Connaissance de la Vigne et du Vin,
Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1989, **23,** N° 2, 67-75.

INFLUENCE DE LA CONSERVATION AU FROID DES SARMENTS DE *Vitis vinifera* L. VAR. UGNI BLANC SUR LES CONSTITUANTS LIPIDIQUES DES BOUTURES AU COURS DE LA RHIZOGENESE.

J.-J. LAVAUD

Laboratoire de Physiologie Végétale et Ampélologie
Université de Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex (France)

Résumé : *La température de conservation des sarments a une influence importante sur le métabolisme et sur la reprise des boutures préparées à partir de ces mêmes sarments. Si la température de conservation des sarments est très basse (– 15° C) les boutures demeurent vivantes, mais elle ne débourrent pas, elles sont incapables d'émettre des racines et leur métabolisme lipidique est fortement perturbé. En revanche, si la température de conservation n'est pas trop basse (– 5° C) les boutures débourrent et émettent des racines, leur teneur en lipides polaires diminue et des lipides neutres sont synthétisés.*

La conservation des sarments par le froid est une technique utilisée actuellement par les pépiniéristes. On sait qu'elle entraîne des modifications de certains constituants des sarments et que ces modifications dépendent à la fois de la durée et de la température de conservation (DARNÉ et *al.,* 1982). Il était donc intéressant de savoir si le fait de conserver les sarments par le froid entraînait, par la suite, au cours de la rhizogenèse, des modifications dans le métabolisme lipidique des boutures préparées à partir de ces sarments.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des sarments de *Vitis vinifera* L. var. Ugni blanc ont été prélevés le 30 janvier 1980, pendant la période de repos de la Vigne, les bourgeons étant dans la phase de post-dormance. Trois lots identiques comprenant chacun 65 sarments et permettant d'obtenir plus de 200 boutures ont été constitués.

L'un de ces lots, le lot P, a été utilisé le jour même du prélèvement. Les deux autres lots ont été placés dans des poches en matière plastique et conservés au froid à deux températures très différentes, – 5° C et – 15° C, pendant une même durée, 90 jours. Ce n'est qu'au bout de ce laps de temps que les boutures ont été préparées, puis placées pendant 30 jours dans de l'eau déminéralisée et aérée, à l'obscurité et à température constante, 25° C.

Toutes les boutures utilisées étaient de même longueur et pourvues d'un œil de type No, c'est-à-dire situé au niveau d'un nœud dépourvu de vrille, de façon à avoir un ensemble aussi homogène que possible (BOUARD, 1966).

Le matériel végétal utilisé pour les analyses a été lyophilisé après élimination des bourgeons puis finement broyé. Les poudres obtenues ont été homogénéisées et conservées dans des flacons en matière plastique bouchés et placés au congélateur.

L'extraction des lipides totaux a été réalisée à partir de 1 gramme de poudre avec le mélange chloroforme-éthanol-eau 2:1:1 (V/V/V) selon la méthode de DARNÉ et MADERO (1979). Les lipides neutres ont été séparés des lipides polaires par chromatographie sur colonne d'acide silicique selon la technique décrite par VORBECK et MARINETTI (1965) modifiée par CHAVANT et SANCHOLLE (1977). La saponification a été réalisée avec la soude méthanolique 0,5 N et la méthylation par le mélange trifluorure de bore-méthanol à 20 p. cent selon METCALFE et *al.,* (1969). Les esters méthyliques ont été ensuite extraits par le pentane et étudiés suivant la technique décrite par ATALAY (1975).

RÉSULTATS

Les boutures préparées à partir des sarments conservés à —5°C ont débourré normalement. Elles ont donné naissance à des racines disposées suivant une «génératrice» partant de la base de l'œil et allant jusqu'à l'extrémité inférieure de la bouture, disposition classique chez l'Ugni blanc (BOUARD, 1966). Les prélèvements destinés aux analyses (15 boutures pour chaque analyse) ont été effectués à trois dates différentes : le jour où elles ont été mises dans l'eau après les 90 jours de stratification (stade I), le jour du débourrement (stade II) et lors de l'apparition de la «génératrice» (stade III).

Les boutures du lot —15°C ont eu un comportement très différent : elles n'ont pas débourré et n'ont pas émis de racines. Par suite, les prélèvements nécessaires aux analyses ne pouvaient être faits aux stades II et III précédemment définis. Ils ont donc été effectués le même jour que ceux du lot —5°C.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux I à IV. Ils représentent les valeurs moyennes de trois analyses différentes. Ils concernent non seulement les cinq acides gras dont la présence est constante dans les sarments (ATALAY et *al.* 1973) ainsi que l'acide arachidique (LAVAUD, 1982a), trouvé dans presque tous les échantillons, mais aussi les catégories lipidiques suivantes : lipides neutres (L.N.) et lipides polaires, ces derniers comprenant les glycolipides (G.L.) et les phospholipides (P.L.).

I — ÉVOLUTION DES LIPIDES DES SARMENTS PENDANT LEUR CONSERVATION AU FROID

a) *Acides gras*

Les variations des teneurs en acides gras que l'on observe (tableau I) montrent qu'il s'est produit des modifications dans les deux lots de sarments soumis au froid pendant une durée de 90 jours. La conservation de ces sarments dans des sacs en plastique pendant 90 jours, à la température très basse de —15°C, n'avait donc pas bloqué complètement leur métabolisme.

TABLEAU I

Teneurs en acides gras totaux (A.G.T.), en acides gras insaturés totaux (A.G.I.T.) et en acides gras saturés totaux (A.G.S.T.) des boutures (en μg/g de matière sèche). P = jour du prélèvement des sarments, stade I = jour où les boutures ont été mises dans l'eau, stade II = débourrement, stade III = apparition des racines.

Les teneurs indiquées représentent la moyenne des résultats de trois dosages. L'écart maximum entre cette moyenne et les valeurs extrêmes obtenues au cours des dosages est donné seulement pour le lot P.

Lots	Lot P	Lot —5°C			Lot —15°C		
Stades		I	II	III	I	II	III
A.G.T.	2589 ± 95	3065	3243	3607	2445	2669	3374
A.G.I.T.	1785 ± 52	2179	2175	2430	1597	1650	2119
A.G.S.T.	804 ± 43	886	1068	1177	848	1019	1255
$\frac{\text{A.G.I.T.}}{\text{A.G.S.T.}}$	2,2	2,4	2,0	2,1	1,9	1,6	1,7

TABLEAU II

Proportions relatives des acides gras saturés des boutures des lots P, —5°C et —15°C (C 16 : 0 = ac. palmitique, C 18 : 0 = ac. stéarique et C 20 : 0 = ac. arachidique) et insaturés (C 18 : 1 = ac. oléique, C 18 : 2 = ac linoléique et C 18 : 3 = ac. linolénique).

Lots	Lot P	Lot —5°C			Lot —15°C		
Stades		I	II	III	I	II	III
C 16 : 0	24,0	23,4	24,8	27,5	30,3	30,5	31,4
C 18 : 0	4,0	5,2	4,6	4,2	5,6	5,6	5,1
C 20 : 0	3,6	0	1,8	2,9	2,0	2,3	0
C 18 : 1	12,4	11,3	11,9	11,1	10,0	12,5	11,8
C 18 : 2	42,8	50,1	47,0	43,5	43,4	40,3	41,6
C 18 : 3	13,2	10,0	9,9	10,8	8,7	8,8	10,1
A.G.I.T.	68,4	71,4	68,8	65,4	62,1	61,6	63,5
A.G.S.T.	31,6	28,6	31,2	34,6	37,9	38,4	36,5

Les modifications observées ne sont pas les mêmes dans les deux lots. En effet, pour la température de conservation de —5° C, la teneur en acides gras augmente d'environ 10 p. cent pour les acides gras saturés totaux (A.G.S.T.), d'environ 22 p. cent pour les acides gras insaturés totaux (A.G.I.T.) et de 18 p. cent pour les acides gras totaux (A.G.T.). Dans le cas des sarments conservés à —15° C, les A.G.S.T. augmentent aussi, mais peu, tandis que les A.G.I.T. diminuent de 10 p. cent, ce qui entraîne une légère baisse des A.G.T. Les deux températures de conservation provoquent donc dans les sarments des réactions opposées en ce qui concerne les A.G.I.T.

TABLEAU III

Teneurs (en μg/g de matière sèche) et proportions relatives des acides gras totaux des lipides neutres (L.N.) des glycolipides (G.L.) et des phospolipides (P.L.) des boutures.

Lots	Lot P	Lot —5° C			Lot —15° C		
Stades		I	II	III	I	II	III
Teneurs							
L.N.	644 ± 24	990	1223	1789	650	1413	1225
G.L.	424 ± 26	608	563	527	468	230	710
P.L.	1521 ± 45	1467	1457	1291	1327	1026	1439
Proportions relatives							
L.N.	24,9	32,3	37,7	49,6	26,6	52,9	36,4
G.L.	16,4	19,8	17,4	14,6	19,1	8,6	21,1
P.L.	58,7	47,9	44,9	35,8	54,3	38,5	42,5

TABLEAU IV

Valeurs du rapport entre les acides gras insaturés totaux et les acides gras saturés totaux (A.G.I.T. / A.G.S.T.) des lipides neutres (L.N.) des glycolipides (G.L.) et des phospholipides (P.L.) des boutures des lots P, —5° C et —15° C.

Lots	Lot P	Lot —5° C			Lot —15° C		
Stades		I	II	III	I	II	III
L.N.	1,8	2,2	2,2	2,7	1,3	1,7	1,6
G.L.	2,3	2,7	2,2	1,6	1,9	2,0	2,0
P.L.	2,4	2,5	1,9	1,6	2,3	1,5	1,7

La conservation au froid entraîne une modification des proportions relatives de certains acides gras (tableau II), mais elle n'est pas la même pour les deux températures : c'est ainsi que le pourcentage de l'acide linoléique subit une forte augmentation dans le cas du lot —5° C, alors qu'il ne varie pas pour le lot —15° C; inversement le pourcentage de l'acide palmitique augmente fortement dans les sarments qui ont été stockés à la température la plus basse, alors que sa teneur ne subit pas de modification à —5° C. Quant à l'acide linolénique, il baisse dans les deux cas mais beaucoup plus dans le lot —15° C.

b) *Lipides neutres et lipides polaires :*

Sous l'influence du froid (tableau III) on observe une modification des teneurs des lipides neutres et des lipides polaires qui est plus accentuée à —5° C qu'à —15° C. En effet, à —5° C les teneurs en L.N. augmentent fortement (+ 54 p. cent) alors qu'elles ne varient pratiquement pas à —15° C; celles des G.L. augmentent de 43 p. cent à —5° C et de 10 p. cent seulement à —15° C. Quant aux teneurs en P.L. leur diminution est importante à —15° C (—13 p. cent).

Les proportions relatives des A.G.T. des L.N. et des G.L. augmentent au détriment de celles des P.L. qui, par conséquent, diminuent. Les variations, en hausse pour les L.N. ou en baisse pour les P.L. sont beaucoup plus importantes à —5° C qu'à —15° C. Par contre l'augmentation des G.L. est faible, elle est très comparable aux deux températures de conservation.

Les valeurs du rapport A.G.I.T. / A.G.S.T. pour les L.N., les G.L. et les P.L. sont différentes dans les deux lots de boutures (tableau IV). La valeur de ce rapport augmente pour les L.N. et les G.L. lorsque la température de conservation est de —5° C; elle diminue dans le cas où la conservation a été faite à —15° C; en ce qui concerne les P.L. on ne note pas de variation : les valeurs sont comparables dans les deux lots de boutures et très voisines de celles du jour du prélèvement.

II — ÉVOLUTION DES LIPIDES DES BOUTURES AU COURS DE LA RHIZOGENESE

Des racines, nous le rappelons, se sont formées seulement sur les boutures provenant des sarments conservés à —5° C, mais des analyses ont également été faites, aux mêmes dates, sur les boutures issues du lot —15° C.

a) *Acides gras*

Du stade I au stade III, c'est-à-dire du jour où les boutures ont été mises dans l'eau et jusqu'à l'apparition des racines dans le lot —5° C, les teneurs en acides gras totaux ont augmenté dans les deux lots, mais beaucoup plus dans le lot —15° C où aucune racine ne s'est formée. En effet, pour le lot —5° C, l'augmentation est de l'ordre de 6 p. cent au moment du débourrement et de 18 p. cent lors de la formation des racines alors que pour le lot —15° C elle est respectivement de 9 p. cent et de 38 p. cent. On remarque que ces augmentations sont dues essentiellement aux A.G.S.T. pourtant beaucoup moins abondants que les A.G.I.T. Ces derniers ne varient que très faiblement jusqu'au débourrement. Les teneurs en A.G.S.T. augmentent d'environ 33 p.

cent depuis le débourrement jusqu'à la formation des racines dans le lot —5° C et beaucoup plus encore, de 48 p. cent pour le lot —15° C (tableau I).

Comme il ne s'est pas formé de racines sur les boutures provenant des sarments conservés à —15° C, on ne peut pas dire que les variations des A.G.T., des A.G.I.T. et des A.G.S.T. qui ont été observées sont en relation directe avec la rhizogenèse. L'action du froid serait donc susceptible à elle seule d'expliquer ces variations.

Les valeurs du rapport A.G.I.T. / A.G.S.T. sont plus élevées au stade I qu'aux deux autres stades. Ce rapport passe rapidement de 2,4 à 2,0 pour le lot —5° C et de 1,9 à 1,6 pour le lot —15° C; il se maintient ensuite pratiquement à la même valeur pendant le stade III.

En fonction de leur importance relative (tableau II) et dans les deux lots de boutures, les principaux acides gras se classent de la manière suivante : C 18 : 2 > C 16 : 0 > C 18 : 1 ⩾ C 18 : 3 > C 18 : 0 > C 20 : 0. On constate en outre que les proportions relatives des A.G.S.T. sont plus élevées pour les boutures du lot —15° C, tandis que pour celles du lot —5° C ce sont les proportions relatives des A.G.I.T. qui prédominent. Par conséquent, à —15° C, sous l'action de la température la plus basse, le fonctionnement des désaturases apparaît fortement ralenti.

b) *Lipides neutres et lipides polaires*

Le tableau III montre que des différences importantes se manifestent entre les deux lots en ce qui concerne les trois catégories lipidiques étudiées.

Pour le lot —5° C, il se produit une augmentation des pourcentages des L.N. du stade I au stade III; elle est peu importante du stade I au stade II, mais beaucoup plus du stade II au stade III. Le phénomène inverse s'observe évidemment pour les lipides polaires et il est plus accentué pour les P.L. que pour les G.L.

Les variations des teneurs en A.G.T. des L.N. se font dans le même sens que les variations de leurs proportions relatives; elles augmentent de + 24 p. cent du stade I au stade II et de + 46 p. cent du stade II au stade III. C'est l'inverse que l'on observe pour les teneurs en lipides polaires; la baisse des teneurs est plus importante dans la catégorie des G.L., qui sont les acides gras les moins bien représentés dans les boutures, que dans celle des P.L.; leurs teneurs ne varient pratiquement pas lors du débourrement et chutent lorsque les racines apparaissent.

Pour le lot —15° C l'évolution dans un sens bien déterminé des proportions relatives des catégories lipidiques, augmentation ou diminution du stade I au stade III, ne s'observe pas. Il se produit une augmentation brutale des L.N. du stade I au stade II (+ 26 p. cent), suivie d'une diminution importante du stade II au stade III (—16 p. cent). Le phénomène inverse s'observe pour les G.L. (—10 p. cent du stade I au stade II et + 12 p. cent du stade II au stade III) et pour les P.L. (—16 p. cent du stade I au stade II et + 4 p. cent du stade II au stade III).

En ce qui concerne les variations des teneurs, l'augmentation de celles de L.N. est très importante du stade I au stade II (+ 117 p. cent) et leur diminution du stade II au

stade III est beaucoup plus discrète (— 13 p. cent). Depuis la plantation jusqu'au débourrement des boutures les teneurs des lipides polaires diminuent (— 50 p. cent pour les G.L. et — 23 p. cent pour les P.L.) inversement elles augmentent quand les racines apparaissent (de + 209 p. cent pour les G.L. et de + 40 p. cent seulement dans le cas des P.L.).

Les résultats obtenus montrent que le métabolisme lipidique des boutures préparées à partir des sarments conservés au froid est très différent suivant la température de conservation. Pour la température basse de — 5° C, il se produit une synthèse continue des lipides neutres alors que les lipides polaires se dégradent, les synthèses ou les dégradations étant d'abord faibles jusqu'au débourrement, puis fortes jusqu'à la formation des racines. Pour la température très basse de — 15° C, les synthèses de lipides neutres et les dégradations des lipides polaires sont très fortes de la plantation jusqu'à la date du prélèvement suivant (débourrement des boutures du lot — 5° C). Le processus s'inverse ensuite : les lipides neutres sont dégradés et les lipides polaires synthétisés dans des proportions comparables à celles trouvées lors du débourrement des boutures du lot — 5° C.

Le tableau IV montre enfin que les valeurs du rapport A.G.I.T. / A.G.S.T. décroissent pour le lot — 5° C dans le cas des lipides polaires (G.L. et P.L.) alors que celles des L.N. sont identiques jusqu'au débourrement et augmentent lors de l'apparition des racines. Pour les boutures du lot — 15° C la valeur de ce rapport diminue dans le cas des P.L. du stade I au stade III alors que pour les deux autres catégories lipidiques elle ne varie que très peu.

DISCUSSION ET CONCLUSION

De nombreux auteurs ont déjà montré que la résistance des plantes aux basses températures s'accompagnait de modifications biochimiques importantes. Dans le cas des boutures de Vigne pour une température de conservation de — 5° C il se produit une augmentation de la quantité des lipides totaux (LAVAUD, 1982b). Une telle augmentation, à température basse avait déjà été signalée, en particulier par SIMONOVITCH et *al.,* (1968), chez *Robinia pseudoacacia* L. On sait par ailleurs, que les teneurs en acides gras polyinsaturés augmentent (MAZLIAK, 1979), et c'est le cas chez beaucoup de plantes, comme le rappelle THOMPSON (1980). C'est plus particulièrement l'acide linoléique qui augmente, comme cela a été observé par GRENIER et *al.,* en 1972 et en 1973 dans les racines de luzerne en période d'endurcissement au froid. Ici, quand la température de conservation des boutures est très basse (— 15° C) on note une diminution de la quantité des lipides totaux ainsi que des acides gras polyinsaturés; par contre les acides gras saturés augmentent et principalement l'acide palmitique, à l'inverse de ce que l'on observe dans les boutures qui ont été conservées à — 5° C. Les variations des teneurs en acides gras observées dans les boutures conservées à — 5° C sont donc comparables à celles que l'on retrouve dans d'autres espèces végétales pendant le phénomène d'endurcissement au froid.

Finalement, les résultats que nous avons obtenus montrent que la température de conservation des sarments a un influence sur la reprise des boutures préparées à

partir de ces mêmes sarments et sur leur métabolisme. Si la température de conservation des sarments est de —5° C, le débourrement des boutures se produit et des racines se forment; une synthèse des lipides neutres a lieu et les teneurs en lipides polaires diminuent. Si, au contraire, la température de conservation des sarments est très basse (—15° C), les boutures préparées à partir de ces derniers ne débourrent pas, elles sont incapables d'émettre des racines et leur métabolisme lipidique est fortement perturbé.

Manuscrit reçu le 5 mars 1989; accepté pour publication le 5 avril 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ATALAY D., CHERRAD M. et BOUARD J., 1973. Mise en évidence de plusieurs acides gras dans les sarments aoûtés de *Vitis vinifera* L. var. Ugni blanc. *C.R. Acad. Sci. Paris,* **277,** D, 309-311.

ATALAY D., 1975. Recherches sur l'évolution des principaux acides gras des sarments de Vigne au cours du cycle végétatif et des boutures au cours de la rhizogenèse. *Thèse Docteur Ingénieur.* Université de Bordeaux I.

BOUARD J., 1966. Recherches physiologiques sur la Vigne et en particulier sur l'aoûtement des sarments. *Thèse Doctorat ès-Sciences.* Université de Bordeaux I.

BLIGH E.G. et DYER W.S., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.* **37,** 911-917.

CHAVANT L. et SANCHOLLE M., 1977. Les lipides de deux moisissures : *Mucor mucedo* et *Aspergillus ochreaceus* se développant sur un même milieu. *Physiol. Vég.* **15,** (2), 209-218.

DARNÉ G. et MADERO-TAMARGO J., 1979. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la Vigne. *Vitis* **18,** 221-228.

DARNÉ G., LAVAUD J.J. et BROQUEDIS M., 1982. Influence de la durée de la conservation au froid des sarments d'Ugni blanc et de Fercal sur quelques aspects de leur métabolisme (lipides, composés phénoliques et acide abscissique). *IIe Colloque International sur la multiplication de la Vigne,* Bordeaux, 58-62.

GRENIER G., TREMOLIÈRES A., THERRIEN H.P. et WILLEMOT C., 1972. Changements dans les lipides de la Luzerne en conditions menant à l'endurcissement au froid. *Canad. J. Bot.,* **50,** 168-190.

GRENIER G., MAZLIAK P., TREMOLIÈRES A. et WILLEMOT C., 1973. Influence du froid sur la synthèse des acides gras dans les racines de deux variétés de Luzerne, l'une très résistante et l'autre moins résistante au froid. *Physiol. Vég.* **11,** (2), 253-265.

LAVAUD J.J., 1982a. Mise en évidence de l'acide arachidique dans les sarments et les boutures d'Ugni blanc. *Connaissance Vigne Vin,* **16,** n° 3, 165-169.

LAVAUD J.J., 1982b. Le métabolisme des boutures de Vigne (*Vitis vinifera* L. var. Ugni blanc) au cours de la rhizogenèse : influence d'une température basse (– 5°C) sur l'évolution de leurs constituants lipidiques. *IIe Colloque International sur la multiplication de la Vigne,* Bordeaux, 66-69.

MAZLIAK P., 1979. Temperature regulation of plant fatty acid desaturases. In *Low temperature stress in crop plants. The role of the membrane.* Proceding of an international seminar on Low Temperature Stresse in Crop Plants. Held at the East-West Center, Honolulu, Hawaii, March 26-30, 1979. Academic Press, London, 391-404.

METCALFE L.P., SCHMIDT A.A. et PELKA J.P., 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas-chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **38,** 514-515.

SIMINOVITCH D., RHEAUME B., POMEROY K. et LEPAGE M., 1968. Phospholipid, protein, and nucleic acid increase in protoplam and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. *Cryobiology,* **5,** 202-225.

THOMPSON G.A., Jr, 1980. *The regulation of membrane lipid metabolism.* Chemical Rubber Company., West Palm Beach, Florida.

VORBECK M.L. et MARINETTI G.U., 1965. Separation of glycosyl diglyceride from phosphatide using silice and chromatography. *J. Lip. Res.* **6,** 3-6.