de ces deux collections de vigne dans le but d'intégrer ces ressources génétiques dans les programmes de sélection.

Ainsi, plusieurs cépages autochtones et espèces spontanées se sont révélés intéressants pour la sélection mais l'infection par des virus constitue un réel obstacle pour leur valorisation.

La technique de la chimiothérapie utilisée repose essentiellement sur le développement de méthodes d'assainissement basées sur l'utilisation d'un produit chimique antiviral notamment le produit médicamenteux la Ribavirine en tant qu'agent antiviral repose sur la concentration utilisée ainsi que les espèces hôtes et le virus ciblé (400).

De nombreux chercheurs rapportent l'effet antiviral de la Ribavirine étudiée sur l'élimination des virus de plantes (401 ; 402 ; 403 ; 404).

Les résultats obtenus lors de cette étude révèlent que le GLRaV-3 a été totalement éliminé de tous les échantillons des cépages infectés par rapport au

GFLV qui a été identifié dans certains échantillons avec un faible taux (12,5 ; 25 et 37,5 %) respectivement pour les cépages (Bezoul El Khadem (BEK) ; Aberkane (ABK) et M.de Fandouk (MF). Nos résultats concordent avec ceux rapportés par plusieurs auteurs qui ont signalé des différences dans le taux d'assainissement de la vigne par la Ribavirine pour les différents virus (326 ; 374).

La technique de chimiothérapie en utilisant de la Ribavirine, a été aussi utilisée avec succès pour l'assainissement de plusieurs cépages de vigne et de plusieurs espèces de virus (45 ; 323 ; 326). Différentes études ont révélé que le traitement à la Ribavirine à 20 mg /l, permet d'éliminer 100% du GFkV et du GRSPaV (373) et du GLRaV-1-3 (46 ; 323) après 8 semaines de traitement.

Cependant, l'utilisation combinée de différents agents antiviraux peut donner des résultats plus intéressants pour l'infection mixte. Le GFkV a été complètement éliminé des infections simples et mixtes avec le GVA par l'utilisation simultanée de Ribavirine et d'un autre agent antiviral Oseltamivir (produit antigrippal) (324). En outre, la présence d'un échantillon infecté par le GFLV peut être due au niveau élevé de concentration du GFLV ou à l'interaction virus/plante.

#### 3.6.1.2. Sur phytotoxicité des pousses

Cette technique a engendré une phytotoxicité des pousses régénérées *in vitro* estimée à plus ou moins 50%. En effet la Ribavirine est un agent antiviral qui peut être toxique, cette constatation est signalée par Guta *et al.* (327 et 324) qui rapportent que la phytotoxicité de ce produit chez la vigne cultivée en *in vitro* était provoquée lorsque la concentration atteinte oscille entre 20 et 40mg/l. Ainsi, le processus d'élimination du virus impliquait souvent l'évaluation de la phytotoxicité des viricides à diverses concentrations et périodes d'exposition (331).

#### 3.6.1.3. Sur la prolifération des pousses

De plus, la technique de chimiothérapie a permis de développer un nouveau protocole de micropropagation de vigne. Ainsi, le milieu développé permet la différenciation de plusieurs micro-pousses par rapport au milieu de multiplication sans traitement chimique. Les résultats obtenus confirment ceux rapportés par Guta *et al.* (331) et (324).

Nous déduisons que la Ribavirine peut induire la différenciation d'une nouvelle micro-pousse directement à partir de cal et aussi peut jouer un rôle de composé

régulateur de croissance. Cette observation peut constituer une avancée importante dans la micropropagation de la vigne en augmentant le taux de multiplication des micro-pousses et par conséquent un rendement important de plantules.

D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène, améliorer et adopter cette méthode pour la micropropagation à grande échelle de plants de vigne et d'autres arbres ligneux.

### 3.6.2. Effet de l'extrait d'ail

#### 3.6.2.1. Sur l'assainissement viral

Les résultats de l'assainissement par l'utilisation de l'extrait d'ail obtenus sur deux cépages de vigne autochtones Amghar (AG) et Ferrana (F), après 8 semaines de culture sur un milieu MS modifié (MS<sub>3</sub>) dont les macroéléments sont réduits de moitié dépourvus de régulateurs de croissances (MS'<sub>3</sub>), additionné aux différentes concentrations de l'extrait d'ail (100, 75, 50 et 25%), montrent que les plants de vigne sont totalement assainis vis à vis du GLRaV-3. Ceci confirme l'efficacité de l'extrait d'ail additionné au milieu de culture *in vitro* pour l'élimination de ce virus testé. En effet, l'ail (*Allium sativum* L.) a été largement utilisé comme agent médicinal pendant des millénaires et les extraits d'ail ont des propriétés antimicrobiennes connues (48).

De nombreuses recherches faites en Chine rapportent l'effet antiviral de l'extrait d'ail sur les virus des plantes (342). Wang *et al.* (364), ont démontré qu'un extrait d'ail brut a un effet inhibiteur marquant sur un large éventail des virus de la vigne.

Il a été également prouvé que cet extrait a un effet inhibiteur contre les virus de vigne en induisant l'augmentation de l'expression des protéines liées à la pathogénie (PR) (405). L'accumulation de ces protéines PR suscite les réactions de défense de la plante. L'ail est une source importante de composés soufrés, ce sont eux qui sont principalement responsables de ses effets bénéfiques (406). En outre, les volatiles, l'allicine, les saponines, les protéines et les peptides peuvent contribuer à l'activité antiviral d'ail (48).

### 3.6.2.2. Sur phytotoxicité des pousses

Cette technique n'a induit aucune phytotoxicité des pousses régénérées *in vitro*, l'absence de cette mortalité en milieu enrichi d'extrait d'ail comparée à celles cultivées sur milieu enrichi de Ribavirine peut s'expliquer par le fait que l'ail possède une activité antioxydant. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par plusieurs auteurs (407 ; 408).

### 3.6.2.3. Sur la croissance des pousses

La survie du matériel végétal dépend de plusieurs facteurs liés essentiellement à l'état physiologique des explants mais également aux conditions nutritionnelles et environnementales de la culture.

Durant le traitement par la phytothérapie, la prolifération des bourgeons sur milieu MS<sub>3</sub> établit lors de la multiplication *in vitro* des cépages autochtones étudiés a révélé le développement de gros cals inhibant ainsi la croissance des pousses. Ceci, peut être lié à la richesse du milieu de MS rapporté par Del Vesco et Guerra (409), en effet, ce milieu est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et en azote sous forme de nitrate et d'ammonium.

L'extrait d'ail additionné au milieu MS dont, il est caractérisé par une richesse en composés chimiques tels que l'eau, sels minéraux, oligoéléments et surtout les composés soufrés, vitamines fibres et acides aminés essentiels (410). La richesse de cette composition du milieu et de l'extrait d'ail a provoqué un antagonisme qui s'est exprimé par un blocage de l'épuisement des éléments essentiels par les tissus de la vigne à la production des métabolites de croissance (synthèse des protéines et de la chlorophylle). Ces résultats corroborent avec ceux rapportés par (410), en culture de tissus, l'excès d'eau, mauvaises conditions d'éclairage et les nutriments provoquent l'hyperhydricité, caractérisée par une forme vitreuse, rabougrie et une faible capacité de régénération (412).

Suite à l'induction importante de la callogénèse et l'orientation que nous avons adopté pour augmenter la prolifération des pousses, le milieu MS'<sub>3</sub> caractérisé par une réduction de moitié des macroéléments du milieu MS<sub>3</sub> et sans l'ajout de régulateurs de croissance additionné à la concentration d'ail de 25% a été plus efficace pour la prolifération des pousses *in vitro*. Ceci peut s'expliquer

par le faite que l'extrait d'ail renferme une large quantité d'éléments minéraux tels que le calcium, phosphore, magnésium, fer ou sélénium. Comme il est également une source d'iode, de soufre, de manganèse, de cuivre, de cobalt, de chlore, de fluor de zinc, de sodium et de potassium (344 ; 410).

## CONCLUSION GENERALE

L'étude relative à la préservation, la conservation et la valorisation du patrimoine viticole demeure à l'heure actuelle un enjeu majeur. Les cépages autochtones de vigne ont régressé et en voie de disparaître sont actuellement répartis dans un habitat fragile. En raison de leur exposition aux bio-agresseurs et l'utilisation des cépages à grand potentiel de rendements. La persistance à long terme de ce patrimoine viticole est incertaine et des programmes doivent être mis en œuvre pour remédier à ces pertes.

L'étude entreprise durant notre recherche a permis de contrôler et d'assainir des cépages autochtones et rares conservés dans les deux collections nationales de l'ITAF de Benchicao (Médéa) et de Tighennif (Mascara).

Parmi les cépages contrôlés par le DAS- ELISA, 3 ont été indemnes des deux virus testés pour le GLRaV-3 et le GFLV et ont fait l'objet d'une régénération par microbouturage.

La mise en place d'un protocole de micropropagation via le microbouturage de la vigne autochtone exige la réussite de l'établissement de culture *in vitro* qui dépend de plusieurs facteurs notamment l'asepsie et la reprise de la croissance.

Durant notre recherche, les pertes enregistrées lors de la stérilisation des explants par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et de calcium (CaOCl) et ce quel que soit leur concentration et leur temps de trempage sont importants et variables avec la technique de désinfection adoptée. Cependant, Le bichlorure de mercure ( $\text{Hg Cl}_2$ ) à 0,7 % pendant 3mn révèle l'efficacité de l'élimination des contaminants microbiens externes et aussi pour réduire les brunissements du matériel végétal.

A travers cette recherche, nous avons pu établir le protocole de micropropagation de trois cépages autochtones indemnes de virus (Ahmar Bou Ameer, Tadhith et Lakhzine) par la technique de microbouturage, de l'initiation jusqu'à l'élevage des plantules. Les résultats obtenus ont permis de montrer que le milieu de culture de base MS réduit dans sa composition en macroéléments de  $\frac{1}{4}$  et la substitution de  $\text{CaCl}_2$  par le  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (MS<sub>3</sub>) a donné de meilleures performances en micropropagation. Nous avons enregistré une augmentation de

la masse végétative (taux de prolifération des bourgeons, taux d'explants ayant survécus, nombre moyen et longueur moyenne de pousses, nombre moyen de feuilles par pousse régénérée ainsi que SEE (Efficacité de l'Elongation des Pousses). Cette augmentation a aussi affectée la masse racinaire (taux d'enracinement, nombre moyen et longueur moyenne des racines ainsi que la REE (Efficacité de l'Elongation Racinaire).

De même ce milieu a été efficient pour l'acclimatation des plants régénérés *in vitro*.

En effet, l'analyse des différents paramètres étudiés montre que le milieu riche en azote apporté sous forme nitrique et en calcium (MS<sub>3</sub>), semble être le plus performant pour tous les paramètres étudiés.

Les milieux dépourvus d'auxines ont été les plus inducteurs de l'enracinement et de l'acclimatation pour les trois cépages étudiés.

Ces résultats obtenus lors de notre expérimentation peuvent être considérés satisfaisants pour l'établissement d'un protocole de multiplication *in vitro*, qui pourrait contribuer à la préservation de ces cépages autochtones de vigne, et il serait possible de produire du matériel végétal identique et sain et par conséquent, contribuer au schéma de la certification de *Vitis vinifera* L. en Algérie. Cette méthode peut être considérée donc comme alternative aux méthodes traditionnelles avec un potentiel élevé de régénération.

La propagation des maladies virales importante a orienté les chercheurs vers les techniques d'assainissement plus performantes pour la production de matériel sain et de qualité.

Nous avons démontré que les deux collections de vigne autochtones installées à l'ITAF sont infectés de viroses particulièrement de l'enroulement foliaire de type 3 (GLRaV-3) et pour la première fois du court noué (GFLV). Par ailleurs, les techniques telles que la thermothérapie et la culture de méristèmes sont les plus communément appliquées à l'assainissement de vigne mais, ces dernières exigent un protocole long et une main d'œuvre très qualifiée. Pour cela, il est primordial de développer de nouvelles méthodes d'assainissement pour la protection et la préservation du patrimoine viticole.

La maladie d'enroulement foliaire de la vigne est considérée comme la plus répandue et en progressant causant des pertes considérables observées sur les vignobles algériens. Il est nécessaire de faire plus de travaux et des recherches et d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la gestion et le contrôle de cette maladie pour la réduire et/ou l'éradiquer afin de diminuer sa nuisibilité.

Nos résultats d'assainissement obtenus attestent que la stratégie établie dans cette étude peut être efficace. En effet, la totalité de ces cépages traités avec de la Ribavirine et ce après deux mois de culture dans un milieu MS modifié (MS<sub>3</sub>) se sont totalement assainis vis à vis du GLRaV-3 et partiellement assainis contre le GFLV qui s'avère plus virulent.

Ces résultats obtenus sont prometteurs et peuvent s'intégrer dans les programmes de sélection sanitaire dans lesquels on est souvent confronté à travailler sur des cépages très rares dont l'infection par un virus met en péril la survie de cette ressource génétique. L'assainissement par chimiothérapie permet donc d'obtenir des plants sains et génétiquement conformes.

Ainsi, nous avons constaté qu'hormis le fait que la Ribavirine assaini totalement les cépages, nous avons constaté aussi qu'elle avait la capacité d'induire la différenciation de nouvelles micro-pousses. Cette nouvelle observation peut constituer une avancée importante dans la micropropagation de la vigne en augmentant le nombre de vitro-pousses et par conséquent le taux de multiplication. D'autres études sont encore nécessaires pour comprendre ce phénomène et améliorer cette méthode de micropropagation de la vigne et des ligneux en générale.

Le travail d'assainissement par chimiothérapie réalisé, ouvre de vastes perspectives de recherche et développement dans le domaine de la préservation des ressources viticoles.

Le deuxième volet d'assainissement expérimenté est la phytothérapie à base d'extrait d'ail qui peut constituer aussi une alternative aux autres méthodes déjà utilisées. En effet, les quatre concentrations de l'ail (100, 75, 50 et 25%) testées ont montré leur efficacité avec l'obtention de vitroplants sains exempt du virus testé et également, les extraits ont agi sur les pousses régénérées *in vitro*

D'autre part, l'extrait d'ail comme bioviricide peut contribuer à l'amélioration de la micropropagation de la vigne en diminuant le coût des intrants.

Toutes les concentrations d'extrait d'ail ont favorisé le débourrement et l'allongement des pousses *in vitro*. En outre, le milieu MS (1962), Modifié lors de notre expérimentation (MS<sub>3</sub>) et enrichi par l'extrait d'ail à 25% montre qu'il est plus efficace au débourrement des bourgeons, à la production et la longueur des pousses feuillées des cépages étudiés.

La production des plants exempts de virus et de meilleure qualité phytosanitaire de la vigne repose essentiellement sur l'utilisation des nouvelles techniques en culture *in vitro* devenue actuellement plus intéressante pour plusieurs raisons telles que le faible coût et la grande efficacité de production de plants sains dans une période largement courte et au espace réduit.

Au cours de ce travail, nous avons pu enrichir les travaux déjà réalisés sur les maladies à virus de la vigne et élargir l'utilisation des techniques d'assainissement vers de nouvelles méthodes comme la chimiothérapie et la phytothérapie, accessibles pour l'assainissement viral afin de produire du matériel de propagation de qualité et de meilleur état sanitaire.

Ces techniques ouvrent une nouvelle voie pour un accroissement significatif du taux de multiplication. Elles sont prometteuses et économiquement rentables du point de vue du nombre de plants obtenus par repiquage. Cependant, elles nécessitent la vérification de la conformité des plants produits.

Les résultats présentés dans cette étude peuvent aussi contribuer à l'amélioration de processus de production de plants de qualités de *Vitis vinifera* L.

Nous soulignons l'importance de cette technique pour sauvegarder et valoriser le patrimoine génétique viticole menacé ainsi que, pour le développement du secteur viticole en Algérie en déclin.

L'étude de l'effet antiviral de ces deux agents (chimique et naturel), associés à la micropropagation de la vigne doit-être approfondie et reconduite dans des conditions expérimentales plus élaborées. Il serait intéressant de confirmer ces résultats par des analyses plus poussées en utilisant les techniques de microscopie électronique et la biologie moléculaire notamment la RT-PCR.

Il serait aussi souhaitable d'élargir ces essais sur une gamme importante de cépages de (*Vitis vinifera* L.) aussi bien autochtones qu'introduites. Comme, il est important aussi de mener des expériences sur différents virus afin de valider et de vulgariser cette technique.

Il serait judicieux et pratique de préparer des solutions à base d'extrait d'ail pour l'assainissement viral des plants en pépinière et ce par des arrosages et des pulvérisations foliaires.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/344124440>

# Sanitation of Autochthonous Grapevine Varieties from Algeria by Chemotherapy

Article in *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* · September 2020

DOI: 10.1556/038.55.2020.013

CITATIONS

0

READS

15

8 authors, including:



**Arezki Lehad**

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

19 PUBLICATIONS 6 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Benalia Haddad**

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

5 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Amélioration Génétique du Palmier Dattier [View project](#)



Préservation et Amélioration des Ressources Génétiques Oléicoles [View project](#)

# Sanitation of Autochthonous Grapevine Varieties from Algeria by Chemotherapy

N. AITER<sup>1,2</sup>, A. LEHAD<sup>3\*</sup>, B. HADDAD<sup>4</sup>, A. TAIBI<sup>2</sup>, S. MEZIANI<sup>5</sup>,  
MOHAND-LARBI RABHI<sup>2</sup>, L. KHELIFI<sup>6</sup> and C. CHAOUIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, Département de Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb-Blida 1, Blida, Algeria

<sup>2</sup>Laboratoire de culture *in vitro*, Département central, Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne, ITAFV, Algiers, Algeria

<sup>3</sup>Laboratoire de Phytopathologie et Biologie Moléculaire, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA, Rue Hassan Badi, Belfort, El Harrach, 16000, Algeria

<sup>4</sup>Laboratoire Amélioration Intégrative Des Productions Végétales (AIPV, C2711100), Département de Productions Végétales, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), Hassan Badi, El Harrach, Algeria

<sup>5</sup>Laboratoire Central, Service des Contrôles phytosanitaires du Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants (CNCC), Hassan Badi, El Harrach, 16200, Algeria

<sup>6</sup>Laboratoire Ressources génétiques et Biotechnologiques, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Rue Hassan Badi, Belfort, El Harrach, 16000, Algeria

(Received: 9 January 2020; accepted: 16 April 2020)

Several grapevine viruses were reported in Algeria and especially in grapevine germplasm collection, therefore it is a great challenge to free these varieties from virus infection before any breeding programs. Our study focused on the development of chemotherapy on autochthonous varieties collected in the grapevine germplasm collection of ITAFV. All these varieties were tested by DAS-ELISA and the presence of GLRaV-3 and GFLV was confirmed in all used samples for the sanitation. After 8 weeks of shoot tips *in vitro* culture in a modified M S medium containing ribavirin, DAS-ELISA test revealed that GLRaV-3 was completely eliminated and GFLV to a significant rate.

**Keywords:** GLRaV-3, GFLV, chemotherapy, micropropagation.

Grapevine was reported to be infected approximately by 70 distinct virus species that belong to a wide range of taxonomic groups (17 families and 27 genera), usually infected by several ones (Meng et al., 2017). Some of these viruses were widely distributed in all grapevine growing regions over the world. Grapevine leafroll viruses were reported as widely distributed (Martelli and Boudon-Padieu, 2006; Mahfoudhi et al., 2008; Almeida et al., 2013; De Moura et al., 2018). These viruses were detected in several autochthonous germplasm collections in association with GFLV, GFKV (Mahfoudhi et al., 2014; Lehad et al., 2015). These collections were infected by several viruses and it is important to develop new methods for virus sanitation in order to protect this human patrimony. Different methods were developed. GLRaV-3, GVA, and GRSPaV were eliminated from infected grapes using somatic embryogenesis (Bouamama Gzara et al., 2017).

\*Corresponding author; e-mail: a.lehad@ensa.dz

The thermotherapy allowed to eliminate virus from 72,2% GFLV infected grapevine and 24,7% for GLRaV-3 (Panattoni and Triolo, 2003). The cryotherapy revealed 97% of elimination for GVA (Wang et al., 2003). Studies revealed the efficiency of chemotherapy for different grapevine viruses. Guță et al. (2014) revealed a total elimination of GFKV from infected grapevine with chemotherapy. Some drugs were reported to have antiviral activity on grapevine virus, ribavirin, oseltamivir, mycophenolic acid, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, amantadine, 2,4-dioxo-hexahydro-1,3,5-triazine, (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)-adenine and tiazofurine (Weiland et al., 2004; Panattoni et al., 2007, 2011; Luvisi et al., 2012; Guță et al., 2014).

Ribavirin is an antiviral agent that may be toxic. Guta et al. (2014) reported the toxicity of ribavirin on grapevine tissue culture. Thus the virus elimination process often involved the evaluation of phytotoxicity of virucides in various concentrations and periods of exposure (Guță et al., 2009).

The grapevine germplasm collection of ITAFV was found to be infected by distinct viruses generally in mixed infection; it was previously reported as infected by GLRaV-3 (Lehad et al., 2015).

Our study focused on the elimination of GLRaV-3 and GFLV from autochthonous varieties provided by the autochthonous germplasm collection of ITAFV using a micro-propagation associated with the antiviral agent ribavirin.

The main objective of this study was the elimination of two different viruses belonging to two families, GLRaV-3 (*Closteroviridae*) and GFLV (*Nepovirus*). The advantages of this technic in grapevine micropropagation and nursery are enormous, due to the set-up of a multiplication method which presents antiviral activity and eliminate viruses from propagating material. Thus, the use of this technic may reduce significantly the dissemination of plant viruses through the use of virus free propagating material.

## Materials and Methods

### *Virus source*

#### *Infected material:*

Samples were collected from varieties infected by GLRaV-3 and GFLV maintained in greenhouse provided from the grapevine germplasm collection of ITAFV. The samples were tested by DAS ELISA and confirmed the infection by GLRaV-3 and GFLV (Table 1).

**Table 1**

Varieties	Infected and no infected samples after sanitation					
	Nbr GFLV positive samples	Nbr GLRaV-3 positive samples	Mother vine GLRaV-3 test	Mother vine GFLV test	GLRav-3 negative	GFLV negative
Aberkane	8	8	2	2	8/8 (100%)	6/8 75%
Bezzoul El Khadem	8			2		7/8 87.5%
Muscat de Fandouk	8	8	2	2	8/8 (100%)	5/8 62,5%
Ferrana		8	2		8/8 (100%)	

*In vitro* chemotherapy:

Grapevine apices (0.2–0.3 cm) and axillary buds, collected from infected mature plants over the growing season were grown on modified MS (Murashige and Skoog, 1962). Ribavirin (20 ml/L) acting as the antiviral agent was added to the proliferating medium for eight weeks. The vitroplant obtained were transferred on virucid-free multiplication medium, for 1-3 subcultures. As the microshoots differentiated, they were cultivated on rooting medium. A positive control from infected mother plant for each variety was *in vitro* regenerated on a free-drug medium. The explants were maintained under controlled condition ( $24 \pm 1$  °C, 16 h photoperiod).

*Assessment of ribavirin effect and phytotoxicity:*

Mortality of shoot tip was assessed. The Tukey's HSD test at  $p=0.05$  was used to compare the effect of the ribavirin on the number of shoot formation using the software Statistica version 12.

*Virus detection by ELISA:*

DAS-ELISA test was performed for GLRaV-3 and GFLV using commercial reagents produced by BIOREBA according to the method described by Clark and Adams (1977).

## Results

After eight weeks of growth on MS medium with ribavirin, the explants were tested by DAS-ELISA for the two viruses GLRaV-3 and GFLV found in mixed infection. Results revealed 100% eradication of all tested samples for GLRaV-3. Thus, the autochthonous varieties Aberkane, Muscat de Fandouk and Ferrana revealed 100% eradication after eight week of micropropagation on medium containing ribavirin compared to the positive control regenerated in a drug-free medium collected from the mother plant that showed a positive reaction.

For the GFLV sanitation, results revealed 75% eradication for the variety Aberkane, 87,5% for the variety Bezoul El Khadem and 62,5% for the variety Muscat de Fandouk. The positive control revealed a positive reaction (Fig.1).

Several authors determined ribavirin as an antiviral agent. Thus, ribavirin and oseltamivir were used for the elimination of the virus in various horticultural species (Guță et al., 2014). Ribavirin has been used for the sanitation of Grapevine virus A (GVA) (Panattoni et al., 2007), for the eradication/elimination of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Weiland et al., 2004), Grapevine rupestris stem pitting-associated virus associated (GRSPaV) (Skiada et al., 2013; Hu et al., 2018).

The assessment of the shoot growth revealed the formation of adventitious buds from which many microshoots differentiate (Figs 1, 2). Same results were observed by Guță et al. (2014). The Tukey HSD test revealed significant effects between the number of microshoot cultivated under the drug medium and the drug-free medium for all varie-

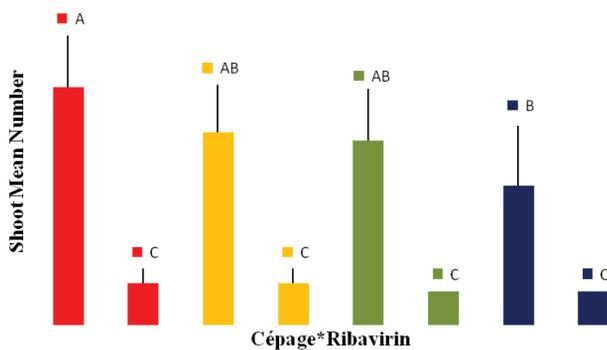


Fig. 1. Effect of treatments on shoot means number, WHO, without ribavirin; WH, with ribavirin; ABK, Aberkane; BEK, Bezoul El Khadem; Mf, Muscat de Fandouk; F, Farrana



Fig. 2. Shoot tip culture in M and S medium containing ribavirin and differentiation of new shoot tips

ties tested. The same test also revealed significant effects for the interaction between the number of shoot regenerated and the varieties. Observation conducted during the *in vitro* culture revealed the formation of call followed by the formation of new microshoot from the callus.

The phytotoxicity effect of ribavirin after 8 weeks of treatment was 60% for the variety Bezoul El Khaddem, 52,94% for the varieties Aberkane and Farrana, 46,66% for Muscat de Fandouk (Table 2).

**Table 2**

Effect of ribavirin on choot tips growth

Cépage	Nbre of budding	Phytotoxicity	Survival shoot tip	Medium without ribavirin	Medium with ribavirin
Aberkane	17	09	8	1	6
				2	6
				1	8
				1	10
				1	7
				2	8
				1	8
				1	5
				1	6
				1	7
Bezoul El Khadem	20	12	8	1	6
				1	7
				2	4
				1	8
				2	6
				1	7
				1	4
				1	5
				1	5
				1	4
Muscat de Fandouk	15	07	08	1	5
				1	4
				1	8
				1	5
				1	4
				1	8
				1	5
				1	6
				1	2
				1	3
Ferrana	17	09	08	1	4
				1	2
				1	6
				1	5
				1	7
				1	5

## Discussion

In Algeria GLRaV-3 represents a prevalence of 44% (Lehad et al., 2015). The spread of this virus may be explained by vector transmission but also by the use of infected propagating material. For this reason, the use of virus-free propagating material plays a great role in plant virus control. The major technic used to control plant virus is thermotherapy. Several technic were developed in order to get more efficiency. The grapevine germplasm collection was found to be infected by several viruses in general in mixed infection; it was previously reported infected by GLRaV-3 (Lehad et al., 2015). In our study, we found that this germplasm collection was also infected by GFLV. The chemotherapy technic was used in order to assess the efficiency of this technic and clean this grapevine collection in purpose to integrate these genetic resources in breeding programs. Thus, several autochthones varieties and wild species were found to have interesting traits for breeding but the infection by viruses constitutes a great problem for their valorization.

The studies on the use of antiviral agent for plant virus sanitation are increasing and permit to find several antiviral agent. Ribavirin was successfully used for chemotherapy sanitation of several grapevine varieties and several virus species (Hu et al., 2018; Weiland et al., 2004; Skiada et al., 2013).

Different studies revealed that the treatment with ribavirin allow to eliminate 100% of GFKV and GRSPaV after 8 weeks of treatment with 20mg/ml of ribavirin (Komínek et al., 2016) and GLRaV-1-3 (Skiada et al., 2013; Panattoni et al., 2007)

Results obtained revealed that GLRaV-3 was eliminated from all sample in comparison to GFLV that was found in some sample with lower rate. Several authors observed differences in the rate of grapevine cleaning by ribavirin for different viruses (Hu et al., 2018; Komínek et al., 2016). However, the combined use of different antiviral agents may give more interesting results. The GFKV has been completely eliminated both from simple and mixed infections with GVA by the simultaneous use of ribavirin and oseltamivir (Guță et al., 2014).

Also, the presence of some sample infected by GFLV may be due to the high level of concentration of the GFLV or due to the virus-plant interaction. For this, it is important to carry out experiments on different viruses in order to validate this technic.

In addition, the technic allow developing a new protocol of grapevine micropropagation. Thus, the developed medium allow the differentiation of several microshoot in comparison with the free drug medium in which we find only one microshoot. Guță et al. (2009 and 2014) reported the same observation. Thus, we can conclude that ribavirin induces the differentiation of a new microshoot directly from the callus playing role as growth regulatory compound. This observation may constitute an important advancement in the micropropagation of grapevine by increasing the number of microshoots. Other studies are still needed in order to understand this phenomenon and improve this method in micropropagation of grapevine and other cultures.

## Literature

- Almeida, R., Daane, K., Bell, V., Blaisdell, G., Cooper, M., Herrbach, E., et al. (2013): Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Front. Microbiol.* 4, 94.10.33.
- Bouamama-Gzara, B., Selmi, I., Chebil, S., Melki, I., Mliki, A., Ghorbel, A., Carra, A., Carimi, F. and Mahfoudhi, N. (2017): Elimination of grapevine leafroll associated virus-3, grapevine rupestris stem pitting associated virus and grapevine virus A from a Tunisian cultivar by somatic embryogenesis and characterization of the somaclones using ampelographic descriptors. *Plant Pathol. J.* 33, 561–571.
- Clark, M. F. and Adams, A. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. General Virology* 34, 475–483.
- De Moura, C. J. M., Fajardo, T. V. M., Eiras, M., FábioNascimento da Silva, F. N. and Nickel, O. (2018): Molecular characterization of GSYV-1 and GLRaV-3 and prevalence of grapevine viruses in a grape-growing area. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* Vol. 75, No.1, 10–15.
- Guță, I. C., Buciumeanu, E. C., Gheorghie, R. N., Teodorescu, A. L. (2009): The assesment of viricides phytotoxicity used in grapevine *in vitro* chemotherapy. *Bulletin UASVM Cluj-Napoca, Horticulture*, 66, 661.
- Guță, I. C., Buciumeanu, E. C. and Visoiu, E., (2014): Elimination of grapevine fleck virus by *in vitro* chemotherapy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42, 115–118.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., Li, Z. and Zhang, S., (2018): Elimination of *Grapevine rupestris* stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* ‘Kyoho’ by an antiviral agent combined with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae* 229, 99–106.
- Komínek, P., Komínková, M. and Jandová, B. (2016): Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses. *Acta Virologica* 60, 400–403.
- Lehad, A., Selmi, I., Louanchi, M., Aitouada, M. and Mahfoudhi, N. (2015): Genetic diversity of grapevine leafroll-associated virus 3 in Algeria. *J. Plant Pathol.* 97, 203–207.
- Luvisi, A., Rinaldelli, E., Panattoni, A. and Triolo, E., (2012): Membrane transport of antiviral drugs in plants: an electrophysiological study in grapevine explants infected by grapevine leafroll associated virus 1. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 2115–2123.
- Mahfoudhi, N., Digiaro, M. and Dhouibi, M. H., (2008): Incidence and distribution of grapevine leafroll-associated viruses in Tunisian vineyards. *J. Phytopathol.* 156, 556–558.
- Mahfoudhi, N., Harbi-Ben Slimane, M., Elair, M., Selmi, I. and Ben Hamda, H. (2014): Prevalence of viruses infecting autochthonous grapevines in Tunisia. *Tunis. J. Plant Prot.* 9, 111–118.
- Martelli, G. P. and Boudon-Padiou, E., (2006): Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of grapevine. *Bibliographic Report 1998-2004*. Bari, CIHEAM-IAMB. Options-Méditerranéennes: Série B.
- Meng, B. and Rowhani, A. (2017): Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. In: B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino and M. Fuchs (eds): *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, 257–287.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–479.
- Panattoni, A. and Triolo, E., (2003): Effect of antiviral drugs in *Vitis vinifera* infected explants. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 244 p.
- Panattoni, A., D’Anna, F., Cristani, C., Triolo, E., (2007): Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *J. Virol. Methods* 146, 129–135.
- Panattoni, A., Luvisi, A. and Triolo, E., (2011): Selective chemotherapy on grapevine leafroll-associated virus-1 and -3, 39: 503. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0185-1>.
- Skiada, F. G., Maliogka, V. I., Katis, N. I. and Eleftheriou, E. P. (2013): Elimination of *Grapevine rupestris* stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by *in vitro* chemotherapy. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 135, 407–414.
- Wang, R. Q., Gafny, P. Li., Mawassi, M., Sela, I. and Tanne, E. (2003): Elimination of Grapevine virus A by cryopreservation. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 242 p.
- Weiland, C., Cantos, M., Troncoso, A. and Perez-Camacho, F., (2004): Regeneration of virus-free plants by *in vitro* chemotherapy of GFLV (grapevine fanleaf virus) infected explants of *Vitis vinifera* l. Cv ‘zalema’. *Acta Hort.* 652, 463–466.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Foudil, O., "Les cépages autochtones en Algérie", V.13, n°1, (1989), 235 - 240.
2. El-Heit, K., Laucou, V., Laladi, Z., Belarbi, B., Hamama, A., Lacombe, T., Boursiquot, J.M. and Derridj, A., "Ampelographic and Ampelometric Characterization of grapes of *Vitis vinifera* L." native of Algeria. Ciéncia et Tecnica Vitivincola Jr. Vit. Eno, V. 28, n° 2, (2013), 952 - 956.
3. INRAA., "Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques". Organisation Des Nations Unies Pour l'Alimentation et l'Agriculture, (Juin, 2006), 67p.
4. Hamama, A., El Heit, K., Meghezzi, S., Sebki, S., Agouazi, O. et Cherfaoui, M. S., "Étude des caractères ampélographiques et phyllométriques des cépages mineurs du Tel Algérien", 37<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine and 12<sup>th</sup> General Assembly of the OIV, (2014), 1 - 6.
5. Almadanim, M.C., Baleiras-Couto, M.M., Pereira, H.S., Morais-Cecilio, L., Viegas, W. and Veloso, M.M., "Genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars most utilized for wine production in Portugal", Vitis V. 46, n°3, (2007), 116 - 119.
6. Boursiquot, J., "Nécessité et intérêt de la conservation des ressources génétiques pour la vigne", Revue des enologues, V. 82, (1997), 5 - 98.
7. Puisais, L. et Hanicotte, C., "Vins et vignobles de France", Paris, Larousse, V. 39, (1997), 639p.
8. Kozlowsky, G., Gibbs, D., Huan, F., Frey, D. et Gratzfeld, J., "Conservation of threatened relict trees through living ex situ collections: lessons from the global survey of the genus *Zelkova* (Ulmaceae)", Biodivers Conserv V. 21, (2012), 671 - 685.
9. Hassanen, S.A., Abido, A.I.A., Aly, M. et Rayan, G.A., "*In vitro* Preservation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria and Black Monukka Cultivars

- as Genetic Resource African”, Journal of Basic & Applied Sciences V. 5, n° 2, (2013), 55 - 63.
10. Skiada, F.G., Grigoriadou, K. et Eleftheriou, E.P., “Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. ‘Malagouzia’ and ‘Xinomavro’”. Central European Journal of Biology, V. 5, n° 6, (2010), 839 - 852.
  11. Banilas, G. et Korkas, E., “Rapid micropropagation of grapevine cv. Agiorgitiko through lateral bud development”. *EJ Sci. Tech*, V. 2, (2007), 31 - 38.
  12. Butiuc-keul, A., Coste, A., Halmagyi, A., Deliu, C-Tin. and Craciunaș, C., “Aspecte privind multiplicarea *in vitro* a unor soiuri de vita-de-vie cultivate in Romania”, in: Vol. BIOTEHNOLOGII VEGETALE pentru SECOLUL XXI, Lucrarile celui de al XVI lea Simp. Nati. De Cult. Se Tesut. Si Cel. Veg. Iunie, Bucuresti, (2008), 86 - 94.
  13. Murashige, T. and Skoog, F., “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. *Physiol. Plant.*, V.15, (1962), 473 - 497.
  14. Lloyd, G.B. et McCown, B.M., “Commercially feasible micropropagation of montian laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture”, *Proc. Int. Plant Prop. Soc*, V.30, (1980), 412 - 427.
  15. Chee, R., Pool, R. et Bucher, D., “A method for large-scale *in vitro* propagation of *Vitis*”, (1984).
  16. Galzy, R., Haffner, V. et Compan, D., “Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings”, *J. Exp. Bot.*, V. 41, (1990), 295 - 301.
  17. Bottalico, G., Savino, V. and Campanale, A., “Improvements in the *in vitro* culture of meristem shoot tips for sanitation and establishment of rooted explants, In: Extended Abstracts of the 12th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)”, Lisbon, Portugal (28 september- october 1997), 163 - 164.
  18. Ibanez, A., Valero, M. et Morte, A., “Establishment and *in vitro* clonal propagation of the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon: an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones”. In *Anales de Biología*, V. 27, (2005), 211 - 220.
  19. Butiuc-Keul, A.L., Coste, A., Halmagyi, A., Deliu, C., Farago, M., Iliescu, M. et Iuoras, R., “Micropropagation *in vitro* de plusieurs cultivars de vigne de Roumanie”. *Acta Horti*, V.812, (2009), 129 -134.

20. De Carvalho-Silva, R., Gomes-Luis, Z. et Scherwinski-Pereira, J.E., "Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes", *Pesq Agrop Brasileira*, V.47, (2012), 344 - 50.
21. Tehrim, S., Mirza, M.Y. et Sajid, G.M., "Étude comparative de différents régulateurs de croissance pour une régénération efficace des plantes dans les raisins". *Pakistan J. Agric. Res*, V. 26, (2013), 275 - 289.
22. Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbas, N., Ejaz, S. et Enjum, M., "Optimising the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes". *OENO One wine* V. 49, n° 1, (2015), 37 - 45.
23. Kinfe, B., Feyssa, T. et Bedada, G., "*In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis vinifera* L.) from nodal culture". *African Journal of Biotechnology*, V.16, n° 43, (2017), 2083 - 2091.
24. Zatiko, J. M. et Molnar, I., "Preliminary results on the *in vitro* mass propagation of grapes from shoot-tip meristem". *Fruit Sci Rep*, V.12, (1985), 83 - 5.
25. Mhatre, M., Salunkhe C.K. et Rao P.S., "Micropropagation of *Vitis vinifera* L. Towards an improved protocol". *Sci Hortic*, V. 84, (2000), 357 - 63.
26. Berraf Teball, A. et Peros, J.P., "Importance of Eutypa dieback and esca in Algeria and structure of the associated fungal community". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, V. 39 n° 3, (Juillet 2005), 121 - 128.
27. Ammad, F., "Dépistage et diagnostic des maladies de dépérissement de la vigne (Eutypiose et viroses) dans quelques vignobles Algériens". PhD, University of Blida, Algeria (thesis in French), (2006), 116p.
28. Berraf-Tebbal, A., Bouzned, Z. et Phillips, A.J.L., "Molecular and morphological characterization of phaeomoniella isolates associated with eutypa dieback and esca of grapevine in north Algeria". *Revue Agrobiologia*, n° 6, (2014), 53 - 59.
29. Ammad, F., Benchabane, M., Toumi, M., Belkacem, N., Guesmi, A., Cherif, A., Lecomte, P., Merah, O., "Occurrence of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine dieback in Algeria". *Turk. J. Agric. Forest.*, V. 38, (2014), 865 - 876.
30. Louanchi, M., Meamiche, H. et Salhi L., "Etude de la spécialisation parasitaire et du polymorphisme génétique par les marqueurs RAPD de *Botrytis sp*",

Communication au séminaire international de biologie végétale et écologie Constantine, Algérie, (22-25 Novembre 2010).

31. Lehad, A., "Detección du virus de l'enroulement de la vigne dans la región de Boumerdès et mise au point d'un sérum anti GLRaV". Mem. Ing. ENSA, (2008), 36p.
32. Meng, B. and Rowhani, A., "Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management", Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, (2017), 257 - 287.
33. Martelli, G.P and Boudon-Padieu, E., "Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus like diseases of the grapevine: Bibliographic report". Bari: CIHEAM., Bari, CIHEAM-IAMB. Options Méditerranéennes: Série B. (2006), 1998 - 2004.
34. Mahfoudhi, N, Digiario., M, Dhouibi, M. H., "Incidence et distribution des virus associés à l'enroulement de la vigne dans les vignobles tunisiens". J Phytopathol, V. 156, (2008), 556 - 558.
35. Almeida, R., Daane, K., Bell, V., Blaisdell, G., Cooper, M., Herrbach, E., "Écologie et gestion de la maladie de l'enroulement de la vigne", De face. Microbiol, V. 4, n° 94, (2013).
36. Perrone, I., Chitarra, W., Boccacci, P. et Gambino G., "Grapevine virus environment interactions: an intriguing puzzle to solve", New Phytol, V. 213, (2017), 983 - 987.
37. Nimmo, B., "The economic effects and financial impact of GLRaV-3", NimmoBell and co. Ltd, Hastings, New Zealand, (2006).
38. Mahfoudhi, N., Soltani, I., Digiario, M. and Elbeaino, T., "Occurrence and widespread distribution of Grapevine virus D in Tunisian grapevines". Journal of Plant Pathology, V. 96, (2014), 431p.
39. Lehad, A., Selmi, I., Louanchi, M., Aitouada, M. and Mahfoudhi, N., "Survey and genetic diversity of grapevine leafroll associated virus-2 in Algeria", International Journal of Phytopathology, V. 4, n° 1, (2015), 35 - 42.
40. Rowhani, A., "Grapevine rupestris stem pitting associated virus: population diversity, titer in the host and possible transmission vector", In: Extended Abstracts 13th Meeting of ICVG. Adelaide, Australia, (2000), 37p.

41. Gribaudo, G., Gambino, G., Cuzzo, D. et Mannini, F., "Attempts to eliminate Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine clones". J. PlantPathol, V. 88, (2006), 293 - 298.
42. Panattoni, A. and Triolo, E., "Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on *in vitro* collection of Kober 5BB". Sci. Hortic, V. 125, (2010), 63 - 67.
43. Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M. and Katis, N.I., "Control of virus infecting grapevine", Control of Plant Virus Diseases Vegetatively Propagated Crops. Advances in Virus Research, V. 9, (2015), 175 - 228.
44. Bouamama-Gzara, B., Selmi, I., Chebil, S., Melki, I., Mliki, A., Ghorbel, A. and Mahfoudhi, N., "Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian Cultivar by Somatic Embryogenesis and Characterization of the Somaclones Using Ampelographic Descriptors". The plant pathology journal, V. 33, n° 6, (2017), 561p.
45. Weiland, C.M., "Regeneration of virus-free plants by *in vitro* chemotherapy of GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) infected explants of *Vitis vinifera* L". cv. Zalema. Acta Hort, V. 652, (2004), 463 - 466.
46. Panattoni, A., D'anna, F., Cristani, C. and Triolo, E., "Grapevine viti virus eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy", J. Virol. Methods, V. 146, (2007), 129 - 135.
47. Guta, I. C. and Buciumeanu, E. C., "Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection", Rom. Biotechnol. Lett, V.16, (2011), 6535 - 6539.
48. Lanzotti, V., "The analysis of onion and garlic. Journal of Chromatography A", V. 1112, (2006), 3 - 22.
49. Quoirin, M. et Lepoivre. P., "Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp", Acta Hort, V. 78, (1977), 437 - 442.
50. De Candolle, A., "Origine des plantes cultivées", 3 edn. Germer Baillière, Paris, (1886), 372p.
51. Negrul, A., "Origin and classification of cultivated grape", Pischepromizdat, Moscou: Ampélographie d'URSS, V. 1, (1946), 159 - 216.
52. Levadoux, L., "Les populations sauvages et cultivées des *Vitis vinifera* L.". Institut national de la recherche agronomique, V. 1, (1956), 59 - 118.

53. Olmo, H.P., "The origin and domestication of the *Vinifera* grape", In: Mc Govern PE (The Origins and Ancient History of Wine), (1995), 31 - 43.
54. Mc Govern, P.E. et Patrick, E., "Ancient Wine: The search for the origins of Viniculture", Princeton Univ. Press, Princeton (2003), 363p.
55. Rowley, A. et Ribaut, J.C., "Le vin. Une histoire de goût, Collection Découvertes Gallimard", Série Culture et société, n° 437, (2003), 160 p.
56. Emanuelli, F., Lorenz, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V. Stefanini, M., Myles, S., Martinez-Zapater, J.M., Zyprian, E. and Moreira, F.M., "Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape", BMC Plant Biol. V. 13, n°1, (2013), 39 - 55.
57. Enjalbert, H., "Histoire de la vigne et du vin, l'avènement de la qualité, Bordas", (1975), 207 p.
58. Barnard, H., Dooley, A.N., Areshian, G., Gasparyan, B. and Faull, K.F., "Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands", Journal of Archaeological Science V. 38, (2011), 977 - 984.
59. Bouquet, A., "Origine et évolution de l'encépagement français à travers les siècles", Progrès agricole et viticole, V. 5, (1982), 110 - 121.
60. Johnson, H., "Une histoire mondiale du vin de l'antiquité à nos jours". Hachette, (1990).
61. Meheut, J.P. and Griffe, M., "Le vin 50 siècles de passion", C.L.c.d.M. Griffe, TSH, Le Cannete, (1997).
62. This, P., Lacombe, T. and Thomas, M. R., "Historical origins and genetic diversity of wine grapes", TRENDS in Genetics, V. 22, n° 9, (2006), 511 - 519.
63. Mullins, M.G., Bouquet, A. and Williams, L.E., "Biology of the grapevine", Cambridge University Press, (1992), 239 p.
64. Zohary, D. et Spiegel-Roy, P., "Beginnings of fruit growing in the Old World", Science, V. 187, n° 4174, (1975), 319 - 327.
65. Larnaud. M., "La vigne en Algérie". In Annales de géographie, V. 57, n° 308, (1948), 356 - 359.
66. Levadoux, L., Benabderrabou, A. et Douaouri, B., "Ampelographie algérienne: cépages de cuve et de table cultivés en Algérie", (1971), 118p.

67. Isnard, H., "La vigne en Algérie", étude géographique. Tome 1 Ophysgop, (1951), 278p.
68. Isnard, H., "La vigne en Algérie", thèse de doctorat. Lettres Parais, (1945 -1947), 52p.
69. Reynier, A., "Manuel de Viticulture, 10<sup>ème</sup> édition". Editions Tec et Doc Lavoisier, Paris, (2007), 532p.
70. Galet, P., "Précis de Viticulture. 7<sup>ème</sup> édition". JF Impression, Saint Jean de Vedas, (Septembre 2000), 602 p.
71. Bouquet, A. et Boursiquot, J.M., "La conservation des ressources génétiques de la vigne". Journal International des sciences de la vigne et du vin. No Hors série, (1996), 41- 45.
72. Mullins, M.G, Bouquet, A., Williams, L.E., "Biology of the grapevine". Biology of horticultural crops. Cambridge University Press, Cambridge (juil 1992), 239 p.
73. Huglin, P. et Schneider, C., "Biologie et écologie de la vigne", France : Lavoisier, (1998), 370 p.
74. Reynier, A., "Manuel de viticulture : guide technique du viticulteur". Lavoisier, (oct. 2011), 592 p.
75. Branas, J., Bernon, G. et Levadoux., "Eléments de viticulture générale". Ed Nation agri, Montpellier. (Janvier 1946).
76. Viala et Pechoutre, "Les Maladies de la Vigne", Ed. G. Masson, Paris, (1893), 183p.
77. Pouget, R., "Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en France", INRA Ed. (Paris), (1990), 157p.
78. OIV., "Eléments de conjoncture mondiale", (2018), 3p.
79. OIV., "Note De Conjoncture Mondiale Situation du Secteur En 2018". Paris : Édit. International Organisation of Vine and Wine, (2019), 15p.
80. MADR., "Statistiques agricoles de la vigne en Algérie". Ministère de l'Agriculture et du Developpement Rural, (2019).
81. MADR., "Statistiques agricoles de la vigne en Algérie". Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, (2020).
82. Breton C, Besnard G, Bervillé A. "Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography". In : Zeder MA, Decker Walters D, Bradley D,

- Smith B, eds. Documenting Domestication: new genetic and archaeological paradigms. Berkeley: University of California Press, (2006), 158 -168.
83. Reynier A., "Manuel de viticulteur. 5ème édition", J.L.Bailliere, Paris, (2000).
84. Margara, F., "Bases de multiplication végétative: les méristèmes et l'organogénèse" . Ed INRA, Paris, (1989), 262p.
85. Grenan, S., "Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). In High-Tech and Micropropagation II", Springer, Berlin, Heidelberg. (1992), 371 - 398.
86. Augé, R. et Boccon-Gibod, J., "Les applications à l'horticulture In La *Culture in Vitro* et ses applications horticoles", Ed JB Baillière (1989), 91-131.
87. Quaschie, A. M. and Kokou, K., "Culture *in vitro* et herbier *in vitro* culture and herbarium". Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales, Tome Ann. Univ. Lomé (Togo), série Sciences, Tome XVII (2009), 49 - 58.
88. Zuccherelli, G. et Zuccherelli, S., "In vitro propagation of fifty olivecultivars". Acta Horticulturae, V. 586, (2000), 931 - 934.
89. Saadi, A., "Régénération des plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogénèse somatique", Thèse de doctorat. Paris Grignon, (1991), 162 p.
90. Haddad, B., Carra, A., Saadi, A., Haddad, N., Mercati, F., Gristina, A.S. et Carimi, F., "In vitro propagation of the relict laperinne's olive (*Olea europaea* L. subsp. *Laperrinei*)", Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, V. 152, n° 4, (2018), 621 - 630.
91. Gifford, E.M. and Hewitt, W. B., "The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine". Am. J. Enol. Vitic. V. 12 (1961), 129 - 135.
92. Galzy, R., "La culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris* .C. R", Acad. Sci. Paris, (in French) V. 274, (1961), 210 - 231.
93. Barlass, M. et Skene, K.G.M., "In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices", Vitis., V. 17, (1978), 335 - 340.
94. Harris R.E., Stevenson J.H., "In vitro propagation of *vitis*", Vitis, V. 21. (1982), 3 - 22.
95. Novak, F. J. and Juvova, Z., "Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture", Scientia Hort, V. 18, n° 3 (Janvier 1983), 231 - 40.

96. Gray, D. J. and Benton, C. M. "*in vitro* Micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*)", in: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, n°. 27, (1991), 7 - 14.
97. Singh, S.K., Khawale, R.N., Singh, S.P., "Technique for rapid *in vitro* multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars". - J. hort. Sci. Biotechnol, V. 19, (2004), 267 - 272.
98. Mullins, M. G. and Srinivasan, C., "Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*". Journal of Experimental Botany, V. 27, n° 5, (1976), 1022 - 1030.
99. Hirabayashi, T., Kozaki, I., and Akihama T., "*In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*", HortScience, V. 11, (1976) 511 - 512.
100. Gresshoff, P.M. and Doy, C.H., "Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera", Z. Pflanzenphysiol, V. 73, (1974), 132 - 141.
101. Salunkhe, C.K, Rao, P.S. and Mhatre, M., "Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L". Plant cell reports, V. 17, n° 1, (1997), 65 - 67.
102. Barlass, M., Miller, R.P. and Antcliff A.J., "Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew", I. Dual culture *in vitro*, V. 37, (1986), 6166p.
103. Caruso, T., Campisi G., Occorso, G., Loconsole, G, Saponari. and M, Manuale per la roduzione., "gestione e difesa in vivaio dell'olivoProgetto di Ricerca Interregionale Rete Interregionale per la Ricerca Agraria, Forestale", Acquacoltura e Pesca (2011), 9 -1.
104. George, E.F. and Sherrington P.D., "Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories", London: Excegetics, (1984), 709 p.
105. Nozeran, R. and Bancilhon, L., "Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes". Ann. Amelior. Plantes. V. 22, (1972), 167 - 185.
106. Camefort, H., "Morphologie des végétaux vasculaires cytologie-anatomie adaptations", Ed. Doin. Paris, (1977), 90 - 130.

107. Boxus, P., Bercetche, J., Bollon, H., Ducos, J.P., Jemmali, A., Pâques, M. et Pieron, S., "Multiplication végétative : micropropagation et embryogenèse somatique in biotechnologies végétales". BV, V. 93, (1995), 191p.
108. Zryd, J.P., "Culture des cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisation pratiques". Ed. Tec et Doc-Lavoisier, Paris., (1988), 216p.
109. Abido, A.I.A., Aly, M.A.M., Hassanen, S.A. and Rayan, G.A., "*In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment", Middle East J Sci Res, V. 13, (2013), 328 - 370.
110. Parveez, G.K.A., Masri, M.M., Zainal, A., Majid, N.A., Yunus, A.M., Fadillah, H.H., Rasid, O. et Cheah, S.C., "Palmier à huile transgénique: production et projection", Biochemical Society Transactions, V. 28, n° 6, (2000), 969 - 972.
111. San Pedro, T., Peiró, R., Villanova, J., Olmos, A. and Gisbert, C., "*In vitro* propagation of *Vitis vinifera* L. cv. Monastrell". Electronic Journal of Biotechnology, V. 27, (2017), 80 - 83.
112. Walali, L., "3 Journées Scientifiques du réseau Biotechnologies végétales", Rabat (Maroc), (1993), 14 -18.
113. Cimato A., "Nursery production of olive plants", In: Conseil Oléicole International, editors, International seminar on scientific innovations and their applications to olive farming and olive oil technology". Madrid, Conseil Oléicole Intl, (1999), 1 - 30.
114. Chee, R., Pool, R. and Bucher, D., "A method for large-scale *in vitro* propagation of *Vitis*" Universidad Catolica de Chile, Santiago (Chile). Facultad de Agronomia New York's food and life sciences bulletin (USA). (1984), n°. 109,
115. Margara, J. and Piollat, M. T., "Influence de la composition minérale et glucide du milieu sur l'organogenèse *in vitro* à partir de pétales de *Begonia x elatior*". CR Acad. Sci. Paris, 294, (1982), 545 - 548.
116. Favre, J.M., "Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinaires chez la vigne", Ann. Amélior. Plantes, V. 27, (1977), 151 - 169.

117. Barlass, M. et Skene, G. M., "Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf primordial fragment *in vitro*", J. Exp. Bot, V. 31, (1980), 483 - 488.
118. Iordan, M., A. Brezeanu, and Rosu, A., "The micropropagation of *Vitis vinifera* L.//. Aspects of morphogenesis in callus culture". Rev. Roum. Biol.-Biol. Veg. V. 26. (1981), 141 - 150.
119. Rajasekaran, K. and Mullins, M. G., "Organogenesis in internode explants of grapevines", Vitis, V. 20, (1981), 218 - 227.
120. Stamp, J.A., Colby, S.M. and Meredith C.P., "Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.)". Plant Cell Tiss. Org. Cult, V. 22, (1990), 127 - 133.
121. CIDES., "Micropropagation en entreprise Cahier de références techniques", Centre d'information et de développement expérimental en serriculture, Édition, (1999), 44p.
122. Rugini, E., "*In vitro* Propagation of Some Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos". Sci. Hortic, V. 24, (1984), 123 - 134.
123. Goussard, P.G., "Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*", Vitis, Siebeldingen, V. 20, n°3, (1981), 228 - 234.
124. Chee, R. et Pool, R.M., "*In vitro* vegetative propagation of Vitis: Application of previously defined culture condition to a selection of genotypes". Vitis 22 (1983), 363 - 374.
125. Lee, N. et Wetzstein, Y.H., "*In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation". Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, V. 115, n° 2, (1990), 324 - 329.
126. Minal-Mhatre; Salunkhe, C.K. and Rao, P.S., "Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol", Scientia Horticulturae, V. 84, n° (3-4), (2000), 357 - 363.
127. Gonzalez, E., Diaz, T. and Mosquera, M.V., "Influence of culture medium on nodal segments of *Vitis vinifera* L. cv. Albarino culture *in vitro*", Phytion Buenos-Aires, V, 58, n° (1-2), (1996), 9 - 13.

128. Biasi, L. A., Passos, I. R. S. and Pommer, C. V., "Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales", Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, V. 33, nº 10, (1998), 1587 - 1594.
129. Hartl, D., Males, P., "Factors affecting grapevine cultivars Vugava and Plavac Mali micro propagation from *in vitro* culture minicuttings". Biologia-Bratislava. V. 55, nº 1, (2000), 121 - 129.
130. Visoiu. E., Zaharia, I., Baditescu, D., Popescu, C.F., "Influența elementelor minerale si a compusilor hormonalni asupra organogenezei *in vitro*-cultura la diferite genotipuri vinifera" Analele ICVV, V. XV, (1998), 35 - 42.
131. Butiuc-keul, A., Coste A., Halmagyi A., Deliu, C-Tin. et Craciunas, C., "Aspecte privind multiplicarea *in vitro* a unor soiuri de vita-de-vie cultivate în Romania" în: Vol. BIOTEHNOLOGII VEGETALE pentru SECOLUL XXI, Lucrarile celui de al XVI lea Simp. Nați. De Cult. Se Tesut. Si Cel. Veg. Iunie, (2008), Bucuresti, 86 - 94.
132. Craciunas, C.,Butiuc-Keul, A., Coste, A., Oltean, B., Farago, M., Iliescu, M. et luoras, R., "Sélection de matériel génétique précieux de vigne et conservation par culture *in vitro*", Acta Hortic, V. 843 , (2009 ), 145 - 150.
133. Sudarsono, X. and Goldy R.G., "Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*", HortScience, V. 26, (1991), 304 - 307.
134. Abracheva P., "Les maladies à virus et les maladies de type viral de la vigne en Bulgarie", Progrès Agricoles et Viticoles, V. 109 nº 20. (1992), 434 - 436.
135. Sivritepe, M., Eris, A., "Determining salt tolerance of some grapevine rootstocks under *in vitro* conditions", Bahce, V. 26, nº (1-2), (1997), 49 - 65.
136. Sivritepe, N., Eris, A., "Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) under *in vitro* conditions". Turkish J. Bot. V. 23, (1999), 473 - 485,
137. Dalal, M.A., Sahni, C.K., Khan, A.A., Surinder, K., Kumar, S., "Effect of explant source and stock plant treatment on pre-existing totalphenols and culture initiation of grapevine *in vitro*". Applied-Biological-Research, V. 1, nº 2, (1999), 95 - 98.

138. Lloyd, G.B. et McCown, B.M., "Commercially feasible micropropagation of montian laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture", Proc. Int. Plant Prop. Soc, V. 30, (1980), 412 - 427.
139. Dev, R., Singh, S.K., Singh, A.K. et Verma, M.K., "Comparative in vitro multiplication of some grape (*Vitis vinifera*) genotypes". Journal indien des sciences agricoles, Publication NRM-CAZRI, V. 85, (2015), 1477 - 1483.
140. Reisch, B.I., "Influence of genotype and cytokinins on in vitro shoot proliferation of grapes", J. Amer. Soc. Hort. Sci. V. 111, (1986), 138 - 141.
141. Jiang, Z., Zhong, L., Li, Y., Wu, G., Ni, J., Jiang, Z.P., Zhong, L., Li, Y.Q., Wu, G., Ni, J.D., "Regulation of multiplication and high-growth of Calmeria grape tube-shoots by PP333, BA and IAA", Journal-of-Jiangsu Forestry Science and Technology, V. 27, n° 2, (2000) , 27 - 29.
142. Goussard, P. G. 1981. "Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured in vitro". *Vitis*, Siebeldingen, v. 20, n. 3, (1981), 228 - 234.
143. Goussard, P.G., "Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*: Effects of cytokinins in routine subculturing", *Vitis* V. 21, (1982), 238 - 234.
144. Chee, R. et Pool, R. M., "Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*". *Scientia Horticulturae*, V. 32 n° 1-2, (1987), 85 - 95.
145. Wafaa, H.W., El-Hammady, A.E., El-saidi, M.T., Shahin, M.F.M., "*In vitro* propagation and evaluation for salt stress tolerance in some grape cultivars". Arab-Universities-Journal-of-Agricultural-Sciences, V. 7, n° 1, (1999), 179 - 190.
146. Thomas, P., "Relationship between tissue growth, CO<sub>2</sub> level and tendrill formation during *in vitro* culture of grape (*Vitis vinifera* L.)". *Vitis*, V. 38, (1999), 25 - 29.
147. Grenan, S., "Rhizogeneses de bourgeons apicaux de vigne cultives *in vitro* cannaissance Vigne Vin", V. 13, (1977), 125 - 136.
148. Morini, S., Marzialetti, P. and Barbieri, C., "*In vitro* propagation of grapevine", Riv. Ortoflorofruitt. Ital, V. 69, (1985), 385 - 96.
149. Li, J.R. and Eaton, G.W., "Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*". HortScience V. 19, (1984), 64 - 66.

150. Kwon, Y. Lee, C., Hyung, N., Kwon, Y.J., Lee, C.H., Hyung, N.I., 2000. "Effect of medium composition and culture condition on plant regeneration via organogenesis of 'Kyoho' grape". Journal of the Korean Society for Horticultural Science. V. 41 n° 3, 276 - 280.
151. Rajasekaran, K. and Mullins, M.G., "Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines", J. Exp. Bot, V. 30, (1979), 399 - 407.
152. Barlass, M. and Skene, K.G.M., "*In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices". Vitis. V. 17, (1988), 335 - 340.
153. Gok, S.F., Ergenoglu, A., Kuden, B. and Dennis, F.G.J., "Propagation of several grape varieties and rootstocks by meristem culture". Acta Hort, V. 441, (1997), 245 - 250.
154. Jiménez, V.M. and Bangerth, F., "Relationship Between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behavior", Vitis, V. 39, n°4, (2001), 151-157.
155. Chaouia, C., "Indirect somatic embryogenesis of *Actinidia chinensis* PL. Afenal Hayward variety case". Rev Agriculturae USAMV Cly Napoca. (2008), 8p.
156. Neumann, K-H., Kumar, A., Imani, J., "Plant Cell and Tissue Culture" A Tool in Biotechnology. Basics and Application. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (2009), 91 - 95.
157. Jona, R. et Webb, K.J., "Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* L. 'Sylvaner Riesling'", Scientia Horticulturae, V. 9, n°1, (1978), 55 - 60.
158. Mullins MG and Srinivasan C., "Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*". Journal of Experimental Botany, V. 27 n° 5, (1976), 1022 - 1030.
159. Krul, W.R. and Worley. J.F., "Formation of adventitious embryos in callus cultures of "Seyval", a French hybrid grape". J. Am. Soc. Hort. Sci. V. 102, (1977), 360 - 363.
160. Zou, C.J. and Li P.F., "Induction of pollen plants of grape (*V. vinifera*L.)". Acta Bot. Sinica, V. 23, (1981), 79 - 81.
161. Bouquet, A. et Torregrosa L., "Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In Micropropagation of woody trees and fruits", Springer, Dordrecht, (2003), 319 - 352.

162. Bouquet, A., Piganeau, B., and A.M. "Influence du génotype sur la production de calcs, d'embryoïdes et de plantes entières par culture d'anthers *in vitro* dans le genre *Vitis*". C.R, Acad. Sci. Paris V. 295, Lamaison (1982), 569 - 574.
163. Martinelli, L. and Gribaudo, I., "Somatic embryogenesis in grapevine". *In: Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*, K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), Kluwer Publish. Co., Amsterdam, (2001), 327 - 351.
164. Nakajima, I., Matsuda, N., "Embryogènèse somatique à partir de filaments de *Vitis vinifera* L, *Vitis labruscana* Bailey", *Vitis*, V. 42, (2003), 53 - 54.
165. Gambino, G., Gribaudo, I., Leopold, S., Scharl, A. et Laimer, M., "Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes", *I. Plant cell reports*, V. 24, n° 11, (2005), 655 - 662.
166. Goussard, P.G., Wiid, J. et Kasdorf, G.G.F., "L'efficacité de l'embryogènèse somatique *in vitro* pour éliminer le virus de la fanleaf et les virus associés à l'enroulement de la vigne", *S Afr J Enol Vitic.*, V. 12, (1991), 77 - 81.
167. Gambino, G., Gribaudo, I. et Gambino, G., "Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control". *Phytopathology*, V. 96, n° 11, (2006), 1223 - 1229.
168. Auge, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L, Digat, B., Jalouzat, R., Minier, R., Morand, J. C. I., Reynoard, J. P. and Strullu, D. G., "La culture *in vitro* et ces applications horticoles", 3 -ème édition revue, corrigée et augmentée. Ed.Tec et Doc, Lavoisier (1989), 225p.
169. Perl, A. and Eshdat, Y., "DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. *In: Biotechnology and genetic engineering reviews*, M.P". Tombs (Ed.), Intercept, Andover, UK, V. 15, (1998), 365 - 386.
170. Thomas, M.R., Franks, T. and Iocco, P., "Transgenic grapevines: status and future". *In: Proceed. 7<sup>th</sup> Intern. Symp. Grapevine Genetics and Breeding*, A. Bouquet and J.-M. Boursiquot (Eds), Montpellier (France) (July 1998). *Acta Hort.* 528, (2000), 279 - 288.
171. Vivier, M. A., and Pretorius, I. S., "Genetically tailored grapevines for the wine industry", *TRENDS in Biotechnology*, V. 20, n° 11, (2002), 472 - 478.
172. Colova-Tsolova, V., Perl, A., Krastanova, S., Tsvetkov, I. and Atanassov, A., "Genetically engineered grape for disease and stress tolerance". *In: Molecular*

- Biology and Biotechnology of Grapevine, K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), Kluwer Publish. Co., Amsterdam, (2001), 411 - 431.
173. Kikkert, J.R., Thomas, M.R. and Reisch B.I., "Grapevine genetic engineering.*In: Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*", K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), Kluwer Publish. Co., Amsterdam, (2001), 327 - 351.
174. Martinelli, L. and Mandolino G., "Transgenic grapes (*Vitis species*)", *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transgenic crops II*, Y.P.S. Bajaj (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, V. 47, (2001), 325 - 338.
175. Kassemeyer, H.H. and BerKelmann-Lohnertz, B., "Age-dependent grey mould susceptibility and tissue-specific defence gene activation of grapevine berry skins after infection by *Botrytis cinerea*". *Journal of Phytopathology*, V.155, n°5, (2011), 258 - 263.
176. Strauss, E., "Phytoplasma research begins to bloom". *Science*, V. 325, (2009), 388 - 390.
177. Powell, K.S., Burns, A., Norng, S., Granett, J. and Mc Gourty, G., "Influence of composted green waste on the population dynamics and dispersal of grapevine phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*", *Ag Ecosyst. Environ*, V. 119, (2007), 33 - 38.
178. Dufour, M.C., "Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élicitation face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*)". (Thèse de doctorat). Bordeaux University. France, Thèse n °1847, (2011), 384p.
179. Boudon-Padiou, E., Ride, M. and Walter, B., "L'enroulement viral Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la Vigne F". *Inéret.*, (2000), 47 - 55.
180. Meng, B. and Rowhani, A., "Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management". Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, (2017), 257 - 287.
181. Cloquemin, G., Blaszczyk, G., Herold, D. et Gillet, J., "Les virus la vigne, Progrès agricoles et viticoles", V. 115, n°3, (1998), 59 - 65.
182. Walter, B., Elisabeth, B.P. et Ride, M., "Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne". Ed. Ferret, (2000), 191 p.
183. Sannino, F.A., "Il rossore delle viti", *Riv. Pat. Veg*, V. 1, (1906), 162-163.

184. Ravaz, L. and Verge, G., "Le rougeau de la vigne", *Progrès Agricole et Viticole*, V. 79, (1924), 11-17, 86-89, 110-113, 135-141.
185. Ling, K. S., Zhu, H. Y., Drong, R. F., Slightom, J. L., Mcrerson, J. R. and Gonsalves, D., "Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll associated virus-3 genome reveals a typical monopartite closterovirus", *Journal of General Virology*, V.79, (1998), 1299 - 1307.
186. Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., S.M., L., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., and Wickner, R.B., *Virus taxonomy* (London, UK), V.1 n°10, (2000), 1179 - 7649.
187. Beuve, M., Sempé, L. and Lemaire, O., "A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine". *J. Virol. Methods* V. 141, (2007), 117 - 124.
188. Jooste, A., Maree, H., Bellstedt, D., Goszczynski, D., Pietersen, G., and Burger, J., "Three genetic grapevine leafroll-associated virus 3 variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR", *Arch*, V. 155, (2010), 1997 - 2006.
189. Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Gugerli, P. and Rowhani, A., "Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications". *Virus Res*, V.163, (2012), 120 - 128.
190. Martelli, G.P., and Candresse, T., "Closteroviridae. In *Encyclopedia of Life Sciences*", Chichester: John Wiley & Sons Ltd, (2010), 1 - 9.
191. Choueiri, E., Boscia, D., Digiario, M., Castellano, M.A. and Martelli, G. P., "Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine". *Vitis* V. 35, (1996), 91 - 93.
192. Alkowni, R., Rowhani, A., Daubert, S. and Golino, D., "Partial characterization of a new Ampelovirus associated with grapevine leafroll disease". *J. Plant Pathol*, V. 86, (2004), 123 - 133.
193. Maliogka, V.I., Dovas, C. I. and Katis, N. I., "Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus". *Virus Res*, V. 135, (2008), 125 - 135.

194. Maliogka, V., Dovas, C., Lotos, L., Efthiniou, K. and Katis, N., "Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus Ampelovirus", *Arch. Virol*, V.154, (2009), 209 - 218.
195. Abou-Ghanem, N., Sabanadzovic, S., Uyemoto, J.K., Golino, D.A. and Rowhani, A., "A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease", *Arch*, V. 155, (2010), 1871 - 1876.
196. Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P. and Carstens, E.B., "Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses", *Archives of Virology*, V. 160, (Avril 2015), 1837 - 1850.
197. Charles, J.G., Cohen, D., Walker, J.T.S., Forgie, S.A., Bell, V.A. and Breen, K.C., "A review of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry (The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd (HortResearch)", Client Report No, Charles 18447, (2006), 79p.
198. Jean Le Maguet, W., Mikona, C., Turturo, C., Navaro, B., Rott, M., Menzel, W., Saldarelli, P., Minafra, A. and Martelli, G., "Molecular characterisation and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7". *Arch. V.* 157, (2012), 359 -362.
199. Martelli, G.P., AbouGhanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A.A., Rwahni, M., Dolja, V.V. and Dovas, C.I., "Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family". *Journal of Plant Pathology*, V. 94, (2012), 7 - 19.
200. Martelli, G.P., "The current status of virus disease of grapevine", *Le principali virosi della vite oggi. Informatore Fitopatologico*, V. 52, n°4, (2002), 18 - 27.
201. Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., "Famille Closteroviridae", dans la taxonomie des virus. Neuvième rapport du Comité international sur la taxonomie des virus, sous la direction de A. King, M.J Adams, E.B Carstens et E. Lefkowitz (Amsterdam : Elsevier-Academic Press), (2011), 987-1001.

202. Golino, D.A., Sim, S.T. and Rowhani, A. "The role of GLRV-2 and GVB in virus-induced rootstock decline in California grapevines". *Phytopathology*, V. 90, (2000), S28.
203. Cieniewicz, E., Perry, K., Fuchs, M. et Meng., "Grapevine Red Blotch: Molecular Biology of the Virus and Management of the Disease", Springer International Publishing AG (2017 B), 304 - 314.
204. Bovey, R., Gartel, W., Hewitt, W., B, Martelli, G.P. and Vuittenez, A., "Virus and virus like diseases of grapevines", Atlas en couleur des symptômes, Lausanne: Ed. Payot, (1980), 181p.
205. Lazar, J. and Bisztray, G.D., "Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary", *Journal of Horticultural Science*, V. 17, (2011), 25 - 36.
206. Bovey, R., "Economic importance of grapevine virus diseases", *Bulletin de l'OIV*, V. 43, (1970), 124 - 138.
207. Hofmann, E.L., "Untersuchungen über die Blattrollkrankheit und die Frührotverfärbung bei Klonen der Sorte "Blauer Spätburgunder (Research on grapevine leafroll and on the early reddening of clones of Pinot noir)". *Die Wein-Wissenschaft*, V. 39, (1984), 16 - 29.
208. Walter, B. and Legin, R., "Connaissances actuelles sur les viroses de l'enroulement de la vigne", *Le Vigneron Champenois*, V. 107, (1986), 436 - 446.
209. Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O. and Fuchs, M., "Comparative Performance of Virus-Infected *Vitis vinifera* cv. Savagnin rose Grafted onto Three Rootstocks". *Am. J. Enol. Viticult.* V. 61, (2010), 68 - 73.
210. Atallah, S.S., Gomez, M.L., Fuchs, M.F. and Martinsom, T.E., "Economic of grapevine leafroll disease on *vitis vinifera* cv. Cabernet franc in fingerlakesvineyards of new York". *Am. J.Enol. Vitic*, V. 63, (2012), 73 - 79.
211. Goheen, A., "Grape leafroll. In *Virus diseases of small fruits and grapevines*", Ed. N. W. Frazier. Berkeley: University of California (1970), 209 - 212.
212. Lider, L.A., Goheen, A.C. and Ferrari, N.L., "A comparison between healthy and leafroll-affected grapevine planting stocks", *Am. J. Enol. Vitcul*, V. 26, (1975), 144 - 147.
213. Kovacs, L., Hanami, H., Fortenberry, M. and Kaps, M., "Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruitquality in French-American hybrid

- grapevines Vidal blanc and St", Vincent. Am. J. Enol. Viticult, V. 52, (2001), 254 -259.
214. Besse, S., Rutsche, C., and Gugerli, P., "Tentative analysis of the economic impact of grapevine leafroll disease in the vineyard of Valais (Switzerland). In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine", (Dijon, France), (Aug- Sept 2009), 232 - 233.
215. Goheen, A.C., Gonsalves, D., Martelli, G.P., Ramsdell, D.C., Savino, V., Stellmach, G., Pearson, R.C. and Goheen, A.C., "Diseases caused by viruses and virus like agents", In Compendium of grape diseases (St. Paul, Minnesota 55121, USA. APS Press, The American phytopathological Society), (1988), 47p.
216. Singh Brar, H., Singh, Z., Swinny, E., and Cameron, I., "Girdling and grapevine leafroll associated viruses affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins in 'Crimson Seedless' grapes during maturation and ripening". Plant Science, V. 175, (2008), 885 - 897.
217. Cabaleiro, C. et Segura, A., "Some characteristics of the transmission of Grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso". European Journal of Plant Pathology, V.103, (1997), 373 - 378.
218. Kruger, K., Saccaggi, D. et Douglas, N., "Grapevine leafroll-associated virus 3 vector interactions: Transmission by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae)". In 15<sup>th</sup> Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Stellenbosch, South Africa, (2006), 3 - 7.
219. Tsai, C.W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K.M., and Almeida, R.P.P., "Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*)". Phytopathology, V. 98, (2008), 1093 - 1098.
220. Rosciglione, B., and Gugerli, P., "Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus*", Phytoparasitica, V. 17, (1989), 63p.
221. Sforza, R., Boudon-Padieu, E. and Greif, C., "New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and-3 (GLRaV-1 and-3)", European Journal of Plant Pathology, V.109, n°9, (2003), 975 - 981.

222. Martelli, G.P., "Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agent", Journal of plant pathology V. 96, (2014), 1-136
223. Schellenberger, P., "Caractérisation structurale et fonctionnelle de déterminants de la capsid du Grapevine fanleaf virus impliqués dans la transmission par Xiphinema index", Thesis, Université de Strasbourg, (2010), 224p.
224. Hewitt, W.B., Raski, D.J. and Goheen A.C., "Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines". Phytopathology", V. 48, (1958), 586 - 595.
225. Andret-Link, P.C., Laporte, L., Valat, C., Ritzenthaler, G., Demangeat, E., Vigne, V., Laval, P., Pfeiffer, C., Stussi-Garaud. and Fuchs. M., "Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry", Journal of Plant Pathology, V. 86, n°3, (Novembre 2004a), 183 -195.
226. Andret-Link, P. et Fuchs, M., "Transmission specificity of plant viruses by vectors", J. Plant Pathol, V. 87, (2005), 153 - 165.
227. Martelli, G.P. et Taylor, C.E., "Distribution of viruses and their nematode vectors. Advances in diseases vector research", V. 6, (1990), 89 -151.
228. Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V. et Fuchs, M., "The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector Xiphinema index is determined by the viral coat protein", Virology, V. 320, (2004b), 12 - 22.
229. Raski, D.J., Goheen, A.C., Lider, L.A. and Meredith, C.P., "Strategies against Grapevine fanleaf virus and its nematode vector", Plant Dis, V. 67, (1983), 335 - 339.
230. Bovey, R., Gartel, W., Hewitt, W.B., Martelli, G.P. and Vuitteñez. A., "Soil-borne viruses transmitted by nematodes. In: Virus and virus-like diseases of grapevine", Lausanne (Switzerland): Edition Payot, (1990), 46 - 50.
231. Martelli, G.P., Savino, V., "Fanleaf degeneration, compendium of grape diseases». The american Phytopathologie", Calif, Society, Second Printed. (1990), 48 - 49.
232. Vigne, E., Komar, V. et Fuchs, M., "Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus", Transgenic Research, V.13, (2004), 165 -179.

233. Winterhagen, P., Brendle, G., Krczal, G., Reustle, G.M., "Development of an *in vitro* dual culture system for grapevine and Xiphenima index us a tool for virus transmission", Dans: South Africa Journal of Enology and Viticulture, V. 28, n°1, (2007), 1 - 5.
234. Lapierre, H. and Pierre, A., "Signoret, Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)", Editions INRA, (2005), 342 - 346.
235. Fuchs, M., Pinck, M., Serghini, M.A., Ravelonandro, M., Walter, B. et Pinck, L. "The Nucleotide Sequence of Satellite RNA in Grapevine Fanleaf Virus, Strain F13", The Journal of General Virology, V. 70, (1989), 955 - 962.
236. Serghini, M.A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B. et Pinck, L., "RNA2 of Grapevine Fanleaf Virus: Sequence Analysis and Coat Protein Cistron Location". The Journal of General Virology, V. 71, (1990), 1433 - 1441.
237. Ritzenthaler, C., Viry, M., Pinck, M., Margis, R., Fuchs, M. and Pink, L., "Complete nucleotide sequence and genetic organization of Grapevine Fanleaf nepovirus RNA1". Journal of General Virology, V. 72, (1991), 235 - 765.
238. Viry, H., Serghini, M.A., Hans, F., Retzenthaler, C., Pinck, M. et Pinck, L., "Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf virus RNAs". J. Gen. Virology, V. 74, n° 2, (Février 1993), 169 -174.
239. Vigne, E., Gottula, J., Smitt-Keichinger, C., Komar, V., Ackerer, L., Belval, L., Rakotomalala, L., Lemaire, O., Ritzenthaler, C. and Fuchs, M., "A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA polymeras of Grapevine fanleaf virus determines symptoms in Nicotiana species", Journal of General Virology, V. 94 n° 12, (Octobre 2013), 2803 - 2813.
240. Van Regenmortel, M.H.V., "On the relative merits of italics, Latin and binomial nomenclature in virus taxonomy", V. 145, n° 10, (2000), 433 - 441.
241. Hefferon, K. and Fuchs, M., "Nepovirus replication. RecentAdv. RNA virus replication", V. 661, (2006), 1-17.
242. Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pink, L. and Ritzenthaler, C., "Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is in RNA2 replication and colocalizes to the replication site". Virology, V. 264, (1999), 25 - 36.
243. Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piequet, A., Loudes, A. M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C. and Pfeiffer, P.,

- “Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum- derived membranes”, V. 76, (2002), 8808 - 8819.
244. Galet, P., “ Enroulement. In les maladies et les parasites de la vigne”, tome 1. Imp. Le Paysan du midi, Montpellier, (1977), 633 - 643.
245. Gugerli, P., Brugger, J.J. et Basler, P., “Dégénérescence infectieuse ou court noué de la vigne”. Revue Suisse. Vitic. Arboric. Hortic, V. 22, n° 1, (1990), 33 - 48.
246. Demangeat, G., Esmenjaud, D., Voisin., R, Bidault. J. M., Grenan, S. and Claverie, M., “Le court-noué de la vigne : état des connaissances sur cette maladie”, Phytoma, V. 587, (2005a), 38 - 42.
247. Martelli, G. P., “Maladies à virus de la vigne”. Département patho. Végétal de l’université de Sassari. Ed. Centre international des hautes études agronomiques mediterraneem, (1997), 39p.
248. Habert, P., “Vignes et virus: la résistance s’organise: la lutte contre le court noué principale maladie virale de la vigne, passe par la création de plants résistants, plusieurs stratégies sont possibles”. La recherche, V. 23, n° 247, (1992), 1184 -1186.
249. Raski, D.J., “La protection phytosanitaire en viticulture”. Rev. Sui. Vit. Arbo. Hortic, V. 1, (2000), 16 - 20.
250. Demangeat, G., “Nepovirus transmission by longidorid nematodes”, Transm. Des Nepovirus par les nematodes longidoridae, V. 11, (2007), 309 - 321.
251. Taylor, C.E., “Nematodes”, In: Harris KF, Maramorosch K, eds. Vectors of plant pathogens. New York: Academic Press, (1980), 375 - 416.
252. Dias, H.F. et Harrison, B.D., “The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses”. Annals of Applied Biology, V. 51, (1963), 97 - 105.
253. Cohn, E., Tanne, E. et Nitzany, F.E., “Xiphinema italiae a new vector of grapevine fanleaf virus”. Phytopathology, V. 60, (1970), 181 - 182.
254. Martelli, G.P. et Taylor, C.E., “Distribution of viruses and their nematode vectors”. Adva. Dis. vector Res, V. 6, (1990), 151 - 189.
255. Taylor, C.E. et Robertson, W.M., “Acquisition, relation and transmission of viruses by nematode”, (253 - 276), in nematodes vectors of plants viruses. Plenum press, N. York, (1975), 629p.

256. Raski, D.J., Hewitt, W.B., Goheen, A.C., Taylor, C.E., et Taylor, R.H., "Survival of Xiphinema index and reservoirs of fanleaf virus in fallowed vineyard soil", *Nematologica*, V. 11, (1965), 349 - 352.
257. Brown, D.J.F., Robertson, W.N. et Trudgill, D.L., "Transmission of viruses by plant nematodes", *Ann. Rev. phytopathol*, V. 33, (1995), 223 - 249.
258. Basso, C., Aguilera, B., Banner, J., Cohle, S., d'Amati, G., de Gouveia, R.H. and Lucena, J., "Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac update from the Association for European Cardiovascular Pathology". *Virchows Archiv*, V. 6, n° 471, (2017), 691 - 705.
259. Gugerli, P., Brugger, J. and Bovey, R., "L'enroulement de la vigne : Mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide", *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic*, V. 16, (1984), 299 - 304.
260. Koenig R., "ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses", *J. Gen*, V, 40, (1978), 309 - 318.
261. Martelli, G.P., "The impact of propagation material on vine health. European perspective", *Proceedings of the 10th Australian Vine Industry Technical Conference*, (1999), 197 - 206.
262. Martelli, G.P., "Rugose ood complex. In: Graft-Transmissible Diseases of Grapevine", G.P. Martelli, ed. FAO. Rome, Italy. (1993), 45 - 54.
263. Walter, B., Bass, P., Legin, R., Martin, C., Vernoy, R., Collas, A., Vesselle, G., "The use of a green grafting technique for the detection of virus like diseases of the grapevine", *J. Phytopathology*, V. 128, (1990), 137 - 145.
264. Debrick, K.S., "Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy", *Virology*, V. 56, (1973), 652 - 653.
265. Russo, M., Martelli, G.P. and Savino, V., "Immunosorbent electron microscopy for detecting saptransmissible viruses of grapevine", *Proc. 7<sup>th</sup> Meet. /CGV, Niagara Falls, NY, USA*, (1980), 251 - 257.
266. Vuittenez, A., Munck, M.C., Kuszala, J., 1964. "Souches de virus à haute agressivité isolées de vignes atteintes de dégénérescence infectieuse". *Etudes de Virologie Appliquées*, V. 5, (1964), 69 -78.
267. Clark, M.F. et Adams, A. N., "Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses". *J. Gen*, V. 34, (1977), 475 - 483.

268. Schaad, N.W. and Frederick, R.D., "Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics", *Can. J. Plant Pathol*, V. 24, (2002), 250 - 258.
269. Voller, A., Bidwell, D. E. et Bartlett, A., "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)", A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe, Borough House, Rue du Pre, (1979), 128p.
270. AlRawahneh, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C. et Rowhani, A., "Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine". *Phytopathology* V. 105, (2015), 758 - 763.
271. Roossink, M.J., Martin, D.P. and Roumagnac P., "Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery", *Phytopathology*, V. 105, (2015), 716 - 727.
272. Pacifico, D., Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F. et Marzachi, C., "Quantification of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field collected *Vitis vinifera* L. "Nebbiolo" by realtime reverse transcription-PCR", *Journal of Virological Methods* 172 , (2011), 1 - 7.
273. Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K. and Kirkpatrick, B. C., "A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay", *Journal of Virological Methods*, 71, (1998), 45 - 50.
274. Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. and Rowhani, A., "Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses", *Journal of Virological Methods*, V. 149, n° 2, (2008), 292 - 299.
275. Nassuth, A., Pollari, E., Helmecczy, K., Stewart, S. and Kofalvi, S. A., "Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts". *Journal of Virological Methods*, V. 90, n° 1, (2000), 37 - 49.
276. Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M, Katis, N.I., "Control of virus infecting grapevine". *Control of Plant Virus Diseases Vegetatively Propagated Crops. Advances in Virus Research*, V. 9, (2015), 175 - 228.
277. EPPO Standard., "Soil test for virus–vector nematodes in the framework of EPPO Standard PM 4 Schemes for the production of healthy plants for planting

- of fruit crops, grapevine, Populus and Salix”, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, V. 39, (2009), 284 - 288.
278. Martelli, G.P. and Walter, B., “Virus certification of grapevines”. Plant virus disease control, (1998), 261 - 276.
279. Selmi, I., Pacifico, D., Harbi ben Slimane, M., Garfi, G., Carimi, F. and Mahfoudhi N., “First report of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Wild Grapevines (*Vitis vinifera* spp. *Sylvestris*) in Tunisia”, Plant Disease, V. 102, (2018), 458p.
280. Daane, K.M., Almeida, R.P.P., Bell, V.A., Walker, J.T.S., Botton, M., Fallahzadeh, M., Miano, L. J, Sforza, R., Walton, V. M. and Zaviezo, T., “Biology and management of mealybugs in vineyards”. In N. J. Bostanian, C. Vincent, & R. Isaacs (Eds.), Arthropod management in vineyards: Pests, approaches and future directions. The Netherlands: Springer Science, (2012), 271 - 307.
281. Demangeat, G., Voisin, R., Minot, J.C., Bosselut, N., Fuchs, M. and Esmenjaud, D., “Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants”, Phytopathology, V. 95, n° 10, (2005b), 1151 - 1156.
282. Villate, L., Morin, E., Demangeat, G., Van Helden, M. and Esmenjaud, D., “Control of *Xiphinema index* Populations by Fallow Plants Under Greenhouse and Field Conditions”. PHYTOPATHOLOGY, V. 102, n° 6, (Fevrier 2012), 627- 634.
283. Kumar, B., Yaduraju, N.T., Ahuja, K.N. and Prasad, D., “Effet de la solarisation du sol sur les mauvaises herbes et les nématodes dans des conditions tropicales indiennes”, Weed Research, V. 33, n° 5, (1993), 423 - 429.
284. Charles, J.G., “*Diadiplosis koebelei* new record (Diptera: Cecidomyiidae) a predator of *Pseudococcus lonsispinus* (Homoptera: Pseudococcidae) from New Zealand”, New Zealand Journal of Zoology, V. 8, (1985), 331 - 334.
285. Daane, KM., Malakar-Kuenen, R.D. and Walton, V. M., “Temperature-dependent development of *Anagyrus pseudococci* (Hymenoptera: Encyrtidae) as a parasitoid of the vine mealybug, *Planococcus ficus* (Homoptera: Pseudococcidae)”. Biological Control, V.31, n° 2, (2004), 123 - 132.
286. Cayrol, J.C., “Propriétés nématocides des endomycorhizes a visicules et arbuscules”, PHM Rev Hortic, V. 321, (Décembre 1991), 33 - 42.

287. Cayrol J.C., Djan-Caporalino C. Panchaud-Mattei E., “La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites”, *Courrier de la cellule environment de PINRA*, V. 17, (1992), 31 - 4.
288. Esmenjaud, D. et Bouquet, A., “Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management. In: Ciancio A, Mukerji KG, eds. *Integrated management of fruit crops and forest nematodes*”. Springer Science and Business Media B.V, (2009), 195 - 214.
289. Claverie, M., Audeguin, L., Bloy, P., Esmenjaud, D. and Ollat, N., “Nemadex Alain Bouquet, a rootstock that delays Grapevine fanleaf virus (GFLV) infection”. In VI International Phylloxera Symposium. Book of abstracts. Presented at 6<sup>th</sup> International Phylloxera Symposium, Bordeaux, FRA, (2013), 33p.
290. Esmenjaud, D., Voisin, R., Fritsch, J., Bouquet, A., Lemaire, O. et Claverie, M., “Le court-noué de la vigne : le point sur la lutte contre la maladie a la journée alternative”. Dossier. *Phytoma. La défense des végétaux, France*, V. 587, (2005), 43 - 48.
291. Hemmer, C., Vigne, E., Goldschmidt, V., Komar, V., Marmonier, A., Vala, L., “Transgenic rootstock expressing GFLV CP gene in a three years field trial ; resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchanges between rootstock and scion”. In: 16<sup>th</sup> Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Dijon, France. (2009).
292. Gambino, G., Perrone, I., Carra, A., Chitarra, W., Boccacci, P., Torello Marinoni, D., Barberis, M., Maghuly, F., Laimer, M. et Gribaudo, I., “Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation”. *Transgenic Research*, V.19, (2010), 17 - 27.
293. Jelly, N.S., Schellenbaum, P., Walter, B. and Maillot, P., “Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos”, *Transgenic Res*, V. 21, (2012), 1319 - 1327.
294. Panattoni, A., Luvisi, A. and Triolo, E., “Elimination of viruses in plants: twenty years of progress”. *Span. J. Agric. Res*, V.11, n° 1, (2013), 173 - 188.

295. Narayanasamy, P., "Systèmes de gestion des maladies biologiques pour les cultures agricoles": Intégration des stratégies de lutte biologique avec les systèmes de gestion des maladies des cultures, V. 2, (2013), 57 - 105.
296. Sastry, K.S. and Zitter, T.A., "Production of virus-free plant material", Plant Virus and Viroid Diseases, V. 2, (2014), 160 - 164.
297. Dewanti, P., Widuri, L.I., Ainiyati, C., Okviandari, P. and Sugiharto, M.B., "Elimination of SCMV and rapid propagation of virus-free sugarcane using somatic embryogenesis", Procedia Chem, V. 18, (2016), 96 - 102.
298. White, P.R., "A Handbook Plant Tissue Culture", New York: Ronald Press, (1943), 261p.
299. Limasset, P. and Cornuet, P., "Recherche de virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes des plantes infectées", C.R. Acad.Sci, V. 228, (1949), 1971 - 1972.
300. Heller, R., Esnault, R. et Lance, C., "Physiologie végétale": développement. Ed Masson, Paris, V. 2, (1995), 315p.
301. Nehra, N.S. and Kartha, K.K., "Meristem and shoot tip culture": requirements and applications. In Plant cell and tissue culture. Springer, Dordrecht, (1994), 37 - 70.
302. Galzy, R., "La culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris*.C.R", Acad. Sci. Paris, V. 274, (1972), 210 - 213.
303. Brezeanu, A., Banu, E., Pop, I. and Coman, I., "Regenerations of vein mozaic virusfree *Vitis Vinifera* L. Plants using meristem culture and *in vitro* low temperature traitement", In: Proc. 8th Nat. Symp. Ind. Microbial. Biotech. Univ. Bucharest, (1994), 418 - 424
304. Agnès, B., Hélène, R. et Louise, F., "La culture *in vitro* en TPE", (2013).
305. Galzy, R., "Thermothérapie de quelques variétés de vigne", Progrès Agricoles et Viticoles, V. 80, n° 8, (1963), 22 - 23.
306. Galzy, R., "Action de la température 35°C sur *Vitis rupestris* atteint de court noué", Bulletin Soc Fr Physiol Veg V.12, (1966), 391 - 399.
307. Panattoni, A. and Triolo, E., "Effect of antiviral drugs in *Vitis vinifera* infected explants". 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, (2003), 244p.

308. Valat, C., Grenan, S., Auran, G. and Bonnet A., "Guérison de quelques maladies à virus de la vigne par thermothérapie de plantules cultivées *in vitro*". *Vigne et Vin*, V. 284, (1979), 19 - 22.
309. Rouag, N., "Etude de la fréquence des principaux virus et viroïdes, phytopathogènes des prunus cultivés en Algérie", Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif, (2009), 164p.
310. Gifford, E.M. and Hewitt, W.B., "The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine". *Am. J. Enol. Vitic*, V. 12, (1961), 129 - 135.
311. Monette, P.C., "Elimination *in vitro* of two grapevine nepovirus by an alternating temperature regime", *J. Phytopathology*, V. 116. (1986), 88 - 91.
312. Mur, G., "Thermothérapie des variétés de vitis vinifera par la méthode de la culture *in vitro*". *Progrès Agricoles et Viticoles*, V. 96, (1979), 148 - 151.
313. Balthazard, J., "Valeur culturale du gerwtraminer clone N° 913 guéri du virus de l'enroulement par thermothérapie", *Progrès Agricoles et Viticoles*, V. 110, n° 18, (1993), 113 - 120.
314. Wang, Q.C., Panis, B., Engelmann, F., Lambardi, M. et Valkonen, J.P.T., "Cryotherapy of shoot tips: A technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy genetic resources for cryopreservation", *The Annals of Applied Biology*, V. 154, (2009), 351 - 363.
315. Brison, M., De Boucaud, M.T., Pierronnet, A. and Dosba, F., "Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus". *Plant Science* V.123, (1997), 189 - 196.
316. Wang, Q, Valkonen J.P.T., 2008. Cryotherapy of the shoot tips: Novel pathogen eradication method. *Trends Plant Sci*, V. 14, n° 3, (2008), 119 - 122.
317. Vieira, S., Castelli, S. and Desideri, A., "Importance of a stable topoisomerase IB clamping for an efficient DNA processing: Effect of the Lys (369) Glu mutation", *Int J Biol Macromol*, V. 81, (2015), 76 - 82.
318. Wang, H., Race, E.J., Shrikhande, A.J. "Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging", *J.Agric.Food Chem*, V. 51, (2003), 7989 - 7994.

319. Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F. et Panis, B., "Removal of leafroll viruses infected grapevine plants by droplet vitrification", *Acta Horticulturae*, V. 1083, (2015), 491 - 498.
320. Panattoni, A., D'anna, F. and Triolo, E., "Improvement in grapevine chemotherapy". *Proc. 15<sup>th</sup> ICVG*, (2006), 139 - 141.
321. Panattoni, A., Luvisi, A. and Triolo, E., "Selective chemotherapy on Grapevine leafroll-associated virus -1 and -3". *Phytoparasitica*, V. 39, (2011), 503 - 508.
322. Luvisi, A., Rinaldelli, E., Panattoni, A. and Triolo, E., "Membrane transport of antiviral drugs in plants: an electrophysiological study in grapevine explants infected by grapevine leafroll associated virus 1". *Acta Physiologiae Plantarum*, V. 34, (2012), 2115 - 2123.
323. Skiada, F.G., Maliogka, V.I., Katis, N.I. and Eleftheriou, E.P., "Elimination of Grapevine stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by *in vitro* chemotherapy", *Eur J Plant Pathol*, V. 135, (2013), 407 - 414.
324. Guta, I.C., Buciumeanu, E.C. and Visoiu, E., "Elimination of Grapevine fleck virus by *in vitro* Chemotherapy", *Not Bot HortiAgrobo*, V.42, n°1, (2014), 115 - 118.
325. Aiter, N., Lehad, A., Haddad, B., Taibi, A., Meziani, S., Rabhi, M.L., Khelifi, L. and Chaouia, C., "Sanitation of Autochthonous Grapevine Varieties from Algeria by Chemotherapy". *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, V. 55, n° 1, (2020), 147 - 154.
326. Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., Li, Z. and Zhang, S., "Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 'Kyoho' by an antiviral agent combined with shoot tip culture". *Scientia Horticulturae*, V. 229, (2018), 99 - 106.
327. Guta, I.C., "Alternative method for obtaining virus-free grapevine propagating material", Univ. of Agronomic Science and Veterinary Medicine Bucharest, PhD Thesis, (2010), 208p.
328. Smith, R.A., "Background and mechanisms of ribavirin", *Clinical Application of Ribavirin*, (1984), 1 - 18.
329. Lerch, B., "On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin", *Antiviral Res*, V. 7, (1987), 257 - 270.

330. Lepoivre, P. et Semal, J., "Traité de pathologie végétale". Chapitre 16: culture de tissus et phytopathologie, 455 - 464p. Ouvrage collectif sous la direction de Jean Semal. Presse Agronomique de Gembloux, (1993), 621p.
331. Guta, I.C., Buciumeanu, E.C., Gheorghe, R.N., and Teodorescu, A.L., "The assesement of viricides phytotoxicity used in grapevine in vitro chemotherapy", Bulletin UASVM, V. 66, n° (1 - 2), (2009), 661p.
332. Dixon, R.A., "Natural Products and Plant Disease Resistance", Nature, V. 411, (2001), 843 - 847.
333. Wittstock, U. et Gershenzon, J., "Les toxines végétales constitutives et leur rôle dans la défense des plantes", Curr Opin Plant Biol, V. 5, (2002), 300 - 307.
334. Hammerschmidt, R., "Phytoalexins: What have we learned after 60 years". Annual Review of Phytopathology, V. 37, (1999), 285 - 306.
335. Morrissey, J.P. and Osbourn, A.E., "Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis". Microbiol. Mol. Biol. Revs, V. 63, (1990), 708 - 724.
336. Heil, M., "Ecological costs of induced resistance", Current Opinion in Plant Biology, V. 5, (2002), 345 - 350.
337. Benzeggouta., "Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments". Mémoire de Magister. Pharmacochimie. Université Mentouri de Constantine. Algérie, (2005), 118p.
338. Choi, M.K., Chac, K.Y., Lee, J.Y. and Kyung, K.H., "Antimicrobial activiyt of chemimical substances derived from salm (en) yl L-cysteine sulfloxite (allium) in garlic", Allium sativum. Food Sci Biotechnol, (2007), 1 - 7.
339. Tahri, N., Orch, H. et Zidane, L., "Ail et Microbes: Examen critique de lalitterature, revue antibiotherapeutique", Journée Scientifique "Ressources Naturelles et Antibiothérapie" Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles. Université Ibn Tofail, Kenitra, (2007).
340. Moore, G.S. et Atkins R.D., "Les effets fongicides et fongistatiques d'un extrait aqueux d'ail sur les champignons de type levure médicalement Importants" Mycologie, V. 69, (1977), 341 - 348.
341. Agarwal, K.C., "Therapeutic action of garlic constituents", Med. Res. Rev, V. 16, n° 1, (1996), 111 - 124.

342. Xu, Y., Xiong, L., Li, Y., Xiong, Y., Tu, Z., Fu, J., Tang, X., "Citric acid detection using phage-displayed anti-idiotypic single-domain antibody for antigen mimicry", *Food Chem*, V. 177, (2015), 97 - 101.
343. Edward, C.D. and Vincent, F.G., "Inhibition of Mycobacteria by Garlic Extract (*Allium sativum*)". *American Society for Microbiology*, V. 27, n° 4, 485 - 486.
344. Sendl, A., "Allium sativum and Allium ursinum": Part 1 Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine*, V. 1, n° 4, (1995), 323 - 339.
345. Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales", 4e éd. Paris, Cachan: Éd. Tec & doc, Éd. médicales internationales, (2009), 1269p.
346. Suleria, H.A.R., Butt, M.S., Khalid, N., Sultan, S., Raza, A., Aleem, M. and Abbas, M., "Garlic (*Allium sativum*): diet based therapy of 21st century a review", *Asian Pac J Trop Dis*, V. 5, n° 4, (2015), 271 - 278.
347. Dene, I., Vaikhol'd-R., Dehne, J. and Weichold, R., "Study in the German Democratic Republic (GDR) of useful breeding material of dwarf French bean, onion, outdoor cucumber and garden pea". *Byulleten' -Vsesoyuznogo -Ordena-Lenina-i-Ordena -Druzhby- Narodov- Nauchno ssledovatel'skogo- Instituta-astenievodstva- Imeni-N.-I.-Vavilova*, n° 120, (1982), 48 - 50.
348. Hecht, H., "Effect of antiviral agents on potato virus Y in intact potato plants. Abscisic acid, etrel, piperonylbutoxide, ribavirin and other antiphytoviral agents", *Bayerisches-Landwirtschaftliches-jahrbuch*. V. 61, (1984) 1027 - 1041.
349. Presly, A.H., Maude, R.B., Currah, L., Taylor, J.D., Bambridge, J.M., Reader, S.L., Entwistle, A.R., Coleman, K.E., White, J.G., Stone, D., Pink, D.A.C., Dowker, B., Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Bolland, C.J. and Miller, A., "Diseases of onions biology, resistance and control", 36<sup>th</sup> Annual Report for 1985, National Vegetable Research Station, (1986), 62 - 66.
350. Entwistle, A.R., Coleman, K.E., Munasinghe, H.L., Horobin, J.F., Hayden, N.J., Peach, L., Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W. and Bolland, C.J., "Diseases of onions -biology, resistance and control", 37<sup>th</sup> Annual Report, National Vegetable Research Station, (1987), 59 - 62.
351. Cheremushkina, N.P., Shishkina, T.S. and Lukonina, E.I., "Using leaf onions in breeding for disease resistance". *Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina*

Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk Imeni V.I.Lenina, V. 6, (1989), 29 - 32.

352. Shul'-man, N.I., 1989. Methods of evaluating and selecting garlic for resistance to virus infection. Nauchno Tekhnicheskii Byulleten' Vsesoyuznogo Ordena Lenina i Ordena Druzhby Narodov Nauchno Issledovatel' skogo Instituta Rasteniievodstva Imeni N.I.Vavilova, V. 188, 61 - 62.
353. Walkey, D.G.A. and Antill, D.N., "Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.)", Journal of Horticultural Science, V. 64, n° 1, (1989), 53 - 604.
354. Dijk, P., Van-Sutarya, R. and Van-Dijk, P., "Virus diseases of shallot, garlic and Welsh onion in Java, Indonesia, and prospects for their control", Onion Newsletter for the Tropics, n°. 4, (1992), 57- 61.
355. Dijk, P., Van-Sutarya, R. and Van-Dijk, P., "Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. International symposium on alliums for the Tropics", Bangkok and Chiang Mai, Thailand, 15-19 Feb. [ed. by Midmore, D.J. Acta-Horticulturae, n° 358, (1994), 299 - 306.
356. Patel, K.D., Patel, P.M. and Patel, B.N., "Inhibition of tobacco mosaic virus infection by some plant extracts", Journal of Mycology and Plant Pathology, V. 30, n° 2, (2000), 229 - 230.
357. Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., Delecolle, B., Messiaen, C.M., Etoh, T. and Armstrong, J., "Resistance to onion yellow dwarf virus and leek yellow stripe virus found in a fertile garlic clone", Proceedings of the Second International Symposium on Edible Alliaceae, Adelaide, Australia, Acta Horticulturae, n° 555, (November 2001), 243 - 246.
358. Gurkina, L.K., "Diseases of onion crops. Zashchita i Karantin Rastenii", n° 10, (2000), 245 - 47.
359. Thirumalaisamy, P.P., Rathi, Y.P.S. and Tripathi, H.S., "Screening of some plant extracts inhibitory to Urdbean leaf crinkle virus", Indian-Phytopathology, V. 56, n° 2, (2003), 233 - 235.
360. Cho, J.W., Cho, S.Y, Lee, S.R and Lee, K.S., "Onion extract and quercetin induce matrix metalloproteinase-1 in vitro and in vivo", Int J Mol Med. Mar, V. 25, n° 3, (2010), 347 - 52.

361. Satyakumar, V, Kari, S. and K, S., "Effect of dietary garlic and onion on biliary proteins and lipid peroxidation which influence cholesterol nucleation in bile", *Steroids*, V. 75, n° 3, (2010), 272 - 281.
362. Chen, Q., Liu, G., Wu, Z., Xie, L. and Lin, Q., "The anti-TMV mechanism of volatile oil extracted from *Allium sativum*", *Fujian Journal of Agricultural Sciences*. V. 21, n° 1, (2006), 24 - 27.
363. Curtis. H., Ulrike Noll, U., Stormann, J., Slusarenko A.J., "Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, V. 65, (2004), 79 - 89.
364. Wang, X.Y., Zhang, C.W., HuangW. T., Yue, J., Dou, J.J., Wang ,L.Y., Wang, Q. , Cheng, Y.Q., "Crude garlic extract significantly inhibits replication of grapevine viruses", *Plant pathology. Journals. Onlinelibrary. Wiley. Com/journal/13653059* (October, 2019).
365. ITAF., Catalogue Variétal de la Vigne en Algérie. Observatoire National de la Filière Vitivinicole/ ONFV. Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne/ ITAF, (2014). 87p.
366. Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. et Eleftheriou, E.P., "*In vitro* propagation of the Greek olive cultivar Chondrolia Chalkidikis", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, V. 71, n° 1, (2002), 47 - 54.
367. Porfirio, S., da Silva, M.D.G., Cabrita, M.J., Azadi, P., et Peixe, A., "Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation", *Sci Hort*, V. 198, (2016), 207 - 226.
368. Cassells A.C., "Problems in tissue culture: Culture contamination". Deburgh P.C. and Zimmerman r.h. (Eds). *Micropropagation*, (1991), 31 - 44.
369. Leva, A.R., Petrucceli, R., Goretti, R. et Panicucci, M., "Ruolo dialcuni micro elementie carboidrati nella proliferazione in vitro di cv. Di olivo (*Olea europaea* L.)". *Atti del congresso inter: "Olive: oil quality" Firenze*, (1992), 333 - 334.
370. Rugini, E. and Fedeli, E., "Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop". In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Y.P.S. Bajaj (ed.), SpringerVerlag, New York, V.10, (1990), 593 - 635.
371. Zacchini, M., De Agazio, M., "Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation", *Biol Plant*, V. 48, (2004), 589 - 592.

372. Carra, A., Del Signore, M.B, Sottile, F., Ricci, A. and Carimi, F., "Potential use of new diphenylurea derivatives in micropropagation of *Capparis spinosa* L.". *Plant Growth Regul*, V. 66, (2012), 229 - 237.
373. Haddad, B., "Amélioration de la micropropagation de plusieurs ariétés d'olivier Algériennes (*Olea Europaea* L.)". *Mem, Doct. UHB de Chlef*, (2019), 127p.
374. Komínek, P., Komínková, M., Jandová, B., 2016. "Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses". *Acta virologica* V. 60, (2016), 400 – 403.
375. Boxus, P., Damiano, C., Brasseur, E., Strawberry. In ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Yamada Y "Nhandbook of plant cell culture", V. 3, New York: Macmillan, (1984), 453 - 486.
376. Lopez-aranda, JM., Pliego-alfaro, F., López-navidad, I., Barcelómuñoz, M., "micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* duch.)". Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *j. hortic. sci*, (1994), 625 - 637.
377. Ahanhanzo, C., Dossoukpevi, R., Agassounon, D., Tchibozo, M., Agbangla, C., Dramane, K., "Contribution à l'optimisation des conditions de culture in vitro de deux espèces d'*Ocimum* spp. (Lamiaceae) et étude de l'influence des manipulations in vitro sur la teneur et la qualité de leur acide désoxyribonucléique (ADN) ". *rev. comes - série a*, V.9, (2009).
378. Ahanhanzo, C., Gandonou, CH., Agbidinokoun, A., Dansi, A., Agbangla, C., "Effect of two cytokinines in combination with acetic acid ^-naphthalene on yams (*discorea* spp.) genotype's response to in vitro morphogenesis". *African Journal of Biotechnology*, V. 9 n° 51, (2010), 8837 - 8843.
379. Brhadda, N., Abousalim, A., Walali, I.D.M., "Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv picholine marocaine". *Fruit* V.85, n° 3, (2003), 1 - 14.
380. Benmahioul, B., Daguin, F. et Kaid-Harche, M., "Effet du stress salin sur la germination et la croissance *in vitro* du pistachier (*Pistacia vera* L)", *C. R. Biologies*, V. 332, (2009), 752 - 758.
381. Deore, A.C., Johnson, T.S., "High frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel crop". *Plant Biotechnology Reports*, V. 2, (2008), 7 - 11.

382. Sarika, S., Meenakshi, B., "Algal filtrate: a low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot)". *Acta Physiol. Plant*, V. 31, (2009), 1205 - 1212.
383. Pratibha, M., Neha, G., Dibya, D., Toppo, V.P., Manoj, K.M., Rakesh, T., "Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination". *Plant Cell Tissue Organ Cult*, V. 100, (2010), 189 - 197.
384. Purkayastha, J., Sugla, T., Paul, A., Solleti, S.K., Mazumdar, P., Basu, A., Mohommad, A., Ahmed, Z. et Sahoo, L., "Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*". *Biol. Plant.*, V.54 n°1, (2010), 13 - 20.
385. Arbaoui, S., Campanella, B., Paul, R. and Bettaieb, T., "Micropropagation *in vitro* d'une plante à fibres : le kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.)". *Revue Nature & Technologie. B-Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 09 (juin 2013), 41 - 47.
386. Ikten, H. et Read, P.E., "The Effects of Growth Regulators on Micropropagation of Grapevine (*Vitis* Spp.) 'Marechal Foch' and 'Lacrosse'". *International Journal of Fruit Science*, V. 10 n°4, (2010), 367 - 378.
387. George, E.F., "Plant propagation by tissue culture", V. 1, (1993), England: Exegetics.
388. Thorpe, T.A., "Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects". In Vasil IK. (ed 2) *International review of cytology. Suppl. II*, V.11, (1980), 71 - 111.
389. Ziv M., "Quality of micropropagated plants", Vitrification, *In Vitro Cell Dev. Biol*, V. 27, (1991), 64 - 69.
390. Bornman, C.H. et Vogelmann, T.C., "Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*". *Physiologia Plantarum*, V. 61, n° 3, (1984), 505 - 512.
391. Elliott, D.C., "Inhibition of cytokinin regulated responses by calmodulin-binding compounds". *Plant Physiol. Explants. 14<sup>th</sup> ICVG Conference, Locorotondo*, V. 72, (September 1983), 244 p.

392. Scienza, A., Failla, O. and Romano, P., "Untersuchungen zur sortenspezifischen Minerals", CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche). *Vitis*, V. 25, (1986), 160 - 168.
393. Isac, V., Popescu, A. Johnson, Coman, M., "Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *fragaria x ananassa* Duch. in Schmidt's (h.), Kellerhals (m.) progress in temperate fruit breeding", Kluwer Academic Publishers, (1994), 395 - 398.
394. Stasinopoulos, T.C. et Hangarter, R.P., "Preventing photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultured tissues", *Plant Physiol*, V. 93, (1990), 1365 - 1369.
395. Dunlap, J.R., Kresovich, S. and McGee, R.E., "The effect of salt concentration on auxin stability in culture media", *Plant Physiol*, V. 81, (1986), 934 - 936.
396. De Klerk, G.J., Brugge, J.T. and Marinova, S., "Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in *Malus*", 'Jork 9'. *Sci. Hortic*, V.31, (1997), 15 -119.
397. Philips, R., "Cytodifferentiation", In Vasil IK. (ed). *Perspectives in plant cell and tissue culture*, New York Academic Press, (1980), 55 - 70.
398. Heloir, M.C., Fournioux, J.C., Oziol, L., Bessis, R., "An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings". *Plant cell, tissue and organ culture*, V. 49, n° 3, (1997), 223 - 225.
399. Hazarika, B.N., "Acclimatization of tissue-cultured plants", *Curr Sci* V. 85, (2003), 1704 - 1712.
400. Klein, R.E., Livingston, C.H., "Eradication of potato virus X from potato by ribavirin treatment of cultivated potato shoot tips". *Am J Potato Res* V. 59, (1982), 359 - 365.
401. Mancino, L.J.C. and Agrios, G.N., "Effects of antiviral compounds on symptoms and as follows: treatment A-2 days and 1 infectivity of cowpea Chlorotic Mottle Virus". *Plant Disease* V. 68, (1984), 219 - 222.
402. Sidaros, S.A., Omar, R.A., El Kewey, S.A., El Khalik, S.A., "Virus elimination from infected garlic plant using different techniques". *Egyptian J. V.1*, (2004), 333 - 341.

403. Kudelkova, M., Ondrurikova, E., Saskova, H., "Elimination of Garlic common latent virus by meristem culture and chemotherapy". *Acta Hortic.* (2016), 1113 - 1135.
404. Kushnarenko, S., Romadanova, N., Aralbayeva, M., Zholamanova, S., Alexandrova, A and Karpova, O., "Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots", *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* V. 53, n° 4, (2017), 425 - 432.
405. Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J., "Significance of Inducible Defenserelated Proteins in Infected Plants". *Annu. Rev. Phytopathol.* V.44, (2006), 135 -162.
406. Santhosha, S.G., Jamuna, P. and Prabhavathi, S.N., "Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance". A review. *Food Bioscience*, V.3, (2013), 59 - 74.
407. Zhu, J.W., Chen, T., Guan, J., Liu, W.B., Liu, J., "Neuroprotective effects of allicin on spinal cord ischemia–reperfusion injury via improvement of mitochondrial function in rabbits", *Neurochem Int*, V. 61(5), (2012), 640 - 648.
408. Banfitebiyi, G., Yaovi, A.A., Holaly, E.G., Bouraïma., Djeri., Kouassi Soncy., Kokou Anani. and Simplicite, D.K., "Revue sur l'Ail et ses Composés Bioactifs", *European Scientific Journal*, V.15 n°6, (Fevrier 2019), 6 - 79.
409. Del Vesco, L.L. et Guerra, P.M., "The effectiveness of nitrogene sources in *Foijoa* somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*", V.64, (2001), 19 - 25.
410. Senninger, F., "L'ail et ses bienfaits", Saint-Julien-en-Genevois; Genève-Bernex: Editions Jouvence, (2009), 94p.
411. Hassannejad, S., Bernard, F., Mirzajani, F., Gholami, M., "Improvement of hyperhydricité reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes". *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol.51, (2012), 40 – 46.
412. Silva, A.L.L., Kielse, P., Horbach, M.A., Brondani, G.E., Walter, J.M., Santos, L.F.D., Habibi, P.E et Araujo, J.F. "Application of Micropropagation in Plant Biotechnology". In *micropropagation, Methods and effects, plant science research and practices*. Nova Sciences Publishers, Inc. (2019), 1 - 24.

## APPENDICE A

Annexe 1 : Cépages autochtones de vigne de germoplasmes de l'ITAF  
(ITAF, 2014)





Mokranl



Boughni



Sbaa Tolba



Ferrana de Mascara



Ain El Kouma



Sultanine de Fandouk



Sultanine



Torki



Amellal



Ahchichen



Bezoul El-khadem



Chaouch



Cherchali



Ferrana noir



Chanez



Lakhdari



Si Ahmed Draa El-Mizan



Toutrisine



Annexe 2 : [Constituants du milieu MS \(Murashige et Skoog, 1962\)](#)

<u>Constituants</u>	<u>Concentrations des solutions mères</u>	
<u>Macroéléments</u>	<u>mg/l</u>	<u>ml/l</u>
<u>KNO<sub>3</sub></u>	<u>1900</u>	<u>Concentré X [10], Prélèvement de 100 ml de la solution mère pour un volume de 1000 ml</u>
<u>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></u>	<u>1650</u>	
<u>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</u>	<u>370</u>	
<u>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u>	<u>170</u>	
<u>CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</u>	<u>440</u>	
<u>Micro-éléments</u>	<u>mg/l</u>	<u>ml/l</u>
<u>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</u>	<u>22.3</u>	<u>Concentré X [100], Prélèvement de 10 ml de la solution mère pour un volume de 1000 ml</u>
<u>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</u>	<u>8.6</u>	
<u>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></u>	<u>6.2</u>	
<u>KI</u>	<u>0.83</u>	
<u>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</u>	<u>0.025</u>	
<u>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</u>	<u>0.25</u>	
<u>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</u>	<u>0.025</u>	
<u>Chélate de fer</u>	<u>mg/l</u>	<u>ml/l</u>
<u>Na<sub>2</sub>.EDTA</u>	<u>37.3</u>	<u>Concentré X [100], Prélèvement de 10 ml de la solution mère pour un volume de 1000 ml</u>
<u>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</u>	<u>27.8</u>	
<u>Acides aminés et vitamines</u>	<u>mg/l</u>	<u>ml/l</u>
<u>Glycine</u>	<u>2</u>	<u>Concentré X [100], Prélèvement de 10 ml de la solution mère pour un volume de 1000 ml</u>
<u>Acide nicotinique</u>	<u>0.05</u>	
<u>Pyridoxine-HCl</u>	<u>0.01</u>	
<u>Thiamine-HCl</u>	<u>0.05</u>	
<u>Miyo-inositol</u>	<u>100</u>	
<u>Autres</u>	<u>mg/l</u>	<u>Ajouté au moment de la préparation de milieu</u>
<u>Saccharose</u>	<u>30 000</u>	
<u>Agar Agar</u>	<u>7000</u>	
<u>pH</u>	<u>5.7-5.8</u>	

## APPENDICE B

### RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DU MICROBOUTURAGE

Annexe 1 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et des milieux de culture sur le taux de débourrement des explants (%)

	SC	D D L	CM	F-ratio	p
Intercept	481666,7	1	481666,7	71065,57	0,000000
Cépage	8,3	2	4,2	0,61	0,546353
Milieux	533,3	5	106,7	15,74	0,000000
Cépage*Milieux	191,7	10	19,2	2,83	0,010678
Error	244,0	36	6,8		

Annexe 2 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Milieu	Taux Débourrement	Groupes homogènes
3	2	90,0000	c
3	3	90,0000	c
1	3	90,0000	c
2	3	90,0000	c
2	1	90,0000	c
2	6	90,0000	c
2	2	95,0000	b
1	4	95,0000	b
3	6	95,0000	b
1	2	95,0000	b
3	4	95,0000	b
1	6	95,0000	b
3	1	95,0000	b
1	1	95,0000	b
1	5	100,0000	a
3	5	100,0000	a
2	4	100,0000	a
2	5	100,0000	a

Annexe 3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et des milieux de cultures sur le taux des explants ayant produit des pousses (%)

	SC	DDL	CM	F-ratio	p
Intercept	412563,0	1	412563,0	24242,00	0,000000
Cépage	225,9	2	113,0	6,64	0,003517
Milieu	1264,8	5	253,0	14,86	0,000000
Cépage*Milieu	379,6	10	38,0	2,23	0,038248
Error	612,7	36	17,0		

Annexe 4 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Milieu	Taux des explants ayant produit des pousses	Groupes homogènes
1	1	80,00000	b
1	2	80,00000	b
3	4	80,00000	b
3	2	80,00000	b
3	1	80,00000	b
2	6	83,33333	b
2	1	85,00000	b
2	4	85,00000	ab
1	4	85,00000	ab
2	2	90,00000	ab
3	3	90,00000	ab
1	6	90,00000	ab
3	6	90,00000	ab
2	3	95,00000	a
1	3	95,00000	a
2	5	95,00000	a
1	5	95,00000	a
3	5	95,00000	a

Annexe 5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et des milieux de cultures sur le nombre moyen de pousses/explant

	SM	DDL	CS	F ratio	p
Intercept	420,3361	1	420,3361	6078,433	0,000000
Cépage	0,2722	2	0,1361	1,968	0,141275
Milieu de culture	4,3806	5	0,8761	12,669	0,000000
cépage*Milieu de culture	2,3611	10	0,2361	3,414	0,000281
Error	23,6500	342	0,0692		

Annexe 6 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

	cépage	Milieu	Nombre moyen de pousses	Groupes homogènes
1	1	1	1,000000	b
2	1	2	1,000000	b
16	3	4	1,000000	b
14	3	2	1,000000	b
13	3	1	1,000000	b
12	2	6	1,000000	b
7	2	1	1,000000	b
10	2	4	1,000000	b
4	1	4	1,050000	b
8	2	2	1,050000	b
15	3	3	1,050000	b
6	1	6	1,050000	b
18	3	6	1,050000	b
9	2	3	1,100000	b
3	1	3	1,150000	b
11	2	5	1,150000	b
5	1	5	1,200000	b
17	3	5	1,600000	a

Annexe 7 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et des milieux de cultures sur la longueur moyenne de pousses (cm)

	SC	D D L	CM	F-ratio	P
Intercept	1071,225	1	1071,225	7850,325	0,000000
Cépage	2,860	2	1,430	10,478	0,000038
Milieu de culture	56,414	5	11,283	82,684	0,000000
Cépage*Milieu de culture	2,554	10	0,255	1,872	0,048087
Error	46,668	342	0,136		

Annexe 8 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

	Cépage	Milieu	Longueur Moyenne Pousses	Groupes homogènes
1	1	1	1,175000	f
7	2	1	1,395000	e
12	2	6	1,435000	def
18	3	6	1,440000	def
6	1	6	1,450000	def
8	2	2	1,455000	def
13	3	1	1,470000	def
9	2	3	1,470000	def
3	1	3	1,530000	def
15	3	3	1,605000	cde
2	1	2	1,685000	cde
4	1	4	1,710000	cde
10	2	4	1,780000	d
14	3	2	1,895000	c
16	3	4	1,920000	c
11	2	5	2,330000	b
5	1	5	2,540000	ab
17	3	5	2,765000	a

Annexe 9 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype et des milieux de cultures sur le nombre moyen de feuilles/explant

	SM	DD L	CM	F	P
Intercept	4558,225	1	4558,225	2282,282	0,000000
Cépage	71,467	2	35,733	17,892	0,000000
Milieu de culture	108,258	5	21,652	10,841	0,000000
cépage*Milieu de culture	12,000	10	1,200	0,601	0,813113
Error	683,050	342	1,997		

Annexe10 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

	Cépage	Milieu	Nombre Moyen de pousses	Groupes homogènes
1	1	1	2,650000	a
2	1	2	2,600000	a
16	3	4	2,600000	a
14	3	2	3,500000	a
13	3	1	3,650000	a
12	2	6	3,550000	a
7	2	1	2,800000	a
10	2	4	2,650000	a
4	1	4	3,250000	a
8	2	2	3,650000	a
15	3	3	4,700000	a
6	1	6	3,500000	a
18	3	6	3,550000	a
9	2	3	3,550000	a
3	1	3	4,050000	a
11	2	5	4,600000	a
5	1	5	5,150000	a
17	3	5	4,050000	a

Annexe 11 : Effet de différents milieux et la composition minérale en Macroéléments sur prolifération et le développement *in vitro* des pousses après 60 jours de culture.

Cépage	Milieu	Taux Débourrement	Taux Explants ayant survécus	Longueur moyenne de pousses régénérées (cm)	Nombre moyen de pousses régénérées / explant	Nombre moyen de feuilles/pousse régénérée
AH	MS	95 ±0.58b	80 ±1.15b	1,175±0,21f	1±0b	2,65±0,21a
	QL-MS	95 ±1.15b	80±1,75b	1,685±0,59cde	1±0b	2,6±0,27a
	MS <sub>1</sub>	90 ±0,58b	80±0,58b	1,530±0,49def	1,15±0,08b	2,6±0,23a
	MS <sub>2</sub>	95 ±0.58a	95±2.89a	1,710±0,52cde	1,05±0,05b	3,50±0,30a
	MS <sub>3</sub>	100 ±0b	95±3.21a	2,54±0,26ab	1,20±0,09b	3,65±0,18a
TD	MS <sub>4</sub>	95 ±1.73b	80±2.31b	1,45±0,56def	1,05±0,05b	3,55±1034a
	MS	90 ±1.15c	85 ±2.89ab	1,395±0,25ef	1±0b	2,80±0,25a
	QL-MS	95 ±2.89b	83,33±2.19b	1,455±0,13def	1,05±0,05b	2,65±0,24a
	MS <sub>1</sub>	90 ±0,58c	80±2.89b	1,470±0,70def	1,10±0,07b	3,25±0,38a
	MS <sub>2</sub>	100 ±0a	95±2.89a	1,780±0,57cd	1±0b	3,65±0,33a
LK	MS <sub>3</sub>	100±0.a	95±3.21a	2,330±0,14b	1,15±0,08b	4,70±0,33a
	MS <sub>4</sub>	90±1.15c	85±2.89ab	1,435±0,27def	1±0b	3,5±0,31a
	MS	95 ±1.73b	90 ±1.15ab	1,470±0,15def	1±0b	3,55±0,33a
	QL-MS	90 ±1.15c	90±2.31ab	1,895±0,13c	1±0b	3,55±0,37a
	MS <sub>1</sub>	90 ±1.73c	90±2.65ab	1,605±0,24cde	1,05±0,05b	4,05±0,31a
	MS <sub>2</sub>	95 ±2.89b	90±1.0ab	1,920±0,13c	1±0b	4,60±0,39a
	MS <sub>3</sub>	100 ±0a	95±1.0a	2,765±0,20a	1,60±0,15a	5,15±0,45a
	MS <sub>4</sub>	95±2.89b	85±3.06ab	1,440±0,17def	1,05±0,05b	4,05±0,31a

Notes : L'effet des traitements pour la formation de pousses a été exprimé en pourcentage des premiers bourgeons produisant des pousses. Les données sont collectées après 2 mois du début de l'expérimentation et chaque traitement comprend 100 explants. Moyenne ± erreur standard, n=100. Variation suivie de la même lettre est non significative selon le test de LSD.

Annexe 12 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype, des milieux de cultures, l'absence et la présence de l'ANA sur le pourcentage d'enracinement (%)

	SS	D DL	MS	F	p
Intercept	140112,0	1	140112,0	4232,755	0,000000
Cépage	375,5	2	187,7	5,671	0,005161
Milieux	17896,3	5	3579,3	108,129	0,000000
Mode Hormone	47292,6	1	47292,6	1428,699	0,000000
Cépage*Milieux	99,5	10	10,0	0,301	0,978797
Cépage*Mode Hormone	100,5	2	50,2	1,517	0,226192
Milieux*Mode Hormone	4521,3	5	904,3	27,317	0,000000
Cépage*Milieux*Mode Hormone	719,0	10	71,9	2,172	0,029250
Error	2383,3	72	33,1		

Annexe 13 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Milieu	Mode Hormone	Taux d'enracinement	Groupes homogènes
2	2	1	6,66667	n
3	1	1	6,66667	n
3	5	1	6,66667	n
2	1	1	6,66667	n
2	5	1	8,33333	m
1	5	1	8,33333	m
1	1	1	10,00000	k
1	2	1	11,66667	k
3	2	1	11,66667	k
3	6	1	15,00000	ij
2	6	1	16,66667	ij
2	3	1	18,33333	hi
2	4	1	18,33333	hi
2	1	2	21,66667	hi
1	3	1	23,33333	gh
1	6	1	23,33333	gh
3	3	1	23,33333	gh
3	1	2	25,00000	gh
1	4	1	26,66667	gh
1	1	2	30,00000	f
3	4	1	30,00000	f
2	5	2	36,66667	de
1	5	2	46,66667	d
3	2	2	46,66667	d
2	2	2	46,66667	d
3	5	2	46,66667	d
1	2	2	53,33333	c
1	6	2	70,00000	b
3	3	2	70,00000	b
2	6	2	70,00000	b
3	6	2	70,00000	b
3	4	2	70,00000	b
1	3	2	80,00000	a
2	3	2	80,00000	a
1	4	2	80,00000	a
2	4	2	81,66667	a

Annexe 14 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype, des milieux de cultures, l'absence et la présence de l'ANA sur la longueur moyenne de racines / pousse (cm)

	SS	DDL	MS	F	P
Intercept	4145,092	1	4145,092	1950,640	0,000000
Cepage	19,408	2	9,704	4,567	0,011071
Milieux	41,383	5	8,277	3,895	0,001923
Mode Hormone	340,414	1	340,414	160,195	0,000000
Cepage*Milieux	85,682	10	8,568	4,032	0,000031
Cepage*Mode Hormone	29,355	2	14,678	6,907	0,001155
Milieux*Mode Hormone	54,605	5	10,921	5,139	0,000149
Cepage*Milieux*Mode Hormone	61,206	10	6,121	2,880	0,001852
Error	688,497	324	2,125		

Annexe 15 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Milieu	Mode Hormone	LMR	Groupes homogènes
2	5	1	1,375000	i
1	6	1	1,606000	i
1	4	1	1,937000	i
2	1	1	1,972000	i
2	3	1	2,034000	i
1	3	1	2,112000	i
2	4	1	2,164000	i
3	1	1	2,166000	i
3	2	1	2,176000	i
2	6	1	2,496000	hi
1	1	1	2,600000	hi
3	1	2	2,700000	hi
3	4	1	2,749000	hi
1	5	1	2,800000	hi
3	5	1	2,860000	hi
2	5	2	2,873000	hi
3	3	1	2,878000	hi
2	2	1	2,892000	hi
2	6	2	3,149000	hi
1	2	1	3,253000	hi
3	5	2	3,277000	hi
3	6	1	3,505000	fg
2	1	2	3,654000	fg
1	2	2	3,833000	ef
1	6	2	3,922000	ef
1	3	2	4,223000	de
3	2	2	4,270000	de
3	6	2	4,290000	de
2	2	2	4,419000	df
3	3	2	4,579000	cd
3	4	2	4,621000	cd
2	4	2	4,781000	cd
1	1	2	5,046000	cd
1	5	2	5,395000	bc
2	3	2	5,868000	b
1	4	2	7,682000	a

Annexe 16 : Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype, des milieux de cultures, l'absence et la présence de l'ANA sur le nombre moyen de racines / pousse (cm)

	SS	Degr. Of	MS	F	P
Intercept	2555,078	1	2555,078	1592,848	0,000000
Cepage	11,512	2	5,756	3,588	0,028749
Milieux	111,562	5	22,312	13,910	0,000000
Mode	110,155	1	110,155	68,671	0,000000
Cepage*Milieux	30,789	10	3,079	1,919	0,041884
Cepage*Mode	1,399	2	0,700	0,436	0,646896
Milieux*Mode	75,216	5	15,043	9,378	0,000000
Cepage*Milieux*Mode	44,354	10	4,435	2,765	0,002744
Error	518,122	323	1,604		

## Annexe 17 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Milieux	Mode	NMR	Groupes homogènes
1	1	1	1,000000	d
2	5	1	1,500000	d
1	6	2	1,600000	d
1	3	1	1,700000	d
1	5	1	1,700000	d
1	2	1	1,700000	d
2	3	1	1,800000	d
2	4	1	2,000000	d
3	1	1	2,000000	d
2	6	1	2,000000	d
3	5	2	2,200000	d
3	2	1	2,300000	d
1	6	1	2,300000	d
3	6	1	2,400000	d
1	1	2	2,400000	d
1	4	1	2,500000	d
3	5	1	2,500000	d
3	3	1	2,500000	d
2	2	1	2,555556	d
3	1	2	2,600000	d
2	3	2	2,600000	d
3	4	1	2,600000	d
2	6	2	2,600000	d
3	3	2	2,800000	cd
2	5	2	2,900000	cd
1	2	2	2,900000	cd
3	2	2	2,900000	cd
2	1	1	3,000000	cd
2	1	2	3,000000	cd
2	2	2	3,000000	cd
3	6	2	3,100000	cd
1	3	2	3,500000	c
1	5	2	3,600000	bc
1	4	2	4,200000	b
2	4	2	5,800000	a
3	4	2	6,300000	a

Annexe 18 : Effet des traitements sur la formation et le développement *in vitro* des racines

Cépage	Milieu	Mode d'enracinement	Taux Enracinement (%)	Longueur moyenne de racines (cm)	Nombre moyen de racines	κ acclimatation (%)	
AH	MS	Mode 1	10 ±0.k	2,6±0,49i	1±0d	78±1,15gh	
		Mode 2	30 ±5.77f	5,05±0,74cd	2,40±2,27d	84±0,58abc	
	QL-MS	Mode 1	23,33 ±0.gh	1,61±0,29i	1,60±0,27d	80±1,15efg	
		Mode 2	70 ±5.77b	3,92±0,28ef	2,30±0,40d	83±0,58bcd	
	MS <sub>1</sub>	Mode 1	11,67 ±1.67k	3,25±0,53hi	1,70±0,30d	81±0,58def	
		Mode 2	53,33±5.77c	3,830±0,49ef	2,90±0,23cd	84±0,58abc	
	MS <sub>2</sub>	Mode 1	23,33 ±0gh	2,11±0,39i	1,70±0,21d	80±1,15efg	
		Mode 2	78 ±0a	4,22±0,53de	3,50±0,16c	83±0,58bcd	
	MS <sub>3</sub>	Mode 1	26,67 ±2.89gh	1,94±0,07i	2,50±0,34d	78±1,15gh	
		Mode 2	80 ±0a	7,68±0,97a	4,20±0,77bc	86±1,15a	
	MS <sub>4</sub>	Mode 1	8,33 ±1.67m	2,8±0,09hi	1,70±0,15d	79±1,15fgh	
		Mode 2	46,67 ±5.77d	5,400±0,70bc	3,60±0,73bc	82±0,58cde	
	TD	MS	Mode 1	6,67 ±0n	1,97±0,41i	3±0,70cd	80±0,58efg
			Mode 2	21,67 ±5.77hi	3,65±0,81fg	3±0,60cd	82±0,58cde
		QL-MS	Mode 1	16,67 ±1.67ij	2,50±0,21hi	2±0,21d	80±0,58efg
			Mode 2	70 ±5.77b	3,15±0,31hi	2,60±0,31d	82±0,58cde
MS <sub>1</sub>		Mode 1	6,67 ±1.67n	2,89±0,4hi	2,55±0,41d	82±0,58cde	
		Mode 2	46,67±5.77d	4,42±0,51de	3±0,30cd	84±1,15abc	
MS <sub>2</sub>		Mode 1	18,33 ±1.67hi	1,80±0,40i	1,80±0,39d	81±0,58def	
		Mode 2	80 ±a	2,60±0,48cd	2,60±0,37d	82±0,58cde	
MS <sub>3</sub>		Mode 1	18,33 ±2.89hi	2,16±0,11i	2±0,21d	81±0,58def	
		Mode 2	81,66 ±0a	5,87±0,70b	5,80±0,88b	85±1,15ab	
MS <sub>4</sub>		Mode 1	8,33 ±1.67m	1,38±0,04i	1,50±0,17d	81±0,58def	
		Mode 2	36,67 ±5.77de	2,87±0,42hi	2,90±0,87cd	84±1,15abc	
LK		MS	Mode 1	6,67 ±1.67n	2,17±0,31i	2±0,26d	80±0,58efg
			Mode 2	25 ±5.77gh	2,70±0,15hi	2,60±0,40d	83±0,58bcd
		QL-MS	Mode 1	15 ±2.89ij	3,51±0,42fg	2,40±0,16d	79±0,58fgh
			Mode 2	70 ±5.77b	4,29±0,34de	3,10±0,10cd	83±0,58bcd
	MS <sub>1</sub>	Mode 1	11,67 ±1.67k	2,18±0,14i	2,30±0,40d	79±0,58fgh	
		Mode 2	46,67 ±5.77d	4,27±0,42de	2,90±0,35cd	82±0,58cde	
	MS <sub>2</sub>	Mode 1	23,67 ±1.67gh	2,88±0,36hi	2,50±0,37d	80±0,58efg	
		Mode 2	70±5.77b	4,58±0,49cd	2,80±0,25cd	82±0,58cde	
	MS <sub>3</sub>	Mode 1	30,00 ±3.33f	2,75±0,18hi	2,60±0,22d	80±0,58efg	
		Mode 2	73 ±5.77b	4,62±0,52cd	6,30±0,21a	85±1,15ab	
	MS <sub>4</sub>	Mode 1	6,67 ±1.67n	2,86±0,60hi	2,20±0,13d	77±0,58h	
		Mode 2	46,67 ±5.77d	3,28±0,41hi	2,50±0,17d	84±1,15abc	

*La réponse à l'enracinement a été exprimée par le pourcentage d'enracinement des pousses, le nombre de racines par explant et la moyenne de la longueur de racines. Les données ont été collectées après 30 jours du début de la phase d'enracinement et les traitements comprennent 20 explants. Les moyennes suivies de la même lettre sont non significative selon test de LSD.*

Annexe 19 ; Modèle ANOVA appliqué aux effets du génotype, des milieux de cultures, l'absence et la présence de l'ANA sur le taux d'acclimatation des plants enracinées

	SM	D D L	CM	F ratio	P
Intercept	718341,3	1	718341,3	297244,7	0,000000
Cépage	12,7	2	6,3	2,6	0,079684
Milieu	14,7	5	2,9	1,2	0,311478
Mode	341,3	1	341,3	141,2	0,000000
Cépage*Milieu	44,3	10	4,4	1,8	0,069627
Cépage*Mode	20,7	2	10,3	4,3	0,017590
Milieu*Mode	16,7	5	3,3	1,4	0,242229
Cépage*Milieu*Mode	50,3	10	5,0	2,1	0,036905
Error	174,0	72	2,4		

Annexe 20 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

	Cépage	Milieu	Mode	Taux d'acclimatation	Groupes homogènes
34	3	5	1	77,00000	h
2	1	1	1	78,00000	gh
4	1	2	1	78,00000	gh
32	3	4	1	79,00000	fgh
28	3	2	1	79,00000	fgh
10	1	5	1	79,00000	fgh
26	3	1	1	80,00000	efg
24	2	6	1	80,00000	efg
6	1	3	1	80,00000	efg
30	3	3	1	80,00000	efg
36	3	6	1	80,00000	efg
12	1	6	1	80,00000	efg
14	2	1	1	80,00000	efg
18	2	3	1	81,00000	def
20	2	4	1	81,00000	def
8	1	4	1	81,00000	def

22	2	5	1	81,00000	def
16	2	2	1	82,00000	cde
29	3	3	2	82,00000	cde
9	1	5	2	82,00000	cde
13	2	1	2	82,00000	cde
27	3	2	2	82,00000	cde
23	2	6	2	82,00000	cde
17	2	3	2	82,00000	cde
31	3	4	2	83,00000	bcd
11	1	6	2	83,00000	bcd
5	1	3	2	83,00000	bcd
25	3	1	2	83,00000	bcd
15	2	2	2	84,00000	abc
7	1	4	2	84,00000	abc
1	1	1	2	84,00000	abc
21	2	5	2	84,00000	abc
33	3	5	2	84,00000	abc
35	3	6	2	85,00000	ab
19	2	4	2	85,00000	ab
3	1	2	2	86,00000	a

## APPENDICE C

### RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES DE L'ASSAINISSEMENT

Annexe 1 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de la Ribavirine sur la prolifération des pousses

	SC	DD L	CM	F ratio	p
Intercept	756,2500	1	756,2500	551,7915	0,000000
Cépage	21,6250	3	7,2083	5,2595	0,002876
Ribavirin	342,2500	1	342,2500	249,7199	0,000000
Cépage*Ribavirin	15,1250	3	5,0417	3,6786	0,017246
Error	76,7500	56	1,3705		

Annexe 2 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Ribavirine	Nombre de pousses	Groupes homogènes
Muscat de Fandouk	Sans	1,000000	d
Ferrana	Sans	1,000000	d
Bezzoul El-Khadem	Sans	1,250000	d
Aberkane	Sans	1,250000	d
Ferrana	Avec	4,250000	c
Muscat de Fendouk	Avec	5,625000	c
Bezzoul El-khadem	Avec	5,875000	b
Aberkane	Avec	7,250000	a

Annexe 3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de l'extrait de l'ail sur le nombre de pousses régénérées *in vitro*

	CS	D D L	CM	Fratio	P
Intercept	158,7000	1	158,7000	1403,242	0,000000
Cépage	0,5333	1	0,5333	4,716	0,031996
Concentratio de l'extrait d'ail	2,0333	3	0,6778	5,993	0,000797
cépage*Concentration de l'extrait d'ail	0,0667	3	0,0222	0,196	0,898594
Error	12,6667	112	0,1131		

Annexe 4 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de l'extrait de l'ail sur la longueur et le développement des pousses régénérées *in vitro*

	SC	DDL	CS	F ratio	p
Intercept	1484,737	1	1484,737	13839,09	0,00
Cépage	46,252	1	46,252	431,11	0,00
Concentratio de l'extrait d'ail	83,799	3	27,933	260,36	0,00
cépage*Concentration de l'extrait d'ail	20,006	3	6,669	62,16	0,00
Error	12,016	112	0,107		

Annexe 5 : Comparaison des moyennes

Méthode : PPDS. 95,0 %

Cépage	Concentrations de l'extrait d'ail	Longueur moyenne de pousses	Groupes homogènes
Ferrana	1	2,200000	e
Amghar	1	2,700000	d
Ferrana	2	2,773333	d
Ferrana	3	3,240000	c
Amghar	2	3,273333	c
Ferrana	4	3,373333	c
Amghar	3	4,740000	b
Amghar	4	5,840000	a