

APPORT DE LA CYTOLOGIE POUR DÉCRIRE ET COMPRENDRE LES DEPERISSEMENTS DE LA VIGNE : CAS DU PORTE-GREFFE 161-49 C

BONNOTTE Aline ^{1,2}, JACQUENS Lucile ¹, AVOSCAN Laure ^{1,2},
COURTY Pierre-Emmanuel ¹, TROUVELOT Sophie ¹

¹ *Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne, Univ.
Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France*

² *Plateforme DImaCell, Agroécologie, INRAE, Institut Agro,
Univ. Bourgogne, Univ. Franche-Comté, 21000 Dijon, France*

sophie.trouvelot@u-bourgogne.fr

CONTRIBUTION OF CYTOLOGY TO DESCRIBE AND UNDERSTAND GRAPEVINE DECLINES: CASE OF THE ROOTSTOCK 161-49 C

ABSTRACT

Grapevine is a cultivated plant of economic importance since viticulture represents 15% of the value of French agricultural production for a low land occupation (3%). However, viticulture is currently facing difficulties as vineyard declines which are multifactorial (i.e. pathological, physiological) and considerably impact the sustainability of winegrowers. Their understanding remains a major current challenge. Since the phylloxera crisis, cultivated grapevines have been grafted. It is therefore composed of a scion (cultivar of *Vitis vinifera* L.), from which the fruits are harvested, and a rootstock from which the root system is established, and involved in plant anchor and plant hydro-mineral nutrition. Among rootstock varieties, the 161-49 C has been and remains widely used in Burgundy as considered as highly qualitative regarding the vigor conferred to the scion. Unfortunately, for more than 10 years, grafted plants with 161-49 C have shown significant symptoms of decline in many plots, such as loss of vigor and yield. However, causes of this decline still remain unknown actually. The objective of this study is to carry out a histological analysis in order to compare the structure of woody and fine roots of asymptomatic and declining vines. The latter is based on cytological approaches carried out in bright field macroscopy and photonic microscopy, and scanning electron microscopy. The observations show changes in fine roots anatomy, as an alteration of fine root cells still not yet described in the literature. This study therefore provides structural indicators of a root dysfunctioning, which could be useful in the selection of new rootstocks. Indeed, the renewal of the vineyard remains a major issue, particularly in a

context of climate change. Also, understanding the sensitivity and fragility of rootstocks will be of interest to choose adequate ones in order to ensure the longevity of the vineyard and the sustainability of wine farms.

KEY WORDS

SVP 161-49C, Grapevine, Histology, Roots, Scanning Electron Microscopy, Stereomicroscopy.

RESUME

La vigne est une plante cultivée d'importance économique puisque la viticulture présente 15% de la valeur de la production agricole française pour une faible occupation des surfaces (3%). Pour autant, la viticulture fait face à des difficultés liées, en particulier, à des problématiques de dépérissements du vignoble. Ces derniers sont multifactoriels (pathologiques, physiologiques...) et impactent considérablement la durabilité des exploitations viti-vinicoles. Mieux les appréhender reste donc un défi actuel majeur. Depuis la crise phylloxérique, la vigne cultivée est greffée. Elle est donc composée d'un greffon (cultivar de *Vitis vinifera* L.), pour lequel les fruits sont vendangés, et d'un porte-greffe qui sert à l'établissement du système racinaire et donc à l'alimentation hydro-minérale du cep. Parmi les variétés de porte-greffe, le 161-49 C a été et reste très utilisé en Bourgogne car considéré comme qualitatif eu égard de la vigueur conférée au greffon. Malheureusement, depuis plus de 10 ans, certaines parcelles plantées avec ce matériel végétal montrent des signes de déclin importants, comme la perte de vigueur et de rendement. Les causes exactes de ce dépérissement restent encore à ce jour inconnues. L'objectif de cette étude est d'effectuer une analyse histologique afin de comparer les structures racinaires et radicellaires de ceps asymptomatiques et dépérissants. Elle est fondée sur des approches cytologiques conduites en macroscopie, en microscopie photonique à fond clair et en microscopie électronique à balayage. Les résultats acquis révèlent des problèmes de déstructurations radicellaires qui n'avaient pas encore été décrits dans

la littérature. Cette étude apporte donc des indicateurs structuraux de dysfonctionnements établis, qui pourront être utiles à la sélection de nouveaux porte-greffes. En effet, le renouvellement du vignoble reste un enjeu majeur, notamment dans un contexte de changement climatique. Aussi, comprendre des points de sensibilité/fragilité de certains porte-greffes nous permettra d'éviter de les préconiser afin d'assurer la pérennité du vignoble et la durabilité des exploitations viti-vinicoles.

MOTS CLES

146-49C, Histologie, Microscopie Electronique à Balayage, Stéréo-microscopie, Racines, Vignes

INTRODUCTION

La viticulture est un secteur d'activité ayant un fort poids économique. En effet, en 2019 la filière viti-vinicole représentait 13 milliards d'euros de chiffre d'affaires à l'export et 500 000 emplois directs et indirects générés sur le territoire français [1]. Ainsi, la viticulture présente 15% de la valeur de la production agricole française pour une faible occupation des surfaces (3%). Pour autant, la viticulture fait présentement face à des difficultés liées, en particulier, à des problématiques de dépérissements du vignoble. Ces derniers sont multifactoriels (pathologiques, physiologiques, ...) et impactent considérablement la durabilité des exploitations viti-vinicoles. Mieux les appréhender reste donc un défi actuel majeur.

Depuis la crise phylloxérique, la vigne cultivée est greffée. Elle est donc composée d'un greffon (cultivar de *Vitis vinifera* L.), pour lequel les fruits sont vendangés, et d'un porte-greffe qui sert à l'établissement du système racinaire et à l'alimentation hydro-minérale du cep. La grande majorité des porte-greffes a été obtenue entre 1880 et 1900 et n'a pas fait l'objet de beaucoup d'innovation depuis cette époque [2]. Au fur et à mesure de la reconstruction du vignoble grâce au greffage, les porte-greffes issus du croisement *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* ont pris une grande importance. En effet, une grande

majorité des vignobles d'Europe centrale a utilisé les porte-greffes de ce groupe. L'intérêt pour ces croisements résidait principalement dans leur résistance au phylloxéra, leur grande résistance vis-à-vis du calcaire actif, une bonne résistance à la sécheresse ainsi que leur développement végétatif souvent qualifié de moyen [3]. Le porte-greffe 161-49 C est donc une variété issue d'un croisement entre *V. riparia* et *V. berlandieri*, obtenu par Georges Couderc en 1888 [4]. Si le parent mâle correspond au Riparia Gloire de Montpellier, le parent femelle serait une accession inconnue de *V. berlandieri* présentant un lien de parenté avec le 420A [5]. L'utilisation de ce porte-greffe a été très largement répandue en France, notamment en Bourgogne, Champagne, Charente et dans les régions méridionales. Réputé pour être très sensible à la compaction des sols [6] et à la thyllose [7], le 161-49 C apparaît être bien adapté aux sols calcaires ou argilo-calcaires, peu compacts, assez profonds et parfaitement drainés. Il est souvent recommandé pour des sols caillouteux, perméables et profonds [8]. Il a été massivement planté il y a quelques décennies et a trouvé ses lettres de noblesse en Bourgogne en étant considéré comme un porte-greffe qualitatif [9]. En effet, les produits obtenus avec les plants greffés sur ce porte-greffe sont particulièrement appréciés, notamment les assemblages réalisés avec les cépages phares de cette région (Chardonnay ou Pinot noir). Malheureusement, depuis plus de 10 ans, certaines parcelles plantées avec ce matériel végétal montrent des signes de déclin importants, comme la perte de vigueur et de rendement.

Les premiers signes de ce dépérissement sont visibles au moment de la croissance des rameaux (Stade G, boutons floraux agglomérés). Les ceps dépérissants sont alors moins vigoureux que les ceps asymptomatiques. De plus, une faible fertilité est également rapportée, avec présence de petites grappes peu ou mal vérées. Les grappes, quand il y en a, sont significativement plus petites que les grappes présentes sur un cep asymptomatique. Les souches atteintes de dépérissement restent symptomatiques au cours du temps, ce qui montre que ce dépérissement est un phénomène irréversible [10]. L'origine causale du dépérissement du porte-greffe 161-49 C reste encore inconnue et à élucider [11]. La plupart des régions viticoles françaises sont concernées par cette problématique à l'exception du vignoble des Charentes.

La problématique ne semble d'ailleurs pas réservée au territoire français puisqu'elle affecte également d'autres pays tels que l'Allemagne ou l'Italie [9]. Dès 1970, on observait déjà la présence de dépérissements liés au 161-49 C. En effet, ce dernier était décrit à l'époque dans la région viticole biterroise, sur une parcelle plutôt jeune (15 ans) d'Aramon greffée sur ce porte-greffe [12]. Torregrosa *et al.* [7] ont alors dressé le tout premier bilan des problèmes de dépérissements graves et inexplicables liés à l'utilisation du porte-greffe 161-49 C. L'objectif de cette étude a donc été de définir (i) si les constats établis, lors d'études antérieures, à l'échelle des racines aoûtées étaient également valables dans notre cadre expérimental (vignoble bourguignon) et, de façon plus originale, (ii) quelles étaient les répercussions observées sur l'anatomie des radicelles, qui sont spécialisées dans le prélèvement de l'eau et des sels minéraux. Dans cette optique, nous avons donc conduit une étude histologique associant différentes techniques cytologiques (stéréomicroscopie, microscopie optique à fond clair et microscopie électronique à balayage) en vue de la caractérisation anatomique, donc structurale, de racines et radicelles de vigne âgées de 5 à 25 ans.

MATERIELS ET METHODES

1. Parcelles d'études dans lesquelles sont collectées les racines et radicelles de vigne

Cinq parcelles ont été exploitées dans le cadre de cette étude, toutes situées dans le département de Côte d'Or, en Côte de Nuits et en Côte de Beaune. Quatre d'entre-elles sont des parcelles décrites comme étant déjà dépérissantes, tandis qu'une d'entre-elles est considérée comme une parcelle de référence, non atteinte de dépérissement.

- 1.1. La parcelle « Les Boutières » (référence : 21G), est située à Aloxe-Corton en appellation village (bas de coteau). Les coordonnées GPS sont : 47.059006, 4.859735. Elle appartient au Domaine du Comte Senard et présente une grande proportion de ceps morts (37%) ou dépérissants (18%).

- 1.2. La parcelle « Les Maizières » (référence : 21L), est située à Vosne-Romanée en appellation village (bas de coteau). Les coordonnées GPS sont : 47.165640, 4.956170. Elle appartient au Domaine Parent-Gros et présente un taux de mortalité relativement faible, avec 3% de ceps manquants. Le dépérissement y est cependant notable, avec 15% de ceps fortement expressifs.
- 1.3. La parcelle « Grand Echezeaux » (référence : 21N), est située à Vosne-Romanée en appellation Grand Cru (milieu de coteau). Les coordonnées GPS sont : 47.268595, 4.976904. La parcelle appartient au Domaine de la Romanée-Conti et est considérée comme référente car elle est non dépérissante.
- 1.4. La parcelle « En Charrons » (référence : 21O), est située à Santenay en appellation village (haut de coteau). Les coordonnées GPS sont : 47.217929, 4.972799. La parcelle appartient au Domaine Lamy-Pillot. Elle présente 47% de ceps morts/manquants, 2% de ceps fortement expressifs du dépérissement et 23% de ceps faiblement expressifs.
- 1.5. Enfin, la parcelle « Les Longerois » (référence : 21T), est située à Marsannay en appellation village (bas de coteau) avec un sol très caillouteux. Les coordonnées GPS sont : 47.283932, 4.993732. La parcelle appartient au Domaine Bruno Clair et peut être considérée comme fortement dépérissante. En effet, on dénombre 47% de ceps morts/manquants et 19% de ceps fortement expressifs de dépérissement.

2. Observation de racines aoûtées

- 2.1. Au stéréomicroscope, Des fragments de racines aoûtées (5 à 10 cm de long) ont été prélevés en parcelles, entre avril et juillet 2022. Ils ont été immédiatement conservés en sachets, sur pains de glace (entre 4 et 10°C) le temps d'être rapportés au laboratoire où ils ont été stockés à 4°C. Le jour même ou le lendemain, ils ont été débités en fragments de plus petite longueur (2 à 3 cm environ) et leur surface a été rafraîchie à la lame de rasoir avant d'être observée sous loupe. D'autre part, des tranches fines ont été réalisées manuellement, à l'aide d'une lame de

rasoir, afin d'observer plus précisément les vaisseaux du bois et leur potentielle obstruction (thyllose/gommose). Toutes les observations ont été conduites soit sous loupe binoculaire (Leica zoom 2000, modèle Z30E) avec acquisition d'images à l'aide d'un smartphone (iPhone 11), soit avec un Stéréomicroscope Zeiss V8 équipé d'une caméra numérique FL-20 (capteur 20 Mpixels) associée au logiciel Capture (v2.3).

2.2. Au microscope électronique à balayage, les échantillons ont consisté en (i) des tranches de racines aoûtées (entières en circonférence et épaisses d'environ 0,5 cm) ; (ii) des nodosités radicellaires ou (iii) des pucerons isolés de la nodosité. Chaque échantillon a été fixé sous vapeur d'azote (pâteux), sublimé à -90 °C durant 5 min et recouvert d'une fine couche de platine par métallisation sous argon à 5 mA durant 10 sec. Les échantillons ont ensuite été observés grâce à un microscope électronique à balayage (modèle Hitachi SU 8230) équipé d'une platine cryo-génique (Quorum PP3010T). Des photographies représentatives ont été acquises pour chaque échantillon observé.

3. Observation de radicelles après inclusion en résine Epon

Des fragments de radicelles (5 mm de long environ) ont été prélevés en parcelles en Juillet 2021 et immédiatement plongés dans du glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) préparée dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,2) et contenant 1% de saccharose. Les échantillons ont été fixés durant une nuit à 4 °C. Ils ont ensuite été rincés 3 fois 1 heure dans le tampon phosphate (à 4 °C) et post-fixés pendant 1 h au tétr oxyde d'osmium 1 % (v/v, dans le tampon phosphate à 4 °C). Après lavage, les échantillons ont été déshydratés, à température ambiante, dans des bains progressifs d'éthanol [(30 % ; 50% ; 70% et 100 %, v/v), 30 min dans chaque bain], puis dans deux bains d'oxyde de propylène, pendant 30 min. Ils ont ensuite été placés deux heures, à température ambiante, dans des bains successifs d'un mélange de résine (Résine Epon 812, Merck) et d'oxyde de propylène [(2-1 ; 1-1 ; 1-2 (v/v)], puis une nuit dans un bain de résine pure avant d'être inclus dans de la résine fraîchement préparée (polymérisation

à 60°C durant 48 h). Une fois la résine polymérisée, des coupes semi-fines (0,5 µm d'épaisseur) ont été réalisées dans les échantillons à l'aide d'un ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E (Cambridge, Angleterre) à l'aide d'un couteau à diamant histo 45° Diatome (Bienne, Suisse). Ces coupes ont été déposées sur lame porte objet de verre (26 x 76mm) et colorées au bleu de toluidine (0,2% dans du tampon sodique 47 mM, pH 11). Elles ont été observées à l'aide d'un microscope photonique Leica Leitz DMRB (Wetzlar, Allemagne). Les acquisitions d'images ont été réalisées à l'aide d'une caméra numérique Nikon Digital Sight DS-5Mc, grâce au logiciel de capture d'image NIS-Elements BR.

RESULTATS

1. Caractérisation histologique de racines aoûtées prélevées sur des ceps dépérissants ou non

L'observation de racines aoûtées prélevées sur des ceps d'aspect sain et dépourvus de symptômes visibles de dépérissement nous a permis de décrire la structure des racines du porte-greffe 161-49 C d'apparence saine et fonctionnelle (**Figure 1**). Les vues générales et les coupes réalisées manuellement, ont toutes été observées à la loupe binoculaire et montrent une structure concentrique régulière (**Figures 1 A-F**). Tant l'écorce que la stèle apparaissent structurées convenablement. On observe cependant assez fréquemment sur des coupes réalisées manuellement, une rupture des tissus au niveau du cambium (**Figures 1 D et F**). Concernant les tissus vasculaires, nous pouvons observer que les vaisseaux sont en très grande majorité non obstrués suggérant que la conduction de la sève brute peut s'établir convenablement. Les images acquises en microscopie électronique à balayage confirment, pour les racines de ceps ne présentant pas de symptôme de dépérissement, la quasi-absence d'obstruction avec une très faible proportion de thylls ou de gommages (**Figures 1 H-J**) et des ponctuations vasculaires aisément observables (**Figures 1 I-J**). L'écorce, partie externe de la racine où s'accumulent des strates de liber secondaire et où se développe le suber, est assez fine et régulière. Par endroits le rhytidome (i.e. couches de

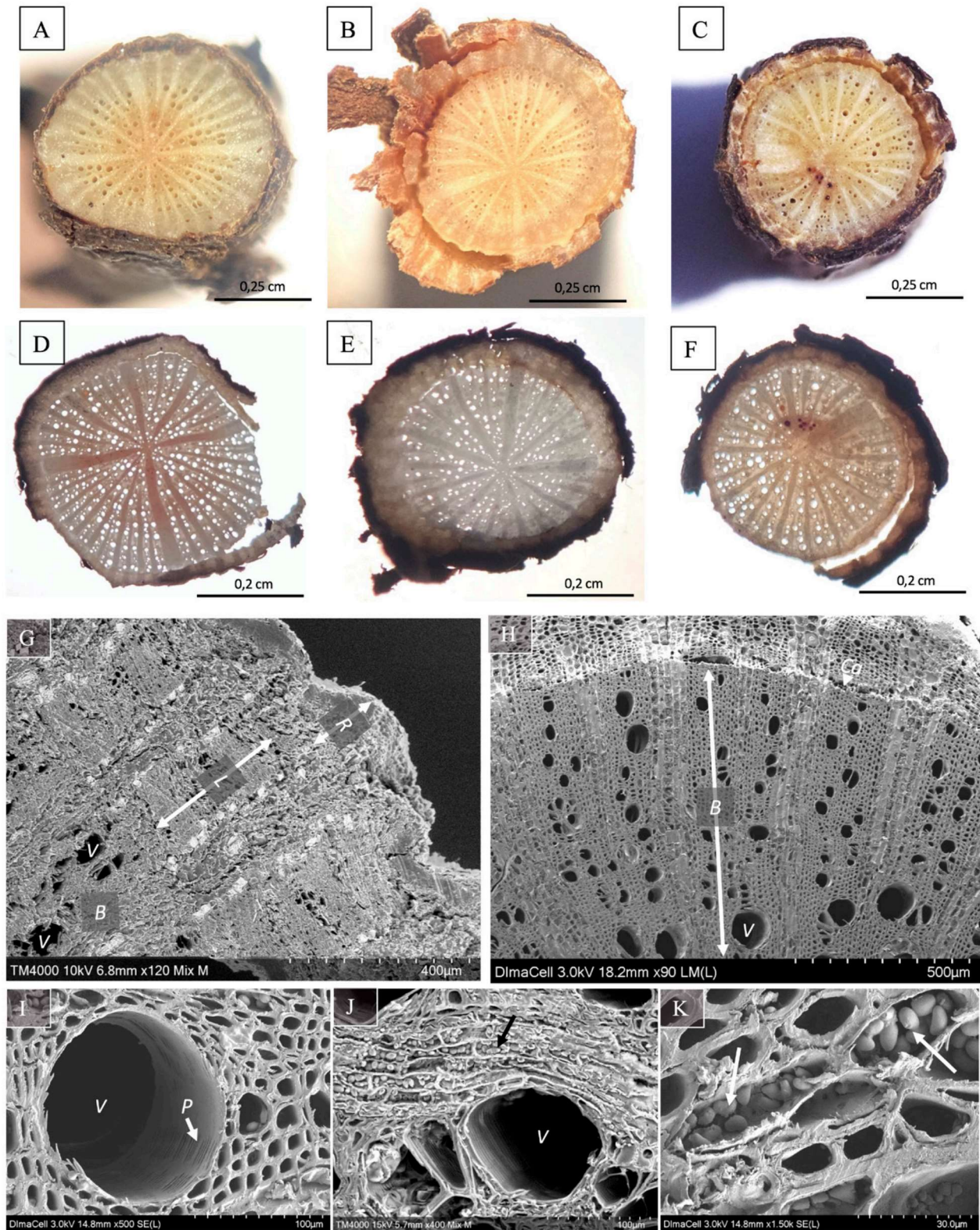


Figure 1 : Observations à la loupe binoculaire (A-F) ou en microscopie électronique à balayage (cryo-MEB ; G-K) de racines de 161-49 C échantillonnées sur des ceps asymptotiques de dépérissement. Les échantillons observés proviennent de 3 parcelles distinctes : 21G (A et D), 21L (B et E), et 21O (C et F). Les échantillons sont observés en surface (A-C ; G-K), ou après une coupe fine réalisée manuellement (D-F). Nombreux amyloplastés identifiables dans les rayons ligneux (J et K, flèches). B : bois (xylème) ; L : liber (phloème) ; P : ponctuations ; R : rhytidome ; V : vaisseau du xylème.

tissus superficiels morts puisque non alimentés par suite de la mise en place du suber) semble se détacher, conformément à ce qui peut être attendu pour une racine aoûtée. Notons également la mise en évidence de la présence, en grande quantité, d'amyloplastés dans les rayons libériens et ligneux (**Figures 1 H, J et K**), suggérant une mise en réserve carbonée efficace. A titre illustratif, les amyloplastés (organites spécialisés dans le stockage d'amidon) sont clairement visibles sur la **Figure 1 K**. Concernant les racines aoûtées prélevées sur des souches dépérissantes, nous observons un réel contraste avec les échantillons provenant de ceps asymptomatiques concernant la structure de l'écorce et des tissus vasculaires. En effet, au niveau de l'écorce nous pouvons observer une irrégularité plus ou moins marquée selon les parcelles d'origine (**Figures 2 A-F**). Ainsi, les profils présentés dans les **Figures 2 A et D**, sont principalement retrouvés dans les parcelles positionnées sur Aloxe-Corton, où le sol a tendance à être lourd avec quelques zones d'hydromorphie. L'épaisseur corticale apparaît noire et anormalement épaisse, suggérant que le rhytidome des années précédentes ne s'est pas exfolié (**Figures 2 A, C et G**). Dans certains échantillons, nous avons même pu observer un dédoublement de l'assise subéro-phellodermique (**Figure 2 G**). Pour autant, dans un certain nombre de parcelles cette problématique « corticale » apparaît moins marquée et les dysfonctionnements visibles sont plus ciblés sur les parties vasculaires des racines. En effet, nous pouvons observer une différenciation anormale des tissus du liber, avec une accumulation de tissus non fonctionnels (**Figures 2 D et F**). Dans ce cadre, les assises cambiales semblent être affectées par le phénomène de dépérissement en générant, notamment à l'échelle du liber, des couches plus ou moins bien structurées et stratifiées. A l'échelle du bois et contrairement à ce que nous avons pu voir en Figure 1, nous avons ici une très grande proportion de vaisseaux obstrués par la présence de thyllés ou de gommes (**Figures 2 D-F et J-K**). En effet, nombreuses sont les zones où la lumière des vaisseaux est entravée (**Figures 2 A-C et D-F**). De plus, certaines zones du bois semblent nécrosées (**Figures 2 B et E**), avec un noircissement apparent des tissus. Enfin, dans ce contexte physiologique (dépérissement établi) et en comparaison avec la **Figure 1 K**, nous observons une quasi absence d'amyloplastés dans les rayons (**Figures 2 J et K**), suggérant une problématique de mise en réserve.

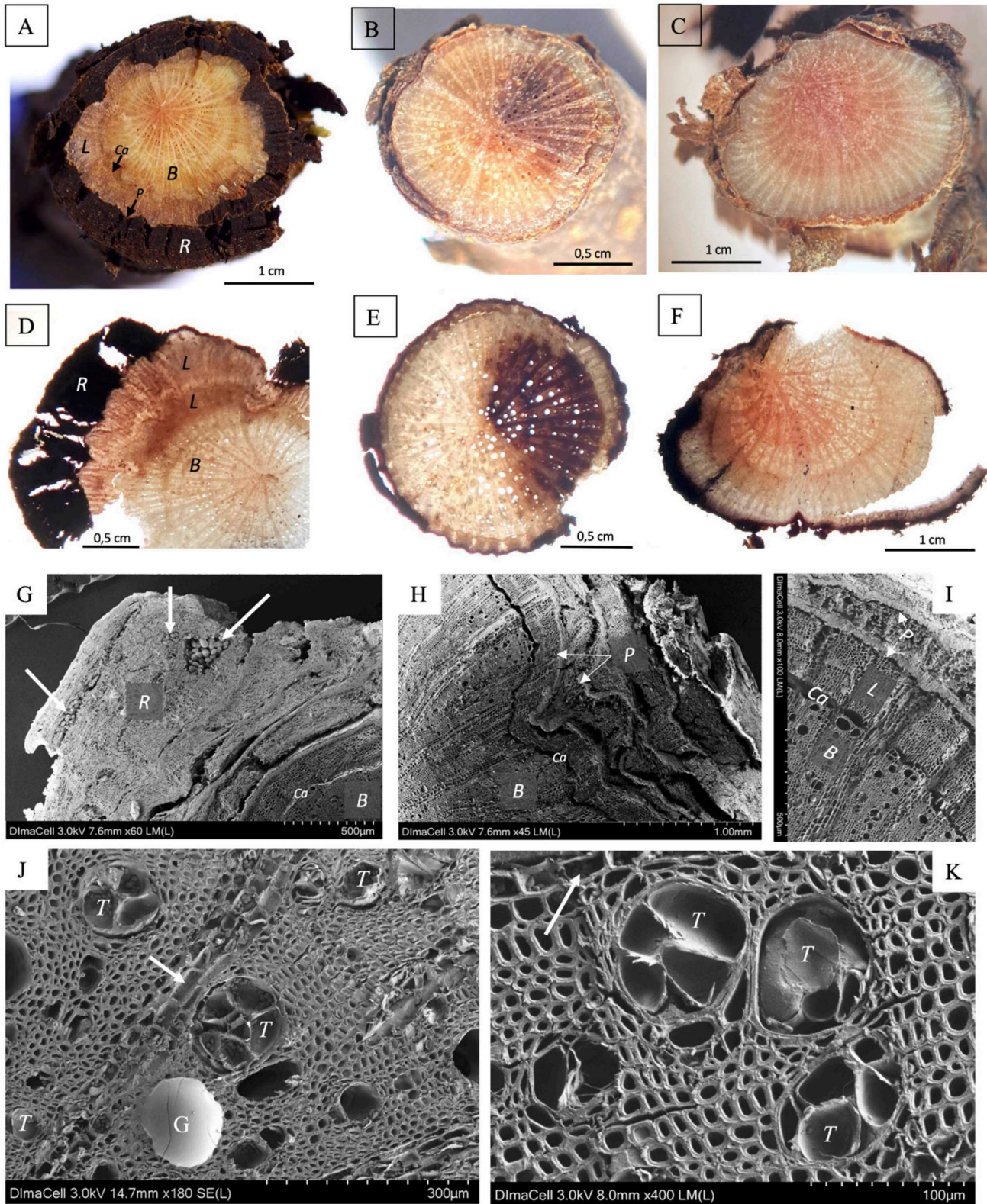
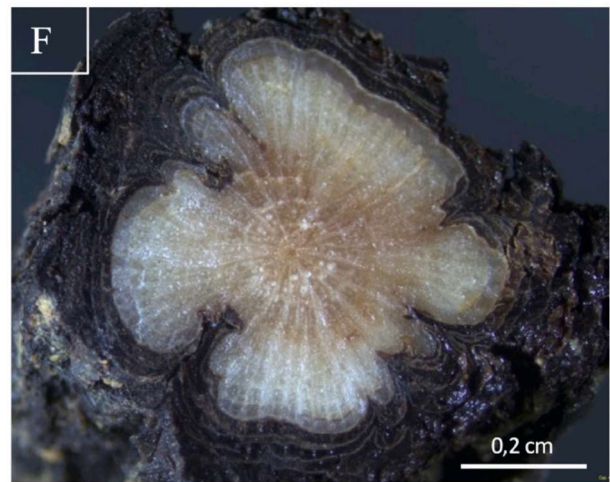
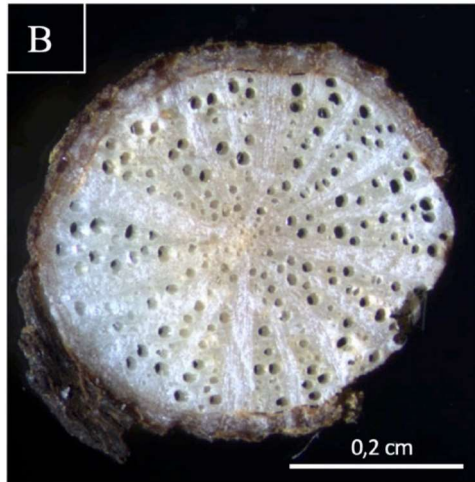
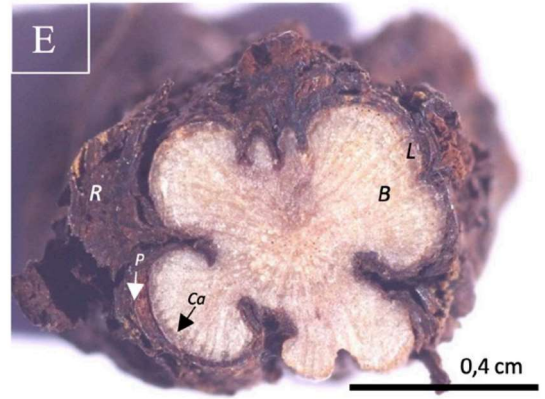
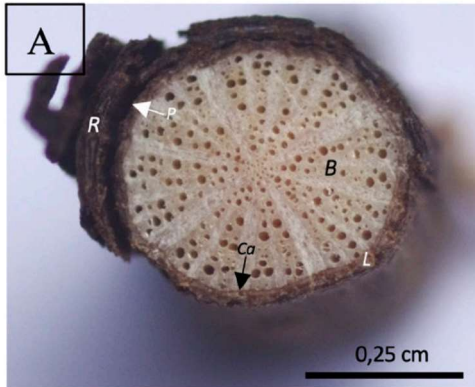


Figure 2 : Observations à la loupe binoculaire (A-F) et en microscopie électronique à balayage (cryo-MEB ; G-K) de racines de 161-49 C échantillonnées sur des ceps dépérissants. Les échantillons observés sous loupe proviennent de 3 parcelles distinctes : 2IG (A et D), 2IO (B et E), et 2IT (C et F). Les échantillons sont observés en surface (A-C ; G-K), ou après une coupe fine réalisée manuellement (D-F). Microphotographies en microscopie électronique à balayage ciblant l'altération libérienne (G-I). En G : spores fongiques (flèches) ; J et K : amyloplastes (flèches). B : bois (xylème) ; Ca : cambium ; G : gomme ; L : liber (phloème) ; P : phellogène ; R : rhytidome ; T : thyllose.

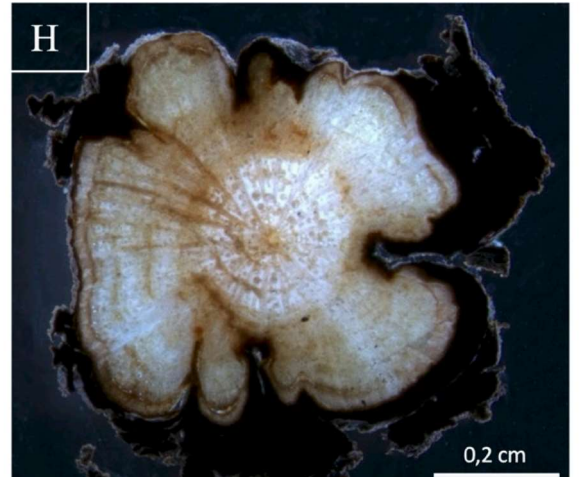
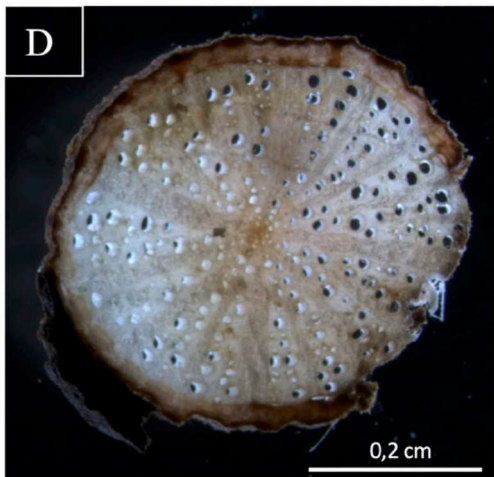
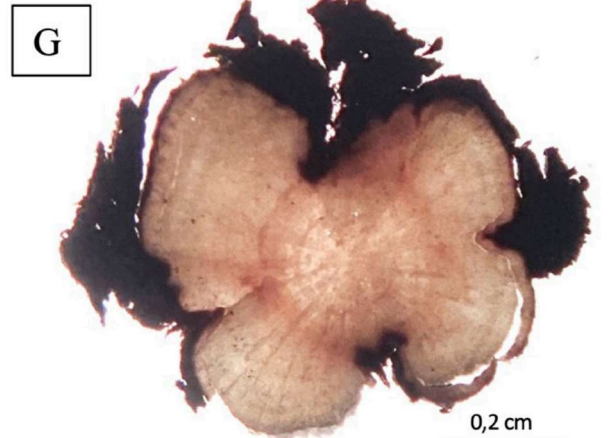
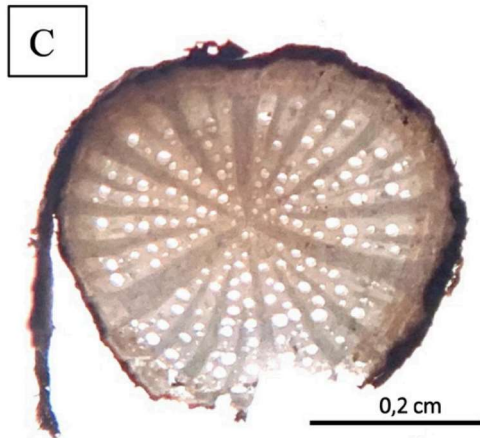
Cep asymptotique

Cep dépérissant

État de surface



Coupes fines, réalisées manuellement



L'étude de la parcelle 21G (positionnée à Aloxe-Corton) a permis de démontrer ces différences au niveau parcellaire et de façon exacerbée. En effet entre les zones parcellaires (placettes) de ceps asymptomatiques et celles de ceps dépérissants, la différence structurale des échantillons est frappante (**Figure 3**). Pour les ceps asymptomatiques, nous retrouvons une structure concentrique avec des vaisseaux non obstrués (lumière bien visible) et une écorce plutôt fine et régulière (**Figures 3 A-D**).

En revanche, les échantillons issus de ceps dépérissants n'ont plus cette structure concentrique mais plutôt une structure irrégulière et striée (**Figures 3 E-H**). Nous pouvons observer de larges zones corticales noires (accumulation probable de rhytidomes non exfoliés), qui explique la texture spongieuse de la racine au toucher. La lumière des vaisseaux est quasiment imperceptible en rétro-éclairage (**Figures 3 G-H**), témoignant une nouvelle fois de défauts probables de conduction à l'échelle de la sève brute, et donc d'alimentation hydrique et minérale à l'échelle de la plante. Cette structure de racine a été observée sur la majeure partie des échantillons prélevés au sein de cette parcelle à partir de ceps dépérissants.

2. Caractérisation histologique de radicelles prélevées sur des ceps dépérissants ou non

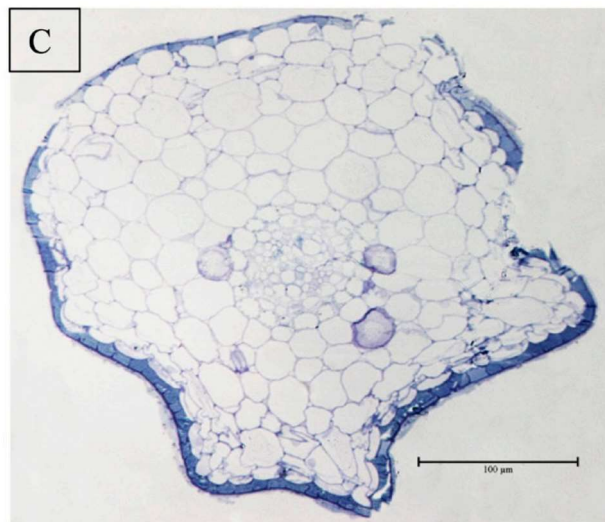
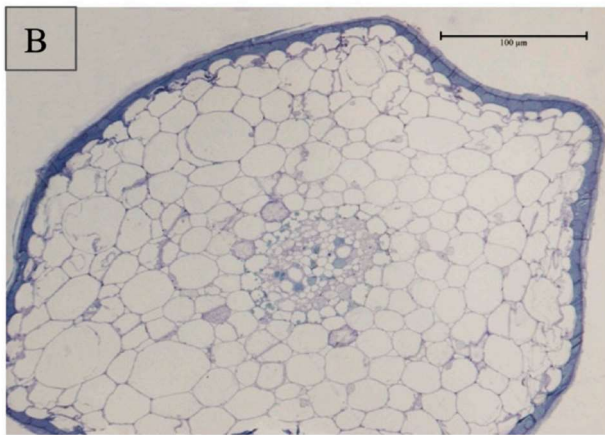
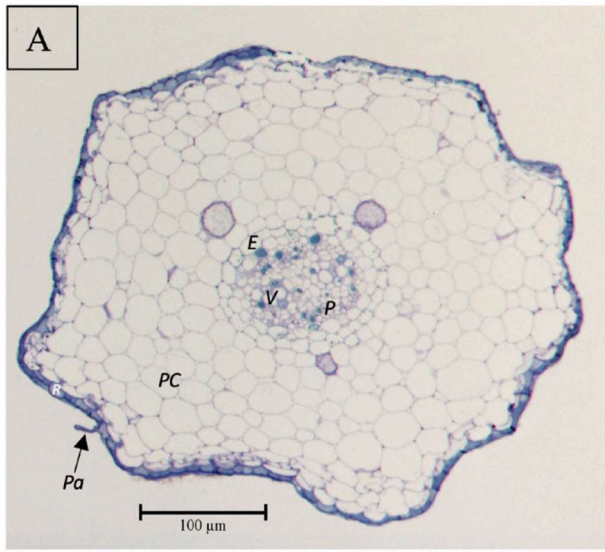
Concernant les ceps asymptomatiques de dépérissement, nous observons un rhizoderme (ou exoderme selon les situations) régulier, assurant une protection continue (**Figures 4 A-C**), avec présence ponctuelle de poils absorbants si la coupe passe par la zone pilifère (**Figure 4A**). Le parenchyme cortical est structuré convenablement (cellules polyédriques de grande taille et cohésives) jusqu'à l'endoderme, avec de petits espaces intercellulaires laissant

Figure 3 : Observations à la loupe binoculaire de coupes transversales de racines issues de la parcelle 21G et échantillonnées sur un cep asymptomatique (**A-D**) ou dépérissant (**E-H**). Les échantillons ont été observés en surface, après rafraîchissement à la lame de rasoir (**A, B, E et F**), ou après réalisation d'une coupe manuelle (**C, D, G et H**). Les observations ont été réalisées soit sur fond clair (**C et G**), soit en contraste de phase (**D et H**), afin de mieux visualiser la lumière des vaisseaux et leur possible obstruction. B : bois (xylème) ; Ca : cambium ; L : liber (phloème) ; P : phellogène ; R : rhytidome.

circuler les fluides apoplastiques. Il en va de même pour les tissus conducteurs du cylindre central, qui sont aisément identifiables (**Figures 4 A-C**). À titre comparatif, les radicelles prélevées sur des ceps dépérissants apparaissent fortement affectées et déstructurées (**Figures 4 D-F**). En effet, dans certaines zones corticales, les cellules de parenchyme cortical ne sont plus cohésives, formant une juxtaposition d'« amas » cellulaires organisés de façon plus ou moins anarchique (**Figures 4 D-E**) et de zones plus ou moins étendues dans lesquelles les cellules parenchymateuses ont disparu (**Figures 4 D-F**). Dans ces zones, le parenchyme cortical n'existe quasiment plus, suggérant une « lacunisation » parenchymateuse et donc une mort cellulaire apparente. Ces zones de vide, positionnées entre le rhizoderme et le cylindre central, reflètent l'aspect spongieux des dites radicelles (souvent rapporté par les viticulteurs dans le cas de 161-49 C dépérissants). Le cylindre central est déstructuré et les tissus vasculaires y sont très difficilement reconnaissables (**Figures 4 D-F**). Si quelques vaisseaux du bois sont encore perceptibles, les tissus phloémiens sont largement affaîssés et le parenchyme vasculaire peut apparaître dégradé, donc non opérant dans la circulation horizontale de la sève.

Par ailleurs, lors des prélèvements effectués en juin et juillet 2022, un détail a particulièrement retenu notre attention (**Figure 5**). En effet, la plupart des radicelles prélevées présentaient de nombreuses galles phylloxériques (ou nodosités ; **Figures 5 A-C**). Celles-ci sont la résultante d'une pique par le puceron responsable du phylloxera (*Daktilosphaira vitifoliae* ; Lasnier et Vincent, 2019). Nous avons observé un nombre conséquent de femelles aptères à la surface des nodosités (**Figure 5**). De plus, nous avons également observé qu'à cette période de l'année ces femelles assuraient une reproduction asexuée (par parthénogenèse), puisque des œufs étaient également aisément visibles (**Figures 5F et J**). Les images acquises par microscopie électronique à balayage exposent plus en détail le puceron et ses organes de piqueur-suceur avec rostre et stylet clairement visibles (**Figure 5 G-I**). Ces mêmes observations avaient déjà été faites sur le millésime 2021, pour lequel des radicelles avaient été incluses en résine Epon. Des coupes semi-fines ont pu être réalisées pour ces échantillons, au niveau d'une galle phylloxérique.

Ceps asymptotiques



Ceps dépérissants

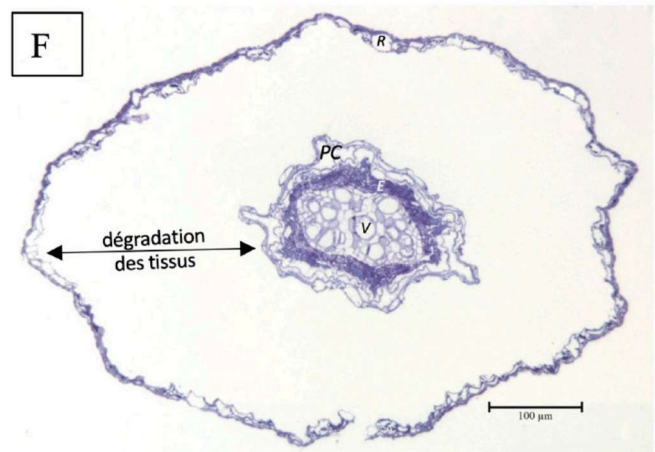
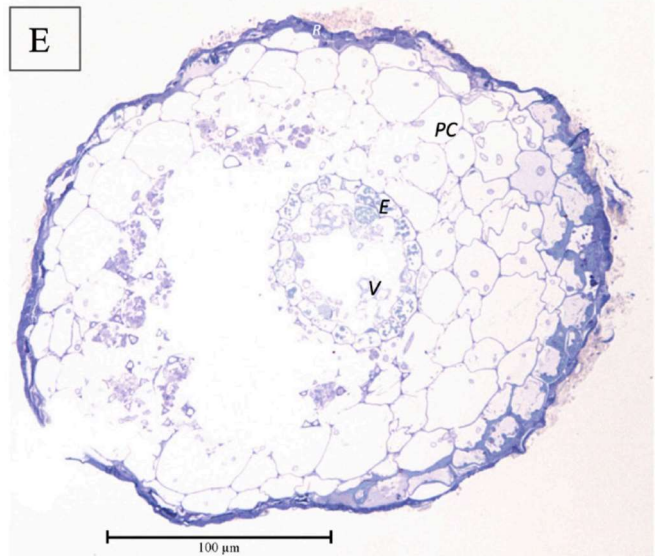


Figure 4 : Observations au microscope optique de coupes transversales semi-fines (500 nm d'épaisseur) de racines de porte-greffe 161-49 C. **A-C** : racines issues de ceps asymptotiques. **D-F** : racines issues de ceps dépérissants. E : endoderme ; P : phloème ; Pa : Poil absorbant ; PC : parenchyme cortical ; R : rhizoderme ; V : vaisseau du xylème.

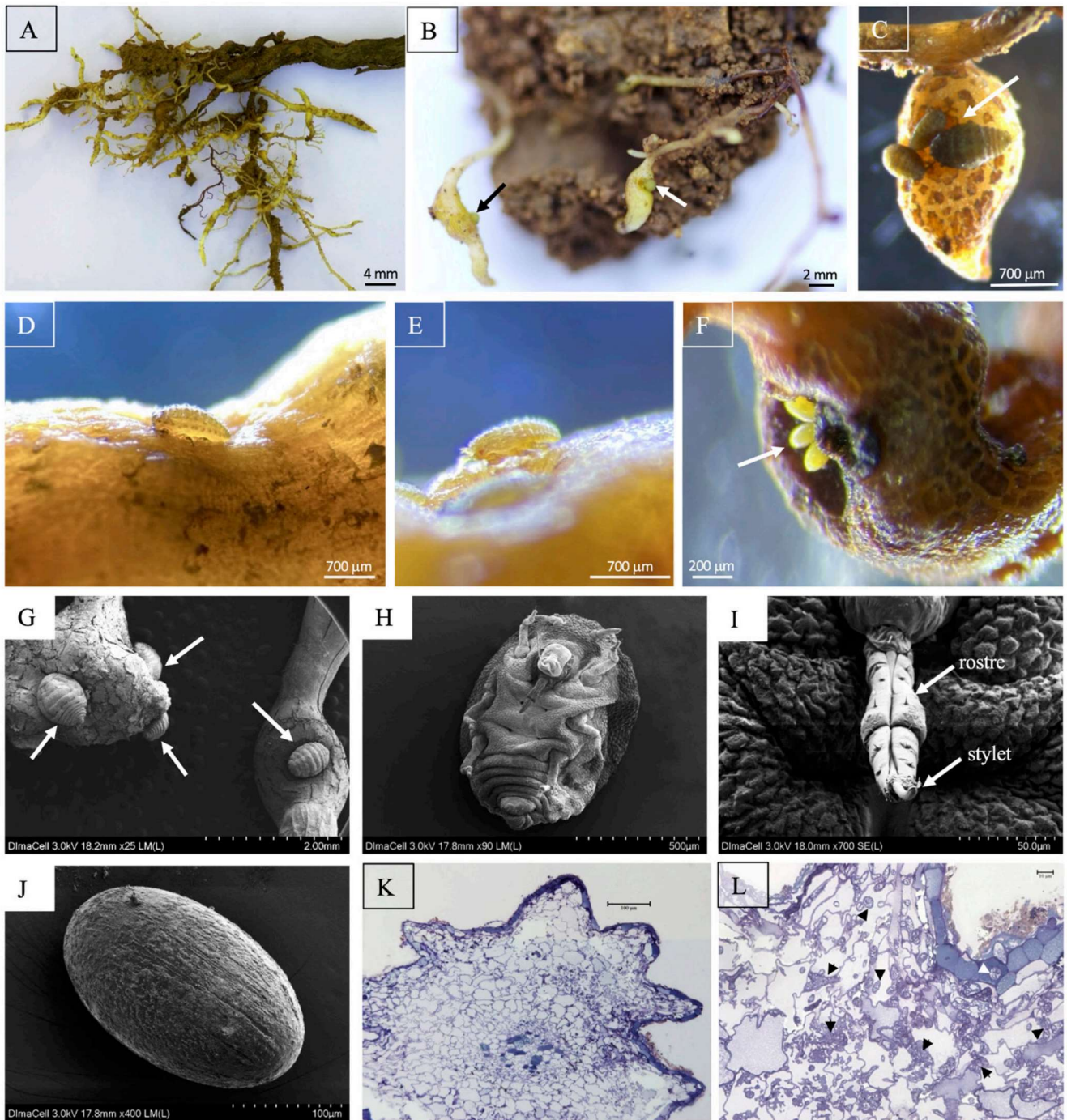


Figure 5 : Illustrations des symptômes d'attaque de phylloxéra radicicole sur radicelles de 161-49 C. **A-C** : Observation de radicelles déformées (nodosités), en becs d'oiseaux. Les flèches indiquent la présence des femelles sur les nodosités. **D-E** : Observations à la loupe binoculaire de la présence des pucerons radicicoles et de leurs œufs (**F**, flèches). **G-J** : Observations en microscopie électronique à balayage (cryo-MEB) des pucerons radicicoles à la surface de galles (**G**, flèches), ou en face ventrale (**H-I**), avec focus sur le rostre et le stylet du puceron (**I**) lui permettant de piquer la radicelle pour se nourrir de sève élaborée. **J** : Observation de la surface d'un œuf. **K-L** : Observation de coupes transversales semi-fines d'une galle phylloxérique (nodosité), mettant en évidence la déformation radicellaire (**K**) ainsi que le développement de nombreux hyphes fongiques (**L**, têtes de flèches) dans les tissus préalablement piqués.

Dans ce cas, on observe aisément une déformation radicellaire générée au sein de la nodosité (**Figure 5 K**), non retrouvée à l'échelle de radicelles n'ayant pas été piquées. En comparaison avec les coupes de radicelles issues de ceps dépérissants (**Figure 4**), cela se traduit notamment par la présence de cellules corticales hypertrophiées (**Figure 5 L**). De plus, au sein des nodosités on observe la présence de nombreux hyphes fongiques (**Figure 5 L**, flèches).

DISCUSSION

1. Un dépérissement caractérisé par la présence de thyllose et une dégradation des réserves carbonées dans les racines aoûtées

Nos observations cytologiques à partir de racines aoûtées ont révélé que, si les ceps asymptomatiques de dépérissement présentent une structuration vasculaire normale et une mise en réserve carbonée évidente (amyloplastés nombreux), il n'en est pas de même pour les racines de ceps symptomatiques de dépérissement. Dans ces derniers, les racines aoûtées présentent des dysfonctionnements structuraux de plusieurs ordres : (i) altération du fonctionnement des méristèmes secondaires (cambium et phellogène) ; (ii) nombreux évènements de thyllose dans le bois secondaire ; (iii) défauts de mise en réserve de composés carbonés (disparition d'amyloplastés) et (iv) possible accumulation de rhytidomes de millésimes consécutifs.

Ces observations sont pleinement cohérentes avec celles décrites par Spilmont et al. [9] et observées dans un contexte pédo-climatique différent. Elles nous permettent de rapporter la présence de dysfonctionnements racinaires observés dans le seul contexte de dépérissement, avec une altération de la circulation de la sève (brute comme élaborée) et un défaut de mise en réserve à l'échelle de ce compartiment. Les dysfonctionnements apparents dans les tissus vasculaires (bois et liber secondaires) pourraient être liés à une variation au niveau des divisions cellulaires cambiales (non homogène sur le diamètre de la racine), qui conduirait à une division « anarchique » (en quantité anormale sur certaines zones) ou une mauvaise différenciation des cellules filles générées (peu de liber dur pour exemple). La thyllose,

observée dans les vaisseaux du bois secondaire, est un mécanisme irréversible qui vise à obstruer les vaisseaux du xylème *via* des excroissances de cytoplasme, appelées thylls, provenant des cellules du parenchyme périvasculaire [13]. Généralement observée en réponse à des problématiques d'origine physiologique ou pathologique [14,15], il est probable qu'elle s'exprime ici dans un contexte pédo-climatique propice à son induction puisqu'aucun agent pathogène n'y est associé. Ce phénomène est généralement lié à un déséquilibre entre la demande évaporative de la partie aérienne (greffon) et la capacité de conductance hydraulique du porte-greffe [16,10]. Lorsque la proportion de vaisseaux affectés par la thyllose est importante dans les ceps atteints de dépérissement, on comprend que les capacités de conduction de la sève brute sont amplement diminuées, ce qui conduit soit à l'affaiblissement des ceps (dépérissement) soit à un flétrissement rapide de la végétation (folletage ou apoplexie) [7]. Cette sensibilité à la thyllose, retrouvée dans notre travail expérimental, empêche les professionnels de la filière de recommander sans réserve l'utilisation du 161-49 C [17]. Enfin, La faible quantité de réserves carbonées dans les racines de ceps atteints de dépérissement peut expliquer les difficultés de croissance et la mortalité durant la période végétative [18].

2. Un dépérissement lié à des défauts de structuration, et donc de fonctionnalité des radicelles

Si les racines aoûtées sont vouées à assumer les rôles d'ancrage, de conduction et de mise en réserve (de sucre et d'azote), les radicelles sont celles qui doivent assumer les rôles de prélèvement des ressources hydro-minérales, ainsi que de sélection de microorganismes endophytiques, donc de structuration de l'holobionte racinaire [19-20]. Ces deux types de racines ont donc des fonctions complémentaires.

Si les répercussions du dépérissement du porte-greffe 161-49 C avaient déjà été décrites pour des racines aoûtées dans d'autres contextes pédo-climatiques, elles n'avaient en revanche jamais été observées à l'échelle des radicelles. Dans notre cadre expérimental, nous avons montré que les radicelles de ceps asymptomatiques ont un aspect général normal, c'est-à-dire cohérent avec ce qui en est connu et décrit [21-22]. Aussi, nous

pouvons conclure que les racines du 161-49 C, prélevées sur des ceps asymptomatiques de dépérissement, sont convenablement structurées tant dans la partie corticale qu'à l'échelle de la stèle, ce qui est garant d'une fonctionnalité optimale. En revanche, ce n'est pas le constat fait sur des racines échantillonnées sur des ceps atteints de dépérissements, voisins de ceps asymptomatiques au sein d'une même parcelle. De manière originale, nous avons révélé que le système vasculaire de racines de ceps atteints de dépérissement n'est plus aussi efficace que celui observé dans des ceps asymptomatiques. La circulation de l'eau et des sels minéraux pourrait ainsi se faire de façon passive à travers les espaces libres apparents (circulation apoplastique) mais de façon altérée à l'échelle du cylindre central (circulation verticale à travers les vaisseaux), ce qui en limiterait le flux vers les parties pérennes (i.e. racines aoûtées). Ces désorganisations tissulaires sont peu évidentes à interpréter dans le sens où le turnover racinaire du 161-49 C, dans nos conditions pédo-climatiques, n'est pas décrit ou connu. Ainsi, nous pouvons envisager que (i) dans les ceps dépérissants une sénescence avancée des racines soit exprimée et qu'en conséquence les répercussions observées traduisent la fin de vie de ces dernières (plus précoce que pour les racines de ceps asymptomatiques) ; ou que (ii) le turnover des racines soit décalé entre les ceps asymptomatiques et dépérissants et que dans ce cadre des prélèvements à un même stade phénologique rapportent des états structuraux distincts ; ou enfin que (iii) les ceps d'état physiologique distinct (asymptomatique vs dépérissant) répondent à une contrainte hydrique différemment et que, dans le cadre de ceps déjà installés dans une phase de dépérissement, la plante se serve de ses racines comme fusible (sacrifié) pour limiter les processus de cavitation dans les racines pérennes. Ce dernier processus, encore connu sous les termes de lysogénie (lyse cellulaire) et de rhexigénie (fracture mécanique des cellules) est effectivement rapporté dans la littérature comme pouvant arriver dans le cadre d'une réponse à une contrainte hydrique (cavitation racinaire) [23-24]. Aussi, si à ce stade de l'étude il est impossible de trancher pour l'une ou l'autre des hypothèses, nous mettons en évidence que ce point reste crucial à étudier afin d'envisager la sélection de nouveau porte-greffes de façon durable, dans un contexte où

le changement climatique peut exacerber ces réactions si les ressources hydriques se rarifient.

Enfin, nous avons constaté que de nombreuses radicelles, prélevées tant sur des ceps asymptotiques que dépérissants, présentaient des atteintes (nodosités) de phylloxéra. Les observations faites sont conformes à celles habituellement décrites dans le cadre d'une infestation phylloxérique (pour revue [25]), notamment pour ce qui concerne l'apparition de cellules corticales hypertrophiées [26]. Les piqûres corticales permettent l'entrée facilitée d'organismes fongiques (et possiblement bactériens) opportunistes. En ce sens, la piqûre permet aux organismes microbiens de franchir la barrière physique que représentent le rhizoderme et/ou l'exoderme et module possiblement à cette échelle la composition microbienne des tissus radicellaires. Ceci peut avoir un effet plus ou moins néfaste pour la plante selon la nature (saprophyte vs parasite) du/des microorganisme(s) incriminé(s). Dans tous les cas, ces microbes prélèveront possiblement des ressources carbonées ce qui affaiblira d'autant plus un cep déjà ancré dans un processus de dépérissement.

Les nodosités phylloxériques ne sont cependant pas létales pour la plante. Il est en effet connu que, malgré ces déformations en « tête d'oiseau », les radicelles peuvent rester fonctionnelles [27], contrairement à des racines aoûtées atteintes de tubérosités (déformations non observées dans le cas présent). D'ailleurs le 161-49 C est classé dans les porte-greffes dits tolérants (et non résistants) au phylloxéra. En revanche, dans un contexte de dépérissement, il s'agit d'un facteur supplémentaire d'affaiblissement des ceps (prélèvement dans le cortex de sucres par le puceron, entrée d'agents fongiques plus ou moins délétères, etc.), qui peut donc être considéré comme un facteur aggravant.

CONCLUSION

La présente étude avait pour objectif majeur d'effectuer une analyse histologique comparative de racines et radicules prélevées sur des vignes greffées sur 161-49 C afin de mieux appréhender et comprendre des facteurs (structuraux) associés à son dépérissement. Dans ce cadre, nous avons confirmé, dans le contexte pédoclimatique de la Bourgogne, certaines observations déjà rapportées dans la littérature sur les racines aoûtées (compartiment associé à la conduction de sève et à la mise en réserve de composés carbonés). En premier lieu, les processus de thylose et de formation de gomme, clairement observables au niveau des vaisseaux du bois des ceps dépérissants, témoignent d'une obstruction vasculaire impactant le transit de la sève brute dans ce compartiment. De plus, la très faible quantité d'amyloplastés dans les rayons libériens et ligneux est également à noter, suggérant une problématique de mise en réserve carbonée à l'échelle des vieilles racines (compartiment sollicité comme « source » en début de cycle végétatif). Enfin, sur certains échantillons nous avons également noté des dysfonctionnements probants du phellogène (méristème secondaire), avec une accumulation de rhytidomes spongieux n'arrivant pas à s'exfolier et pouvant servir de niche écologique à certains microorganismes et/ou ravageurs. Tous ces éléments peuvent en grande partie expliquer les problèmes de vigueur (dans certains cas la mortalité) en début de saison végétative quand la demande de mobilisation des réserves est importante. Cependant, les résultats laissent également apparaître des différences notables de la symptomatique racinaire en fonction des parcelles. Pour exemple, seules les racines de ceps échantillonnés dans les parcelles d'Aloxe-Corton, où un sol lourd (hydromorphe) est observé, présentent des rhytidomes superposés, ne pouvant pas s'exfolier et à l'écorce très épaisse et spongieuse. A l'échelle des radicules (racines fines), leur observation a permis de mettre en lumière de façon originale plusieurs éléments de dysfonctionnements structuraux comme la « lacunisation » parenchymateuse, observée de façon récurrente dans les échantillons radicellaires de ceps dépérissants. En effet, la

totalité des échantillons analysés présentait une déstructuration profonde du parenchyme cortical ainsi qu'un système vasculaire (xylémien comme phloémien) endommagé et donc bien moins performant. Ces premières observations ne permettent pour autant pas de savoir s'il s'agit d'une des causes ou une conséquence du dépérissement, puisque le travail a été effectué sur des ceps déjà ancrés dans le dépérissement. Aussi, travailler sur des parcelles initiant ce dernier devrait permettre de déterminer si ces facteurs (structuraux) sont déterminants dans l'expression des symptômes ou s'ils doivent s'ajouter à d'autres pour en lire les effets. De plus, nous avons également rapporté que de nombreux dégâts radicellaires causés par le phylloxéra sont à déplorer. Le 161-49 C est décrit comme tolérant au phylloxéra, du fait qu'il n'y ait pas de tubérosités visibles, et qu'il ne souffre donc pas de létalité concernant les piqûres du puceron. Cependant, ce dernier peut être considéré comme un facteur aggravant en raison (i) des prélèvements de ressources carbonées effectués sur un système racinaire déjà fragilisé par une difficulté à reconstituer ses réserves et (ii) de l'entrée de microorganismes opportunistes, qui profitent des dégâts radicellaires associés au phylloxéra pour trouver une porte d'entrée dans le végétal. Il est à l'heure actuelle crucial de continuer les investigations sur le 161-49 C, même si l'utilisation de ce porte-greffe en conditions de production est désormais fortement déconseillée. En effet, la compréhension de cette problématique (physiologique) nous permettrait d'anticiper au mieux d'éventuelles situations de dépérissement sur d'autres variétés de porte-greffe, qu'elles soient issues du même croisement que le 161-49 C ou d'autres parentés. Cela reste un enjeu majeur dans un contexte de renouvellement du vignoble, notamment lié aux évolutions climatiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier tout spécifiquement le Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté, le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) et l'Association Technique Viticole de Bourgogne (ATVB)

pour leur soutien financier, attribué dans le cadre du projet de recherche « APTITUDE ». Les auteurs remercient également chaleureusement Pierre Mendez et Pierre-Antoine Noceto pour leur aide dans le prélèvement des racines et radicelles dans les différentes parcelles échantillonnées. Enfin, les auteurs remercient vivement les viticulteurs propriétaires et/ou régisseurs des parcelles échantillonnées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CNIV (Comité National des Interprofessions des Vins d'appellation d'origine et à indication géographique), 2019. <https://www.intervin.fr/etudes-et-economie-de-la-filiere/chiffres-cles#:~:text=Avec%20750%20000%20hectares%2C%20la,vinifi%C3%A9s%20par%20des%20caves%20particuli%C3%A8res>
2. BIVB. Quels porte-greffes en bourgogne pour les 50 prochaines années ? Éléments bibliographiques et avis d'experts, 2021, https://extranet.bivb.com/technique-et-qualite/projet-en-cours/viticulture/gallery_files/site/2992/48177/66771.pdf
3. BECKER H. Les porte-greffes Berlandieri x Riparia. *Prog. Agri. Vitic.*, 1968, **8**, 196-208.
4. PLANTGRAPE. <https://plantgrape.plantnet-project.org/fr/porte-greffe/161-49%20Couderc>
5. RIAZ, S., PAP D., URETSKY J., LAUCOU V., BOURSQUOT J.-M., KOCSIS L. & WALKER M. A. Genetic Diversity and Parentage Analysis of Grape Rootstocks. *Theor. Appl. Genet.*, 2019, **132** (6), 1847-1860. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03320-5>.
6. CORDEAU J. Création d'un vignoble : Greffage de la vigne et porte-greffes. Élimination des maladies à virus. En éditions Féret, Collection des Usuels Féret de la Vigne et du Vin. Bordeaux, France, 1998.
7. TORREGROSA L., VIGUIER D., BERNARD A.-C., BLOY P., LOPEZ G., CAMBOURNAC J.-R., CAUSSE C., AUDEGUIN L. & BOURSQUOT J.-M. Le 161-49 C et le dépérissement des jeunes vignes. *Prog. Ag. Vitic.*, 2011, **7**, 123-128.

8. SPRING J.-L., ZUFFEREY V., VERDENAL T. & VIRET O. Influence du porte-greffe sur le comportement du Pinot noir dans les conditions du Valais central. *Rev. Suisse Viti. Arbo. Hort.*, 2016, **48** (2), 112-122.
9. SPILMONT A.S., SERENO C., EL KHOTI N. & TORREGROSA L. The decline of the young vines grafted onto 161- 49 C. *Acta Hortic.*, 2016, **1136** (juillet), 251-264. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1136.35>.
10. SPILMONT A.S., LAMBLIN P. & SERENO C. Dépérissement du 161-49C. Lettre maladies de dépérissement, 2020, #05 Edition. https://www.plan-deperissement-vigne.fr/sites/default/files/2021-05/5_LettreDeperissement_BFC.pdf
11. SANGOY, M. Dépérissement du 161-49 C. Lettre maladies de dépérissement, 2020, #05 Edition. https://www.plan-deperissement-vigne.fr/sites/default/files/2021-05/5_LettreDeperissement_BFC.pdf
12. BRANAS J. Le Riparia-Berlandieri. *Pro. Agri. Vitic.*, 1970, **21** (Novembre), 309-315.
13. RIOU, C., AGOSTINI D., AIGRAIN P., BARTHE M., DES ROBERT M-L., GERVAIS J.-P., JOBARD E., LURTON L., MONCOMBLE D. & PRÊTET-LATASTE C. Action plan against declining vineyards: An innovative approach. En BIO Web of Conferences, 2016, Édité par Jean-Marie Aurand, 7, 01040. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20160701040>.
14. SUN Q., ROST T. L., REID M. S. & MATTHEWS M. A. Ethylene and Not Embolism Is Required for Wound-Induced Tylose Development in Stems of Grapevines. *Plant Physiol.*, 2007, **145** (4), 1629-1636. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100537>.
15. SUN Q., ROST T. L. & MATTHEWS M. A. Wound-Induced Vascular Occlusions in *Vitis Vinifera* (Vitaceae): Tyloses in Summer and Gels in Winter. *Am. J. Bot.*, 2008, **95** (12), 1498-1505. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800061>.
16. TORREGROSA L., EL-KHOLTI N., LOPEZ G. & SPILMONT A.S. Le dépérissement de la vigne greffée sur le porte-greffe 161-49 C ; revue de la symptomatologie associée. Publications et Actualités Vitivinicoles de l'Académie de la Vigne et du Vin du GiESCO, 2014, juin.
17. SPRING, J.-L., VERDENAL T., ZUFFEREY V., GINDRO K. & VIRET O. Influence du porte-greffe sur le comportement du cépage Cornalin dans le Valais central. *Rev. Suisse Viti. Arbo. Hort.*, 2012, **44** (5), 298-307.

18. ZUFFEREY V., MURISIER F., VIVIN P., BELCHER S., LORENZINI F., SPRING J.-L. & VIRET O. Réserves en glucides de la vigne (cv. Chasselas) : influence du rapport feuille-fruit. *Rev. Suisse Viti. Arbo. Hort.*, 2012, **44** (4), 216-224.
19. BETTENFELD P., CADENA I CANALS J., JACQUENS L., FERNANDEZ O., FONTAINE F., VAN SCHAİK E., COURTY P.-E. & S. TROUVELOT. The Microbiota of the Grapevine Holobiont: A Key Component of Plant Health. *J. Adv. Res.*, 2022, **40** (septembre), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.008>.
20. DEYETTE. & ROLSHAUSEN P.-E. Endophytic Microbial Assemblage in Grapevine. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2020, **96** (5), f1aa053. <https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa053>.
21. KELLER M. En *The science of grapevines: Anatomy and physiology, Second Edition*, 2015.
22. SWANEPOEL J.-J. & DE VILLIERS C-E. The anatomy of Vitis roots and certain abnormalities. En *The Grapevine Roots and its Environment*, chapitre 9, 1988, **215**, 138 – 146
23. DAYER S., REINGWIRTZ I., MCELRONE A. J. & GAMBETTA G. A. Response and Recovery of Grapevine to Water Deficit: From Genes to Physiology. En *The Grape Genome*, édité par Dario Cantu et M. Andrew Walker, 2019, 223-245. *Compendium of Plant Genomes*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18601-2_11.
24. CUNEO I. F., BARRIOS-MASIAS F., KNIPFER T., URETSKY J., REYES C., LENAIN P., BRODERSEN C. R., WALKER M. A. & MCELRONE A. J. Differences in Grapevine Rootstock Sensitivity and Recovery from Drought Are Linked to Fine Root Cortical Lacunae and Root Tip Function. *New Phytol.*, 2021, **229** (1), 272-283. <https://doi.org/10.1111/nph.16542>.
25. POWELL K. S., COOPER P. D. & FORNECK A. The Biology, Physiology and Host-Plant Interactions of Grape Phylloxera *Daktulosphaira Vitifoliae*. En *Advances in Insect Physiology*, 2013, **45**, 159-218. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417165-7.00004-0>.
26. FORNECK A., KLEINMAN S., BLAICH R. & ANVARI S.-F. Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktilosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine. *Vitis*, 2002, **41** (2), 93-97.
27. BRANAS J. Sur le Phylloxéra. *Prog. Agri. Vitic.*, 1968, **15** (Août), 507-513.