Réponse de la vigne (*Vitis vinifera* L) aux températures inférieures à 0°C. I. Effets d'un refroidissement contrôlé sur des sarments aoûtés

JC Audran ¹, C Leddet ², J Dereuddre ², E Ait Barka ¹, O Brun ³

¹ UFR sciences, laboratoire de Biologie et Physiologie végétales, BP 347, F51062 Reims;

² Université P-et-M-Curie, laboratoire de Cryobiologie végétale, 12, rue Cuvier, F75005 Paris;

³ Mumm Perrier-Jouet, Vignobles et Recherches, 11, av de Champagne, F51200 Épernay, France

(Reçu le 30 juin 1992; accepté le 15 mars 1993)

Résumé — Afin de simuler les effets d'un froid hivernal, des fragments de sarments aoûtés de vigne ont été soumis artificiellement à un refroidissement programmé de 1°C.mm⁻¹, entre +5° et -50°C. Les thermogrammes obtenus en microcalorimétrie différentielle à balayage présentent 2 exothermes successifs : le premier, nettement marqué vers -9°C, le second, plus étalé, débute vers -17°C et persiste jusqu'à -30°C. Corrélativement à ces pics de cristallisation les analyses histo-cytologiques ont montré des seuils thermiques de dégradation sélective des différents tissus caulinaires : parenchyme cortical et vaisseaux conducteurs du bois (-10°C), liber (-17°C) et cellules médullaires (-30°C).

gel / sarment / analyse thermique / tolérance / *Vitis vinifera* = vigne

Summary — Analysis of the response of grapevine mature shoots to controlled freezing. The effects of controlled freezing on mature shoots of grapevine (*Vitis vinifera* L cv Chardonnay) were studied by differential scanning microcalorimetry and histological techniques. One-yr-old shoots were taken from plants in a Champagne vineyard and frozen progressively from +5°C to -50°C (1°C/min). Figure 1 presents thermograms obtained from different parts of the shoot. Thermograms generally displayed 2 exotherms at $\approx -10^\circ\text{C}$ and -17°C respectively, whatever the nature of the explant: a piece of shoot, bark or pith. However, secondary xylem thermograms presented only 1 crystallization peak. Histological alterations due to the formation of ice appeared after the first exotherm and involved the bark (figs 2, 3) and the secondary xylem vessels (figs 9, 10 and 11), whereas other tissues (the cambium and liber) remained unaltered (fig 6). After the second exotherm (between -17 and -30°C) every tissue was affected: the bark (fig 4), the liber and cambium (figs 5, 7 and 8), and the secondary xylem (fig 12). In conclusion, although some destruction inside the shoot seemed to have been induced by freezing at -9°C, it only concerned the superficial tissues and did not affect further development of the plant. Further freezing $< -17^\circ\text{C}$ appeared necessary to destroy liber and secondary xylem vessels.

frost / shoot / thermal analysis / tolerance / *Vitis vinifera* = grapevine

INTRODUCTION

La région viticole champenoise constitue une limite septentrionale à la culture de la vigne. Dans cette région, les vignes cultivées, constituées de cépages issus du *Vitis vinifera*, sont exposées aux gelées hivernales et aux gelées

de printemps. Les basses températures peuvent constituer un facteur limitant du développement optimal du vignoble. Le climat champenois, dont la température moyenne annuelle est de l'ordre de +10°C, est tout juste compatible avec la culture de la vigne. Il est caractérisé par 60 à 80 j de gelées se répartissant en automne, hiver et printemps. Si les très fortes gelées

d'hiver sont heureusement peu fréquentes, elles n'en sont pas pour autant négligeables au plan économique, du fait des dégâts qu'elles provoquent. En effet, selon Galet (1976) «la plupart des cépages cultivés commencent à souffrir en-dessous de -15°C ». Si de telles températures, bien que rares, ne sont pas exceptionnelles en Champagne, comme en témoignent celles de l'hiver 1985, des phénomènes d'acclimatation interviennent et l'importance des dégâts dépend des régions et de certains facteurs locaux (orientation, pente du terrain, cultivar, âge de la vigne...). Dans leur majorité, les données concernant les effets des températures basses létales sur les sarments de vigne se rapportent à l'analyse exclusive de sarments gelés, pour lesquels il a été constaté, au plan anatomique, la détérioration du liber et le développement de lésions tissulaires, variables en nombre et en étendue (Branas, 1974; Pratt et Pool, 1981). Aussi, dans le cadre d'une étude sur la résistance de la vigne aux gelées d'hiver, s'est posé le problème d'une connaissance approfondie du comportement des sarments pendant un abaissement progressif de température. Les travaux réalisés avaient pour objectif :

- la détermination des profils de cristallisation des sarments;
- l'étude du rôle des différents tissus dans l'établissement du profil de cristallisation ;
- l'analyse aux niveaux tissulaire et cellulaire des effets du gel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les sarments d'un an utilisés dans cette étude ont été prélevés durant le mois de mars 1989 sur des souches du cépage chardonnay cultivées à Avize (Marne).

La technique d'analyse microcalorimétrique différentielle (Mettler DSC30) est basée sur la mesure des différences de températures entre 2 creusets en aluminium placés dans un four dont le refroidissement peut être programmé. Un premier creuset, vide, sert de référence ; un second creuset, identique au premier, contient l'échantillon à analyser. Les différences de température permettent d'estimer le flux de chaleur dégagé par l'échantillon lorsque celui-ci est le siège d'une cristallisation (formation de glace). L'intensité du pic de cristallisation (exotherme) dépend de la quantité de glace formée et de l'écart entre la température de rupture de surfusion et la température de cristallisation des liquides cellulaires et de la masse de ces derniers.

Pour cette étude, différents types d'échantillons ont été utilisés : fragments de tige et bourgeons. Dans ce premier article, seuls ont été analysés différents tissus de la tige prélevés dans les régions internodales des sarments : morceau complet de tige (écorce + bois + moelle), morceau de tige dépourvue de moelle, fragments de moelle seule et fragments de bois seul. Les échantillons ont été soumis à un refroidissement programmé de $1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, de $+5^{\circ}\text{C}$ à -50°C .

Pour l'analyse histo-cytologique, seuls les échantillons «tige complète» ont été étudiés. Après chaque exotherme, les morceaux de tige sont fixés immédiatement par une solution de glutaraldéhyde à 5% dans un tampon cacodylate (pH : 7,2) pendant 24 h, et inclus selon le protocole habituel dans la paraffine. Pour l'observation, les coupes, épaisses de $7\text{ }\mu$ environ, sont colorées par l'acide periodique-Schiff (APS) réactifs des polysaccharides totaux et étudiées en microscopie photonique.

RÉSULTATS

Analyse microcalorimétrique différentielle à balayage (fig 1)

Elle a été réalisée sur différents types d'échantillons (fig 1 et tableaux I et II). Pour un fragment de tige complète (fig 1, T), le profil de cristallisation présente toujours 2 exothermes successifs. Le premier pic, très marqué, apparaît vers $-9,1^{\circ}\text{C}$, le second commence vers $-17,1^{\circ}\text{C}$ et s'étend jusque vers -30°C . Ce second exotherme ne présente pas de rupture de surfusion nette. Dans le cas d'un fragment de tige dépourvue de moelle (fig 1, T-M), 2 pics de cristalli-

Tableau I. Températures de rupture de surfusion ($^{\circ}\text{C}$) correspondant au premier pic (E_1) de fragments de tige comportant l'ensemble des tissus (T), de tige dépourvue de moelle (T-M), de moelle (M) et du xylème secondaire (X).

	T	T-M	M	X
<i>n</i>	18	7	10	6
<i>m</i>	-9,1	-11,0	-10,7	-13,2
<i>s</i>	1,4	1,5	1,7	2,6

n : effectifs; *m* : moyenne des valeurs; *s* : écart type. La vitesse de refroidissement est de $1^{\circ}\text{C}.\text{mn}^{-1}$. Les échantillons ont été prélevés sur des sarments âgés d'un an.

Tableau II. Températures d'initiation (°C) de l'exotherme E_2 en fonction de la nature du matériel congelé : tige (T); tige sans moelle (T-M); moelle (M); xylème secondaire (X).

	T	T-M	M	X
<i>n</i>	12	7	10	6
<i>m</i>	-17,1	-16,7	-20,6	-19,9
<i>s</i>	1,6	1,0	1,2	1,9

n : nombre de mesures effectuées; *m* : moyenne des mesures; *s* : écart type. La vitesse de refroidissement est de $1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

sation sont également obtenus, dont les températures d'initiation sont respectivement de $-11,0^{\circ}\text{C}$ pour le premier pic et de $-16,7^{\circ}\text{C}$ approximativement pour le second, comme pour la tige complète. Pour un fragment de moelle (fig 1, M), le profil thermique met également en évidence 2 cristallisations successives dont les températures d'initiation sont respectivement de $-10,7^{\circ}\text{C}$ pour la première et de $-20,6^{\circ}\text{C}$ pour la seconde. Enfin, pour un fragment ne comportant que du bois (fig 1, X), les exothermes apparaissent respectivement à $-13,2^{\circ}\text{C}$ et $-19,9^{\circ}\text{C}$.

L'analyse de la variance à un critère de classification (test *F*) montre un effet du type de fragment utilisé sur la température de rupture de

Fig 1. Thermogrammes obtenus en DSC d'un fragment de tige entière (T), de tige sans moelle (T-M), de moelle seule (M) ou de bois seul (X). La flèche indique le sens des dégagements de chaleur (en unités arbitraires). Pour chaque condition, 3 thermogrammes parmi les plus caractéristiques sont présentés. Chaque thermogramme présente 2 exothermes (E_1 et E_2).

surfusion correspondant à l'exotherme E_1 ; les différences entre le xylème (X), d'une part, et la tige (T), la tige sans moelle (T-M) et la moelle (M), d'autre part, sont hautement significatives (probabilité de l'ordre de 1%). Les différences entre la tige (T), la tige sans moelle (T-M) et la moelle (M) ne sont pas différentes au seuil de probabilité de 5%. Ces résultats mettent en évidence le comportement des différents tissus de la tige.

Une étude analogue a été faite pour le second exotherme (exotherme E_2), dont la température d'initiation est plus difficile à déterminer (fig 1 et tableau II), compte tenu du fait que la cristallisation initiale n'est pas achevée.

Pour les températures du deuxième exotherme (E_2), il y a des différences hautement significatives entre les 4 types de fragments. Deux groupes peuvent être distingués : la moelle (M) et le xylème (X), d'une part ; la tige (T) et la tige sans moelle (T-M), d'autre part.

Analyse cytologique

Nous rappellerons tout d'abord les principales caractéristiques cyto-histologiques de l'anatomie secondaire d'un sarment d'un an aoûté, puis nous envisagerons les effets d'un froid gelant sur son organisation.

Organisation d'un sarment témoin

Sur une coupe transversale internodale de la périphérie vers le centre du sarment, on observe les différentes régions suivantes disposées concentriquement :

- une écorce comportant une zone corticale (cortex) constituée d'un parenchyme et d'îlots de sclérenchyme (fig 2), une zone subérifiée, de 3 ou 4 assises de cellules, issue de l'activité de l'assise subérophellodermique et une zone libérienne discontinue, organisée en massifs stratifiés constitués par l'alternance de couches pluricellulaires de liber mou, conducteur et de liber dur, constitué de fibres libériennes de soutien (fig 5) ; ces massifs sont séparés par des rayons médullaires libériens ;
- un cambium ;
- une zone ligneuse (xylème secondaire) conductrice de la sève brute et formée de vaisseaux conducteurs et de fibres ligneuses (figs 5–9) ; comme la zone libérienne, la zone ligneuse

est aussi structurée en territoires séparés par des rayons médullaires ligneux ; dans le sarment de vigne, la région conductrice (liber et bois) forme un anneau discontinu (pachyte discontinu) ; les rayons médullaires libéro-ligneux sont riches en amidon ;

- une zone médullaire parenchymateuse dont les cellules périphériques renferment de l'amidon.

Effets d'un refroidissement sur le sarment

Lorsque le refroidissement d'un fragment complet de tige (T) est arrêté après le premier exotherme qui se produit vers -9°C , seuls quelques tissus : parenchyme cortical (fig 5) et vaisseaux conducteurs du bois (figs 10 et 11) présentent des altérations. Le reste des tissus caulinaires, et, en particulier le cambium, demeure intact (fig 8). En ce qui concerne les vaisseaux du bois, les plus grands se sont révélés les plus sensibles et leur paroi est rompue à de nombreux endroits (figs 6 et 7, flèches). Toutefois, ces lésions sont limitées dans leur importance et n'affectent pas ou peu le tissu ligneux (fibres) et le parenchyme ligneux. On notera la présence de lacunes importantes orientées tangentiellement dans la région de contact parenchyme cortical-liège (fig 5, flèches). Cette première cristallisation semble donc concerner tous les tissus, bien que seuls certains d'entre eux présentent des désordres cellulaires.

Si le refroidissement est interrompu après le second exotherme qui s'étend entre -17°C et -30°C , les altérations induites par la cristallisation s'étendent à l'ensemble des tissus. Dès l'initiation du second exotherme on constate :

- la destruction totale de la zone corticale (fig 4) par l'écrasement du parenchyme et la désagrégation des îlots de sclérenchyme ;
- la désorganisation profonde des tissus conducteurs libériens (fig 7 et 8) et ligneux (fig 12) par éclatement des cellules conductrices, le développement de déchirures radiales et la perte de cohérence des fibres ligneuses ; le parenchyme ligneux des rayons médullaires, dont les cellules sont riches en amidon, n'est que faiblement affecté (fig 12) ;
- la détérioration du cambium, dont les cellules sont déchirées (fig 7–8).

Après un refroidissement à -30°C , les dégradations histo-cytologiques décrites précédemment sont accentuées, en particulier au niveau

Figs 2 à 6. 2. Détail anatomique de la région corticale d'un sarment aouté non traité (x 600). 3 et 4. États successifs de la dégradation de l'organisation histo-cytologique du cortex d'un sarment d'un an à l'issue du premier exotherme (fig 3 : x 450), puis du second exotherme (fig 4 : x 600). 5. Sarment aouté non traité. Constitution histologique du liber (x 440). 6. Après le premier exotherme, l'anatomie du liber n'est pas modifiée (x 400). Ep : épiderme; PC: parenchyme cortical; S: sclérenchyme; L: liège; Li: liber; LiM: liber mou; LiD: liber dur; C: cambium; B: bois; RM: rayon médullaire; VC: vaisseau conducteur; FL: fibre ligneuse; A: amidon; barre = 20 μ m.

Fig 7 à 12. 7–8. Désorganisation du tissu libérien après le second exotherme par le développement de fissures tangentielles (flèches simples) et radiales (flèches doubles) (x 480). 9. Sarment aoûté non traité: détail de la structure histologique du bois (x 450). 10–11. A l'issue du premier exotherme, les parois des gros vaisseaux conducteurs du bois sont rompues (flèches) (x 400 et 720). 12. Désorganisation du tissu ligneux après le second exotherme (x 450). Ep : épiderme; PC: parenchyme cortical; S: sclérenchyme; L: liège; Li: liber; LiM: liber mou; LiD: liber dur; C: cambium; B: bois; RM: rayon médullaire; VC: vaisseau conducteur; FL: fibre ligneuse; A: amidon; barre = 20 μ m.

des rayons médullaires et de la zone médullaire, où la plupart des cellules sont détruites.

DISCUSSION

Le problème de la résistance des végétaux aux très basses températures a fait l'objet de nombreux travaux et les mécanismes naturels de cryoprotection mis en jeu par la plante sont actuellement bien connus dans leur généralité (Modlibowska, 1961 ; Alden et Hermann, 1971 ; Dereuddre, 1977, 1985 ; Levitt, 1980 ; Dereuddre et Gazeau, 1986 ; Grout, 1987). Ainsi la survie des plantes ligneuses, qui nous intéressent ici, aux gelées d'hiver est le résultat de phénomènes complexes dont la finalité est d'éviter la formation intracellulaire de cristaux de glace toujours létale pour la cellule, du fait des altérations irréversibles qu'elle engendre (Grout et Morris, 1987).

Deux mécanismes principaux participent à cette protection (Dereuddre et Gazeau, 1986) : l'abaissement de la température de rupture de surfusion au niveau de la cellule et la tolérance à la cristallisation extracellulaire. Ces 2 mécanismes sont liés à un certain degré de déshydratation des cellules et de résistance des membranes ; ils impliquent des transferts contrôlés d'eau entre les différents niveaux de compartimentation de la plante (cellules, tissus et organes).

Les exothermes mis en évidence en analyse thermique fournissent des indications sur la cristallisation intra- ou extracellulaire. Chez la vigne, les thermogrammes obtenus en DSC ont toujours présenté 2 exothermes : le premier, qui se présente sous l'aspect d'un pic fortement développé, apparaît entre -9°C (cas de la tige entière) et 13°C environ pour le xylème isolé ; le second, plus étendu, se développe à partir de -17°C et s'étend jusqu'à -30°C . Des profils de cristallisation similaires ont été aussi rapportés sur des sarments de différents arbres fruitiers : abricotier, pêcher (Ashworth *et al*, 1983), pommier (Quamme *et al*, 1972), prunier (Quamme *et al*, 1982), ou d'arbres forestiers comme le bouleau (George *et al*, 1982).

Le premier exotherme correspond vraisemblablement à une cristallisation extracellulaire à laquelle semblent participer l'ensemble des tissus caulinaires, comme en témoignent les thermogrammes résultant du traitement de fragments de tige complète (T), de portions de tige dépourvue de moelle (T-M), ainsi que de fragments de bois

(X) et de moelle (M) isolés. La température de rupture de surfusion du xylème seul est significativement différente de celle des autres fragments. La présence des autres tissus de la tige aurait ainsi pour effet de rendre plus gélifs certains vaisseaux du xylème secondaire.

Le second exotherme (E_2) pourrait correspondre à la cristallisation progressive des liquides cellulaires résiduels des différents tissus, après la première cristallisation. Il serait dû à un état prolongé de surfusion des liquides cellulaires. Comme chez le pommier (Ashworth *et al*, 1988), il résulterait essentiellement de la réaction des tissus ligneux et médullaire aux basses températures.

L'importance des lésions anatomiques est en rapport étroit avec les exothermes. Pendant la première cristallisation, les cellules du parenchyme cortical sont les premières atteintes. La désorganisation des massifs compacts de sclérenchyme qui se produit ensuite est apparemment liée à des déchirures périphériques pénétrant plus ou moins profondément et à des forces de cisaillement induites par la déformation des tissus environnants et provoquées par la croissance des cristaux de glace.

L'absence d'altérations dans le liber sous-jacent est sans doute à rattacher à la présence à la base du cortex d'une zone subérimée, composée de 3 ou 4 assises de cellules mortes aux parois imperméables. Cette région constitue une barrière limitant la progression de la glace vers l'intérieur de la tige. L'existence d'importantes déchirures tangentielles dans la zone de contact du liège et du parenchyme cortical, témoins du développement de gros cristaux de glace à cet endroit, provoque une séparation artificielle des tissus corticaux du reste du sarment.

Dans le bois, les cristaux de glace prennent naissance dans les vaisseaux conducteurs, tout d'abord au niveau des pores de plus grand diamètre. Au cours de leur accroissement, ils provoquent des ruptures localisées dans la paroi d'où partent, dans le tissu fibreux environnant, des déchirures radiales. L'ampleur de ces fractures est fonction de la température.

Pour des températures inférieures à -17°C , correspondant au second exotherme, la désorganisation tissulaire est amplifiée en plus du parenchyme et des vaisseaux conducteurs. Les lésions observées correspondent à celles décrites habituellement sur les sarments gelés (Branas, 1984). Les cellules conductrices du liber (liber mou) et les cellules cambiales sont les pre-

mières atteintes, puis les tissus de soutien (liber dur et fibres ligneuses) et enfin, vers -30°C , les cellules médullaires. Les cellules du parenchyme des rayons libéro-ligneux, riches en amidon, se révèlent les plus résistantes et leur organisation tissulaire n'est que rarement perturbée. Les rayons libériens semblent plus sensibles au froid que les rayons ligneux.

En conclusion, si un gel à -10°C peut induire des altérations du sarment, il n'affecte que le cortex et est sans conséquence importante sur l'évolution du sarment. Les altérations les plus importantes, celles des vaisseaux conducteurs du bois, apparaissent progressivement, et pourraient être préjudiciables au développement ultérieur de la vigne, expliquant les observations faites *in situ* par Galet (1976).

Le sarment est caractérisé par l'importance des tissus conducteurs libéro-ligneux qui constituent l'essentiel de la tige. De ce fait, le comportement du sarment au gel, quant à son devenir fonctionnel, dépend directement de la sensibilité au froid du liber et du bois.

L'aptitude de ces tissus conducteurs à résister au gel d'hiver semble résulter :

- de leur organisation anatomique compartimentée : en effet, la présence de régions tissulaires, orientées tangentiellement et radialement, composées de cellules imperméables (suber), séparant le cortex et le xylème, ou de cellules résistantes (liber dur, rayons médullaires) qui isolent et fragmentent l'anneau conducteur, constitue des barrières successives freinant ou inhibant la progression de la cristallisation ;
- de la mise en jeu de mécanismes physiologiques conduisant à accroître la surfusion des liquides intracellulaires qui en abaissant le point de cristallisation retarde le moment de la cristallisation intracellulaire.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un programme de recherche financé par la Commission nationale des calamités agricoles, que les auteurs remercient. Nous remercions également M Najar, de l'AFOCEL, pour son aide dans l'analyse statistique des résultats.

RÉFÉRENCES

- Alden J, Hermann RK (1971) Aspects of cold-hardiness mechanism in plants. *Bot Rev* 37, 37-142
- Ashworth EN, Rowse DJ, Billmyer LA (1983) The freezing of water in woody tissues of apricot and peach and the relationship to freezing injury. *J Am Soc Hortic Sci* 108, 299-303
- Ashworth EN, Echlin P, Pearce RS, Hayes TL (1988) Ice formation and tissue response in apple twigs. *Plant Cell Environ* 11, 703-710
- Branas J (1974) *Viticulture*. Dehan, Montpellier
- Dereuddre J (1977) Adaptations physiologiques des végétaux au froid. *Bull Soc Ecophysiol* 2, 5-15
- Dereuddre J (1985) Physiologie de la résistance au gel chez les plantes ligneuses. *Bull Soc Ecophysiol* 10, 1-19
- Dereuddre J, Gazeau C (1986) La résistance naturelle au gel chez les végétaux. *Bull Soc Bot Fr* 133, *Actual Bot*, 7-25
- Galet P (1976) *Précis de viticulture*. Dehan, Montpellier, 3^e éd
- George MF, Beckwar MR, Weiser CJ, Burke MJ (1982) Freezing avoidance by deep undercooling of tissue water in winter-hardy plants. *Cryobiology* 19, 628-629
- Grout BWW (1987) Higher plants at freezing temperatures. In: *The effects of low temperatures on biological systems* (BWW Grout, GJ Morris, A Edward, eds) Arnold, London, 293-314
- Grout BWW, Morris GJ (1987) Freezing and cellular organization. In: *The effects of low temperatures on biological systems* (Grout BWW, Morris GJ, Edward A, eds) Arnold, Londres, 147-173
- Levitt J (1980) *Responses of plants to environmental stresses. Vol I : Chilling, freezing and high temperature stresses*. Academic Press, New York
- Modlibowska I (1961) Sur les mécanismes du gel et de la reprise d'une vie normale au retour à la température ordinaire. *Bull Soc Fr Physiol Vég* 7, 123-133
- Pratt C, Pool RM (1981) Anatomy of recovery of canes of *Vitis vinifera* L from simulated freezing injury. *Am J Enol Vitic* 32, 223-227
- Quamme HA, Layne REC, Ronald WG (1982) Relationship of super cooling to cold hardiness and the northern distribution of several cultivated and native *Prunus* species and hybrids. *Can J Plant Sci* 62, 137-148
- Quamme HA, Stushnoff C, Weiser CJ (1972) The relationship of exotherms to cold injury in apple stem tissues. *J Am Soc Hortic Sci* 97, 608-613