

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie

THESE

présentée à l'U.F.R. des Sciences Exactes et Naturelles

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne
Spécialité: Biologie et Physiologie Végétales

par

Gaël LEBON

Sujet:

**Importance des glucides lors de la floraison chez la vigne
(*Vitis vinifera* L.).
Exemples de cépages présentant une sensibilité différente à la coulure.**

Soutenue publiquement le 6 Décembre 2005, devant le jury composé de:

M. DELROT S.	Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M. ROITSCH T.	Professeur, Université de Würzburg (Allemagne)	Rapporteur
M. BOULAY M.	Directeur de Recherche, Moët et Chandon	Examineur
M. MAGNÉ C.	Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale	Co-directeur de thèse
M. CLÉMENT C.	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'O.N.I.VINS, le R.V.V.S. et la société de Champagne Mumm-Perrier-Jouët Vignobles et Recherches qui ont financé ce travail et sans qui rien n'aurait été possible ; et plus particulièrement M. Olivier Brun qui m'a fait confiance pour mener à bien ce travail.

Je remercie le Professeur Christophe Clément, directeur du Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, qui m'a proposé ce sujet de thèse, m'a ensuite accueilli au sein de son équipe et a co-dirigé cette thèse. Sa patience (extrême) et son soutien m'ont grandement aidé tout durant ces années. Je le remercie aussi pour la liberté qu'il m'a toujours accordée pour mes expériences. J'espère que sa rigueur scientifique aura fait de moi un meilleur chercheur qu'à mes débuts.

Je remercie également M. Christian Magné, co-directeur de cette thèse, pour son aide lors du commencement de ce travail.

Je tiens aussi à remercier M. les Professeurs Serge Delrot et Thomas Roitsch d'avoir accepté de prendre le temps de lire ma thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie également M. Olivier Brun, Directeur de Recherche de la société de Champagne Mumm-Perrier-Jouët, et M. Michel Boulay, Directeur de Recherche de la société de Champagne Moët et Chandon, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Cette thèse a été l'occasion de nombreuses collaborations, qui ont toutes permis de faire avancer mes recherches. Merci donc à :

- M. Laurent Panigai et Damien Le Sueur du C.I.V.C. pour la collaboration permanente et fructueuse que nous avons pu avoir pendant ces quelques années. Leurs connaissances ainsi que nos nombreuses rencontres m'ont permis de mieux appréhender le fonctionnement de la vigne.
- M. Eric Duchêne et Mme Nathalie Jaegli de l'I.N.R.A. de Colmar pour leur accueil lors de mes nombreuses visites et pour m'avoir transmis la technique des boutures. Merci notamment à Eric pour ses réponses à mes nombreuses interrogations et pour les nombreuses discussions fructueuses.
- M. Michel Péan, Mlle Séverine Boiry et M. Frédéric Gibiat du C.E.A. de Cadarache de m'avoir accueilli dans leur équipe pendant quelque temps. Ces quelques semaines passées dans le Sud m'ont permis, en plus de profiter du soleil, d'apprendre de nouvelles techniques d'investigation scientifiques.

Ce travail a été réalisé avec l'aide précieuse de stagiaires dont j'ai eu la responsabilité et que je tiens à remercier : dans l'ordre d'apparition, Frédéric Gimenez, Céline Guèze, Éline Perrin, Fanny LaMilza, Héléne Dassimy et Thomas Mineur.

Je remercie les membres du Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes pour leur accueil et la bonne ambiance. Et plus particulièrement, Anne-Marie Hammalian pour son aide administrative, Cathy Hachet pour sa bonne humeur quotidienne et permanente, Fabienne Baillieu, Florence Mazeyrat-Gourbère, Essaïd Aït Barka, Eric Courot, Jean-Louis Druelle et Philippe Laporte pour leurs réponses à mes questions, pour les préparations de cours et les cours eux-mêmes. Les personnes les plus méritantes du laboratoire sont celles qui ont dû me supporter quelque temps dans notre bureau : merci donc à Gaëlle, Anne-Noëlle, Anne-Lise, Frédérique, Dali, Cédric et bien sûr Stéphane pour leur patience et leur bonne humeur. Et plus particulièrement aux 2 pépettes et au P'tit Poney.

Je ne peux oublier tous ces moments de détente partagés le midi et qui m'ont permis de décompresser et de repartir du bon pied ; ceci en grande partie grâce à Florence, Fabienne, Alexandra et Stéphane. Merci plus spécialement à Florence d'avoir été franche, de m'avoir remonté le moral durant mes périodes de doute et pour ses conseils professionnels et personnels.

Merci aussi aux membres actifs de la Bier Hour qui permettent de toujours bien commencer le week-end et plus particulièrement à Elise et Laurent, Ben, Romain (encore désolé pour cette soirée un peu trop arrosée !!!), Hervé, Charlotte et Cyril, Coquine, Béra et Manu.

Plus personnellement, un merci spécial à Régis qui est toujours là : comme quoi les exams, ça a du bon!!! D'Amiens où j'ai passé une partie de mes études, je n'oublie pas la petite et la grande Nénette.

Cette thèse a aussi été pour moi une accumulation de très bons moments partagés avec Karine, Caroline et Jérémie (et Hugo), Manu et Xavier (et Mathilde), Gaëlle, Sabine, Ingrid et Peggy. Je tenais aussi à remercier tous les Semidats pour leur gentillesse et leur accueil, et notamment Séverine et Romain, Cachou et Céline, Ludovic et Laurianne, Laurence, Urbain et David.

Merci aussi à Delphine qui m'a supporté lors de la rédaction de cette thèse et qui m'a toujours soutenu. Sa patience et son amour m'ont beaucoup aidé et je l'en remercie.

Je tiens aussi à rendre hommage à toute ma famille pour son soutien et plus particulièrement à mes sœurs et mes grands-parents. Pour finir, je tiens aussi à exprimer tout mon respect et toute ma gratitude à mon père qui a toujours été là et qui m'a toujours soutenu dans mes études et ma vie : MERCI.

Sommaire



Résumé – Abstract

Liste des abréviations

Liste des publications et communications

Introduction **1**

1. La Vigne	1
1.1. Présentation botanique et historique régionale	1
1.1.1. Présentation botanique	1
1.1.2. Historique régionale	2
1.1.3. Superficie et productions des vignobles	3
1.2. Le cycle de développement	4
1.2.1. Le cycle végétatif	4
1.2.2. Le cycle reproducteur de la vigne	5
1.2.2.1. La formation des inflorescences chez la vigne	6
1.2.2.2. La formation des fleurs chez la vigne	8
1.2.2.3. La phase visible du cycle reproducteur de la vigne	9
 2. La coulure	 10
2.1. La coulure climatique	13
2.1.1. La température	13
2.1.2. Les stress hydriques	15
2.1.3. La lumière	16
2.2. La coulure et le développement des structures reproductrices	17
2.2.1. Le pollen est peu impliqué dans la coulure	17
2.2.2. Les structures femelles sont impliquées dans la coulure	18
2.3. La coulure et les hormones	19
2.3.1. L'éthylène	20
2.3.2. Les cytokinines	21
2.3.3. Les gibbérellines	22
2.3.4. Les auxines	22

2.3.5. Les polyamines	23
2.4. La coulure par détournement trophique	23
2.4.1. La défoliation	23
2.4.2. L'éclaircissage	24
3. Les glucides et la floraison	24
3.1. Les glucides	25
3.1.1. La photosynthèse	25
3.1.1.1. La régulation de la photosynthèse par la lumière	26
3.1.1.2. La régulation de la photosynthèse par la température	27
3.1.1.2.1. Les faibles températures	27
3.1.1.2.2. Les températures élevées	28
3.1.1.2.3. Les températures élevées et la sécheresse	30
3.1.1.3. La régulation de la photosynthèse par le CO ₂	31
3.1.1.4. La régulation de la photosynthèse par les glucides	32
3.1.1.5. La photosynthèse au niveau des organes reproducteurs	33
3.1.1.6. L'évolution de la photosynthèse chez la vigne au cours de la journée et de la campagne	34
3.1.1.6.1. La photosynthèse au cours de la journée	34
3.1.1.6.2. La photosynthèse au cours de la campagne	35
3.1.2. L'amidon, principal glucide de réserve chez la Vigne	36
3.2. Le rôle des glucides	37
3.2.1. Les glucides et les stress	37
3.2.2. Les glucides lors de la reproduction	39
3.2.2.1. L'évocation florale (transition florale)	39
3.2.2.2. Le développement des structures reproductrices	42
3.2.2.3. L'anthèse	44
3.2.2.4. La pollinisation et la fécondation	45
4. Objectifs du travail	46
4.1. Contexte socio-économique	46
4.2. Stratégie adoptée	47
4.3. Choix des cépages	50
4.4. Choix du modèle d'étude	50

Résultats et Discussions **52**

Partie 1. Développement et physiologie des glucides du Gewurztraminer et du Pinot noir cultivés au vignoble **52**

Publication 1 **54**

Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C & Clément C (2004)

Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* **17**(2), 71-79.

Publication 2 **64**

Lebon G & Clément C

Changes in enzyme activities of carbohydrate metabolism during the development of grapevine (*Vitis vinifera* L.) flowers. *Planta* (soumise).

Publication 3 **75**

Lebon G, Brun O, Magné C & Clément C (2005)

Photosynthesis of the grape (*Vitis vinifera* L.) inflorescence. *Tree Physiology* **25**, 627-633.

Partie 2. Expérimentations avec le modèle bouture fructifère et au vignoble **85**

Publication 4 **86**

Lebon G, Duchêne E, Brun O & Clément C (2005)

Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany* **95**(6), 943-948.

Publication 5 **94**

Lebon G & Clément C

Source/sink relations in fruiting cuttings of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during the inflorescence development. *Physiologia Plantarum* (soumise).

Publication 6 **105**

Lebon G, Mineur T, Le Sueur D, Panigai L & Clément C

Impact of reserve restoration on flowering and fruit set in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* (soumise).

Conclusions	116
--------------------	------------

Perspectives	124
---------------------	------------

Références bibliographiques	131
------------------------------------	------------

Résumé - Abstract



Résumé

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est naturellement affectée par l'abscission et la chute des fleurs (coulure) durant le développement des inflorescences. Ce phénomène est dépendant de facteurs physiologiques et environnementaux et tous les cépages y sont sensibles à un degré plus ou moins important. Les causes exactes de la coulure demeurent encore inconnues à ce jour. Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur le métabolisme des sucres dans les inflorescences durant le développement des fleurs en utilisant des cépages de sensibilité différente à la coulure. Nous avons travaillé sur des plantes cultivées au vignoble et nous avons optimisé un système expérimental mimant le développement floral en conditions contrôlées à partir de boutures fructifères.

De nombreux critères de différenciation existent entre le Gewurztraminer (GW), cépage sensible à la coulure et le Pinot noir (PN), cépage peu sensible. Ainsi, les structures reproductrices mâles et femelles de PN se développent plus précocement que celles de GW. De plus, les teneurs en glucides (amidon, saccharose, glucose et fructose) des inflorescences diffèrent entre les deux cépages lors du développement floral, notamment entre les stades 15 et 17, période des méioses polliniques et ovulaires et stades clés dans le développement reproducteur. Les différences constatées se manifestent, entre autres, par la présence d'amidon dans les ovules de PN, contrairement à ceux du GW. La mesure des activités enzymatiques du métabolisme glucidique ont confirmé que, durant la période 15-17, les deux cépages utilisent les sucres de manière différente. Nous avons par ailleurs démontré l'existence d'une photosynthèse nette positive dans les inflorescences des deux cépages, avec des intensités fluctuantes, notamment entre les stades 15 et 17. La tolérance plus importante à la coulure du PN pourrait donc résulter d'un métabolisme glucidique différent, permettant d'éviter toute carence glucidique lors de la méiose en cas de stress environnementaux.

Afin de confirmer l'impact de la physiologie des glucides dans le développement floral, nous avons tenté de perturber le métabolisme carboné en agissant sur la mise en réserve dans les organes pérennes, au vignoble et sur boutures fructifères. Les résultats obtenus démontrent dans les deux cépages l'importance de la mise en réserves de l'été_n sur la floraison de l'année_{n+1} et ce, à la fois sur le nombre d'inflorescences par pied et sur le nombre de fleurs par inflorescence.

Mots clés : coulure, floraison, métabolisme glucidique, photosynthèse, réserves carbonées, structures reproductrices, *Vitis vinifera* L.

Abstract

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is naturally affected by flower abscission in various extents depending on cultivars, meaning that flowers abort during their development. This abscission may be caused by both physiological and environmental factors. In this context, we focused on the analysis of carbon metabolism in the inflorescence during flower development using the sensitive Gewurtzraminer (GW) and the low sensitive Pinot noir (PN) cultivars grow in vineyards. In parallel, we optimized a protocol to obtain flowers under controlled conditions enabling to get inflorescences that mimic vineyard grown inflorescence development.

Numerous differences were detected between GW and PN i.e. male and female organs develop more precociously in PN than in GW. Carbohydrate (starch, sucrose, glucose and fructose) levels in inflorescences differ between the two cultivars during the whole of floral development, especially between stages 15 and 17, corresponding to the key male and female meiosis. At this stage, one of the main differences consist in the presence of starch in the ovules of PN, in the contrary of GW. The assay of carbohydrate related enzyme activities confirmed that between stages 15 and 17 PN and GW metabolize sugars differently. Besides, we have shown that photosynthesis occurs in the inflorescence with different intensities in PN and GW, in particular between stages 15 and 17. The greater tolerance of PN to flower abscission may thus result in different carbohydrate metabolism enabling to avoid sugar starvation during meiosis when environmental stress occurs.

In order to confirm the impact of sugar physiology during flower development, we did perturb carbohydrate metabolism acting on reserve accumulation in perennial organs and using both vineyard grown plants and fruiting cuttings. Our results indicate in both cvs. that reserve restoration during the year n conditions the number of inflorescences per plant and the number of flowers per inflorescence developing during the year $n+1$.

Keywords: carbohydrate metabolism, carbohydrate reserves, coulure, flowering, photosynthesis, reproductive structures, *Vitis vinifera* L.

Liste des abréviations



Liste des abréviations

A	archéspore
A.O.C.	appellations d'origine contrôlée
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP-G	ADP-glucose
AIA	acide indole-3-acétique
AIB	acide indole butyrique
AOA	acide amino-oxyacétique
ATP	adénosine triphosphate
B.I.V.B.	Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne
BAP	6-(benzylamino)-9H purine
C	carbone
C.I.V.A.	Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace
C.I.V.C.	Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne
C.I.V.J.	Comité Interprofessionnel des Vins du Jura
C.N.R.S.	Centre National de la Recherche Scientifique
Ca	concentration atmosphérique de CO ₂
CC	cycle de Calvin
CCC	chlorure 2-chloroéthyl-triméthylammonium
CH	Chardonnay
Ci	concentration intercellulaire de CO ₂
CMM	cellule mère de macrospore
Cmm	cellule mère de microspore
CMSE	cellule mère du sac embryonnaire
CO ₂	dioxyde de carbone
CS	cellules sporogènes
F1,6-biP	fructose 1,6-biphosphate
F6-P	fructose 6-phosphate
G1-P	glucose 1-phosphate
G3P	glycéraldéhyde-3-phosphate
G6-P	glucose 6-phosphate
GA ₃	acide gibbérellique
GPM	grain de pollen mature
GW	Gewurztraminer

Liste des abréviations

HCO ₃ ⁻	bicarbonate
I.N.A.O.	Institut National des Appellations d'Origine
I.N.R.A.	Institut National de la Recherche Agronomique
I.T.V.	Centre Technique Interprofessionnel de la Vigne et du Vin
JGP	jeune grain de pollen
m	microspores
mV	microspores vacuolisées
N	azote
NaCl	chlorure de sodium
NADPH	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NO ₃ ⁻	nitrate
PEP carboxylase	phospho <i>enol</i> pyruvate carboxylase
Pi	phosphate
PM	Pinot Meunier
PN	Pinot noir
PSII	photosystème II
R.V.V.S.	Réseau Vignes et Vins Septentrionaux
Rubisco	ribulose biphosphate carboxylase/oxygénase
S6-P	saccharose 6-phosphate
SD 8339	6-benzylamino-9-(2-tétrahydropyranyl)-9H purine
SE	sac embryonnaire
T	tétrades
TP	triose-phosphate
TS	tissu sporogène
UDP-G	UDP-glucose
UV	ultras-violets
V.D.Q.S.	vins délimités de qualité supérieure

Liste des publications et communications



Publications

- Publication 1 **Lebon G**, Duchêne E, Brun O, Magné C & Clément C (2004)
Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* **17(2)**, 71-79.
- Publication 2 **Lebon G** & Clément C
Changes in enzyme activities of carbohydrate metabolism during the development of grapevine (*Vitis vinifera* L.) flowers. *Planta* (soumise).
- Publication 3 **Lebon G**, Brun O, Magné C & Clément C (2005)
Photosynthesis of the grape (*Vitis vinifera*) inflorescence. *Tree Physiology* **25**, 627-633.
- Publication 4 **Lebon G**, Duchêne E, Brun O & Clément C (2005)
Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany* **95(6)**, 943-948.
- Publication 5 **Lebon G** & Clément C
Source/sink relations in fruiting cuttings of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during the inflorescence development. *Physiologia Plantarum* (soumise).
- Publication 6 **Lebon G**, Mineur T, Le Sueur D, Panigai L & Clément C
Impact of reserve restoration on flowering and fruit set in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* (soumise).

Communications orales

- **Dans des congrès internationaux à comité de lecture**

Lebon G, Magné C, Brun O & Clément C (juin 2004)

Involvement of photosynthesis in the achievement of reproduction in grapevine.

7th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Davis, U.S.A.

Lebon G, Magné C, Brun O & Clément C (juillet 2003)

Carbohydrate content and sexual structure development in grapevine (*Vitis vinifera* L.).

Relation with flower and fruit drop.

1st International Symposium on Grapevine – Growing, Commerce and Research, Lisbonne, Portugal.

- **Dans des manifestations nationales**

Lebon G, Magné C, Brun O, Le Sueur D, Panigai L & Clément C (avril 2004)

Réserves et floraison chez la Vigne : rôle des glucides.

3^{ème} colloque du Réseau Vigne et Vins Septentrionaux, Colmar.

Lebon G, Magné C & Clément C (avril 2002)

Floraison et glucides chez la Vigne (*Vitis vinifera* L.). Relation avec le phénomène de coulure.

2^{ème} colloque du Réseau Vigne et Vins Septentrionaux, Reims.

Présentations de posters dans des congrès internationaux

Lebon G & Clément C (août 2004)

Correlation between the development of reproductive structures and the carbohydrate content in inflorescences of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) cvs.

18th International Congress on Sexual Plant Reproduction, Beijing, Chine.

Lebon G, Magné C, Brun O & Clément C (juin 2004)

Carbohydrate content in inflorescences of grapevine (*Vitis vinifera* L.) and sexual structure development in relation with flower and fruit drop.

7th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Davis, U.S.A.

Lebon G, Magné C, Brun O & Clément C (septembre 2003)

Source/sink relation in grapevine cuttings during flowering.

International Meeting on Phloem Transport, Bayreuth, Allemagne.

Lebon G, Brun O, Magné C & Clément C (juin 2003)

Carbohydrate content and sexual structure development in grapevine (*Vitis vinifera* L.) in relation with flower and fruit drop.

7th International Symposium of Enology, Bordeaux, France.

Introduction



Tableau 1. Différences entre les genres *Vitis* et *Muscadinia* (Mullins et al. 1992).

	<i>Vitis</i>	<i>Muscadinia</i>
Lenticelles	absentes	présentes
Vrilles	fourchues	simples
Graines	ovoïdes, chalaze lisse	allongées, chalaze plissée
Moelle	discontinue	continue
Phellogène	profond	sous-épidermique
Phloème	tangentiel	radial
Nombre de chromosomes	2n = 38	2n = 40
Nombre d'espèces identifiées	59	3

1. La Vigne

1.1. Présentation botanique et historique régionale

1.1.1. Présentation botanique

La vigne, plante angiosperme dicotylédone, est une liane de la famille des *Vitaceae*, anciennement famille des *Ampelideae* (Planchon 1887). Cette famille, associée aux familles des *Rhamnaceae* et des *Leeceae*, forme l'ordre des Rhamnales (Chadefaud et Emberger 1960). Les *Vitaceae* sont, pour la plupart, des lianes ligneuses ou herbacées, ainsi que des arbustes à tiges sarmenteuses. Morphologiquement, elles sont caractérisées par la présence de vrilles ou d'inflorescences opposées aux feuilles. L'évolution de cette famille aurait pour origine un ancêtre asiatique similaire au genre *Cissus* (Lavie 1970). La classification de Planchon (1887) propose une systématique des *Vitaceae* composée de 10 genres. Ces genres sont caractérisés par des fleurs pentamères (excepté le genre *Tetrastigma*) et un nombre de chromosomes $2n = 40$, à l'exception du genre *Vitis* chez lequel $2n = 38$.

Le genre *Vitis* comprend environ 60 espèces localisées principalement dans les zones tempérées de l'hémisphère nord (Asie, Amérique et Europe). Sa classification est particulièrement difficile du fait de sa répartition géographique. Il est divisé en 2 sous-genres, *Euvitis* et *Muscadinia* (Planchon 1887). Ces 2 sous-genres sont numériquement différents : *Muscadinia* regroupe 3 espèces cultivées au Mexique et aux Etats-Unis alors qu'*Euvitis* comprend environ 40 espèces localisées en Asie orientale et en Amérique du Nord. En Europe et Asie occidentale, seule l'espèce *Vitis vinifera* L. représente le sous-genre *Euvitis*. Des différences morphologiques, anatomiques et génétiques existent entre ces 2 sous-genres (Tableau 1). Néanmoins, leur séparation n'est pas unanimement acceptée bien qu'il n'existe pas d'hybrides naturels et que l'hybridation artificielle entre 2 espèces de ces sous-genres est complexe, notamment à cause du nombre de chromosomes. En effet, le sous-genre *Euvitis* possède $2n = 38$ chromosomes et le sous-genre *Muscadinia* $2n = 40$. De plus, des barrières de croisement entre ces deux sous-genres existent comme les barrières écologiques (habitats trop différents) et les barrières phénologiques (décalage dans la floraison) : toutes ces différences expliquent la difficulté de croisement entre les espèces de ces deux sous-genres. Parmi le sous-genre *Euvitis*, aucune barrière génétique n'est présente et les espèces sont interfertiles.

Les cépages (ou cultivars) sont les variétés de l'espèce *Vitis vinifera* L. résultant de croisements naturels ou de sélections par les viticulteurs. Dans le genre *Vitis*, l'espèce *Vitis vinifera* L. est la plus répandue avec environ 10 000 cépages connus (Mullins *et al.* 1992). À l'origine dioïque, la plupart des cépages de *Vitis vinifera* L. est actuellement hermaphrodite, ce qui en a fait une plante plus facilement cultivable (Mullins *et al.* 1992). De plus, le nombre de cépages actuels est dû aux nombreux croisements naturels ainsi qu'aux diverses sélections des viticulteurs et chercheurs. Tous les cépages de cette espèce, bien qu'interfertiles, ont une morphologie et une répartition géographique différentes. Cette répartition est autant due aux spécificités des cépages qu'aux travaux de sélection des hommes (Mullins *et al.* 1992).

1.1.2. Historique régionale

Les plantes du genre *Cissus*, considérées comme les ancêtres des vignes actuelles, étaient présentes en France et jusqu'aux zones polaires à l'ère Tertiaire. À cette époque, les vignes du genre *Vitis* se sont développées, puis durant les périodes glaciaires du Quaternaire, elles se sont surtout acclimatées aux régions plus tempérées comme le pourtour méditerranéen, la mer Noire et le Moyen-Orient (Simon *et al.* 1977).

Bien que présente en France depuis l'ère Tertiaire, la vigne n'a été cultivée qu'après l'importation de vin de Grèce et d'Italie. Sa culture a d'abord débuté près de Marseille et dans le Languedoc vers 125 avant J.C. Ce n'est qu'au I^{er} siècle après J.C. que la viticulture a atteint la vallée du Rhône et le Bordelais, au II ou III^e siècle après J.C. la Bourgogne et au IV^e les bords de la Loire, la Champagne et la vallée de la Moselle (Johnson 1989). Les religieux permirent un développement important de la viticulture et son expansion grâce au besoin de vin pour la messe (Mullins *et al.* 1992). Ainsi, de nombreux religieux devinrent viticulteurs et vinificateurs. L'appellation "vins de Champagne" fut énoncée la première fois sous Henri IV quand les anciens "vins d'Ay" reçurent une distinction particulière parmi les "vins de France". Cependant, les vins de Champagne n'étaient pas pétillants à cette époque. Souvent attribué à Don Pérignon, le pétillant des vins était déjà connu à Londres dès 1663 où des vins de Champagne pétillants étaient bus (Johnson 1989). Enfin, au début du XX^e siècle, de nombreuses lois et décrets furent publiés afin de contrôler la circulation des vins et de fixer les limites de production du Champagne. La Première Guerre Mondiale provoqua une baisse de l'activité vinicole champenoise. Celle-ci redevint ensuite très active et sujette à de

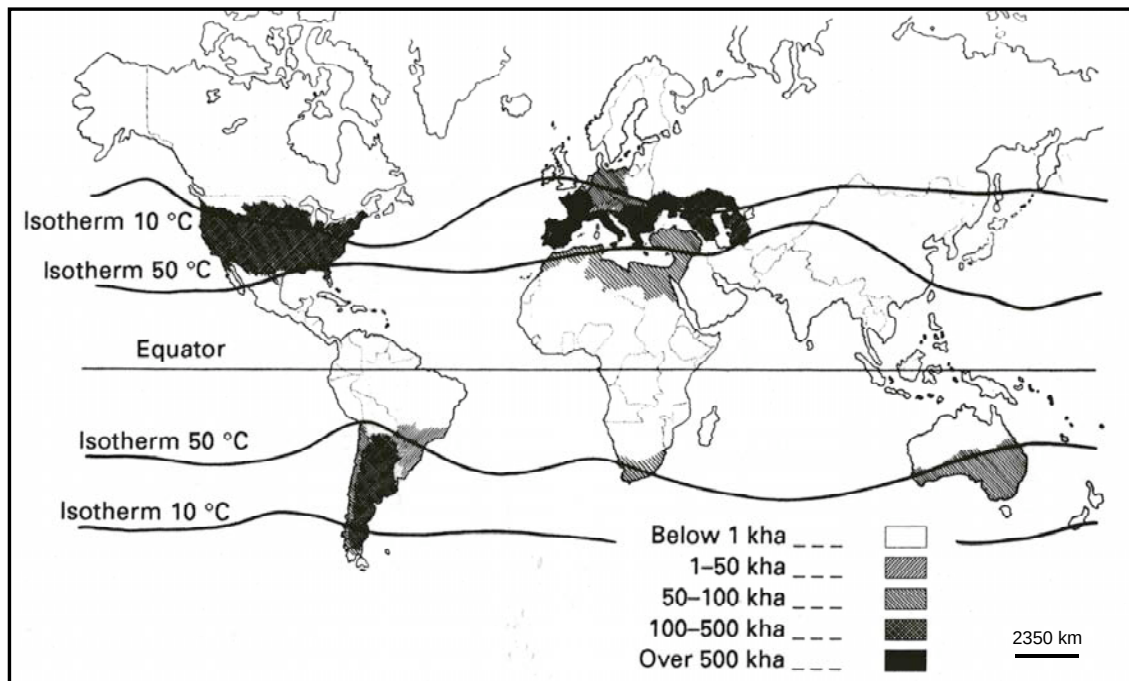


Figure 1. Répartition mondiale du vignoble (Mullins *et al.* 1992).

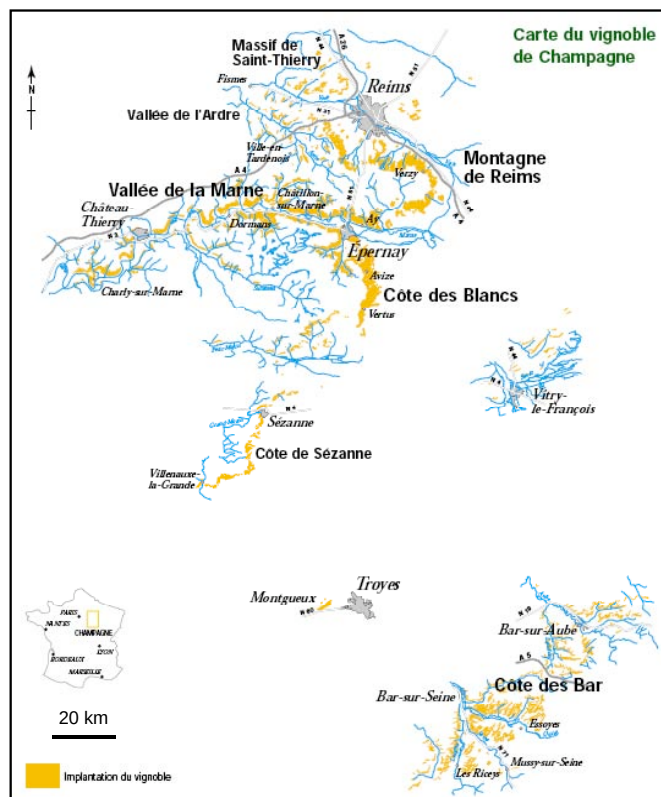


Figure 2. Principales régions viticoles de la région champenoise (<http://www.champagne.fr/files/pdf-fr/atlas.pdf>).

nouvelles dérives qui furent limitées par la création des Appellations d'Origine Contrôlée (A.O.C) en 1935 et des Vins Délimités de Qualité Supérieure (V.D.Q.S.) en 1949 (Johnson 1989).

1.1.3. Superficie et productions des vignobles

De nos jours, la superficie mondiale des vignobles s'étend sur 7,9 millions d'hectares et est toujours en progression avec l'augmentation des surfaces en Australie (Dutruc-Rosset 2001). L'augmentation de cette surface s'explique par l'augmentation des températures à la surface du globe. En effet, la vigne est capable de se développer dans une région si celle-ci subit une période sèche suffisamment longue et si les températures au printemps sont supérieures à -5°C. L'optimum de température pour la culture de la vigne se situe entre 21 et 32°C selon les régions (Kriedemann 1968 ; Stoev et Slavtcheva 1982 ; Downton *et al.* 1987). Le vignoble mondial est donc principalement localisé dans les hémisphères Nord et Sud compris entre les isothermes 10°C et 50°C (Mullins *et al.* 1992) (Fig. 1).

Le vignoble français est le 2^{ème} européen en terme de superficie avec 917 000 hectares (Aigrain 2002) et sa production correspond à 20% de la production mondiale. Les vignobles du Sud de la France produisent presque la moitié des vins français et 10% de la production mondiale. Le vignoble champenois représente environ 3 % des superficies consacrées à la viticulture en France et est divisé en 5 zones de production : la Montagne de Reims, la Vallée de la Marne, la Côte des Blancs, la Côte de Sézanne et la Côte des Bar (Fig. 2). L'ensemble de ces zones couvre une surface supérieure à 30 000 hectares. Le Chardonnay, le Pinot Meunier et le Pinot noir sont les 3 principaux cépages cultivés pour la fabrication du champagne : la culture de chaque cépage représente environ 1/3 de la surface totale. Cependant, d'autres cépages comme Arbanne et Petit Meslier peuvent être cultivés et bénéficier de l'appellation "Champagne".

En Champagne, le chiffre d'affaires de la profession en 2004 était de 3,6 milliards d'euros pour 300 millions de bouteilles vendues. Ces ventes de Champagne profitent à l'ensemble de l'économie locale: cette activité rassemble en effet la profession viti-vinicole et d'autres secteurs d'activités tels que la fabrication de bouteilles, de bouchons, l'emballage... De plus, le nombre de bouteilles vendues ne cesse d'augmenter depuis 1945 avec une hausse

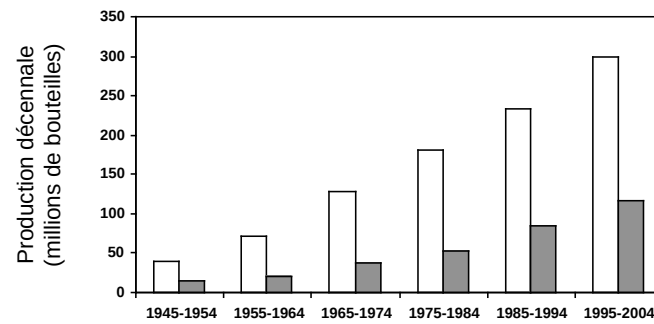


Figure 3. Part à l'exportation et production annuelle moyenne de Champagne (L'Union 2005).

La production annuelle moyenne est représentée par les barres blanches et la part à l'exportation par les barres grises. Les données sont calculées en moyennes décennales.

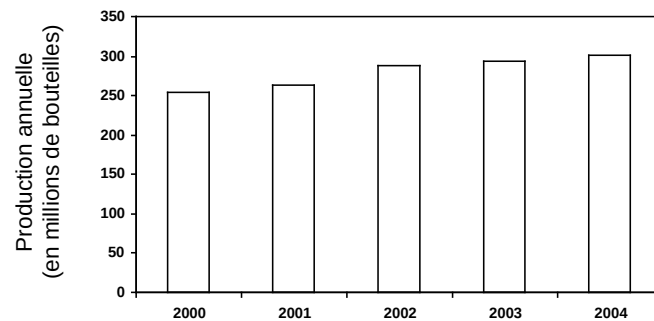


Figure 4. Production annuelle en Champagne de 2000 à 2004 (L'Union 2005).

de la part des exportations (Fig. 3) et a même augmenté de 50 millions de bouteilles (soit 20%) depuis “le passage au 21^{ème} siècle” (Fig. 4).

1.2. Le cycle de développement

En 1952, Baggiolini a décomposé le développement de la vigne en 16 stades phénologiques désignés par des lettres (A à P). La tendance fut ensuite d’affiner la description du développement en subdivisant les stades existants afin de détailler plus précisément ces derniers. Ceci amena Eichhorn et Lorenz (1977) à proposer une classification à 22 stades repères codée par un système à 2 chiffres (de 00 à 50) (Fig. 5). Bien que précises, ces classifications sont uniquement basées sur des critères morphologiques externes et ne tiennent donc pas compte de l’évolution du développement interne, telle que le stade d’avancement des structures reproductrices.

En tant qu’espèce pérenne, le développement de la vigne est entrecoupé d’une période de repos correspondant, dans l’hémisphère Nord, à l’hiver. Un cycle annuel est la superposition du cycle végétatif et du cycle reproducteur (Fig. 6). En Champagne, sur les 25 dernières années, les cycles végétatif et reproducteur débutent mi-avril par le débourrement des bourgeons, se terminent mi-septembre (aux vendanges) pour le cycle reproducteur et mi-novembre pour le cycle végétatif (Fig. 6).

1.2.1. Le cycle végétatif

Après 4 mois de repos hivernal, la vigne assure simultanément le développement et la croissance de ses organes végétatifs (tiges, feuilles, racines) et reproducteurs (inflorescences puis grappes) à partir de ses seules réserves. Durant l’hiver, le bourgeon est en dormance et est reconnaissable par son “œil” presque entièrement recouvert par deux écailles brunâtres ; ce bourgeon d’hiver est le premier stade des classifications (stade A-01) (Fig. 5). À la fin de l’hiver, lorsque la température du sol s’élève, la vigne entre en activité (Huglin 1986). Les racines sont alors stimulées : elles absorbent l’eau et mobilisent les réserves accumulées l’année précédente dans les parties pérennes sous forme d’amidon (Huglin 1986). La mobilisation des réserves carbonées est visualisée par la présence de glucides solubles dans la sève, principalement de glucose (0,4 mM) et de fructose (0,15 mM) (Glad 1992 ; Glad *et al.*

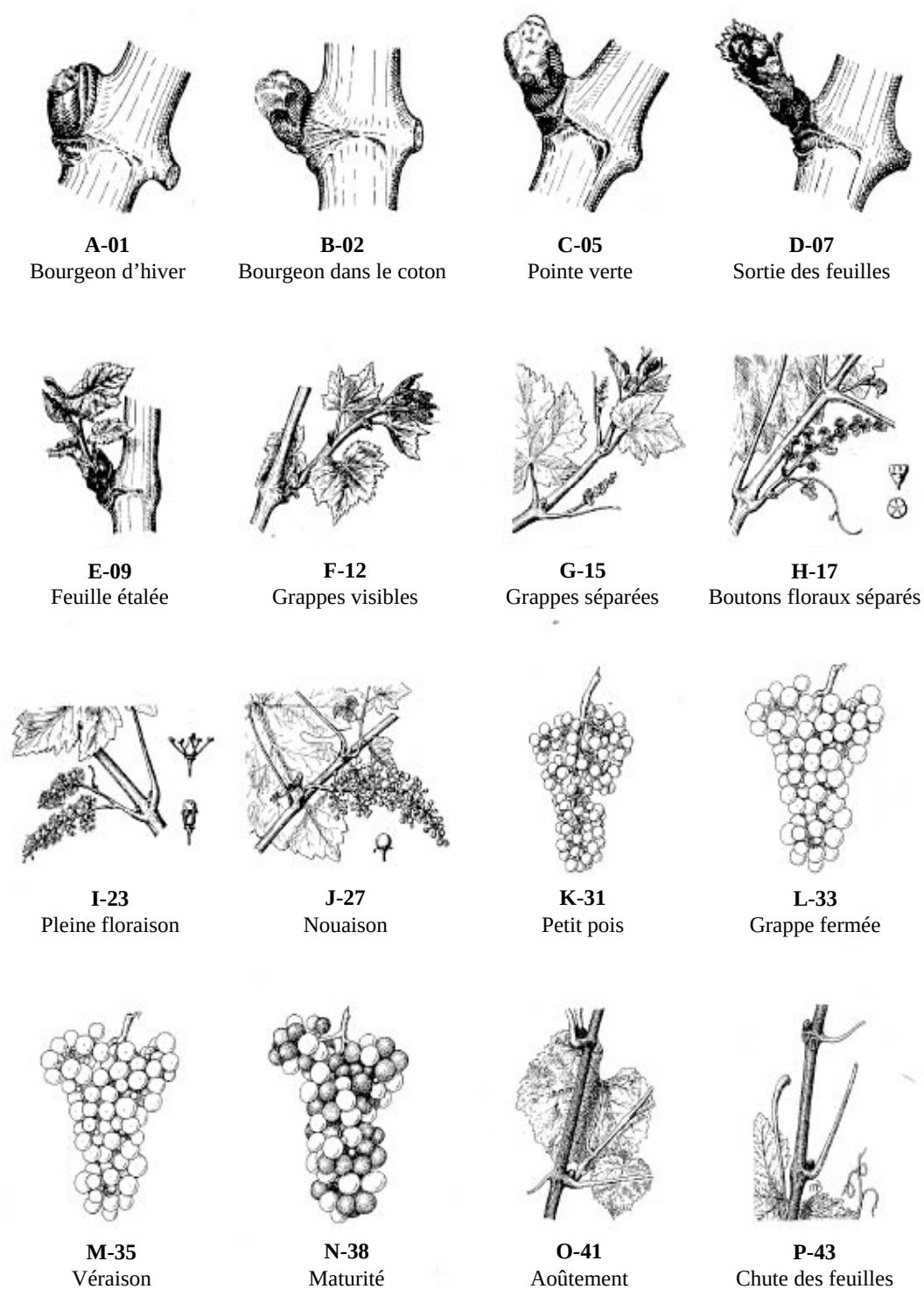


Figure 5. Stades repères de la vigne selon la classification de Baggiolini (1952) pour les lettres et selon Eichhorn & Lorenz (1977) pour les chiffres.

1992). En absence de végétation, la sève brute s'écoule par les plaies de taille et favorise leur cicatrisation : c'est le phénomène des pleurs.

Vers la mi-avril, les bourgeons reprennent leur développement stoppé durant l'hiver et gonflent à l'intérieur des écailles et de la bourre. Ce gonflement, appelé débourrement, est le départ de la reprise d'activité du bourgeon et correspond au stade bourgeon dans le coton (B-02) (Fig. 5). L'œil continue à gonfler et à s'allonger jusqu'à laisser apparaître la jeune pousse, ou pointe verte, à travers la bourre (stade C-05) (Fig. 5). Les feuilles, dont la base est encore protégée par la bourre, apparaissent et forment des rosettes (stade D-07) (Fig. 5). Alors que la bourre est rejetée hors des écailles, les premières feuilles se dégagent totalement (stade E-09) et présentent déjà les caractères spécifiques à chaque cépage (Fig. 5). Les feuilles se développent ensuite jusqu'au mois d'août. Pendant leur croissance, les feuilles, d'abord hétérotrophes, deviennent autotrophes vis-à-vis du carbone. Quand les feuilles atteignent la moitié de leur taille finale, leur activité photosynthétique devient excédentaire (Koblet 1969) de puits (utilisatrices de réserves), elles deviennent alors sources (exportatrices de glucides). À l'échelle de la plante, le bilan de la nutrition carbonée montre un basculement entre l'hétérotrophie (utilisation des réserves prioritaire) et l'autotrophie (utilisation des photoassimilats) environ 2-3 semaines avant la floraison (Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004b). À partir de cette période, les feuilles âgées peuvent assurer leur propre nutrition ainsi que celle des jeunes feuilles (encore hétérotrophes), des organes reproducteurs, des racines et des tiges en croissance. Elles contribuent également à la reconstitution des réserves au niveau des organes pérennes (racines, cep, sarments) (Zapata 1998). Du stade F-12 (grappes visibles) au stade O-41 (aoûtement), les classifications ne se basent plus sur l'aspect des feuilles mais sur le développement des inflorescences puis des grappes. Bien que s'amorçant dès la véraison (stade M-35), la lignification des sarments principaux n'est vraiment visible qu'après la maturation des baies, c'est l'aoûtement (stade O-41) (Fig. 5). Enfin, courant novembre, les feuilles jaunissent, brunissent puis chutent progressivement (stade P-43) (Fig. 5).

1.2.2. Le cycle reproducteur de la vigne

Chez la vigne, le développement reproducteur s'effectue sur 2 années successives et est interrompu pendant l'hiver. Les inflorescences sont en effet initiées durant l'été $n-1$, puis leur développement s'arrête en hiver lorsque les primordia entrent en dormance (Mullins *et al.*

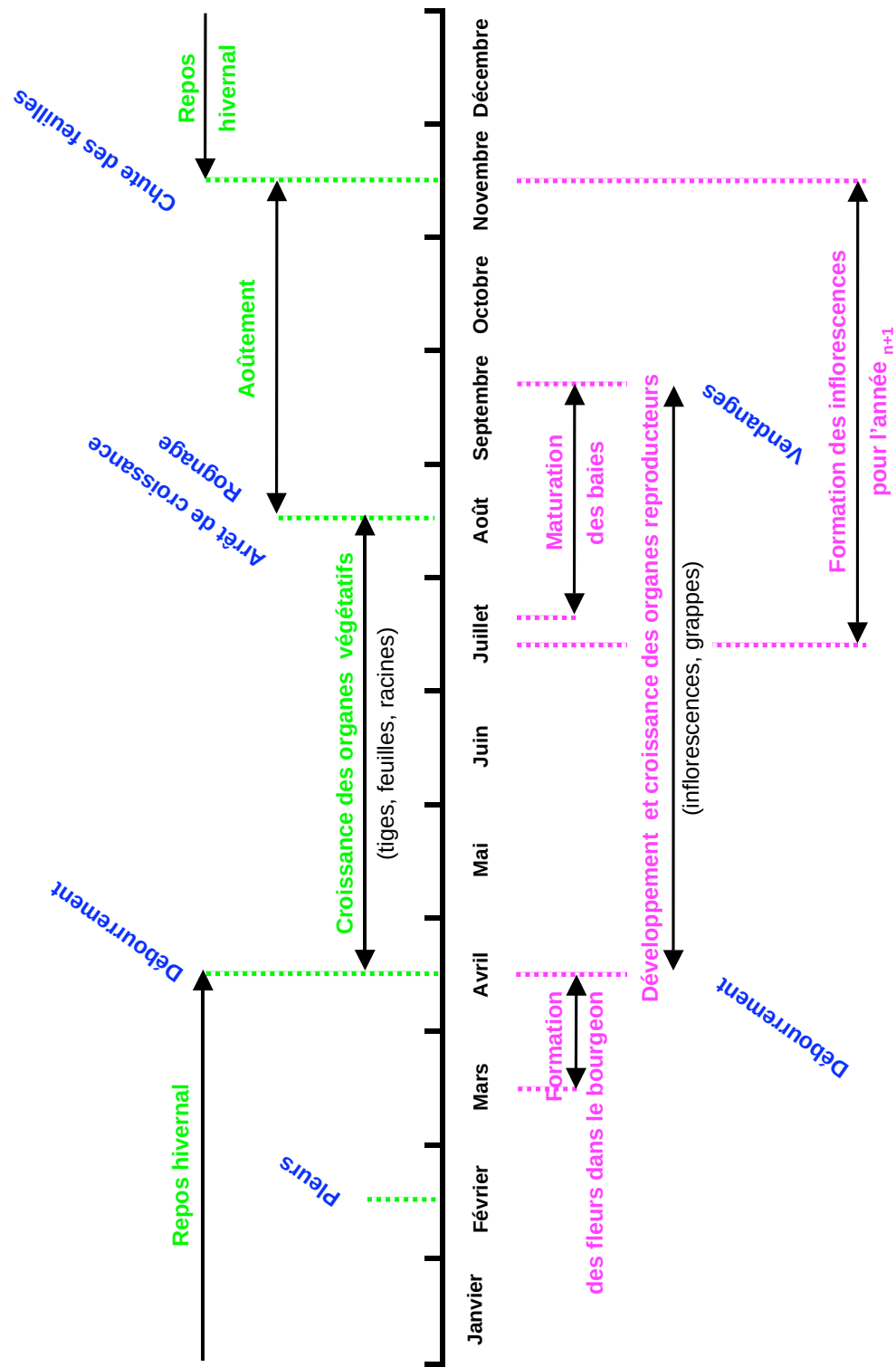


Figure 6. Le cycle de développement de la vigne en Champagne.

1992 ; Boss *et al.* 2003). La floraison peut ainsi être divisée en 2 périodes séparées par une phase de dormance :

- la 1^{ère} période a lieu lors de l'année $n-1$ et concerne des événements non visibles se produisant à l'intérieur des bourgeons pendant l'été. La formation du primordium par l'apex des bourgeons latents précède le développement de ce primordium indéterminé en primordium inflorescentiel ou vrillaire. Les bourgeons latents entrent alors en dormance ;
- la seconde période a lieu l'année n et concerne des événements visibles. La formation des fleurs débute peu avant le débourrement, puis leur développement jusqu'à l'anthèse composent cette étape.

1.2.2.1. La formation des inflorescences chez la vigne

Dans les régions septentrionales, l'initiation des inflorescences de vigne a lieu l'été précédant la floraison (année $n-1$). Cependant, la période à laquelle elle débute est très variable selon les conditions environnementales du lieu de culture (Tableau 2) : dans certains cas, comme pour le Shiraz en Australie (Srinivasan et Mullins 1981) et *Vitis riparia* au Canada (Gerrath et Posluszny 1988), elle peut même ne débiter qu'au printemps.

Une des caractéristiques de la vigne est la formation simultanée des primordia végétatifs et reproducteurs sur le même apex (Boss *et al.* 2003). Selon le cépage, l'apex du bourgeon latent produit 3 à 8 primordia foliaires puis se divise en 2 parties égales. La partie opposée au primordium foliaire le plus jeune est une protubérance méristématique, appelée *Anlage* ou primordium indéterminé. Cette étape est la 1^{ère} dans le développement des primordia indéterminés et donc la 1^{ère} indication de la mise en place des inflorescences (Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Mullins *et al.* 1992 ; Boss et Thomas 2002 ; Boss *et al.* 2003). La formation des premiers *Anlagen* (primordia indéterminés) a lieu au milieu de l'été et se produit dans les bourgeons latents présents à la base des rameaux récemment aoûtés (Mullins *et al.* 1992). Les *Anlagen* apparaissent ensuite progressivement dans les bourgeons latents de la base à la pointe des rameaux, en parallèle de l'aoûttement de ces rameaux (Mullins *et al.* 1992). Les méristèmes indifférenciés poursuivent leur développement avec la formation d'une bractée (dépression distale des *Anlagen*). Cette bractée s'agrandit en formant une structure en col (Mullins *et al.* 1992). L'apex des *Anlagen* se divise ensuite pour former 2 ramifications appelées bras : le bras intérieur est le plus proche de l'apex alors que le bras extérieur est proche de la bractée. Cette étape est capitale pour le développement reproducteur de la vigne

Tableau 2. Période de l'initiation florale chez différents cépages et espèces.

Cépages/espèces	Lieu	Période de l'initiation inflorescentielle	Auteurs
<i>Vitis vinifera</i> L.	Ankara (Turquie)	Août	Aglaoglu (1971)
<i>Vitis</i> spp.	différents	Avant la dormance	Allweldt et Balkema (1965)
<i>Vitis riparia</i>	Ontario (Canada)	Variable (normalement au printemps)	Gerrath et Posluszny (1988)
<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Shiraz	Sydney (Australie)	Printemps	Srinivasan et Mullins (1981)

car les méristèmes indéterminés à 2 ramifications ont la potentialité de produire des primordia inflorescentiels, vrillaires ou caulinares (Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). Cependant, la formation de pousses à partir du méristème indifférencié est rare.

La nature future du méristème indéterminé dépend de nombreux signaux internes (hormones, réserves glucidiques,...) et externes (lumière, température) (Srinivasan et Mullins 1981). Les gibbérellines interviennent ainsi dans le développement des méristèmes indéterminés (Srinivasan et Mullins 1980b). L'acide gibbérellique GA₃ (de 3 à 30 µM) stimule ainsi l'initiation des primordia indéterminés et leur développement en vrille (Srinivasan et Mullins 1980b) alors que la benzyl-aminopurine, une cytokinine, induit la ramification des primordia indéterminés (Srinivasan et Mullins 1978) et le développement d'inflorescences (Srinivasan et Mullins 1980a). Chez la vigne, les vrilles sont généralement considérées comme des organes végétatifs (et donc stériles), bien qu'elles puissent être jugées comme des organes potentiellement fertiles (Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). En effet, les vrilles et les inflorescences ont la même origine méristématique, le primordium indéterminé ou *Anlage*, et seuls les stimuli induisent le devenir stérile en vrilles ou le devenir fertile en inflorescences. De plus, de jeunes vrilles cultivées *in vitro* avec la cytokinine BAP (6-(benzylamino)- 9H purine) ou la zéatine riboside se ramifient et se développent en inflorescences : le développement du calice (ensemble des sépales) et de la corolle (ensemble des pétales) est normal mais les fleurs ne possèdent pas d'ovules et d'anthères fonctionnels (Srinivasan et Mullins 1978, 1979). Cependant, des applications de BAP (de 50 à 200 µM) sur la pointe des vrilles récemment devenues inflorescences provoquent leur floraison et leur nouaison avec des pépins viables (Srinivasan et Mullins 1978, 1979).

Les méristèmes inflorescentiels sont formés suite à l'importante ramification des méristèmes indéterminés : le bras interne se divise et produit plusieurs primordia globuleux et ramifiés qui formeront le corps de l'inflorescence (Scholefield et Ward 1975). Le degré de ramification du bras interne diminue progressivement dans une direction acropète (de la base vers l'apex) et donne ainsi une forme conique au primordium inflorescentiel (Srinivasan et Mullins 1981). Le bourgeon latent entre en dormance après la formation de 1 à 3 méristèmes inflorescentiels par bourgeon selon le cépage (Pratt 1971). Durant la dormance, les bourgeons latents sont donc constitués d'inflorescences et de feuilles immatures (May 2000).

Les bourgeons latents et les prompts bourgeons sont les 2 types de bourgeons de la vigne (Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). Dans chacun de ces bourgeons, 3 primordia indéterminés se développent. La principale différence entre ces bourgeons est l'entrée en dormance des bourgeons latents durant l'hiver et le débourrement des prompts bourgeons l'année de leur formation (Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). Cette distinction induit les devenir différents des primordia indéterminés. Les primordia indéterminés des bourgeons latents se développent ainsi majoritairement en primordia inflorescentiels alors qu'ils se développent principalement en vrilles si le bourgeon se développe dans l'année (prompt bourgeon) (Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). Dans les bourgeons latents, la différenciation de 3 à 8 primordia foliaires (selon le cépage) précède la formation des premiers primordia indéterminés (Boss *et al.* 2003). Ensuite, un primordia foliaire se développera à l'opposé de chaque primordia indéterminé (Boss et Thomas 2002 ; Boss *et al.* 2003).

1.2.2.2. La formation des fleurs chez la vigne

Dans les régions septentrionales, le débourrement a lieu au printemps suivant la formation des inflorescences (Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). Peu avant, quand les bourgeons latents sont activés, les inflorescences immatures reprennent leur différenciation avec la formation des organes floraux (Agaoglu 1971). La différenciation des fleurs à partir des méristèmes inflorescentiels des bourgeons latents est différente selon le cépage avec des primordia floraux formés par groupe de 3 ou 5. En outre, le développement des différentes parties des fleurs (sépalés, pétales, étamines et pistil) est simultanée dans le même primordium inflorescentiel (Mullins *et al.* 1992). Cependant, dans chaque fleur, les sépalés sont les premières structures à se développer. Les pétales puis les étamines et enfin le pistil se développent ensuite les uns après les autres (Mullins *et al.* 1992).

Le primordium des sépalés est le premier visible. Le calice (ensemble des sépalés) prend la forme d'une bague et masque éventuellement le développement des sépalés individuels (Gerrath 1993). Les premières étapes du développement floral ont lieu peu avant le débourrement. À ce moment, les sépalés protègent la fleur, puis dégènèrent avant que les inflorescences soient visibles : la protection des organes reproducteurs est alors assurée par les pétales.

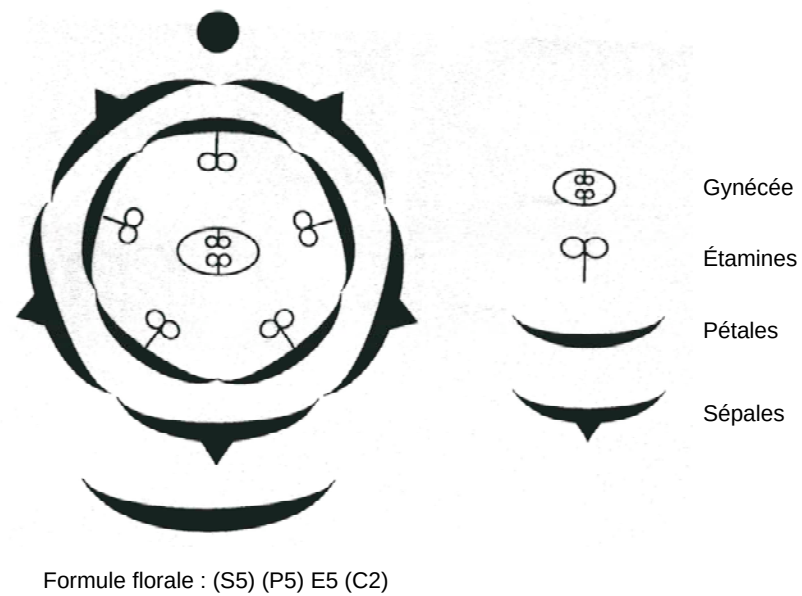


Figure 7. Diagramme floral de la vigne (Gerrath 1993).

Les pétales et les étamines se développent à partir de leurs primordia respectifs (Gerrath et Posluszny 1988). Lors de leur croissance, les pétales traversent le calice, se soudent à partir de leur sommet et se joignent pour former la corolle. Chez la vigne, la corolle est appelée capuchon (Srinivasan et Mullins 1976, 1981). Cette structure protégera les organes reproducteurs jusqu'à l'anthèse, puis se séparera du reste de la fleur par l'action des filaments staminaux (Pratt 1971 ; Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Gerrath 1993 ; Boss *et al.* 2003).

Le gynécée (ensemble des carpelles de la fleur) provient de la fusion de 2 carpelles formant un méristème en boucle (Agaoglu 1971 ; Considine et Knox 1979 ; Posluszny et Gerrath 1986). La croissance apicale de ce méristème forme le pistil composé d'un petit style et d'un stigmate discoïde (Considine et Knox 1979). Deux loges séparées par un septum se forment au niveau du gynécée (Agaoglu 1971 ; Gerrath et Posluszny 1988). Dans chaque loge, 2 ovules anatropes se développent au niveau du septum. De plus, des nectaires lobulés peuvent se former à la base des ovaires.

Chez la vigne, la fleur est donc composée d'un calice à 5 sépales jointes à leur base et d'une corolle à 5 pétales soudés : le calice et la corolle sont alternes (Pratt 1971 ; Gerrath 1993). Au niveau des structures reproductrices, la fleur contient 5 étamines opposées aux pétales et un pistil à 2 carpelles soudés (Pratt 1971 ; Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Gerrath 1993). La fleur de vigne est donc pentamère et a pour formule florale (S5) (P5) E5 (C2) (Fig. 7).

1.2.2.3. La phase visible du cycle reproducteur de la vigne

Après l'étalement des premières feuilles (stade E-09), les inflorescences apparaissent (stade F-12), puis se séparent grâce à l'allongement des entre-nœuds (stade G-15) (Fig. 5). Les fleurs composant les inflorescences sont encore agglomérées. Ensuite, les boutons floraux se séparent (stade H-17) et les pédicelles des fleurs s'allongent, ce qui permet de différencier chaque fleur individuellement (Fig. 5).

La floraison débute mi-juin (stade I-19) et dure environ une semaine (Fig. 5). Lors de la floraison, les capuchons floraux (pétales soudés entre eux) se détachent du réceptacle floral sous la poussée des filaments staminaux (Gerrath 1993 ; Boss *et al.* 2003). La chute de la corolle met à nu l'ovaire et permet l'étalement des étamines autour de lui. La floraison est

Tableau 3. Teneurs en glucides et acidité des baies à maturité.

Les teneurs en glucides correspondent à l'addition des concentrations de glucose, fructose et saccharose.

Cépages	Teneurs en glucides	Acidité	Auteurs
Dolcetto	116 g.L ⁻¹		Coombe <i>et al.</i> 1987
Cabernet Sauvignon	520 mg.g ⁻¹ MS	35 mg.g ⁻¹ MS	Gény <i>et al.</i> 1998
Cabernet franc	213,8 g.L ⁻¹	3 g équivalent H ₂ SO ₄ .L ⁻¹	Matthews et Anderson 1998
Shiraz	247 g.L ⁻¹		Coombe et McCarthy 2000
Cabernet Sauvignon	191,1 g.L ⁻¹	1,19 g équivalent H ₂ SO ₄ .L ⁻¹	Ollat <i>et al.</i> 2002
Chardonnay	230,5 g.L ⁻¹	7,4 g équivalent H ₂ SO ₄ .L ⁻¹	Duchêne <i>et al.</i> 2003
Gewurztraminer	237,2 g.L ⁻¹	4,2 g équivalent H ₂ SO ₄ .L ⁻¹	Duchêne <i>et al.</i> 2003
Pinot noir	212 g.L ⁻¹	6,3 g équivalent H ₂ SO ₄ .L ⁻¹	Duchêne <i>et al.</i> 2003

décomposée en plusieurs étapes en fonction de la proportion de capuchons floraux tombés : on parle ainsi de pleine fleur (stade I-23) et de fin de floraison (stade I-25) quand respectivement 50% et 80% des capuchons sont tombés.

La nouaison (stade J-27) correspond au début du développement de l'ovaire fécondé. Pendant cette période, les étamines flétrissent et tombent, ou restent fixées à leur point d'attache (Fig. 5). Ensuite, les fruits grossissent jusqu'à atteindre la taille d'un petit pois (stade K-31) : les grappes pendent alors progressivement sous le poids des baies (Fig. 5). Ensuite, les baies grossissent et se touchent, ce qui induit la fermeture de la grappe (stade L-33) (Fig. 5). La véraison (stade M-35) commence lorsque les baies s'éclaircissent ou se colorent : cette période correspond au début de l'accumulation de sucres et de la diminution de l'acidité dans les baies et se termine quand toutes les baies ont changé de couleur. Chez les vignes à baies rouges ou noires, la coloration des baies est principalement due aux anthocyanes et chez les vignes à baies blanches ou jaunes, elle est due aux caroténoïdes (carotènes et xanthophylles). Ces composés sont généralement localisés dans les vacuoles des cellules sous-épidermiques (Coombe 1992 ; Mullins *et al.* 1992 ; Coombe et McCarthy 2000 ; Ollat *et al.* 2002). Enfin, de début à fin septembre selon le cépage et le lieu, les baies arrivent à maturité : elles atteignent leur taille maximale et leur taux en sucres et leur acidité sont stabilisés, ce qui permet leur vendange (Coombe 1992 ; Mullins *et al.* 1992 ; Coombe et McCarthy 2000 ; Ollat *et al.* 2002) (Fig. 5). Cependant, les teneurs en glucides et l'acidité des baies à la vendange sont dépendantes des cépages (Tableau 3).

Chez la vigne, la période entre l'initiation des inflorescences et la maturité des baies dure plus d'une année. Durant ce cycle, les stress biotiques (champignons, plantes adventices, ...) et abiotiques (températures basses, pluviométrie importante, ...) peuvent compromettre le développement des fleurs et des baies. Ces différents stress peuvent induire une chute anormalement élevée des fleurs et des baies, c'est **la coulure** (Huglin et Schneider 1998 ; Bessis et Fournioux 1992).

2. La coulure

La coulure est un phénomène connu depuis longtemps et défini pour la première fois par Marès (1868). Cependant, d'autres interprétations de ce phénomène ont introduit une forte

ambiguïté sur la définition de ce terme. Ainsi, plusieurs critères varient d'une explication à une autre.

La première ambiguïté sur la coulure provient des **organes qui la subissent**. Pour Marès (1868), "la plupart des grains de raisins noue aussitôt qu'ils sont fécondés, mais ils ne continuent pas tous à se développer et il en avorte une grande quantité. Ce fait d'avortement après la période de floraison est normal pour un grand nombre de grains bien constitués et noués, désignés par coulure normale". Dans cette définition, seules les jeunes baies sont donc prises en compte. Un siècle plus tard, Rives (1961) décrit la coulure "comme une chute excessive de fleurs et de jeunes fruits. Elle se mesure en déterminant le nombre de baies formées par rapport au nombre de fleurs présentes avant la floraison". Cette fois, l'auteur prend en considération les fleurs et les baies. Plus récemment, la définition de la coulure énoncée par Bessis et Fournioux (1992) a rassemblé les 2 précédentes. Elle la décrit comme le phénomène d'abscission des fleurs et des petites baies provoquant leur chute.

La **période de coulure** est, elle aussi, différente selon les auteurs. Certains considèrent que la coulure a lieu avant la pollinisation (Branas 1957 ; Bessis 1965) et, dans ce cas, la coulure ne concernerait que les fleurs. D'autres jugent qu'elle se termine peu après la nouaison (Marès 1868 ; Stoev 1962), d'où la chute de jeunes fruits. Enfin, une vision plus actuelle situe la période de coulure entre la floraison et peu après la nouaison (Bessis et Fournioux 1992).

Le dernier facteur de divergence entre les nombreuses définitions de la coulure est la **proportion de fleurs ou de fruits qui chutent**. La coulure "normale" fut décrite comme l'avortement d'un grand nombre de grains bien constitués et noués (Marès 1868). *A contrario*, d'autres la jugent comme une chute excessive de fleurs et de jeunes fruits (Rives 1961). Bien qu'il soit question dans les deux cas de chute importante de fleurs et de baies, la coulure est jugée normale ou excessive selon l'auteur. De plus, tous les ans, une proportion plus ou moins importante de fleurs et de baies ne se développe pas et tombe sans que l'on parle de coulure. Une des difficultés se situe dans la limite entre la coulure "normale" (nouaison normale) et une coulure excessive (nouaison plus faible) : ainsi, pour un même taux de nouaison, certains considèrent qu'il y a coulure "normale" et d'autres coulure excessive. En fait, cette proportion est dépendante du cépage considéré car plusieurs cépages soumis aux mêmes conditions environnementales ont des taux de nouaison très différents (Bessis 1965 ; Huglin

Tableau 4. Nombres de fleurs de plusieurs cépages (Huglin et Schneider 1998).

Cépages	Nombre de fleurs	Références
Aramon	1800	Ravaz 1930
Tannat	443	Reynier 1989
Carbernet Sauvignon	375	Reynier 1989
Pinot noir	349	Reynier 1989
Sauvignon	235	Reynier 1989
Riesling	125	Reynier 1989
Merlot	370	Reynier 1989
Chasselas	258	Reynier 1989
Cabernet franc	216	Reynier 1989
Semillon	257	Reynier 1989
Ugni blanc	401	Reynier 1989
Cot	269	Reynier 1989
Gewurztraminer	123	Huglin et Schneider 1998
Riesling	198	Huglin et Schneider 1998
Sylvaner	128	Huglin et Schneider 1998
Chasselas blanc	195	Huglin et Schneider 1998
Auxerrois blanc	193	Huglin et Schneider 1998
Pinot gris	145	Huglin et Schneider 1998
Pinot blanc	234	Huglin et Schneider 1998

et Schneider 1998). La proportion de fleurs et de fruits qui chutent dépend aussi du nombre de fleurs à la floraison : selon les cépages, ce nombre est très variable allant de 100 à 1000 (Huglin et Schneider 1998). En France, le nombre de fleurs par inflorescence varie de 100 (Riesling et Gewurztraminer) à 700 (Merlot) (Reynier 1989 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata 1998) (Tableau 4). Cependant, en 1930, Ravaz signala qu'une inflorescence d'Aramon pouvait contenir jusqu'à 1800 fleurs. Le nombre de baies par grappe est relativement constant (de 100 à 200 baies) (Merjanian et Ravaz 1930). En fait, des études sur le Muscat Ottonel (Huglin et Balthazard 1961), le Sylvaner et le Riesling (Huglin 1960) ont montré une relation inverse entre le nombre de fleurs par inflorescence et le taux de nouaison : ainsi, plus une inflorescence contient de fleurs et plus son pourcentage de nouaison est faible. Les différences de taux de nouaison entre les cépages seraient donc principalement dues au nombre de fleurs par inflorescence. Cependant, il ne semble pas y avoir de relation directe entre le taux de nouaison et la sensibilité à la coulure : un cépage présentant un taux de nouaison faible pourra être considéré comme non-coulard et inversement.

Le terme coulure n'étant pas clairement défini, nous considérerons qu'il y a ***coulure quand la nouaison est statistiquement ($P = 0,05$) plus faible que la moyenne des nouaisons des 5 années précédentes dans la même région.*** Nous parlerons donc de diminution du taux de nouaison quand la proportion de chute des fleurs et de baies n'est pas significative par rapport à la moyenne des nouaisons des 5 années précédentes. En outre, la coulure peut être accompagnée de millerandage. Ce phénomène est caractérisé par l'arrêt de croissance et de développement de baies qui restent immatures sur la grappe (Hellman 2003). Quand ils sont associés, coulure et millerandage provoquent une forte diminution du rendement (Carbonneau 1983). Cependant, depuis plus de 20 ans, aucune année à coulure n'a été recensée en Champagne, et ceci en grande partie grâce à l'évolution des pratiques culturales. Dans d'autres régions, la coulure touche encore quelques parcelles comme cette année sur les merlots à Gaillac ou en Dordogne (Stef 2005).

De nombreuses causes de coulure ont été décrites sans qu'aucune ne parvienne à expliquer entièrement le phénomène. Ainsi, Bessis et Fournioux (1992) ont distingué 3 types de coulure selon leur origine supposée : la coulure climatique, la coulure physiologique et la coulure par détournement trophique. Les aspects suivants seront décrits en se basant sur la définition de la coulure formulée par Bessis et Fournioux (1992) car cette définition prend en

Tableau 5. Influence de la température sur le volume et le type d'ovules de Chardonnay et de Shiraz (Ebadi *et al.* 1995b).

Le volume des ovules est en $\text{mm}^3 \cdot 10^{-3}$. Pour les données du type d'ovule (sac embryonnaire et nucelle), 108 ovules de chaque cépage ont été étudiés. Le nombre de sacs embryonnaires fécondés est inclus dans le nombre d'ovules normaux et le nombre de nuelles dégénérés correspond aux ovules sans sac embryonnaire.

	Chardonnay		Shiraz	
	Témoin	Froid	Témoin	Froid
	25°/20°C	12°/9°C	25°/20°C	12°/9°C
Volume des ovules				
Moyenne	752	502	674	564
Maximum	936	622	817	659
Minimum	616	381	564	461
Sac embryonnaire				
Normaux	84	44	86	70
Fécondés	7	0	13	1
Anormaux	6	10	4	11
Aucun	18	54	18	27
Nuelles dégénérés				
	3	5	2	7

compte les différents cas de coulure. Notre définition sera utilisée lors des différents travaux présentés dans cette thèse.

2.1. La coulure climatique

Les conditions climatiques défavorables (températures basses et pluviométrie importante) à la floraison ont longtemps été considérées comme la cause majeure de la coulure (Butrose 1970 ; Pouget 1981 ; Jackson 1991 ; Huglin et Schneider 1998). La contribution des facteurs climatiques dans le défaut de nouaison chez les espèces fruitières a fait l'objet de nombreuses études, parmi lesquelles les effets de la température, la sécheresse et la lumière sont les plus importantes.

2.1.1. La température

Depuis longtemps, les cultivateurs savent que les gelées tardives induisent une perte importante de la production (Addicott et Lynch 1955). Cependant, la période à laquelle ont lieu ces faibles températures provoque une réponse différente selon les espèces. Ainsi, chez la cerise douce (*Prunus avium* L.), une température froide (9°C) réduit le temps de débourrement et induit même un taux de nouaison plus important qu'une température normale (25°C) (Mahmood *et al.* 2000).

Chez la vigne, les effets de la température sont liés au génotype. Ainsi, des températures de 25°/10°C (jour/nuit), 25°/20°C et 15/10°C imposées une semaine avant la floraison n'induisent pas de différence de nouaison chez le Cabernet Sauvignon (Ewart et Kliever 1977). Au contraire, une réduction de la température de 25°/20°C (jour/nuit) à 12°/9°C diminue la nouaison de 9,9% à 5,9% chez le Chardonnay et de 14,2% à 12,2% chez le Shiraz (Ebadi *et al.* 1995a). Chez le Cabernet Sauvignon exposé à des températures de 14°/9°C (jour/nuit), la nouaison devient nulle alors qu'elle atteint 56% quand la température est de 20°/15°C (Buttrose et Hale 1973). Ces températures ont aussi un impact sur les ovules : lorsqu'ils sont exposés à des températures de 12°/9°C 2 jours avant la floraison et pendant une semaine, les ovules ont un développement ralenti et jusqu'à la moitié peuvent présenter des anomalies (Ebadi *et al.* 1995b) (Tableau 5). Dans tous les cas, chaque cépage a une sensibilité différente aux faibles températures (Ebadi *et al.* 1995a), ce qui explique tout ou partie les différences de taux de nouaison observées entre les cépages.

Dans la majeure partie des cas, c'est l'impact des températures élevées qui a été étudié. Ces températures présentent un large spectre d'effets : elles agissent sur le développement des bourgeons, des inflorescences et des fruits. En effet, les bourgeons d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) soumis à des températures élevées (supérieures à 33°C) présentent des taux de nouaison très faibles (Vara Prasad *et al.* 2001). Ces températures provoquent aussi un retard de développement. Au contraire, chez l'abricot (*Prunus armeniaca* L.), une température élevée avant la floraison accélère le développement du bourgeon floral (Rodrigo et Herrero 2002). Néanmoins, ces bourgeons subissent l'abscission après la floraison à cause d'un manque de synchronisation entre le développement du bourgeon et celui du pistil. Selon l'espèce, les températures peuvent donc avoir des effets contraires sur les fleurs. Ainsi, chez la framboise (*Rubus idaeus* L.), une température élevée provoque une floraison plus rapide (Carew *et al.* 2003). Au contraire, chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.), des jours et des nuits chauds sont sans effet sur le nombre de fleurs et le déroulement de la floraison (Vara Prasad *et al.* 1999b). Néanmoins, chez certaines espèces, plus la température est élevée, moins le nombre de fleurs est important comme chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) (Vara Prasad *et al.* 2000) . Chez d'autres comme le colza (*Brassica napus* L.), tous les fruits avortent à 35°C (Young *et al.* 2004).

Les structures mâles, notamment les grains de pollen, sont très sensibles aux températures élevées. De nombreuses études ont montré que ces températures réduisent très fortement la viabilité du pollen comme chez l'arachide (Vara Prasad *et al.* 1999a), le poivron (*Capsicum annuum* L.) (Erickson et Markhart 2002) et le colza (*Brassica napus* L.) (Young *et al.* 2004). Si le pollen reste viable malgré ce stress, sa capacité à germer est souvent fortement réduite (Sato *et al.* 2000 ; Vara Prasad *et al.* 2001 ; Young *et al.* 2004). Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), non seulement le développement du pollen mais aussi celui de l'endothecium, de l'épiderme et du stomium est perturbé et stoppé par de fortes températures (Sato *et al.* 2002). Cependant, chez de nombreuses espèces, la quantité de pollen n'est pas un facteur limitant pour la nouaison même si chez la tomate (Sato *et al.* 2000) et l'arachide (Vara Prasad *et al.* 1999a), la diminution du taux de nouaison due à une température élevée est corrélée à la diminution du nombre de grains de pollen viables libérés par les anthères. Chez ces espèces, la quantité de pollen est donc le facteur limitant.

Depuis longtemps, il est connu que les températures élevées peuvent provoquer une abscission importante des jeunes fruits, induisant une diminution importante du taux de nouaison (Addicott et Lyon 1973). Depuis, des études sur l'arachide (Wheeler *et al.* 1997 ; Vara Prasad *et al.* 1999b, 2000), le colza (Young *et al.* 2004), la tomate (Sato *et al.* 2002), le poivron (Erickson et Markhart 2002) et la mandarine (*Citrus reticulata* L.) (Ogata *et al.* 2002) ont confirmé cet impact négatif des températures élevées sur le taux de nouaison.

Chez la vigne, la température conditionne la germination du pollen (Staudt 1982). Ceci explique la production plus importante de pollen sous des conditions de températures favorables, à 25°C le jour et 20°C la nuit (Ebadi *et al.* 1995a). Cependant, les effets positifs d'une augmentation de la température ne sont visibles qu'à des températures inférieures à 32°C : au-delà, les températures réduisent la nouaison suite à la réduction de la fertilité des ovules (Buttrose et Hale 1973 ; Buttrose 1974 ; Kliewer 1977).

2.1.2. Les stress hydriques

Chez les plantes, le développement des structures reproductrices, et notamment des structures mâles, est affecté par le manque d'eau (Saini 1997).

La méiose est une période sensible du développement des structures reproductrices (Saini 1997). Chez le blé (*Triticum aestivum* L.), une période de stress hydrique de 4 jours autour de la méiose diminue le pourcentage de fructification de 93% à 47% (Dorion *et al.* 1996). Chez la fève (*Vicia faba* L.), la diminution de l'approvisionnement en eau induit un avortement des fleurs et des gousses provoqué par une augmentation de la concentration endogène d'éthylène dans les tissus (Karamanos et Gimenez 1991).

La période entourant l'anthèse est aussi sensible au stress hydrique. Le taux de fructification de plants de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) passe ainsi de 80% chez les plantes témoins à 30% suite à un stress hydrique commencé 9 jours avant l'anthèse (Kokubum *et al.* 2001). Enfin, des plants de soja non arrosés à partir de 4, 3 et 2 jours avant jusqu'à 4 jours après la floraison présentent des taux de fructification de 41, 48 et 55% respectivement, alors que le pourcentage de fructification est de 67% chez les plantes témoin (Liu *et al.* 2004).

Chez la vigne, la sécheresse provoque des pertes de rendements importantes. Ainsi, des boutures fructifères de Cabernet Sauvignon arrosées quotidiennement ont des grappes à 58,5

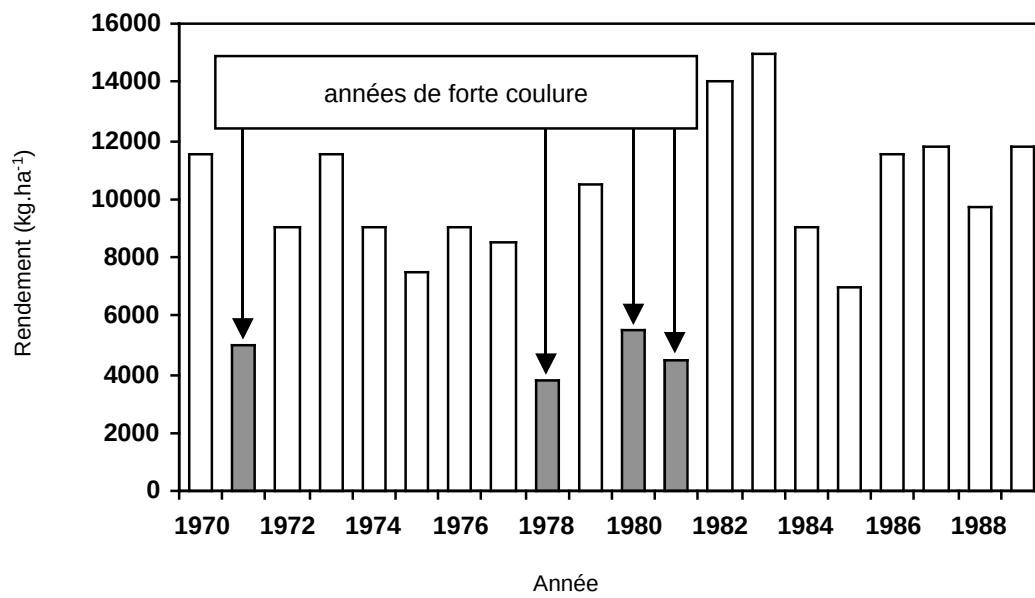


Figure 8. Rendements moyens dans l'ensemble du vignoble champenois entre 1970 et 1989 (Zapata 1998).

baies contre 45,7 baies sur les boutures arrosées 3 fois par semaine (Ussahatanonta *et al.* 1996). De plus, les baies pèsent 0,93 g chez les boutures arrosées tous les jours et 0,81 g chez les boutures arrosées périodiquement (Ussahatanonta *et al.* 1996). Les rendements par bouture sont donc réduits de plus de 30%, de 54,41 g par bouture quotidiennement arrosée à 37,02 g par bouture arrosée 3 fois par semaine. Pour les cépages Tempranillo et Manto Negro, les rendements au vignoble sont très dépendants de l'eau présente dans le sol : quand les plants sont arrosés à hauteur de 30% de l'évaporation, les rendements sont respectivement de 3,63 et 5,41 kg.plante⁻¹ pour le Tempranillo et le Manto Negro. Quand ces plantes ne sont pas arrosées, les rendements chutent alors de 32% chez le Tempranillo et de 52% chez le Manto Negro (Medrano *et al.* 2003).

Tout comme le manque d'eau, une forte pluviométrie provoque un stress lors de la reproduction chez la vigne. Ainsi, une pluviométrie importante entraîne un alourdissement du capuchon et l'impossibilité pour les étamines de le soulever et de le libérer. Ces fleurs sont dites encapuchonnées car les étamines restent sous le capuchon et ne peuvent pas disperser le pollen (Toussaint 1983). Cette absence de pollen dans l'environnement provoque l'avortement des fleurs qui ne peuvent être fécondées. Les conditions climatiques ont certainement un rôle dans la coulure mais elles ne peuvent expliquer à elles seules tous les cas d'apparition du phénomène : en Champagne, aucune coulure significative n'a été observée en 1975 et 1989, alors que les conditions climatiques étaient défavorables pendant la floraison (Zapata 1998) (Fig. 8). En revanche, l'année 1981 fut une année à forte coulure alors que le climat était clément au printemps et durant la floraison (Zapata 1998) (Fig. 8).

2.1.3. La lumière

Dans la plupart des études menées sur l'importance de la lumière dans le développement des fleurs et des fruits, l'abscission de ces organes n'est obtenue que sous un ombrage d'au moins 80% de l'éclairement normal (Byers *et al.* 1985, 1991 ; Jiang et Egli 1993 ; Stopar 1998). Chez la vigne, la nouaison est favorisée quand les feuilles sont fortement éclairées (May et Antcliff 1963). L'ombrage des feuilles réduit considérablement l'apport de nutriments disponibles pour le développement des fruits et augmente leur chute (May et Antcliff 1963). Un ombrage de 90% de la plante entière provoque une coulure significative due à l'apport insuffisant de photoassimilats (Ollat 1997). L'ombrage provoque aussi la mort des bourgeons axillaires (Wolf et Warren 1995 ; Vasudevan *et al.* 1998) ou une réduction de la nouaison (Ebadi *et al.* 1996).

Les conditions climatiques (sécheresse, températures élevées ou faibles, pluviométrie importante) ne sont cependant pas les seules causes de la coulure. Ce phénomène pourrait être induit par un dérèglement de certains facteurs internes comme le développement floral, la balance hormonale et les relations source/puits chez la plante entière (Jackson 1991 ; Zapata *et al.* 2004b).

2.2. La coulure et le développement des structures reproductrices

2.2.1. Le pollen est peu impliqué dans la coulure

Parmi les origines possibles de la coulure, les défauts lors du développement floral, en particulier au moment de la fécondation, ont souvent été mis en avant. Ces défauts de fécondation peuvent être imputés aux structures mâles comme aux femelles. L'absence de pores germinatifs du pollen a été considérée comme une des causes de la coulure. En effet, si le grain de pollen n'est pas capable de germer, la fécondation ne peut avoir lieu et les fleurs tombent, comme pour le cépage Picolit giallo (Cargnello *et al.* 1980 ; Vallania *et al.* 1987). Néanmoins, cette hypothèse n'est valable que si le nombre de grains de pollen est limité. Or, aucune donnée chiffrée n'est disponible sur ce critère. Une étude a affirmé que le nombre de grains de pollen n'est pas limitant chez le Chardonnay, le Cabernet Sauvignon et le Merlot mais aucune chiffre n'a été présenté (Benharbit El Alami 1995). Il serait donc nécessaire d'évaluer le nombre et la viabilité des grains de pollen afin de savoir si ce paramètre est limitant. Pour certains, les structures mâles et notamment les filets staminaux seraient responsables de la coulure suite à un développement incorrect : leur trop petite taille à la floraison ne permettrait pas la chute du capuchon et empêcherait alors la pollinisation et la fécondation (Vallania *et al.* 1987).

Le développement du pollen peut aussi être perturbé par les conditions climatiques. Un choc thermique provoque ainsi une modification du nombre de pores germinatifs (Huglin 1960). De plus, les basses températures réduisent le nombre (Ebadi *et al.* 1995b) et la croissance (Staudt 1982 ; Fougère-Rifot *et al.* 1996) des tubes polliniques. Ces mécanismes induisent une diminution significative du nombre de fleurs fécondées, voire une absence totale de fécondation. Cependant, les cépages n'ont pas la même sensibilité aux faibles

températures (Ebadi *et al.* 1995b), ce qui expliquerait les différences de taux de nouaison des cépages sensibles à la coulure soumis aux mêmes conditions environnementales (Tableau 5).

Malgré les défauts potentiels du développement des structures mâles, le nombre de grains de pollen n'est pas le facteur principal de la coulure car il est largement suffisant pour qu'une fécondation normale ait lieu (Benharbit El Alami 1995) : cependant, aucune donnée chiffrée n'est apportée par cette étude. De plus, le développement anormal des grains de pollen d'un pied de vigne n'explique pas la coulure car la vigne est allogame. Les organes femelles paraissent alors être le facteur le plus sensible à l'origine de la coulure chez la vigne.

2.2.2. Les structures femelles sont impliquées dans la coulure

Le développement normal des structures reproductrices femelles (Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Boss *et al.* 2003) et leur avortement ont fait l'objet de plusieurs études (Pratt 1971 ; Bouard 1978 ; Fougère-Rifot et Bouard 1992 ; Ebadi *et al.* 1995a ; Fougère-Rifot *et al.* 1996 ; Caporali *et al.* 2003). Ces études ont montré qu'il existe plusieurs causes possibles à l'avortement des structures femelles parmi lesquelles une régression ovulaire au stade 15 (Bouard 1978) ou autour de la méiose (Pratt 1971), et l'impact négatif de faibles températures sur le développement des structures femelles (Ebadi *et al.* 1995a, b).

Une étude réalisée sur les cultivars Ugni Blanc, Cabernet Sauvignon, Cabernet franc et Merlot a montré que les 4 ovules restent sains et se développent normalement jusqu'à la fin du stade grappes séparées (stade G-15) (Bouard 1978). À partir de ce stade, une régression ovulaire due à une déshydratation apparaît et se caractérise par le décollement du tégument interne et du nucelle. Ce phénomène, dont le mécanisme n'est pas connu peut n'affecter qu'un, deux ou trois ovules parmi les quatre que renferme une fleur.

Pour tous les cépages, il existe deux stades critiques d'involution ovulaire autour de la méiose (Pratt 1971). Avant la méiose, des ovules peuvent subir une involution à cause du développement anormal du nucelle, des téguments internes et externes. Après la méiose, le sac embryonnaire peut interrompre son développement ou dégénérer. Les ovules peuvent donc subir une dégénérescence pré- ou post-méiotique.

Les structures femelles du Chardonnay et du Shiraz sont sensibles aux faibles températures. Ainsi, des températures de 17°/14°C (jour/nuit) et 12°/9°C provoquent une diminution significative de la nouaison chez les deux cépages d'autant plus importante que les températures sont basses (Ebadi *et al.* 1995a). Lorsque des vignes sont exposées à des températures de 12°/9°C (jour/nuit) deux jours avant la floraison, les ovules de ces plantes sont plus petits et ont un développement plus lent (Ebadi *et al.* 1995b). Pour le Chardonnay, plus de la moitié des ovules exposés à ces températures sont anormaux, alors que 35% des ovules de Shiraz n'ont pas de sac embryonnaire normal (Ebadi *et al.* 1995b) (Tableau 5). Dans cette étude, les ovules anormaux ne possèdent pas de sac embryonnaire, un sac embryonnaire petit ou incomplet, un sac embryonnaire présentant une paroi centrale ou encore un nucelle détérioré.

En résumé, le développement des structures mâles peut être sujet à de nombreuses défaillances, mais il n'est pas un facteur limitant la fécondation. En revanche, les structures femelles semblent jouer un rôle clé dans le phénomène de coulure. Parmi les différentes étapes du développement de l'ovule, la méiose est une étape sensible à de nombreux stress environnementaux. Une défaillance lors de son déroulement peut alors mener à l'avortement des structures femelles.

2.3. La coulure et les hormones

Parmi les origines possibles de la coulure, les hormones ont souvent été évoquées (Osborne 1989 ; Roberts *et al.* 2002). En effet, des changements dans les taux d'hormones au niveau du pédicelle peuvent intervenir dans l'abscission des fruits (Osborne 1989 ; Ruperti *et al.* 1998). Chez la vigne, la chute des fleurs et des baies est provoquée par l'abscission de la base du pédicelle (Bessis et Fournioux 1992). Bien que les mécanismes de ce phénomène ne soient pas entièrement connus, les hormones telles que l'éthylène (Hilt 2001 ; Roberts *et al.* 2002 ; Hilt et Bessis 2003), les cytokinines (Ollat *et al.* 2002), les gibbérellines (Dokoozlian *et al.* 2001 ; Roberts *et al.* 2002), les auxines (Osborne 1989 ; Gonzalez-Carranza *et al.* 1997 ; Roberts *et al.* 2002) et les polyamines (Colin 2000 ; Aziz *et al.* 2001) semblent y être impliquées de manière importante (Bouard *et al.* 1996). Ainsi, la coulure "hormonale" se manifesterait suite à "un dysfonctionnement (...) de l'équilibre hormonal" (Bessis et Fournioux 1992).

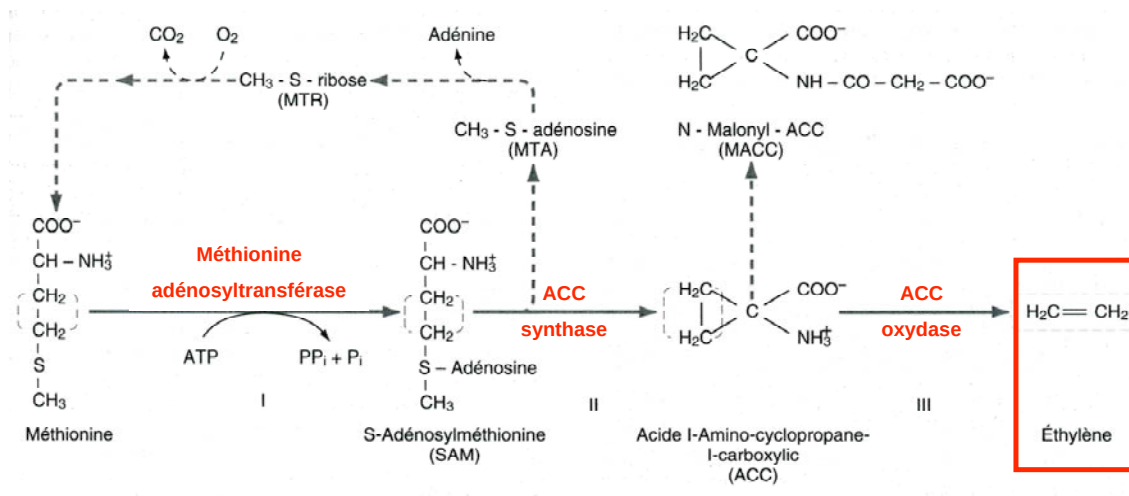


Figure 9. Biosynthèse de l'éthylène (Hopkins 1999).

2.3.1. L'éthylène

L'éthylène (Fig. 9) est une molécule produite par tous les tissus végétaux (Yang 1985 ; Kende et Zeevaart 1997). Elle a un rôle de régulateur des processus de croissance et de développement comme le vieillissement, la sénescence, la maturation des fruits et l'abscission (Yang et Hoffman 1984 ; Abeles *et al.* 1992). Le fait que la méthionine soit son précurseur n'a été démontré que dans les années 1960 (Lieberman et Mapson 1964) et sa voie de biosynthèse dans les années 1970 (Adams et Yang 1977) (Fig. 9). De plus, l'éthylène et ses précurseurs ont souvent été étudiés pour leur implication possible dans la mise en place de la zone d'abscission des fleurs et des fruits (Abeles *et al.* 1992). L'éthylène exogène à très faibles concentrations (de 0,1 à 0,5 $\mu\text{L.L}^{-1}$) accélère l'abscission des feuilles, des fleurs et des baies chez de nombreuses espèces (Sexton *et al.* 1985 ; Sexton 1995). Chez la vigne, il a été montré que cette molécule joue un rôle majeur dans la régulation de l'abscission des fleurs et des baies car il existe une relation entre la teneur en éthylène dans les fleurs ou les baies et la vitesse de chute de ces organes (Hilt et Bessis 2000), ainsi que dans la maturation des baies (Chervin *et al.* 2004). L'éthylène est le dernier effecteur de l'abscission (Gomez-Cadenas *et al.* 2000). La régulation de l'abscission n'aurait lieu qu'à certains stades de développement grâce à la réactivité de cellules-cible (Bessis et Fournieux 1992). En outre, l'intensité du processus d'abscission est proportionnelle à la concentration d'éthylène jusqu'à environ 100 ppm alors qu'une concentration de l'ordre de 1000 ppm a un effet inverse (Bessis et Fournieux 1992). Enfin, la concentration d'éthylène peut servir de marqueur d'abscission puisqu'il existe une corrélation entre l'augmentation d'éthylène dans les tissus et le début de l'abscission au stade I-23 (Hilt et Bessis 2003).

Les précurseurs de l'éthylène provoquent également l'abscission (Osborne 1989). Ainsi, l'acide 2-chloroéthylphosphonique ou éthéphon augmente l'intensité et la rapidité avec laquelle survient l'abscission lorsque sa concentration augmente dans le milieu de 10^{-4} à 10^{-3} M (Bessis *et al.* 2000). Ce composé double aussi le taux de nécrose précoce des bourgeons et augmente le nombre de grappes à baies peu nombreuses (Jackson 1991) : le nombre de grappes formées est ainsi plus faible car il y a moins de bourgeons floraux et la plupart de ces grappes sont peu pourvues en baies. L'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique ou ACC, autre précurseur de l'éthylène, induit les mêmes effets que l'éthéphon quand il est présent avec la même concentration dans le milieu (Bessis *et al.* 2000).

La pulvérisation d'acide amino-oxyacétique ou AOA, inhibiteur de la biosynthèse de l'éthylène, diminue le taux d'abscission des fleurs et des baies (Bessis *et al.* 2000). De plus, l'apport de sels d'argent (inhibiteur de l'action de l'éthylène) ralentit l'abscission et en diminue l'importance. Ces résultats permettent de confirmer le rôle majeur de l'éthylène dans l'abscission chez la vigne.

Lors des études sur l'impact de l'éthylène sur l'abscission des feuilles, des fleurs et des fruits chez la vigne, les concentrations utilisées sont très largement supérieures à celles biologiquement présentes dans les tissus. Ainsi, les teneurs tissulaires d'éthylène atteignent au maximum $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ (Abales *et al.* 1992). Des expériences avec des concentrations de 10^3 ou $10^4 \mu\text{L.L}^{-1}$ ne sont donc pas biologiquement représentatives de ce qui se passe dans la nature, mais sont réalisées pour obtenir des effets exagérés.

2.3.2. Les cytokinines

Chez la vigne, les cytokinines augmentent surtout la capacité puits des fleurs et des baies qui puisent plus d'assimilats au détriment des parties végétatives de la plante (Huglin et Schneider 1998). De plus, les cytokinines interviennent dans l'élongation cellulaire et leur synthèse est régulée par les glucides. La pulvérisation de cytokinine (benzylamino-purine) stimule la croissance des inflorescences aux dépens de la croissance végétative (Mullins 1967). Cependant, si la concentration est trop élevée, le résultat inverse est obtenu avec une réduction du débourrement (Mullins 1967). Le SD 8339 (6-benzylamino-9-(2-tétrahydropyranyl)-9H purine), surtout étudié au milieu du XX^{ème} siècle, n'est efficace que sur les inflorescences qui présentent alors une croissance plus importante (Mullins 1967), caractérisée notamment par une stimulation de leur élongation et l'émergence des fleurs (Mullins 1968). De plus, le nombre de baies par grappes dépend de la concentration appliquée : ainsi, des pulvérisations SD 8339 jusqu'à une concentration de 0,025% (poids/volume) sur des inflorescences de Corinthe noir 3 jours après la pleine floraison augmentent le nombre de baies par grappes de 66 à 137, respectivement pour les témoins et les plantes traitées. Au-delà de cette concentration, le nombre de baies par grappes n'augmente pas (Weaver *et al.* 1965). Chez la vigne, le CCC (chlorure 2-chloroethyl-triméthylammonium) augmente le nombre d'inflorescences, le nombre de grappes par pied et le rendement (Lilov et Andonova 1976). Dans ce cas, l'augmentation du nombre de grappes

est liée à une multiplication précoce du nombre de primordia inflorescentiels (Sugiura *et al.* 1976).

2.3.3. Les gibbérellines

Dans certains pays, l'acide gibbérellique ou GA₃ est communément appliqué à la floraison afin de réduire la nouaison et les grappes trop compactes des raisins de table (Huglin et Schneider 1998). Plusieurs études ont été menées pour préciser les effets du GA₃ sur le développement des fleurs et des baies et montrent des résultats parfois contradictoires. Ainsi, le GA₃ induit une diminution du nombre de feuilles, ainsi qu'une augmentation de la longueur des inflorescences et du nombre de fleurs (Khurshid *et al.* 1992). Dans ce cas, les gibbérellines augmenteraient la capacité puits des fleurs en développement (Archbold et Dennis 1985). Mais d'autres études montrent que la pulvérisation de GA₃ diminue le nombre de baies, leur poids, la nouaison et aussi le rendement (Weaver et Pool 1971 ; Dokoozlian *et al.* 2001). Dans certains cas extrêmes, certaines concentrations de GA₃ peuvent retarder le débourrement, réduire l'initiation florale, provoquer l'avortement des ovules et induire la coulure (Agüero *et al.* 1995 ; Ezzili 1997).

2.3.4. Les auxines

Les auxines sont des hormones synthétisées à partir d'un point de branchement de la voie de biosynthèse du tryptophane (Normanly *et al.* 1995 ; Kende et Zeevaart 1997). Elles induisent généralement les divisions cellulaires et la différenciation tissulaire (Kende et Zeevaart 1997 ; Bergmann 2004 ; del Pozo *et al.* 2005 ; Woodward et Bartel 2005), ce qui explique leur synthèse et leur présence dans les organes jeunes en croissance (Reynier 1989). Les différentes études sur les auxines ont souvent abouti à des résultats contradictoires. Ainsi, dès 1957, une corrélation positive entre la concentration en auxines et la vitesse de croissance des inflorescences de vigne a été présentée (Nitsch *et al.* 1957). Néanmoins, des études sur le 2,4-D (acide dichlorophénoxyacétique), analogue de l'auxine naturelle, ont démontré son rôle dans l'inhibition de la croissance des inflorescences de vigne (Mullins 1968). L'AIA (acide indole-3-acétique) provoque des effets équivalents, notamment une diminution du nombre de fleurs et de la longueur des inflorescences (Khurshid *et al.* 1992).

2.3.5. Les polyamines

Les polyamines regroupent les composés contenant au moins 2 groupements amines. Ces molécules interviennent dans de nombreux processus biologiques dont la floraison (Egea-Cortines et Mizrahi 1991). Chez la vigne, les teneurs élevées en polyamines à la nouaison sont fortement corrélées à un taux de nouaison élevé (Gény 1997 ; Colin 2000 ; Aziz *et al.* 2001 ; Aziz 2003). Une accumulation de polyamines est ainsi observable lors de la transition florale (Gény 1997). Alors qu'un apport exogène de polyamines augmente le taux de nouaison des boutures fructifères, celui d'un inhibiteur de la biosynthèse des polyamines le réduit significativement (Gény 1997 ; Aziz *et al.* 2001 ; Aziz 2003), confirmant ainsi le rôle anti-abscission des polyamines chez la vigne.

2.4. La coulure par détournement trophique

2.4.1. La défoliation

La défoliation précoce (jeunes feuilles) ou tardive (feuilles âgées) est souvent utilisée en agronomie pour diminuer respectivement le puits ou la source d'assimilats que constituent les feuilles. Cependant, en plus de supprimer ce puits, la défoliation diminue aussi la surface foliaire donc la photosynthèse de la plante (Stephenson 1980, 1981). La défoliation réduit donc la source d'assimilats permettant le développement des fruits. Dans les cas plus marqués, la proportion de fruits avortés augmente significativement (Stephenson 1980). Cette augmentation est visible chez de nombreuses espèces comme le pommier (Jackson et Palmer 1977), le mandarinier (*Citrus unshiu*) (Mehouachi *et al.* 1995 ; Iglesias *et al.* 2003) et le papayer (*Carica papaya* L.) (Zhou *et al.* 2000). Dans ce dernier cas, une défoliation d'au moins 75% est nécessaire pour que les fruits tombent. Ceci montre que les plantes sont capables de compenser partiellement une perte de la photosynthèse grâce notamment à leurs réserves.

Comme chez de nombreuses autres plantes cultivées, la réduction de la surface foliaire de vigne provoque la chute des fruits (Candolfi-Vasconcelos et Koblet 1991). Mais l'effeuillage doit être très important (environ 90%) pour que la photosynthèse soit suffisamment réduite et que les réserves ne puissent la compenser (Chaumont 1995 ; Ollat

1997). Dans les cas extrêmes, où la totalité des feuilles est supprimée, aucune fleur ne noue (Caspari *et al.* 1998).

2.4.2. L'éclaircissage

L'éclaircissage consiste supprimer un certain nombre de fleurs ou de fruits de la plante afin de privilégier la qualité à la quantité de la production. L'éclaircissage partiel (50%) des fleurs de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) à la floraison n'augmente pas la production de l'année, mais induit un plus grand nombre de bourgeons floraux l'année suivante (Myers *et al.* 2002). L'effet de l'éclaircissage est donc différé dans le temps. Chez le mandarinier (*Citrus unshiu*) et le papayer (*Carica papaya* L.), l'éclaircissage diminue l'abscission des fruits restants, donc augmente la nouaison, en élevant la quantité de nutriments disponibles pour leur développement (Goldschmidt et Koch 1996 ; Zhou *et al.* 2000). Chez le papayer, les fruits restants deviennent ainsi plus gros et se développent plus rapidement (Zhou *et al.* 2000).

Chez la vigne, l'éclaircissage sévère augmente significativement la mort des bourgeons chez le Shiraz australien (Dry et Coombe 1994). Une autre étude a même montré l'existence d'une corrélation entre le taux de mortalité des bourgeons et l'éclaircissage (Wolf et Warren 1995).

Selon l'espèce, l'éclaircissage a des impacts très différents sur le rendement. Ainsi, il induit des effets positifs sur le rendement l'année en cours (augmentation de la nouaison) ou de l'année suivante (augmentation du nombre de bourgeons floraux), mais aussi des effets négatifs (augmentation de la mort des bourgeons).

3. Les glucides et la floraison

Chez les végétaux, les glucides ont un rôle central dans le contrôle du métabolisme, de la croissance et du développement. Ils interagissent (Sheen *et al.* 1999 ; Smeekens 2000 ; Gibson 2005) avec les signaux externes, les stress (Roitsch 1999) et les hormones (Gazzarini et McCourt 2001 ; Finkelstein et Gibson 2002) dans les voies de signalisation.

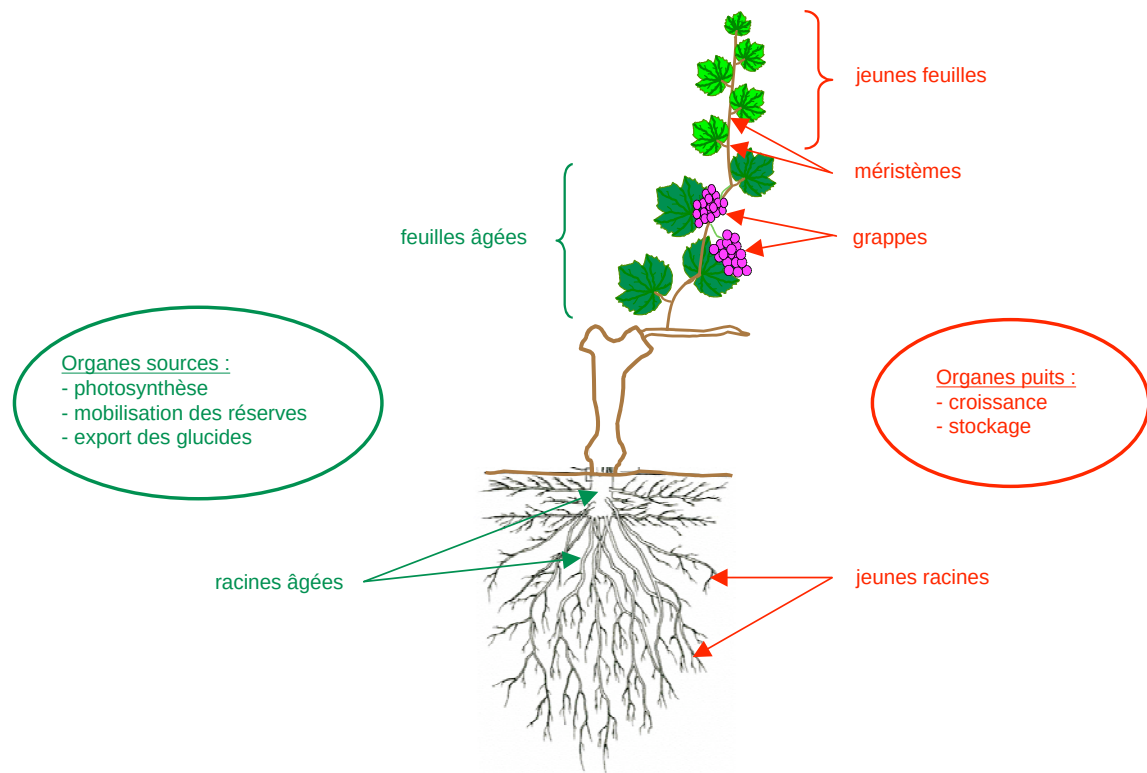


Figure 10. Localisation et fonctions des organes sources et des organes puits chez la Vigne.

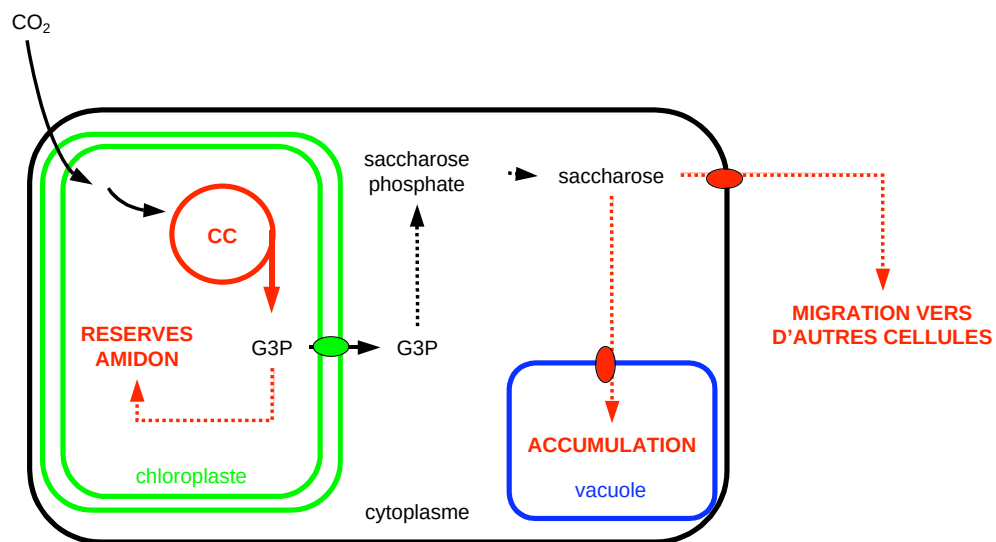


Figure 11. Origine et devenir du glycéraldéhyde-3-phosphate.

CC cycle de Calvin; G3P glycéraldéhyde-3-phosphate.

Les sphères rouges représentent les transporteurs de saccharose et la sphère verte le transporteur à G3P.

3.1. Les glucides

Chez les plantes, la synthèse de glucides par la photosynthèse est un processus vital. Les photoassimilats sont directement utilisés par les cellules ou stockés sous forme d'amidon pour une utilisation ultérieure. Ils sont transportés aux différents organes de la plante et sont des molécules-signal importantes pour le développement des structures végétatives et reproductrices (Lalonde *et al.* 1999 ; Hellmann *et al.* 2000 ; Rolland *et al.* 2002 ; Roitsch et Gonzalez 2004). Les organes exportateurs de glucides sont appelés organes sources et les organes utilisant ces glucides sont dits organes puits (Fig. 10).

3.1.1. La photosynthèse

La photosynthèse est l'ensemble des réactions biochimiques par lesquelles les végétaux chlorophylliens transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique permettant de synthétiser des glucides. Deux étapes interviennent lors de la photosynthèse et permettent la synthèse des glucides : les réactions claires et les réactions sombres. Tout d'abord, les réactions claires (ou réactions photochimiques) de la photosynthèse sont dépendantes de la lumière. Elles transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique stable sous forme de molécules à fort pouvoir réducteur (NADPH) ou phosphorylant (ATP). Ces molécules seront ensuite utilisées durant les réactions sombres. Celles-ci font partie d'un processus appelée cycle photosynthétique de réduction du carbone ou cycle de Calvin. Ce cycle réduit le carbone fixé sous forme de CO₂ pour synthétiser du glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P), produit final de la photosynthèse. Ce glucide est une molécule-carrefour : elle permet la synthèse d'amidon dans le chloroplaste ou la synthèse de saccharose (forme de transport des glucides) dans le cytoplasme (Fig. 11). Ce saccharose pourra alors être accumulé dans la vacuole de la cellule source ou être transporté vers des cellules-puits où il servira à alimenter le métabolisme énergétique ou la synthèse d'amidon. Les glucides produits lors de la photosynthèse régulent et coordonnent les stimuli internes (éthylène, auxines, acide abscissique, acides gibbérelliques et cytokinines) et environnementaux (lumière et température) gouvernant la croissance et le développement (Koch 1996 ; Sheen *et al.* 1999 ; Smeekens 2000).

L'activité photosynthétique d'une plante est le résultat d'un ensemble de régulations induites par des stimuli. Ces stimuli sont provoqués par des facteurs environnementaux et par les produits finaux de la photosynthèse (Fig. 12).

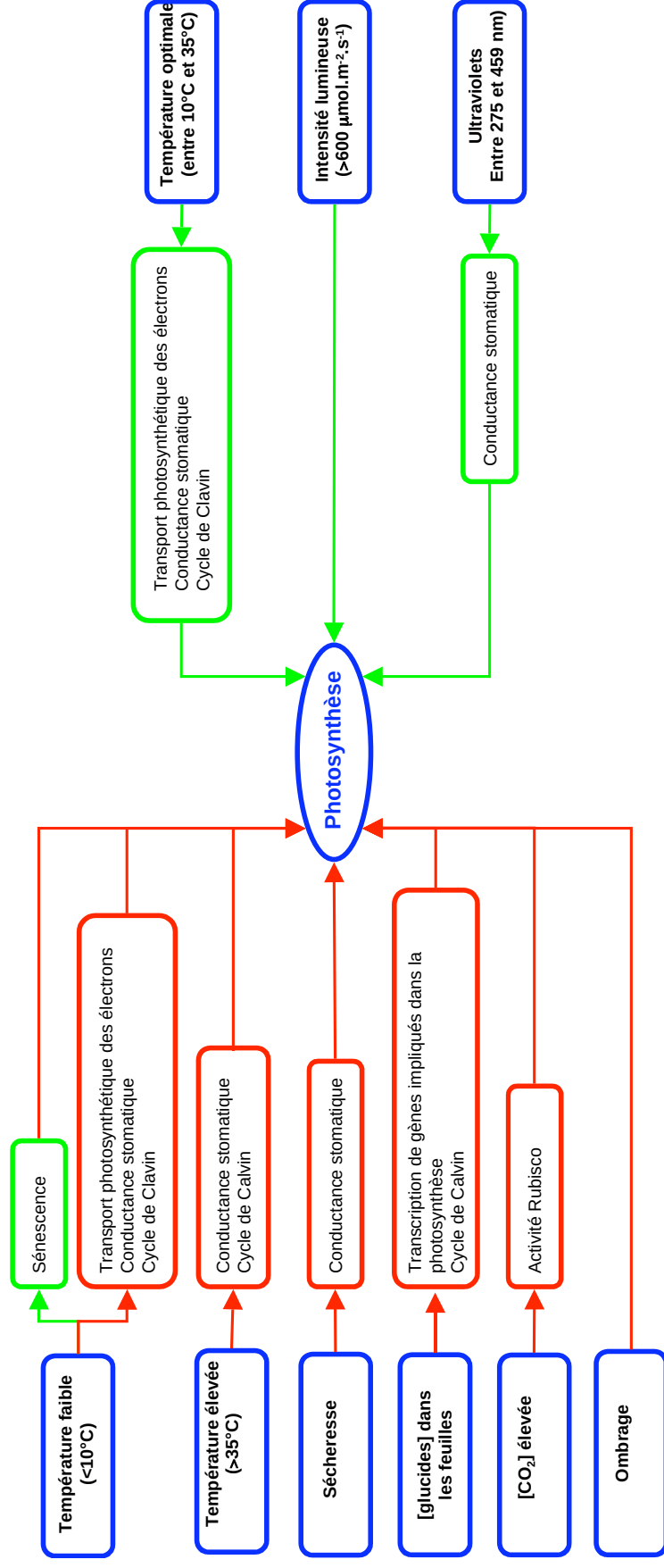


Figure 12. Paramètres régulant la photosynthèse chez la Vigne.

Les flèches rouges représentent les inhibitions et les flèches vertes les stimulations

3.1.1.1. La régulation de la photosynthèse par la lumière

La photosynthèse est globalement une réaction d'oxydo-réduction rendue possible par l'énergie apportée par la lumière. Le couplage de l'expression de gènes avec le transfert d'électrons est impliqué dans l'adaptation de la photosynthèse à la variation de la qualité et de la quantité de lumière (Allen *et al.* 1995).

Plus que l'intensité, la qualité de la lumière influe sur la photosynthèse. Ainsi, chez de nombreuses plantes, la fluorescence bleue des ultraviolets (de 275 à 459 nm) augmente l'assimilation du CO₂, donc la photosynthèse (Grantz et Assmann 1991 ; Hoque et Remus 1999 ; Eisinger *et al.* 2000 ; Mantha *et al.* 2001). Chez le sorgho (*Sorghum bicolor*), la photosynthèse moyenne des feuilles augmente de 4,6% quand elles sont exposées à une lumière UV de 311 nm (Johnson et Day 2002). Chez le pâturin annuel (*Poa annua*), le laurier rose (*Nerium oleander*) et le sorgho d'Alep (*Sorghum halepense*), une corrélation positive significative ($r^2=0,90$) existe entre l'intensité des rayons ultraviolets émis à la surface des feuilles (λ de 333 à 344 nm) et l'augmentation de la photosynthèse, avec un pic à 340 nm (Mantha *et al.* 2001). L'ouverture des stomates provoquée par les photorécepteurs de la lumière bleue ($\lambda = 280$ nm) des cellules de garde serait à l'origine de l'augmentation de la photosynthèse (Eisinger *et al.* 2000). L'induction de l'ouverture des stomates par les rayons ultraviolets est aussi observée chez la canne à sucre (*Saccharum officinarum* L.), le soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Grantz et Assmann 1991), le sapin (*Picea abies* (L.) Karst.) (Hoque et Remus 1999) et la fève (*Vicia faba*) (Eisinger *et al.* 2000).

Chez la vigne, les radiations solaires sont un facteur environnemental important dans le contrôle de la photosynthèse (Mullins *et al.* 1992). De plus, l'assimilation de CO₂, chez la vigne comme chez les autres plantes en C₃, est saturée à partir d'une intensité lumineuse de 600 à 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Zufferey et Murisier 2000) (Fig. 13). La courbe de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse est donc une hyperbole. Ainsi, une augmentation de l'intensité lumineuse au-delà de 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ n'induit pas d'augmentation de l'assimilation nette de CO₂ (Mullins *et al.* 1992 ; Hendrickson *et al.* 2004). Cependant, les conditions de culture de la vigne peuvent changer la valeur de saturation lumineuse de la photosynthèse des feuilles (Kriedemann 1968) : sous un climat désertique, l'activité photosynthétique des feuilles des cépages Perlette (Kriedemann 1968) et Riesling (Downton *et al.* 1987) saturent à partir d'une intensité lumineuse de 1500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 14). La

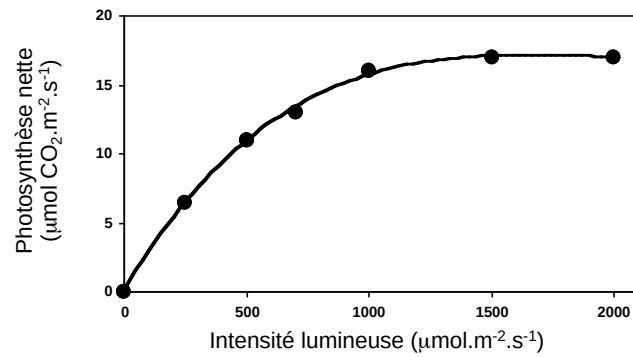


Figure 13. Evolution de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse chez la Vigne (Zufferey et Murisier 2000).

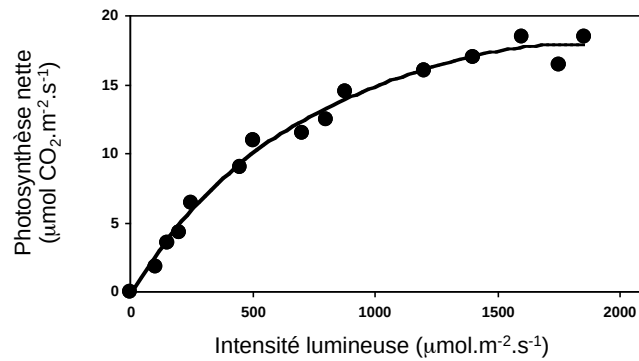


Figure 14. Evolution de la photosynthèse de feuilles de Vigne (cépage Perlette) dans la vallée désertique de Coachella en Californie en fonction de l'intensité lumineuse (Mullins *et al.* 1992).

saturation de la photosynthèse par une forte intensité lumineuse ($1900 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) s'explique par l'inactivation des donneurs d'électrons et des accepteurs d'électrons du PSII chez les feuilles jeunes et âgées, respectivement (Bertamini et Nedunchezian 2003a).

La réduction de lumière (ombrage) sur les feuilles de vigne diminue aussi la photosynthèse. Ainsi, des feuilles ombragées (rayonnement lumineux de $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) présentent des conductances stomatiques 60% plus faibles que des feuilles éclairées (rayonnement lumineux de $1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) : la fermeture de ces stomates provoque une diminution de la photosynthèse de 65%, de 15 à $5 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les feuilles éclairées et ombragées, respectivement) (Schultz *et al.* 1996).

Chez la vigne, l'assimilation de CO_2 augmente jusqu'à une intensité lumineuse de $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, puis se stabilise au delà de cette intensité lumineuse.

3.1.1.2. La régulation de la photosynthèse par la température

L'activité photosynthétique est aussi dépendante de la température, dont la valeur optimale varie avec chaque espèce, des températures trop froides ou trop élevées modifiant l'activité photosynthétique (Allen et Ort 2001 ; Sharkey 2005).

3.1.1.2.1. Les faibles températures

Chez de nombreuses espèces végétales et notamment les variétés cultivées, les faibles températures (inférieures à 10°C) sont un facteur limitant majeur de la productivité (Allen et Ort 2001). En effet, la baisse des températures perturbe tous les paramètres de la photosynthèse, de la conductance stomatique au cycle de réduction du carbone (cycle de Calvin), en passant par le transport photosynthétique des électrons (Allen et Ort 2001). L'exposition de plants de coton (*Gossypium hirsutum* L.) à une température de 15°C et une densité photométrique de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant 14 h diminue l'assimilation de CO_2 de 40% en deux jours, puis de 20% supplémentaires après huit jours (Perera *et al.* 1995) : cette réduction de photosynthèse est provoquée par une diminution de 88% de la conductance stomatique. Chez le maïs (*Zea mays* L.), l'assimilation du CO_2 et le transport photosynthétique des électrons sont inhibés lorsque les feuilles sont exposées à des températures inférieures à 10°C (Foyer *et al.* 2002). Au champ aussi, ces paramètres sont jusqu'à 2 fois plus faibles en hiver qu'au printemps : ainsi, lors des périodes fraîches (8°C la

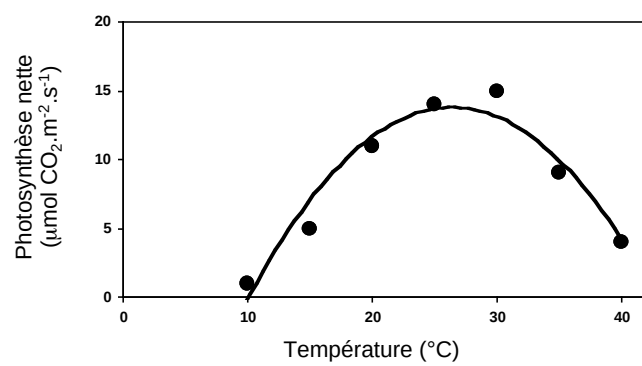


Figure 15. Evolution de la photosynthèse en fonction de la température chez la Vigne (Zufferey et Murisier 2002).

nuit et 16°C le jour), 6 électrons sont transportés à travers le PSII par molécule de CO₂ assimilée au lieu de 21 en périodes non stressantes (14°C la nuit et 21°C le jour) (Fryer *et al.* 1998). Ensuite, sous des températures inférieures à 15°C, les feuilles de maïs présentent une sénescence précoce et ne peuvent plus assurer la photosynthèse (Foyer *et al.* 2002).

Au champ, les températures les plus fraîches sont observées la nuit et ont impact sur la photosynthèse du jour suivant (Allen et Ort 2001). Des plants de soja ayant passé une nuit à 8°C voient leur conductance stomatique diminuer de moitié le jour suivant par rapport à des plants ayant passé une nuit à 20°C (Van Heerden *et al.* 2004) : cette réduction de l'ouverture des stomates est un signe de diminution de l'assimilation du CO₂ et donc de la photosynthèse. Chez la mangue (*Mangifera indica* L.), une nuit à 7°C (au lieu de 25°C pour le témoin) ne provoque pas d'inhibition de l'assimilation de CO₂ le matin suivant (Allen *et al.* 2000). Mais le midi, la conductance stomatique et l'activité Rubisco sont réduites de 50%, diminuant d'autant l'assimilation du CO₂.

Chez la vigne, la température optimale pour la photosynthèse se situe entre 21°C et 32°C selon les régions (Kriedemann 1968 ; Stoev et Slavtcheva 1982 ; Huglin 1986, Mullins *et al.* 1992 ; Zufferey et Murisier 2000).

Les basses températures provoquent une diminution de la photosynthèse (Fig. 15). En effet, à 10°C, l'assimilation nette de CO₂ est proche de 0 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Kriedemann 1968). De plus, la photosynthèse est fortement inhibée à des températures inférieures à 20°C. Ainsi, la photosynthèse des feuilles de Riesling passe de $14,4 \pm 0,1$ à $5,2 \pm 0,4$ $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ quand leur température passe de 25°C à 5°C (Hendrickson *et al.* 2004). Chez le Chasselas, les feuilles assimilent 4 fois moins de CO₂ à 15°C qu'à 30°C, soit $2,5 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ contre $10 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ à 30°C (Zufferey et Murisier 2000).

3.1.1.2.2. Les températures élevées

Comme les températures trop froides, les températures trop élevées réduisent la photosynthèse des végétaux : dans la plupart des cas, la réduction de l'assimilation du CO₂ est provoquée par une inactivation de la Rubisco (Sharkey 2005). Chez toutes les plantes, l'inhibition de la photosynthèse est réversible quand les températures sont légèrement supérieures à leur optimal (stress modéré), alors que les dommages sont irrémédiables sous des stress sévères (Berry et Björkman 1980). Chez le coton (*Gossypium hirsutum* L.) et le pois (*Pisum sativum* L.), la photosynthèse nette est optimale à 28°C et 25°C, respectivement.

L'assimilation de CO_2 diminue quand la température augmente et devient nulle à 45°C. L'inhibition de la photosynthèse est provoquée par la réduction de l'état d'activation de la Rubisco (Law et Crafts-Brandner 1999 ; Haldimann et Feller 2005).

Chez la vigne, les températures supérieures à 35°C inhibent la photosynthèse par un mécanisme impliquant la fermeture des stomates. Cependant, à cette température, les feuilles sont plus sensibles à la sécheresse qu'à la température (Huglin 1986 ; Huglin et Schneider 1998). La sécheresse est plus néfaste pour la photosynthèse de la vigne que les températures élevées. Ainsi, des plantes en pots de Tempranillo non arrosées à la véraison ont des feuilles présentant une diminution de la conductance stomatique de 80% par rapport à des feuilles de plantes arrosées : la fermeture des stomates a pour conséquence une diminution de 60% de la photosynthèse (Bota *et al.* 2004). Au vignoble aussi, la sécheresse diminue les échanges gazeux. Ainsi, les feuilles de plants (cépage Moscatel) non arrosés présentent des conductances stomatiques 3 fois plus faibles que de feuilles de plants arrosés (de Souza *et al.* 2003). L'assimilation du CO_2 diminue dans ce cas de 65% par rapport aux feuilles des plants témoin. Enfin, l'assimilation nette de CO_2 a été comparée entre des plantes en pot arrosées quotidiennement et d'autres non arrosées (Patakas *et al.* 2002). Dans ce cas, les plantes non arrosées assimilent 2 à 3 fois moins de CO_2 que les plantes arrosées, selon la période de la journée ; ceci est dû à la réduction de la conductance stomatique de 50 à 80% des plantes non arrosées. Des diminutions de 50 à 90% de la conductance stomatique selon la période ont aussi été observées chez les cépages Tempranillo et Manto Negro non arrosés de la journée (Medrano *et al.* 2003). Cette plus grande fermeture des stomates a aussi conduit à une diminution de 40 à 60% de la photosynthèse.

Enfin, l'adaptation aux températures basses ou élevées est dépendante du cépage. En effet, à des températures inférieures à 20°C, les feuilles de Riesling présentent une photosynthèse un tiers plus élevée que les feuilles de Chasselas. Au contraire, au-delà de 34°C, les feuilles de Chasselas ont une assimilation nette de CO_2 plus du double de celles de Riesling (Zufferey *et al.* 2000).

3.1.1.2.3. Les températures élevées et la sécheresse

Souvent, la sécheresse résulte d'une période de températures élevées. Elle est un facteur majeur de la distribution géographique des plantes et elle est responsable des faibles rendements (Iba 2002). Cette sécheresse provoque une diminution de l'assimilation de CO₂ consécutive à la réduction de la conductance stomatique. Ainsi, des diminutions de 60% de la conductance stomatique et de la photosynthèse ont été obtenues chez des peupliers (*Populus kangdingensis* C.) cultivés sous une atmosphère quatre fois moins humide que chez des arbres témoins d'autres (Yin *et al.* 2005). Chez l'hétéromèle de Californie (*Heteromeles arbutifolia*), l'association de la sécheresse et des températures élevées limite la capacité photosynthétique des plantes (Valladares et Pearcy 1997).

Plusieurs études ont été menées sur la combinaison entre des températures élevées et de la sécheresse (Flexas *et al.* 1998 ; Escalona *et al.* 1999 ; Flexas *et al.* 2002). Chez la vigne comme chez les autres plantes en C₃, la sécheresse provoque une diminution de la conductance stomatique, ce qui limite les pertes d'eau. La fermeture des stomates induit la réduction de la photosynthèse (Flexas *et al.* 2002 ; Medrano *et al.* 2002). Quand des vignes en pot ne sont pas arrosées pendant 2 jours à 35°C le jour et 20°C la nuit, les stomates se ferment, ce qui réduit les pertes d'eau et provoque la diminution de l'assimilation du CO₂ (Flexas *et al.* 1998 ; Escalona *et al.* 1999 ; Flexas *et al.* 2002) : la fermeture totale des stomates, faisant passer la conductance stomatique de 200 à 0 mmol.m⁻².s⁻¹, induit une réduction de la photosynthèse nette de 14 à 3 μmol CO₂.m⁻².s⁻¹ (Flexas *et al.* 1999). La sécheresse affecte aussi l'efficacité du PSII (Flexas *et al.* 1999). Les plants de vigne en pots non arrosés ont ainsi des taux de transport d'électrons 4 fois inférieurs (30 μmol électrons.m⁻².s⁻¹) aux plants arrosés (120 μmol électrons.m⁻².s⁻¹) : le PSII est alors moins efficace car moins d'électrons sont disponibles.

La température, comme la lumière, est un facteur majeur de régulation de la photosynthèse chez la vigne. Ainsi, l'assimilation de CO₂ est optimale quand la température se situe entre 21°C et 32°C. En deçà ou au-delà de ces valeurs, la photosynthèse est diminuée.

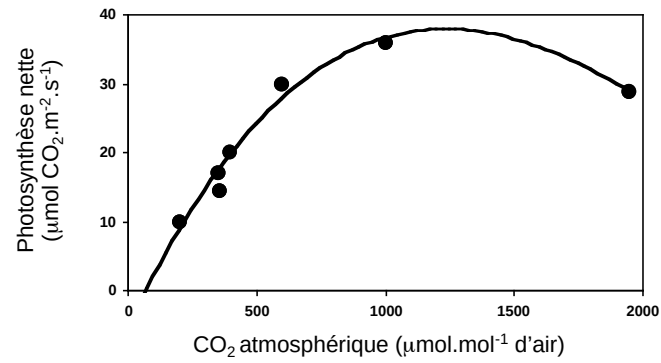


Figure 16. Evolution de la photosynthèse chez la Vigne en fonction de la concentration atmosphérique en CO₂ (Kriedemann et Lenz 1972, Maroco *et al.* 2002, Düring 2003, Hendrickson *et al.* 2004).

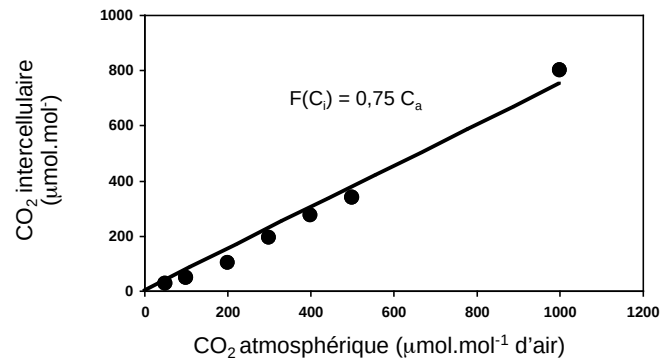


Figure 17. Evolution de la concentration intercellulaire en CO₂ (C_i) en fonction de la concentration atmosphérique en CO₂ (C_a) chez la Vigne (Düring 2003).

3.1.1.3. La régulation de la photosynthèse par le CO₂

Le CO₂ est naturellement présent à une concentration moyenne de 350 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ dans l'atmosphère (Aranjuelo *et al.* 2005). L'augmentation prévue de cette concentration dans les années futures a amené les chercheurs à étudier l'impact de concentrations en CO₂ élevées sur la photosynthèse. Dans ces conditions, la réaction de la plante se traduit par une réduction de la quantité de Rubisco et une diminution de l'activité photosynthétique (Moore *et al.* 1999). Ainsi, des plants de luzerne (*Medicago sativa* L.) exposés à une concentration en CO₂ de 730 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ (double de la concentration terrestre) présentent des diminutions de moitié de la photosynthèse. Cette réaction est due à l'incapacité de la plante à maintenir une teneur en CO₂ compatible avec la photosynthèse dans les chambres sous-stomatiques : la concentration élevée provoque alors une diminution de 75% de l'activité Rubisco (Aranjuelo *et al.* 2005). La photosynthèse des feuilles de citronnier (*Citrus unshiu*) diminue après une exposition de 90 jours à 600 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ de CO₂ : ceci est le résultat des réductions de l'activité et/ou de la concentration des enzymes du cycle de Calvin (Keutgen et Chen 2001). De même, des feuilles de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) présentent une inhibition de 92% de leur photosynthèse en présence de 1500 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ de CO₂ (Van Heerden *et al.* 2004).

Chez la vigne, la concentration en CO₂ du milieu dans lequel se trouvent les feuilles est un facteur limitant de l'efficacité de leur photosynthèse (Fig. 16). Par exemple, l'assimilation de CO₂ passe de 10 à 20 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lorsque la concentration du milieu ambiant augmente de 200 à 400 $\mu\text{mol CO}_2.\text{mol}^{-1}$ d'air, respectivement (Kriedemann et Lenz 1972). Chez le cépage Tempranillo, l'activité photosynthétique passe de 17 à 36 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, suite à l'augmentation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère de 350 à 1000 $\mu\text{mol CO}_2.\text{mol}^{-1}$ d'air (Maroco *et al.* 2002). Enfin, les feuilles de Riesling, sous une atmosphère de 1950 $\mu\text{mol CO}_2.\text{mol}^{-1}$ d'air, ont une photosynthèse de 28,9 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et seulement de 14,4 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en présence de 360 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ de CO₂ (Hendrickson *et al.* 2004).

La concentration en CO₂ de l'atmosphère (Ca) modifie la concentration intercellulaire (Ci) : chez le Riesling, cette dernière augmente linéairement quand la concentration en CO₂ du milieu est comprise entre 0 et 1000 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ d'air, selon $Ci=0,75 Ca$ (Düring 2003) (Fig. 17). De plus, la photosynthèse est dépendante de la concentration interne en CO₂. En effet, l'assimilation de CO₂ des feuilles augmente avec l'accroissement de la concentration en

Tableau 6. Effets du saccharose et du glucose sur l'expression de plusieurs promoteurs de gènes codant pour des protéines impliquées dans la photosynthèse (Sheen 1990).

Les protoplastes sont incubés dans des solutions glucidiques à 0,6 M de mannitol seul (témoin) ou de 0,6 M de mannitol avec 0,3 M de saccharose ou glucose.

Promoteur	Activité relative par rapport au témoin (%)	
	Saccharose (0.3 M)	Glucose (0.3 M)
C ₄ ppdkZm1CAT	7,3%	4,2%
C ₄ pepcZm1CAT	31,9%	12,5%
C ₄ meZm1CAT	24,1	11,1%
cabZm1CAT	26,9%	9,9%
cabZm5CAT	9,2%	8,3%
rbcSZm1CAT	7,7%	2,7%
rbcSZm3CAT	21,3%	4%
35SCAT	58,8%	57,6%
nosCAT	61,4%	57,5%
Adh1CAT	83,9%	76,8%
cypdkZm1CAT	17,6%	3,1%

Tableau 7. Effets de plusieurs glucides sur l'expression des promoteurs C₄ppdkZm1CAT (Sheen 1990) et cabZm5-cat (Jang et Sheen 1994).

Les protoplastes sont incubés dans des solutions glucidiques à 0,6 M de mannitol contenant 0,3 M de divers glucides.

Glucides	Activité relative par rapport au témoin (%)	
	C ₄ ppdkZm1CAT	cabZm5-cat
Témoin (0.6 M mannitol)	100%	100%
D-glucose	5,8%	15%
D-fructose	8,8%	50%
D-galactose	31,8%	15%
saccharose	6,8%	60%
D-mannose		3%
maltose		42%
lactose		92%
raffinose		90%

CO₂ intercellulaire et atteint son maximum pour $C_i=360 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ d'air. Au-delà, la photosynthèse se stabilise (Düring 2003).

Comme pour l'intensité lumineuse, l'assimilation nette de CO₂ en fonction de la concentration en CO₂ du milieu est une hyperbole : jusqu'à $1000 \mu\text{mol CO}_2.\text{mol}^{-1}$ d'air, la photosynthèse augmente avec la quantité de CO₂ dans l'air, puis au-delà de cette valeur, l'assimilation de CO₂ se stabilise autour de $30 \mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.1.1.4. La régulation de la photosynthèse par les glucides

Selon le mécanisme de rétrocontrôle positif, les faibles teneurs en glucides dans les feuilles stimulent généralement la photosynthèse, la mobilisation des réserves et l'exportation de glucides vers les organes puits (Koch 1996). Au contraire, l'abondance de glucides inhibe la photosynthèse, la croissance et la mise en réserve des glucides (Koch 1996).

Depuis les années 1990, plusieurs études ont montré que les glucides agissent sur l'expression de gènes codant pour des protéines intervenant dans différentes voies métaboliques chez les végétaux (Sheen 1990, 1994 ; Sheen *et al.* 1999). L'utilisation de protoplastes de maïs a montré que l'activité transcriptionnelle de sept promoteurs de gènes codant une protéine impliquée dans la photosynthèse est spécifiquement réprimée par le saccharose et le glucose. Cette répression par les glucides est plus efficace que les autres formes de régulation comme la lumière et le stade de développement (Sheen 1990). En fait, dans ce système, le glucose et ses analogues sont les inhibiteurs les plus probables de l'expression des gènes car ils agissent aux concentrations cellulaires. En général, les glucides sont des inhibiteurs de promoteurs de gènes codant une protéine impliquée dans la photosynthèse (Sheen 1990) (Tableau 6). Plus particulièrement, les substrats de l'hexokinase sont des inhibiteurs de transcription de ces promoteurs, comme *C₄ppdkZm1CAT* et *cabZm5-cat* (Sheen 1990 ; Jang et Sheen 1994) (Tableau 7). Sur cultures cellulaires de chénopode (*Chenopodium rubrum*), le glucose réprime la transcription du gène codant pour la Rubisco dès 12 h après son apport dans le milieu de culture (Krapp *et al.* 1993).

Les glucides, produits de la photosynthèse, exercent donc un rétrocontrôle négatif sur la photosynthèse : si les teneurs en glucides sont excessives au niveau des feuilles, la photosynthèse est inhibée alors que si ces teneurs sont faibles, elle est activée. Cependant,

l'activité photosynthétique possède toujours un certain niveau de base. Ce rétrocontrôle agit notamment sur l'expression des gènes codant pour des protéines intervenant dans la photosynthèse. Seule la transformation génétique, en diminuant la sensibilité des protéines régulant la photosynthèse, peut permettre une synthèse de glucides plus importante (Paul *et al.* 2001).

Chez la vigne, l'impact des glucides sur la photosynthèse n'a pas été étudié.

3.1.1.5. La photosynthèse au niveau des organes reproducteurs

Chez les végétaux, la photosynthèse a lieu au niveau des organes chlorophylliens comme les feuilles (Wang et Gregg 1992 ; Hieke *et al.* 2002) et les inflorescences chlorophylliennes (Bazzaz *et al.* 1979 ; Vemmos et Goldwin 1994 ; Clément *et al.* 1997). Les inflorescences sont donc capables de photosynthèse chez les plantes herbacées comme le pétunia (Weiss *et al.* 1988) ou le lys (*Lilium hybridum* var. Enchantment) (Clément *et al.* 1997) et chez les arbres comme l'oranger (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Vu *et al.* 1985) ou le pommier (*Malus pumila*) (Vemmos et Goldwin 1993, 1994). La photosynthèse des fleurs est très importante pour le développement des structures reproductrices car elle participe à l'effort reproducteur. Ainsi, chez l'érable à feuilles pourpres (*Acer platanoides*), la photosynthèse des fleurs apporte jusqu'à 64,5% de leurs besoins en glucides (Bazzaz *et al.* 1979). Chez les arbres fruitiers, l'assimilation de CO₂ par les fleurs et les fruits couvre de 3 à 15% des besoins en glucides de ces organes selon l'espèce et les conditions environnementales (Birkhold *et al.* 1992 ; Pavel et DeJong 1993 ; Marcelis et Baan Hofman-Eijer 1995 ; Hieke *et al.* 2002).

Chez la vigne, le métabolisme des glucides dans les inflorescences en développement est peu décrit jusqu'à la floraison, bien que cette plante soit sujette à une chute de fleurs importante pouvant atteindre 50% (Jackson et Coombe 1988). Il est généralement admis que les glucides nécessaires au développement des fleurs et des fruits proviennent de la mobilisation des réserves (Scholefield *et al.* 1978 ; Araujo et Williams 1988 ; Mullins *et al.* 1992 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata *et al.* 2004a) et/ou de la photosynthèse des feuilles (Ollat et Gaudillère 2000 ; Petrie *et al.* 2000). Récemment, il a aussi été montré que la photosynthèse des inflorescences intervient dans le développement des fleurs et fruits (Palliotti et Cartechini 2001).

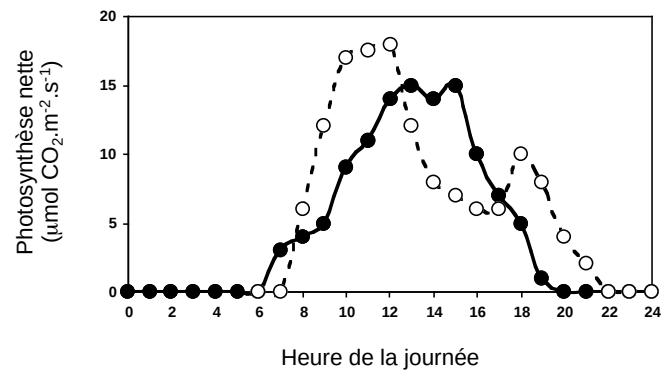


Figure 18. Evolution de la photosynthèse dans les feuilles de Vigne au cours de la journée (Schultz 2003).

Pour le graphique en fonction de l'heure de la journée, les cercles pleins représentent une journée où la température maximale est inférieure à 25°C et les cercles vides une journée où la température est supérieure à 30°C.

3.1.1.6. L'évolution de la photosynthèse chez la vigne au cours de la journée et de la campagne

La photosynthèse n'est pas un paramètre stable au cours du temps. En effet, elle varie en fonction de la période de l'année et au cours d'une journée selon les différents stimuli, notamment la température et la lumière.

3.1.1.6.1. La photosynthèse au cours de la journée

La photosynthèse n'est pas stable au cours d'une même journée et varie selon les paramètres du milieu, et la température au niveau des feuilles (Schultz 2003). En effet, selon la température foliaire, l'assimilation de CO₂ est différente (Fig. 18), la température agissant sur l'ouverture ou la fermeture des stomates qui favorise ou réduit la photosynthèse (Maroco *et al.* 2002 ; Patakas *et al.* 2002 ; Medrano *et al.* 2003 ; Schultz 2003). Quand la température est inférieure à 25°C, l'assimilation de CO₂ par les feuilles est maximale entre 12 h et 15 h car la température et l'intensité lumineuse sont maximales à cette période (Schultz 2003). Au contraire, quand la température est supérieure à 30°C, la photosynthèse augmente rapidement entre 8 h et 9 h, puis se stabilise jusqu'à midi. À cet instant, quand la température devient supérieure à 30°C, les stomates se ferment : les pertes d'eau sont alors limitées et la photosynthèse baisse continuellement jusqu'à 19 h (Schultz 2003). Ensuite, la photosynthèse augmente légèrement puis devient nulle avec le coucher du soleil.

Cependant, l'impact d'une température foliaire élevée (supérieure à 30°C) sur la photosynthèse semble être spécifique à chaque cépage. En effet, dans le cas du cépage Tempranillo cultivé au sud du Portugal, la photosynthèse maximale est atteinte à 10 h et se maintient jusqu'à 18 h bien que la température foliaire soit supérieure à 30°C de 9 h à 18 h (Maroco *et al.* 2002) : la photosynthèse n'est donc pas toujours réduite quand la température foliaire est supérieure à 30°C.

Le climat spécifique d'un lieu agit différemment sur la photosynthèse d'un cépage. Ainsi, aux Baléares, la photosynthèse augmente du lever du jour jusqu'à midi pour atteindre 11 et 14 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ chez les cépages Tempranillo et Manto Negro respectivement (Medrano *et al.* 2003). Ensuite, elle diminue continuellement le reste de la journée et devient nulle à 20 h. Les différences observées pour le Tempranillo entre cette étude et l'étude précédente (Maroco *et al.* 2002) s'expliquent par la localisation et les contraintes climatiques des vignobles : ainsi, le climat au sud du Portugal est plutôt maritime, alors que le climat aux

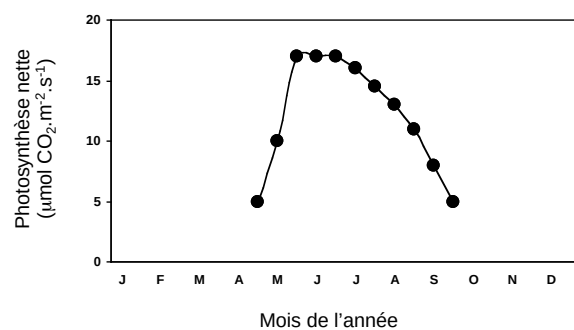


Figure 19. Evolution de la photosynthèse dans les feuilles de Vigne au cours de l'année (Stoev 1952).

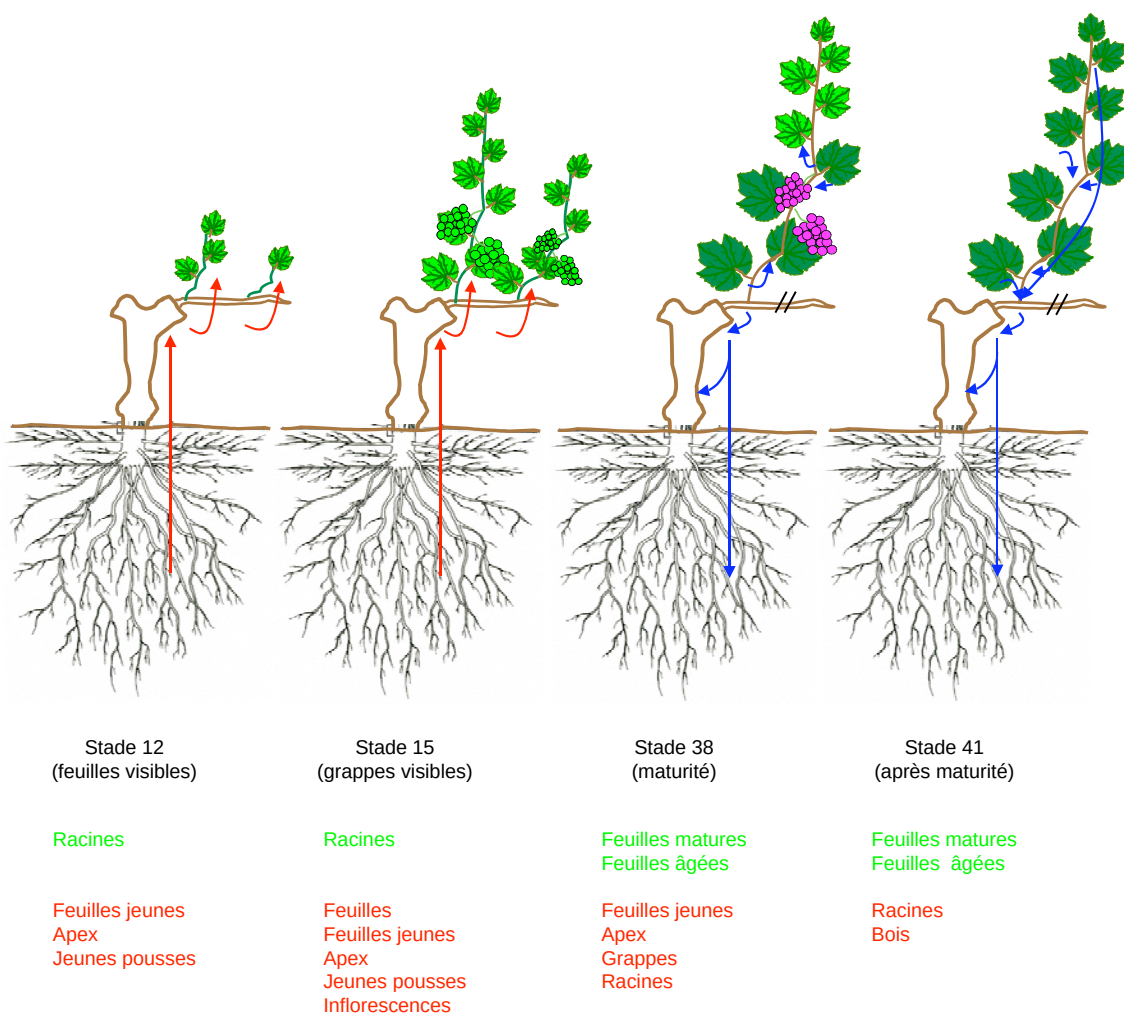


Figure 20. Schéma général des relations source/puits chez la vigne lors de son développement.

Les flèches rouges représentent le trajet des réserves et les bleues le trajet des photoassimilats.
Les organes sources sont indiqués en vert et les organes puits en rouge.

îles Baléares est un climat méditerranéen typique (températures élevées, intensité lumineuse, haut potentiel d'évapotranspiration et très peu de précipitations en été).

Enfin, des plantes en pot présentent des évolutions de photosynthèse différentes de celles observées au vignoble avec des taux plus faibles. Chez le Savatiano, l'assimilation de CO_2 est maximale dès 8 h ($11 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) puis diminue jusqu'à midi ($2 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). La photosynthèse n'augmente plus ensuite au cours de la journée, bien que les températures soient moins élevées (Patakas *et al.* 2002) : ceci montre que la température foliaire n'est pas le seul paramètre modifiant l'évolution de la photosynthèse au cours de la journée. Aussi, des plants de Chardonnay cultivés en serre assimilent à des taux d'environ $6 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Chaumont *et al.* 1994) : la photosynthèse de ces plants chute à midi ($2 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et augmente ensuite jusqu'à 17 h ($8 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Dans tous les cas présentés ici, la photosynthèse de la vigne est limitée par la conductance stomatique (Maroco *et al.* 2002 ; Patakas *et al.* 2002 ; Medrano *et al.* 2003 ; Schultz 2003). Les stomates sont en effet très sensibles aux variations de températures : leur ouverture et leur fermeture limitent les pertes d'eau dues à une température élevée.

3.1.1.6.2. La photosynthèse au cours de la campagne

Chez la vigne, la photosynthèse rapportée à la surface des feuilles et au pied augmente depuis le débourrement jusqu'au mois de juin (floraison) puis décroît progressivement jusqu'à la sénescence des feuilles (Stoev 1952) (Fig. 19). Dès le débourrement, les feuilles de vigne assimilent du CO_2 (Griffon 1905). Cependant, leur photosynthèse demeure très faible tant que ces feuilles sont jeunes (Kriedemann 1968) : elles ne deviennent ainsi exportatrices de glucides que lorsqu'elles atteignent un tiers (Koblet 1969) ou 50% (Stoev 1952 ; Hale et Weaver 1962) de leur surface finale (Fig. 20). Chez le Chasselas, la capacité photosynthétique des feuilles est maximale quand les feuilles atteignent 75 à 100% de leur surface finale, puis se maintient à ce niveau pendant environ 30 jours (Zufferey *et al.* 1999). À l'échelle de la plante, la photosynthèse est maximale avant et pendant la floraison (Zufferey *et al.* 1999 ; Zufferey et Murisier 2002). De plus, chez le Chasselas (Zufferey *et al.* 1999) et le Riesling (Schultz *et al.* 1996), la capacité d'assimilation de CO_2 reste supérieure à 70% de la capacité maximale pendant environ 100 jours, ce qui permet le développement des jeunes baies. Au contraire, des plants de Chardonnay cultivés en serre ne présentent pas de différences significatives du mois d'avril au mois de juillet avec une assimilation de CO_2 comprise entre

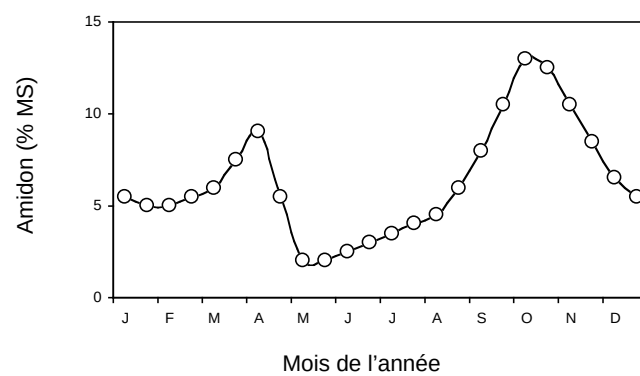


Figure 21. Courbe théorique de l'évolution de la teneur en amidon d'un vieux bois de Vigne au cours d'une année (Zapata 1998).

11 et 14 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Chaumont *et al.* 1994). Ensuite, l'activité photosynthétique des feuilles décroît progressivement jusqu'à leur sénescence (Stoev 1952 ; Schultz *et al.* 1996 ; Bertamini et Nedunchezian 2003b). La diminution de la photosynthèse est alors due à la réduction de plusieurs paramètres comme la conductance stomatique (Schultz *et al.* 1996), la quantité de protéines (Bettner *et al.* 1986) et de Rubisco (Hunter *et al.* 1994) dans les feuilles.

Les teneurs en pigments des fleurs et baies varient au cours de la campagne. Ainsi, le taux de pigments est maximal dans les fleurs de Cabernet Sauvignon dès 15 jours avant l'anthèse, puis se stabilise à 2 et 0,5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche pour les chlorophylles a et b respectivement (Palliotti et Cartechini 2001). À partir de l'anthèse, les concentrations en chlorophylles diminuent pendant 5 à 7 semaines pour atteindre 0,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche.

3.1.2. L'amidon, principal glucide de réserve chez la Vigne

Chez la vigne, l'amidon est le principal glucide de réserve (Winkler et Williams 1938 ; Eifert *et al.* 1960 ; Bouard, 1966 ; Mullins *et al.* 1992 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata 1998). Au cours de l'année, il est dégradé ou synthétisé selon les besoins de la plante. De plus, sa localisation diffère selon la période de la campagne.

L'amidon est accumulé dans les bois, le cep et les racines de la nouaison à la chute des feuilles (Eifert *et al.* 1960 ; Mullins *et al.* 1992). Selon la période de l'année, l'amidon n'est pas localisé dans les mêmes tissus. Durant la dormance hivernale, l'amidon est principalement détecté dans les parenchymes médullaires et corticaux des racines et des rameaux (Zapata *et al.* 2004a). À cette période, 90% de l'amidon est contenu dans les racines (Eifert *et al.* 1960 ; Bouard, 1966 ; Bates *et al.* 2002). Ces réserves sont progressivement mobilisées lors de la reprise de la croissance végétative (pousses et jeunes feuilles) au printemps (Zapata *et al.* 2004a) (Fig. 21). À partir de l'anthèse, l'amidon nouvellement formé s'accumule dans les tissus des pousses annuelles (Bates *et al.* 2002) et les parties pérennes (Mullins *et al.* 1992 ; Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a). Les teneurs en amidon des sarments varient du simple au sextuple selon la saison (Eifert *et al.* 1960) (Fig. 21). Ces variations s'expliquent par la proximité des sarments (par rapport aux racines et au cep) avec les organes en croissance (régions apicales, inflorescences, ...).

Chez la vigne, l'amidon assure les besoins en glucides de la plante lorsque la photosynthèse n'en produit pas suffisamment (Eifert *et al.* 1960 ; Bouard 1966 ; Mullins *et al.*

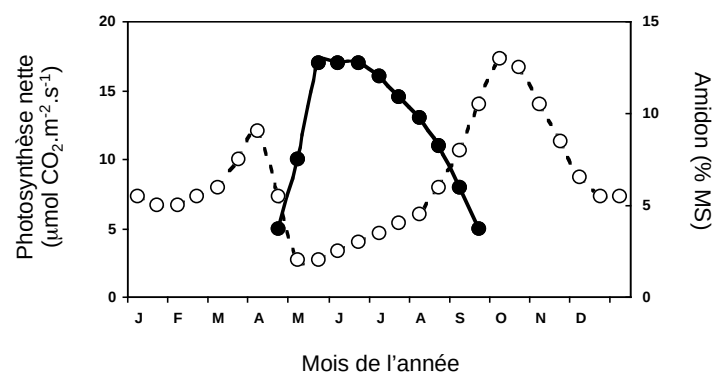


Figure 22. Evolution de la teneur en amidon dans les parties pérennes et de la photosynthèse au cours du développement de la Vigne (Stoev 1952, Zapata 1998).

Les cercles vides représentent la teneur en amidon dans les parties pérennes et les cercles pleins la photosynthèse.

1992 ; Huglin et Schneider 1998). La synthèse d'amidon est dépendante de la photosynthèse : elle a lieu lorsque la photosynthèse produit plus de glucides que nécessaire au maintien des métabolismes et au développement des structures. La mise en réserve d'amidon débute donc principalement à la nouaison et se termine à la chute des feuilles, quand le nombre de feuilles permet une production en assimilats supérieure aux besoins énergétiques liés à la croissance. Pendant l'hiver, seule une très faible activité métabolique interne (catabolisme des glucides) persiste ce qui permet de protéger la plante du gel (Sauter et Van Cleve 1994). En effet, la dégradation de l'amidon donne des glucides solubles qui augmentent la pression osmotique et abaissent ainsi le point de congélation du milieu cellulaire. Peu avant le débourrement, lorsque la température du sol atteint 10 à 12°C, la vigne sort de sa dormance (Huglin 1986). À ce moment, la seule source de glucides de la vigne est l'amidon (Scholefield *et al.* 1978 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004b) qui permet le développement des structures reproductrices et végétatives au printemps (Bates *et al.* 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004a, b). Cet apport de glucides de réserve aux organes en croissance est ensuite remplacé par les assimilats produits par l'activité photosynthétique foliaire. Exceptionnellement, l'amidon peut encore assurer les besoins en glucides de la plante pendant la saison estivale si la photosynthèse n'exporte pas suffisamment de glucides aux différents organes (par exemple, suite à un stress).

La mobilisation des réserves et la photosynthèse interviennent donc en complément tout au long de l'année et pourvoient aux besoins de la plante (Fig. 22).

3.2. Le rôle des glucides

3.2.1. Les glucides et les stress

Lors de stress biotiques ou abiotiques, l'assimilation photosynthétique est fortement diminuée (Foyer *et al.* 2002 ; Nogues *et al.* 2002). La réduction de la photosynthèse entraîne généralement une diminution de la teneur en glucides nécessaires pour assurer la croissance (Liu et Huang 2000) et la reconstitution des réserves. Selon le stress, les plantes réagissent différemment pour pallier le manque de photoassimilats. Ainsi, le soja (*Glycine max* L.) cultivé au champs et stressé par une atmosphère contenant 50 à 60 nL d'ozone.L⁻¹ hydrolyse une partie de ses réserves glucidiques (Britz et Robinson 2001). Sous l'effet de basses températures (5°C jour et nuit), les feuilles de blé (*Triticum aestivum* L.) accumulent des

glucides solubles (glucose, fructose et saccharose) pouvant jouer un rôle protecteur contre le froid (Savitch *et al.* 2000), bien que ces quantités de glucides puissent inhiber le transport des glucides vers les organes puits comme chez le maïs (*Zea mays* L.) (Sowinski *et al.* 1999) et l'abutilon strié (*Abutilon striatum*) (Lohaus *et al.* 2000). De plus, chez le chrysanthème (*Chrysanthemum Dendranthema x grandiflorum*), les tiges coupées accumulent 2 fois plus de glucose et fructose quand elles sont cultivées à 20°C, température suboptimale, qu'à 30°C, température optimale (Adachi *et al.* 2000). Les jeunes pousses de peuplier tremble (*Populus tremulus* L.) cultivées *in vitro* accumulent les glucides solubles (glucose, fructose et saccharose) lorsqu'elles subissent un stress hydrique (Pelah *et al.* 1997). Enfin, chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en milieu salin, les teneurs en glucose, fructose, saccharose et amidon du péricarpe augmentent en fonction de la concentration en sels du milieu (de 70 à 140 mM NaCl) (Balibrea *et al.* 1996).

Chez la vigne, les études sur les stress provoqués par un pesticide et 2 fongicides ont montré des résultats différents selon le modèle considéré. Ainsi, des plants de vigne cultivés *in vitro* dans un milieu contenant 1, 10 et 100 µM de l'herbicide flumioxazine présentent des concentrations de glucides dans les feuilles, tiges et racines supérieures à celles des plantes témoins (Saladin *et al.* 2003a). Cependant, cette augmentation des taux de glucides n'est pas due à une augmentation de la photosynthèse mais à une plus grande absorption des glucides présents dans le milieu de culture. Chez le même modèle, l'application sur les feuilles des fongicides fludioxonil (0 à 30 mM) ou pyriméthanil (0 à 75 mM) provoque une diminution de la concentration en amidon et de la photosynthèse, ainsi qu'une augmentation de la concentration en sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) dans les feuilles. L'impact de ces fongicides (utilisés au vignoble contre *Botrytis cinerea*) est donc la mobilisation des réserves en réponse à l'inhibition de l'assimilation de CO₂ (Saladin *et al.* 2003b).

Sur boutures fructifères, l'application de l'herbicide flumioxazine ou des fongicides fludioxonil et pyriméthanil augmente la mise en réserve des glucides et diminue la concentration en hexoses (glucose et fructose) dans les feuilles (Saladin *et al.* 2003b, c).

Au vignoble, la flumioxazine stimule la photosynthèse provoquant l'accumulation de monosaccharides (glucose et fructose) et mobilise l'amidon et le saccharose (Saladin *et al.* 2003c). De même, les fongicides provoquent l'augmentation de la concentration en glucides solubles (glucose, fructose et saccharose) dans les feuilles ainsi que la mobilisation de l'amidon (Saladin *et al.* 2003b).

Aux stades phénologiques A-01 (bourgeon d'hiver), B-02 (bourgeon dans le coton) et C-05 (pointe verte), les faibles températures (de -30 à -6°C) induisent un changement de quantité des glucides dans les bourgeons. En effet, le stress provoqué par ces températures inférieures à 0°C provoque une accumulation d'amidon et de raffinose ainsi qu'une diminution de la quantité de saccharose dans les bourgeons là où les teneurs en fructose et glucose ne varient pas (Aït Barka et Audran 1996).

Chez la vigne, le métabolisme glucidique varie en fonction du stress (fongicides, herbicide, froid) et du cépage. L'étude du métabolisme glucidique en conditions normales et stressantes doit donc être entreprise.

3.2.2. Les glucides lors de la reproduction

La floraison est l'ensemble des étapes menant à la formation des organes sexués et à la reproduction. Chez les plantes supérieures, elle débute lors de l'évocation florale et se termine par la fécondation.

Pendant la floraison, la demande en glucides est permanente de l'évocation florale (King et Evans 1991 ; Rideout *et al.* 1992) jusqu'à la maturation des organes floraux (Wang et Breen 1984 ; Tirosh et Mayak 1988 ; Mc Conchie *et al.* 1991 ; Clément *et al.* 1996) et des fruits (Loescher *et al.* 1990). Les réserves glucidiques ont un rôle majeur lors de la floraison, influençant fortement le succès reproducteur (Charlesworth 1989) et la croissance des fleurs chez les ligneux (Oliveira et Priestley 1988). Les sucres impliqués dans l'évocation florale et dans le développement de la fleur peuvent être des sucres solubles comme le saccharose (Bodson et Outlaw 1985 ; Houssa *et al.* 1991) ou des sucres insolubles comme l'amidon (Komarova et Milyaeva 1991 ; Lejeune *et al.* 1993 ; Clément *et al.* 1994, 1996). Ces glucides proviennent de la photosynthèse (Wang et Breen 1986, 1987), des réserves (Candolfi-Vasconcelos *et al.* 1994) ou des deux (Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004b).

3.2.2.1. L'évocation florale (transition florale)

Le méristème apical est la source de tous les organes post-embryonnaires chez les plantes supérieures (Clark 2001). La transition de la phase végétative à la phase reproductrice a lieu dans ce méristème et est appelée évocation ou transition florale. Elle se décompose en 2

étapes distinctes contrôlées génétiquement : 1/ la transformation du méristème végétatif en méristème inflorescentiel et 2/ la transformation du méristème inflorescentiel au méristème floral (Battey et Tooke 2002 ; Chuck et Hake 2005).

De nombreux travaux ont porté sur les gènes régulant la transition florale (Yanofsky 1995 ; Rouse *et al.* 2002 ; Zik et Irish 2003 ; Komeda 2004 ; Moon *et al.* 2005) et beaucoup moins sur l'impact des glucides lors de cette étape importante du développement floral (Levy et Dean 1998). Ainsi, l'évocation florale est régulée par un ensemble complexe de gènes qui contrôlent le développement en fonction des conditions environnementales (photopériode, qualité de lumière, température, ...) et des signaux endogènes (hormones, glucides, ...) (Araki 2001 ; Boss *et al.* 2004). La régulation de l'initiation florale est assurée par un réseau complexe de voies de signalisation (Mouradov *et al.* 2002), dont celles des hormones et des glucides qui sont très liées (Gazzarrini et McCourt 2001).

Le déterminisme de la transition florale par les signaux endogènes semble être prépondérant (Boss *et al.* 2004), bien que les mécanismes de régulation par les conditions environnementales soient les plus étudiés. Par exemple, chez l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), plante de jours longs, les promoteurs de transition florale comme les gibbérellines induisent la floraison en l'absence de jours longs (Reeves et Coupland 2001). Au contraire, chez la vigne, les gibbérellines inhibent la transition vers les méristèmes floraux (Boss et Thomas 2002).

La concentration en glucides dans les sèves est un facteur endogène participant à la transition florale (Bernier *et al.* 1993 ; Lejeune *et al.* 1993). Dès 1977, il a été montré que l'induction florale se traduit par une modification des relations source/puits, résultant en une meilleure alimentation du méristème apical notamment en glucides (Sahchs et Hackett 1977). Cet apport en glucides serait notamment facilité par des variations de l'activité invertase acide au niveau de l'apex (Pryke et Bernier 1978). Ce phénomène est indépendant des facteurs environnementaux comme la longueur des journées, la vernalisation, la quantité et la qualité de lumière (Sahchs et Hackett 1977). D'ailleurs, une des premières hypothèses de la transition florale était la présence de stimuli floraux dans le phloème (Bernier *et al.* 1981). La nature de ces stimuli a longtemps été discutée mais les glucides, ainsi que les hormones, pourraient en faire partie (Bernier *et al.* 1988, 1993 ; Levy et Dean 1998). Chez la moutarde blanche (*Sinapis alba*) et l'arabette des dames, l'apport massif de glucides (et d'acides aminés) vers le

méristème apical induit la transition florale (Lejeune *et al.* 1991 ; Corbesier *et al.* 1998, 2001). L'efficacité de l'induction florale serait relative à l'augmentation de saccharose affecté aux méristèmes (Corbesier *et al.* 1998). Le saccharose serait un signal déclenchant l'initiation florale : des mutants d'*Arabidopsis* synthétisant peu d'amidon sont incapables d'initier leur floraison. En effet, la dégradation des faibles quantités d'amidon accumulé le jour ne fournit pas assez de glucides, et notamment de saccharose. Or, ces composés glucidiques servent de signal à l'initiation florale (Yu *et al.* 2000). De plus, chez le fuschia (*Fuschsia hydrida*), une forte corrélation ($r^2=0,93$) entre la floraison et le contenu en saccharose des apex montre le rôle de stimulus du saccharose vis-à-vis de la floraison (King et Ben-Tal 2001). Ces travaux, comme ceux de Bernier *et al.* (1993), montrent l'importance du saccharose dans l'initiation florale.

Par ailleurs, la transition florale est influencée par la disponibilité relative de glucides et d'azote (rapport C/N) au niveau du méristème apical. Chez le tabac, plante à jours longs, l'indisponibilité en azote et la disponibilité en glucides au niveau du méristème après le début du jour long favorisent l'augmentation de la teneur en glucides dans le méristème et accélèrent la floraison (Rideout *et al.* 1992). Chez la moutarde blanche et l'arabette des dames, plantes de jours longs, l'analyse de la sève élaborée parvenant au méristème a montré que le rapport C/N est doublé, voire triplé, 16 h après le début du régime de jour long (Corbesier *et al.* 2002).

En culture *in vitro* aussi, les glucides, notamment le saccharose, sont inducteurs de l'initiation florale. Chez le chénopode, la lentille d'eau (*Lemna minor*), le soja, le tabac (*Nicotiana tabacum* L.) et la pérille (*Perilla frutescens* L.), les milieux de culture pour la production de fleurs *in vitro* doivent contenir plus de saccharose que pour la croissance végétative, et moins d'azote car une trop grande quantité d'azote inhibe la floraison (Dickens et van Staden 1988). Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), le saccharose induit la transition florale d'apex de plantes végétatives jusqu'à une concentration maximale (30 g.L^{-1}), puis l'inhibe quand sa teneur est plus élevée : ainsi, 41,2% des apex de plantes végétatives donnent des fleurs en présence de 30 g.L^{-1} de saccharose (Dielen *et al.* 2001). Au-delà, le pourcentage de floraison baisse et devient nul à 60 g.L^{-1} . De même chez l'arabette des dames, le saccharose induit ou inhibe la transition florale en fonction de sa concentration : il est inducteur de floraison à 1% (Roldan *et al.* 1999) mais la retarde à 5% (Ohto *et al.* 2001).

Les glucides participent aussi à la régulation de l'expression de nombreux gènes dont ceux intervenant lors des différentes étapes de la floraison (Koch 1996). Chez l'arabette des dames, les mutants *co*, *gi*, *fca*, *fpa*, et *fve* cultivés *in vitro* perdent partiellement leur phénotype floraison tardive quand le milieu de culture contient 1% de saccharose (Roldan *et al.* 1999). Le saccharose à 5% affecte aussi la transition florale en inhibant les gènes qui la contrôlent (Ohto *et al.* 2001). De plus, la régulation de l'accumulation d'amidon et celle de la floraison tardive chez *Arabidopsis thaliana* semblent être reliées : en effet, les mutants à floraison tardive contiennent jusqu'à 4 fois plus d'amidon dans leurs feuilles que les plantes témoins. De plus, l'altération de la teneur en amidon et le phénotype floraison tardive sont dus à une mutation récessive monogénique du gène *cam1* (carbohydrate accumulation mutant 1) (Eimert *et al.* 1995). Cependant, la floraison tardive n'est pas causée par l'augmentation d'amidon dans les feuilles.

Le glucose seul agit également sur la floraison : en effet, les arabettes des dames arrosées avec des solutions de glucose de 2 et 6% ont une floraison retardée de 30 jours et un nombre de rosettes supérieur aux plantes témoins (Zhou *et al.* 1998).

Chez la vigne, l'apport de photoassimilats à l'anthèse est nécessaire à l'initiation des inflorescences. L'initiation florale débute dès l'anthèse de l'année $n-1$. Ainsi, la défoliation totale de plants de Pinot noir cultivés au vignoble à partir de l'anthèse de l'année n induit une diminution 65% du débourrement des bourgeons l'année $n+1$, passant de 95% pour les plantes témoin à 35% pour les plantes défoliées (Candolfi-Vasconcelos et Koblet 1990). De plus, ce traitement aboutit à une réduction de 1,5 à 0,5 inflorescences par nœud. La productivité des bourgeons lors de l'année $n+1$ est donc largement dépendante de la quantité de glucides présents au moment de l'initiation florale.

3.2.2.2. Le développement des structures reproductrices

Après l'évocation florale, les organes floraux se mettent en place. Durant leur développement, ces organes sont sensibles aux stress environnementaux et aux stimuli internes.

Le développement du pollen, en particulier la méiose pollinique, est un des processus les plus sensibles aux stress. Ceux-ci provoquent des modifications du métabolisme

glucidique menant à l'avortement du pollen, à une diminution de son potentiel germinatif ou à sa stérilité (Saini et Aspinall 1981 ; Namuco et O'Toole 1986 ; Dorion *et al.* 1996 ; Aloni *et al.* 2001). Or, les glucides sont les nutriments essentiels au développement normal de grains de pollen fonctionnels (Pacini 1996). Ainsi, durant son développement, le grain de pollen du blé accumule de l'amidon, et il avorte quand cette accumulation est inhibée par une altération du métabolisme carboné ou de l'apport de glucides (Dorion *et al.* 1996). De même, la germination des grains de pollen de poivron (*Capsicum annuum* L.) chute de 24 à 6% sous l'effet d'un stress de température modéré (28°C pour les plantes contrôle et 32°C pour les plantes traitées) lors de la méiose pollinique (Aloni *et al.* 2001). Cette diminution du taux de germination est due à l'augmentation des teneurs polliniques en amidon et saccharose résultant de la réduction du métabolisme glucidique sous l'effet de la température. Chez les lys, les anthères dégradent leur amidon durant leur phase de croissance (de la méiose à la mitose sporales), alors que les grains de pollen synthétisent et accumulent l'amidon lors de la phase de maturation de l'anthère qui débute peu avant la mitose des microspores : il existe donc une relation entre le développement de l'anthère et celui des microspores car l'amidon synthétisé par les microspores proviendrait de l'hydrolyse de l'amidon de l'anthère (Clément *et al.* 1994).

L'amidon intervient dans le développement des structures femelles et, en particulier, de l'ovule. Ainsi, chez l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), le développement de l'ovule est dépendant de ses réserves d'amidon (Rodrigo et Herrero 1998). En effet, cet amidon est utilisé pour la croissance l'ovule après l'anthèse. De plus, la quantité d'amidon présente dans les ovules d'abricot à l'anthèse détermine le devenir de l'ovule fécondé (Rodrigo *et al.* 2000). Une fleur donnera ainsi un fruit si la quantité d'amidon présente dans son ovule est suffisante pour supporter les premières phases de son développement jusqu'à ce que les photoassimilats interviennent. Dans le cas contraire (quantité d'amidon dans l'ovule insuffisante), un ovule fécondé donnera un fruit mais ce dernier tombera faute de nutriments.

Chez la vigne, de la floraison à la formation des jeunes fruits, la sève élaborée présente une augmentation significative de sa teneur en glucides transportés vers les grappes (Glad 1992). Ce surplus de glucides serait dû à l'augmentation de la force puits des inflorescences lors de leur transformation en grappes. La coulure correspond à un déficit en glucides au niveau des baies (Merjanian et Ravaz 1930). Une force puits des inflorescences et des grappes trop faible serait donc un facteur favorisant la coulure. Au début de la floraison, les

photoassimilats sont principalement attirés par les organes puits que sont les apex et les inflorescences (Glad 1992). De plus, la mobilisation des réserves chez le Pinot noir et le Merlot a lieu au moment 2-3 semaines avant la floraison, au moment de la méiose ovulaire (Zapata 1998). L'hypothèse sous-jacente de cette étude est l'importance de la reprise d'assimilation photosynthétique le plus tôt possible, ce qui permet de palier au manque de nutriments provenant de la mobilisation des réserves.

3.2.2.3. L'anthèse

L'anthèse est le développement des pièces florales de leur épanouissement à leur flétrissement. Cette étape représente donc la phase visible de la floraison. L'ouverture des fleurs est due à l'expansion des pétales sous la dépendance de facteurs externes (température, lumière, humidité) et internes comme les glucides : chez la plupart des espèces, la mobilisation des réserves et/ou l'importation de saccharose accompagne l'ouverture des fleurs (van Doorn et van Meeteren 2003). Selon les espèces, le glucide accumulé dans les pétales avant leur ouverture est différent. Chez la rose (*Rosa damascena* P. Miller) (Hammond 1982), le lys (*Lilium hybridum* var. Cordelia, Mona, Elite, Montrose) (Bielecki *et al.* 2000) et le lys des incas (*Alstroemeria auriantaca*) (Collier 1997), les jeunes pétales contiennent de l'amidon dégradé en glucose et fructose peu de temps avant l'ouverture des fleurs. Chez le pâturen (*Phipssia aligida*) (Solhaug et Aares 1994) et la campanule fausse raiponce (*Campanula rapunculoides*) (Vergauwen *et al.* 2000), le fructane est le glucide accumulé dans les pétales avant l'ouverture. Chez le chrysanthème, l'amidon et le fructane sont dégradés pendant l'expansion des pétales (Trusty et Miller 1991).

Les glucides utilisés lors de l'ouverture des fleurs proviennent de la mobilisation des réserves et des glucides présents dans la sève élaborée. Ainsi, chez le glaïeul, l'augmentation de glucides dans les pétales est 8 fois supérieure à la diminution d'amidon (Yamane *et al.* 1991) et chez le freesia (*Freesia hybrida* var. Polaris) 10 fois supérieure (van Meeteren *et al.* 1995). Les quantités supplémentaires de glucides nécessaires à l'ouverture des fleurs proviennent donc des photoassimilats transportés dans les sèves.

Chez la vigne, la relation entre les glucides et l'ouverture de la fleur n'a jamais été étudiée.

3.2.2.4. La pollinisation et la fécondation

Chez les végétaux, la reproduction se décompose en plusieurs étapes : tout d'abord, les grains de pollen sont en contact avec le stigmate qui les retient et les hydrate, c'est la pollinisation (Gaude et McCormick 1999 ; Swanson *et al.* 2003). Ensuite, le pollen germe dans le pistil et forme le tube pollinique lors de la germination (Cheung 1996). Enfin, les gamètes mâles fusionnent avec les gamètes femelles, c'est la fécondation. Durant ces étapes, les glucides ont aussi un rôle important.

Le tube pollinique est hétérotrophe pour sa croissance. Il tire ses nutriments de ses propres réserves accumulées dans la cellule végétative, puis dans les cellules du pistil qui l'entourent (Herrero et Dickindon 1979 ; Herrero 2001 ; Sanchez *et al.* 2004). Il utilise les réserves des cellules de pistil pour se développer. Pour d'autres, la croissance et la direction du tube pollinique ne nécessiteraient pas de glucides exogènes lors du trajet du tube pollinique dans le pistil (Lush *et al.* 1998). Lors de la pollinisation et de la pénétration du tube pollinique dans le pistil, le contenu glucidique des cellules du pistil décline et l'amidon des amyloplastes des cellules en contact avec le tube pollinique est dégradé (Cheung 1996 ; Herrero et Hormaza 1996). De plus, ces cellules sont vidées de leur cytoplasme. Néanmoins, les cellules du pistil secréteraient de nombreux composés, parmi lesquels des glucides, dans la matrice extracellulaire (Cheung 1996 ; Swanson *et al.* 2003 ; Weterings et Russell 2004). Ces composés fournissent les nutriments nécessaires à la croissance rapide des tubes polliniques après que les réserves du grain de pollen aient été épuisées. Le suivi des glucides au niveau du pistil a ainsi montré que ces derniers étaient absorbés par les tubes polliniques en croissance et utilisés par ces derniers pour la synthèse de leur paroi cellulaire (Labarca et Loewus 1973). Enfin, les tubes polliniques seraient attirés vers les ovules grâce aux exsudats qu'ils secrètent car les micropyles des ovules sont couverts d'exsudats riches en glucides (Franssen-Verheijen et Willemse 1993).

Chez la vigne, aucune étude n'a montré l'importance des glucides lors de la pollinisation et de la fécondation.

4. Objectifs du travail

4.1. Contexte socio-économique

En 2004, le rendement moyen en Champagne était de 23 000 kg.ha⁻¹. Or, cette même année, le comité régional de l'I.N.A.O. donna un rendement de 12 000 kg.ha⁻¹ par exploitation pour l'A.O.C. De plus, la législation ordonne que toutes les parcelles doivent être vendangées ; ceci induit un surcoût financier pour les viticulteurs. Le problème de la coulure ne paraît plus être d'actualité car la dernière année à coulure remonte à 1984. Néanmoins, la compréhension des mécanismes menant à la coulure doit être entreprise avant qu'une nouvelle année à coulure ait lieu, et ainsi limiter son impact. Plus que la coulure elle-même, les mécanismes physiologiques contrôlant la floraison doivent être étudiés. En effet, les rendements supérieurs à ceux exigés par l'A.O.C. n'étant pas profitables aux viticulteurs, la **maîtrise des rendements** est la voie par laquelle les professionnels de la filière peuvent allier quantité et qualité du produit. Parmi les nombreux régulateurs de la floraison, les glucides sont connus pour intervenir de manière primordiale de l'initiation florale à la nouaison chez de nombreuses espèces végétales. Cependant, chez la vigne, l'impact des glucides sur les mécanismes contrôlant la floraison a été très peu étudié.

Le **Réseau Vigne et Vins Septentrionaux (R.V.V.S.)** est une structure interrégionale dont le but est de favoriser les collaborations et la concertation entre les acteurs de la filière viti-vinicole des régions Alsace, Bourgogne et Champagne-Ardenne. Ainsi, le R.V.V.S. est un point de rencontre entre les chercheurs (I.N.R.A., Universités, C.N.R.S.), les techniciens (I.T.V., chambre d'agriculture, centres techniques...), les représentants des interprofessions viti-vinicoles (B.I.V.B., C.I.V.A., C.I.V.C., C.I.V.J.) et les bailleurs de fonds publics (Conseils régionaux, Etat et Région). Les différents programmes de ce réseau s'intéressent directement et indirectement à la filière : viticulture, œnologie et environnement. Parmi ces programmes, un axe de recherche porte sur la **physiologie et la maîtrise des rendements chez la Vigne**. Cet axe s'articule en 2 volets :

Le volet A porte sur l'étude du fonctionnement de la plante dans son ensemble et cherche à comprendre les relations entre la disponibilité en assimilats et la formation des baies et pépins.

Le volet B vise à préciser l'impact des glucides sur le développement floral et à contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant le phénomène de coulure.

L'objectif de cet axe de recherche est de comprendre la relation entre les glucides présents dans les inflorescences et la floraison. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le volet B de cet axe.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse devraient permettre de mieux connaître le rôle des glucides lors de la floraison chez la vigne. Ils contribueront aussi à expliquer les différences entre les cépages sensibles et les peu sensibles à la coulure. Enfin, ils devront fournir un outil de prédiction de la floraison aux vignerons afin que ceux-ci puissent adapter leur pratiques culturales au rendement désiré.

4.2. Stratégie adoptée

Chez la vigne, les différences physiologique, métabolique ainsi qu'en terme de développement des structures reproductrices entre les variétés sont importantes (Bernard et Chalias 1986, 1987 ; Reynier 1989 ; Fougère-Rifot *et al.* 1993 ; Huglin et Schneider 1998). Nous avons donc choisi d'étudier deux cépages présentant une sensibilité différente à la coulure. **Le Gewurztraminer (GW)** est considéré comme sensible à la coulure (Huglin et Schneider 1998) alors que **le Pinot noir (PN)** est peu sensible à ce phénomène (Zapata 1998). Pour comprendre les mécanismes expliquant les différences de nouaison entre ces deux cépages, il est nécessaire de les caractériser au vignoble.

Les classifications de Baggiolini (1952) et Eichhorn et Lorenz (1977) sont les plus utilisées par les professionnels. Cependant, les critères utilisés pour déterminer le stade de développement des inflorescences sont uniquement fondés sur des caractères morphologiques tels que le nombre de feuilles, le nombre de grappes ou le pourcentage de fleurs ouvertes. Ainsi, ces critères ne reflètent pas les stades de développement des structures reproductrices, et notamment les étapes clé comme les méioses et les mitoses polliniques et ovulaires. Des études précédentes sur les cultivars Merlot, Cabernet-Sauvignon et Chardonnay (Fougère-Rifot *et al.* 1993) et sur Grenache et Carignan (Bernard et Chalias 1986, 1987) ont montré que le moment de la méiose et la durée entre celle-ci et la floraison sont dépendants du cépage. Il

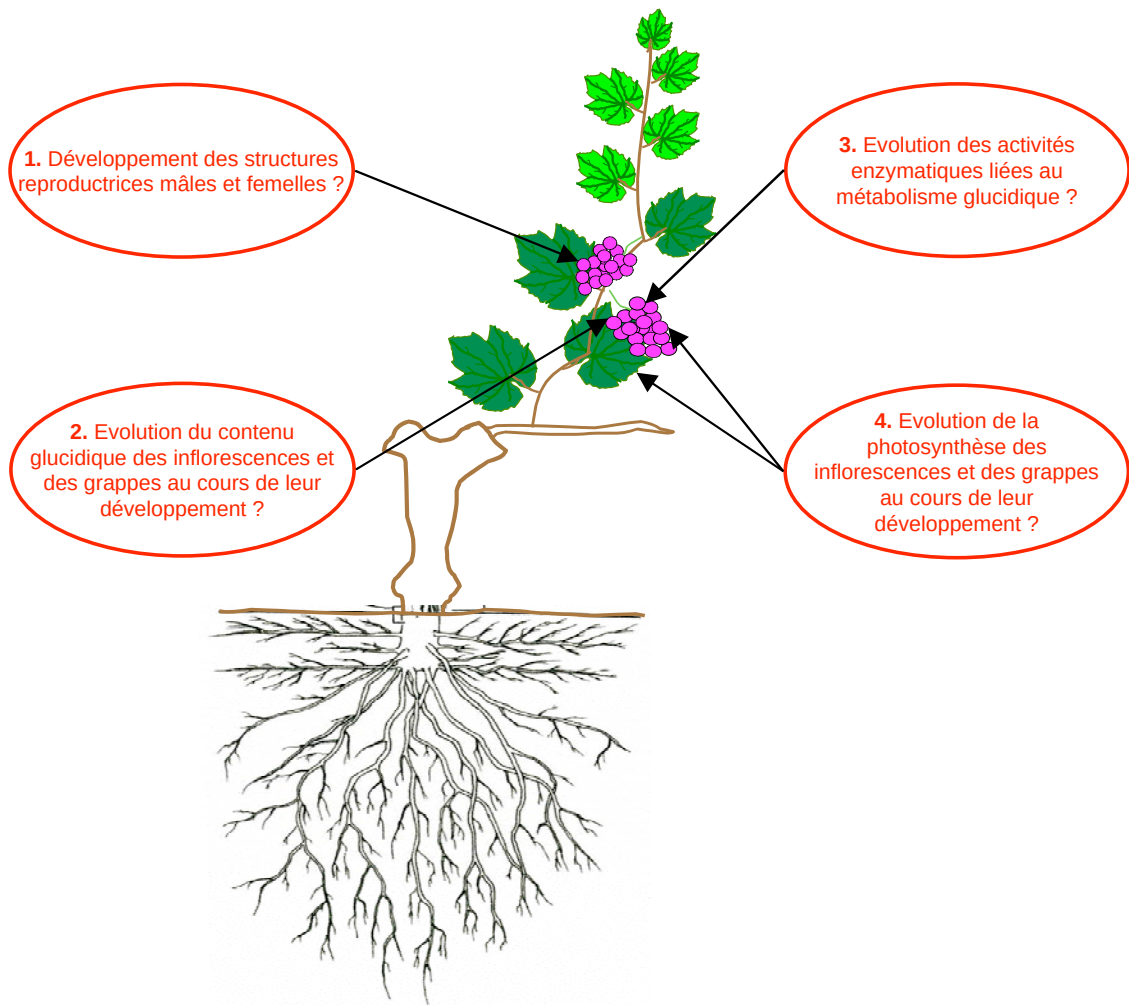


Figure 23. Paramètres étudiés pour caractériser les deux cépages (GW et PN) utilisés lors de la thèse.

est donc nécessaire d'étudier le développement des structures reproductrices mâles et femelles du débourrement à la nouaison de nos deux cépages (Fig. 23).

Les glucides et leur métabolisme interviennent tout au long de la floraison, de l'initiation florale à l'anthèse (voir chapitre 3.2.). La description du contenu glucidique des inflorescences et des grappes au cours de leur développement a donc été entreprise chez nos deux cépages (Fig. 23). De plus, la variation des taux de glucides et leur composition dans les inflorescences sont le résultat du métabolisme glucidique dans son ensemble. L'évolution des principales activités enzymatiques du métabolisme glucidique a donc aussi été étudiée dans les inflorescences et les grappes du stade grappe visible (stade 12) à la nouaison (stade 27) (Fig. 23). Au cours de l'année, la photosynthèse et la mobilisation des réserves pourvoient aux besoins glucidiques de la plante. Nous avons donc étudié la photosynthèse des inflorescences puis des grappes et de la feuille opposée à la première inflorescence (Motomura 1982) du stade 12 (grappe visible) au stade 27 (nouaison) (Fig. 23).

L'ensemble de ces travaux consacré à la caractérisation des deux cépages (GW et PN) utilisés constituera notre première partie et sera présenté sous la forme de 3 publications :

- Publication 1 **Lebon G**, Duchêne E, Brun O, Magné C et Clément C (2004)
Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction*, 17(2) : 71-79.
- Publication 2 **Lebon G** et Clément C (soumise)
Carbohydrate metabolism in the inflorescences of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during flower development.
- Publication 3 **Lebon G**, Brun O, Magné C et Clément C (2005)
Photosynthesis of the grape (*Vitis vinifera* L.) inflorescence. *Tree Physiology*, 25 : 627-633.

La caractérisation des cépages au vignoble (développement des structures reproductrices ainsi que l'analyse du contenu et de l'évolution glucidiques dans les inflorescences et les grappes) est obligatoire afin de comprendre le rôle des glucides dans les différences de sensibilité à la coulure observées entre le GW et le PN. Cependant, la floraison n'a lieu qu'une fois par an donc les possibilités d'expérimentation sont limitées. Il est donc nécessaire d'expérimenter sur d'autres modèles comme les boutures fructifères. En parallèle à

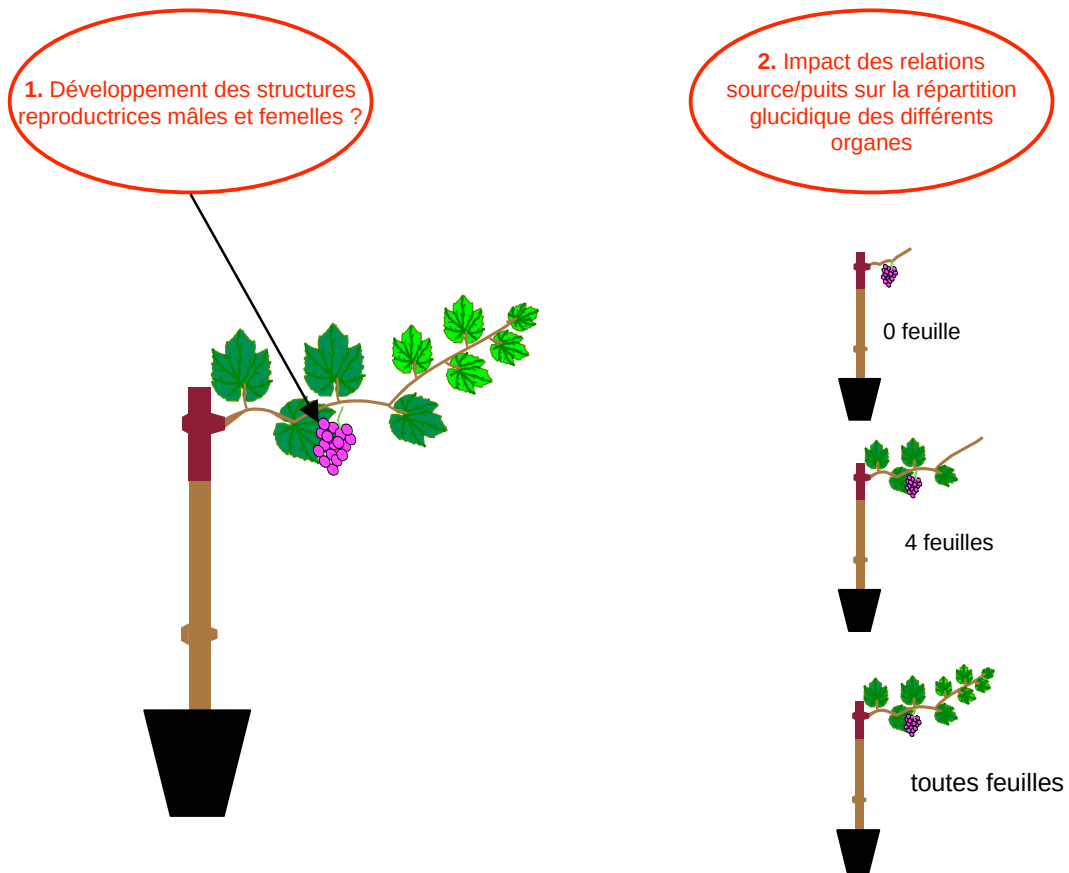


Figure 24. Expérimentations réalisées sur les boutures fructifères de GW et PN.

la caractérisation des cépages au vignoble, nous avons optimisé les protocoles d'obtention de boutures fructifères existants (Mullins 1966 ; Mullins et Rajasekaran 1981 ; Gény 1997 ; Ollat *et al.* 1998 ; Collin 2000) et travaillé tout au long de l'année. Comme au vignoble, nous avons tout d'abord caractérisé le modèle bouture fructifère afin de comparer le comportement de nos deux cépages avec ce système expérimental. La description de ce modèle expérimental comprenait tout d'abord l'analyse du développement des structures reproductrices mâles et femelles au cours de la floraison, du stade 12 (grappe visible) au stade 27 (nouaison), comme nous l'avons réalisée au vignoble (Fig. 24). En effet, aucune étude n'a été menée sur le développement des structures reproductrices de boutures fructifères. Ensuite, nous avons étudié l'importance des relations source/puits sur la répartition des glucides chez la bouture fructifère en modifiant le nombre de feuilles (Fig. 24).

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 1.2.2.), le développement reproducteur de la vigne est réparti sur 2 années successives, l'initiation florale débutant l'été précédant l'anthèse. Or, à partir de l'anthèse et jusqu'à la chute des feuilles, la photosynthèse est excédentaire et l'amidon s'accumule dans le cep, les bois et les racines (Mullins *et al.* 1992 ; Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a, b). Nous avons donc observé l'impact de la mise en réserve lors de l'été_n sur la floraison de l'été_{n+1} grâce à des effeuillages et des égrappages à la véraison (Fig. 25). Cette étude a été réalisée dans le vignoble champenois sur les 3 principaux cépages de cette région : le Chardonnay (CH), le Pinot Meunier (PM) et le Pinot noir (PN).

Les expérimentations réalisées avec le modèle bouture fructifère et au vignoble constitueront notre deuxième partie qui sera présentée sous la forme de 3 publications :

- Publication 4 **Lebon G**, Duchêne E, Brun O et Clément C (2005)
Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany*, 95 : 943-948.
- Publication 5 **Lebon G** et Clément C (soumise)
Source/sink relations in fruiting cuttings of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during the inflorescence development.
- Publication 6 **Lebon G**, Mineur T, Le Sueur D, Panigai L et Clément C (soumise)
Impact of reserve restoration on flowering and fruit set in grapevine (*Vitis vinifera* L.).

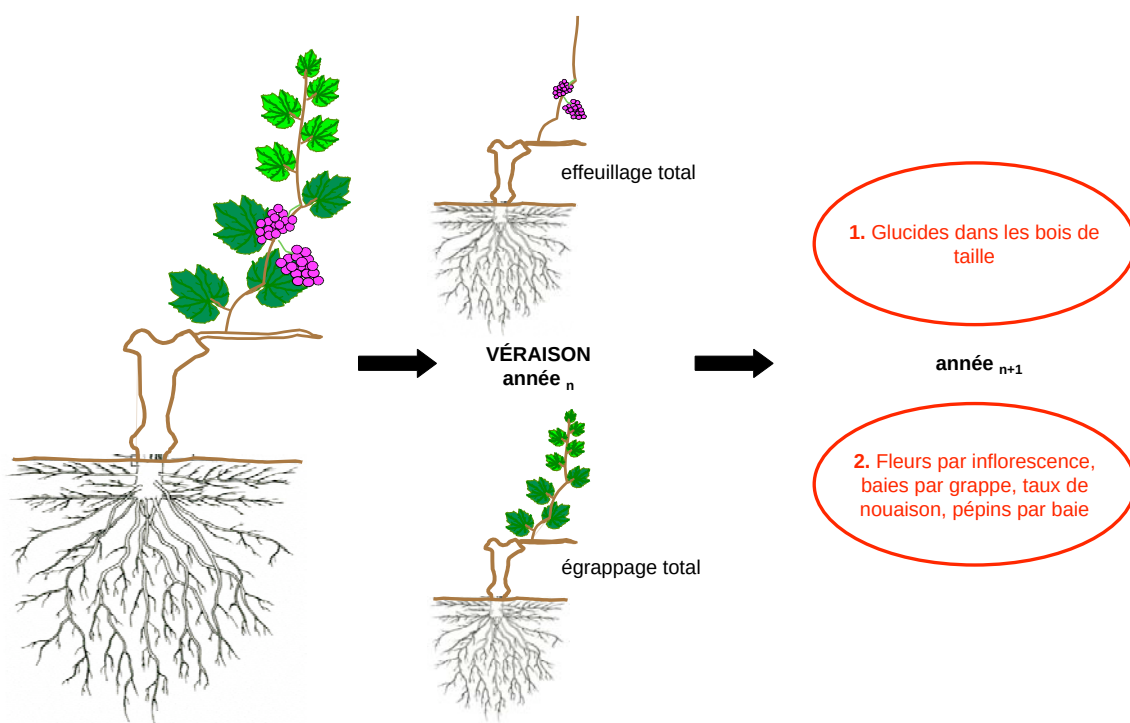


Figure 25. Expérimentations réalisées dans le vignoble champenois sur les cépages CH, PM et PN.

4.3. Choix des cépages

Pour nos travaux, les cépages utilisés doivent répondre à plusieurs critères. Tout d'abord, notre étude doit porter sur des cépages présentant des sensibilités différentes à la coulure. Afin de comprendre les mécanismes menant à la coulure, il est nécessaire de comparer un cépage sensible à la coulure avec un cépage peu sensible, ce dernier pouvant être considéré comme un témoin négatif à la coulure.

Dans le cadre du projet interrégional RVVS, les cépages utilisés doivent être septentrionaux, et donc cultivés dans les régions partenaires du projet. En effet, les résultats de ces travaux doivent permettre la mise au point d'outils de prévision de récolte utilisables par les viticulteurs de nos régions.

Enfin, les cépages doivent être cultivés au même endroit afin d'éviter l'effet terroir. La comparaison de données n'est en effet valable que si ces données sont obtenues dans les mêmes conditions environnementales.

Le **Gewurztraminer (GW)** et le **Pinot noir (PN)** ont été les 2 cépages choisis car ils répondent aux différents critères. Le GW est sensible à la coulure (Huglin et Schneider 1998) alors que le PN est considéré comme peu sensible (Zapata 1998). De plus, le GW est cultivé en Alsace et le Pinot noir est présent dans les 3 régions partenaires du projet (Alsace, Bourgogne et Champagne). Enfin, ces 2 cépages sont cultivés sur la même parcelle localisée à Bergheim (68) et appartenant à l'INRA de Colmar (partenaire du projet).

Lors de notre étude sur l'impact de la mise en réserve l'été_n sur la floraison de l'été_{n+1}, nous avons choisi **les 3 cépages champenois** (Chardonnay CH, Pinot Meunier PM et Pinot noir PN), afin de vérifier si nos travaux réalisés en Alsace sont transposables à la Champagne.

4.4. Choix du modèle d'étude

Le travail entrepris lors de cette étude a pour objectif la **compréhension de la floraison au vignoble**. En plus de nos études au vignoble, nous avons optimisé le modèle bouture fructifère, puis l'avons utilisé au laboratoire afin d'étudier la floraison toute l'année dans des conditions de culture déterminées.

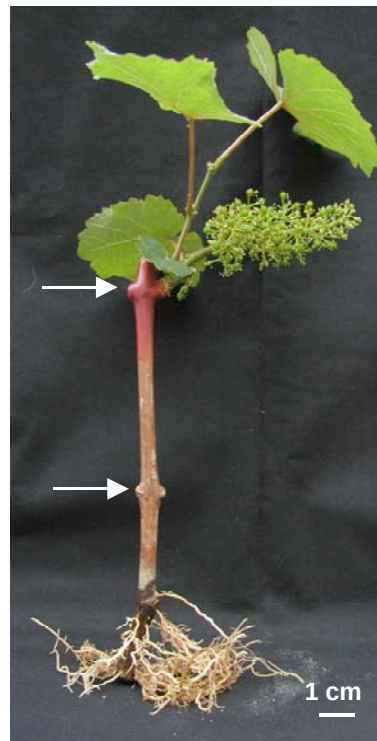


Figure 26. Bouture fructifère de Vigne (cv. Gewurztraminer).

Les flèches correspondent aux 2 nœuds possédant une vrille ou une grappe en été.

La **bouture fructifère** est obtenue à partir de sarments de vigne aoûtés coupés à la fin de l'hiver de manière à obtenir un nœud sans vrille ni grappe suivi de deux nœuds avec vrille ou grappe (Fig. 26). L'aoûtement des sarments est nécessaire afin que ces derniers possèdent des bourgeons. Ce modèle mime le vignoble car des structures végétatives et reproductrices se développent. De plus, il a déjà été utilisé pour étudier le développement des inflorescences (Mullins 1966, 1968 ; Mullins et Rajasekaran 1981) et l'impact de phytohormones sur le développement des inflorescences (Mullins 1968 ; Fournioux 2001 ; Patil *et al.* 2001).

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a donc été réalisé en parallèle sur des plantes au vignoble (âgées de 30 ans) et des boutures fructifères cultivées au laboratoire.

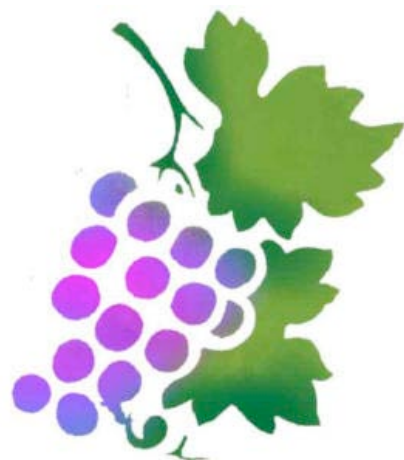
Cette thèse vise donc à atteindre deux objectifs complémentaires :

- 1. L'objectif fondamental de ce travail est de comprendre les relations entre les glucides et la floraison chez la vigne ;**
- 2. L'objectif appliqué est de proposer une optimisation des pratiques culturales afin de maîtriser les rendements et de limiter l'impact de la coulure.**

Résultats et Discussions

- Partie 1-

**Développement et physiologie des glucides
du Gewurztraminer et du Pinot noir
cultivés au vignoble**



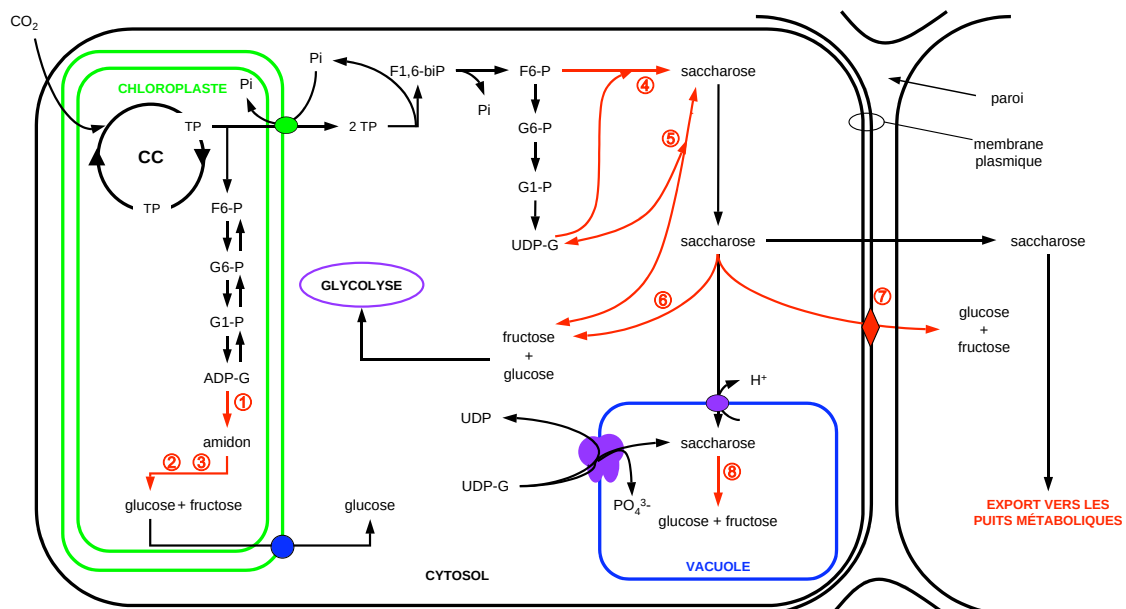


Figure 27. Intégration des enzymes dosées dans le métabolisme glucidique d'une cellule végétale (Komor *et al.* 1981 ; Lewis *et al.* 2000 ; Weber *et al.* 2000).

ADP-G ADP-glucose; CC cycle de Calvin; $\text{F}_1,6\text{-biP}$ fructose 1,6-biphosphate; F6-P fructose 6-phosphate; G1-P glucose 1-phosphate; G6-P glucose 6-phosphate; Pi phosphate; S6-P saccharose 6-phosphate; UDP-G UDP-glucose; TP triose-phosphate.

La sphère verte représente la translocase triose-phosphate, la sphère bleue le transporteur de glucose et la sphère violette l'antiport H^+ vacuolaire à saccharose. Le losange rouge représente une invertase extra-cellulaire. Au niveau de la vacuole, le groupe multienzymatique vectoriel de synthèse du saccharose (structure violette) permet la synthèse de ce composé à partir de 2 UDP-G.

Les flèches rouges représentent les enzymes dont les activités seront dosées : ① amidon synthase; ② α -amylase; ③ β -amylase; ④ saccharose phosphate synthase; ⑤ saccharose synthase; ⑥ invertase cytoplasmique; ⑦ invertase extra-cellulaire; ⑧ invertase vacuolaire.

La vigne est une plante d'intérêt économique majeur en Champagne et dans de nombreuses autres régions. L'importance économique et culturelle de la vigne explique en partie le nombre d'études portant sur son développement et sa physiologie. Une des informations majeures de ces travaux est la spécificité de chaque cépage : en effet, chacun d'entre eux présente un développement et une physiologie spécifiques. Pour nos travaux, les deux cépages choisis sont le Gewurztraminer (GW) et le Pinot noir (PN) car ils présentent une sensibilité différente à la coulure : en effet, le GW y est sensible et le PN beaucoup moins. La caractérisation du GW et du PN a été entreprise dans la même parcelle afin de s'affranchir de l'effet terroir. En effet, dans les mêmes conditions de terroir et environnementales, les différences observées ne peuvent provenir que des particularités de chaque cépage.

Tout d'abord, le développement des structures reproductrices des deux cépages a été analysé du débourrement à la nouaison. En effet, chez la vigne, les classifications utilisées habituellement (Baggiolini 1952 ; Eichhorn et Lorenz 1977) tiennent compte du développement morphologique des feuilles, des inflorescences (sépalés et pétales) et des grappes (taille des baies). Néanmoins, des différences existent entre le développement des structures reproductrices et le développement des structures visibles (sépalés, pétales et baies). Or, le développement des cellules reproductrices est fortement lié à leur métabolisme. Nous avons donc entrepris l'étude de l'évolution des glucides solubles majoritaires (glucose, fructose, saccharose) chez la vigne (Glad *et al.* 1992) et de l'amidon dans les inflorescences au cours de leur développement. Ce travail a été réalisé dans le but d'identifier des différences de contenu glucidique dans les structures reproductrices chez les deux cépages. Ces travaux sont rapportés dans **l'article 1**.

La compréhension du métabolisme glucidique est complexe car de nombreuses enzymes interagissent sur les variations de concentration d'un glucide. En effet, la quantité de chaque glucide présente dans les différents niveaux d'organisations d'un organisme (compartiment cellulaire, cellule, tissu et organe) est le résultat d'un équilibre métabolique entre les activités des enzymes synthétisant (anabolisme) et dégradant (catabolisme) chaque glucide spécifiquement. De plus, ces enzymes sont localisées dans les différents compartiments de la cellule et permettent ainsi une régulation spécifique des concentrations de glucides à chaque compartiment (Fig. 27). Ensuite, les activités enzymatiques ne sont pas identiques lors du développement d'une plante, mais fluctuent en fonction du stade de développement et des conditions environnementales auxquelles elle est soumise. Nous avons

donc dosé les activités des principales enzymes du métabolisme glucidique du débourrement à la nouaison dans les inflorescences de nos deux cépages. Ainsi, il nous a été possible de caractériser plus en détail les différences entre le GW et le PN. Ces travaux seront présentés dans **l'article 2**.

Enfin, les glucides utilisés par les plantes ligneuses pérennes ont deux origines possibles : la mobilisation des réserves et la photosynthèse. L'étude des racines au vignoble est fastidieuse à cause de leur longueur (jusqu'à 10 m) et de leur enchevêtrement dans le sol (Hellman 2003). En effet, les racines de vigne produisent de nouvelles racines latérales, ce qui augmente le volume de sol utilisable par la plante. Au contraire des racines, les parties aériennes sont facilement disponibles. Chez la vigne, la plupart des organes aériens (feuilles, jeunes pousses et inflorescences) contiennent des chlorophylles et sont donc capables d'assimiler le CO₂ grâce à la photosynthèse (Palliotti et Cartechini 2001). Nous avons donc étudié l'évolution de la photosynthèse des feuilles mais aussi des inflorescences (concentrations en chlorophylles, conductance stomatique, concentration intracellulaire et assimilation nette de CO₂) du débourrement à la nouaison pour nos 2 cépages. Les résultats obtenus ont alors été mis en relation avec la sensibilité à la coulure du GW et du PN. Ces résultats seront présentés dans **l'article 3**.

Sex Plant Reprod (2004) 17: 71–79
DOI 10.1007/s00497-004-0217-9

ORIGINAL ARTICLE

Gaël Lebon · Eric Duchêne · Olivier Brun ·
Christian Magné · Christophe Clément

Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine

Received: 4 February 2004 / Accepted: 1 April 2004 / Published online: 19 May 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract The Gewurztraminer (GW) and the Pinot noir (PN) cultivars of grapevine differ in their sensitivity to environmental factors that can cause flower abscission, cv. GW being the most sensitive. In order to further define the mechanisms leading to abscission, and owing to the importance of sugars in the achievement of sexual organ ontogenesis, we attempted to correlate the chronology of flower ontogenesis with the variations of carbohydrates in the inflorescence. In the vineyard, under optimal climatic conditions, fruit set of cv. GW and cv. PN was 82% and 65%, respectively. The sugar distribution was different in their inflorescences during the entire duration of flower development. Between stages 15 and 17, flowers of GW and PN reached the crucial meiosis stage. At that time, the inflorescences of cv. GW exhibited higher concentrations of starch and sucrose, whereas those of PN presented higher levels of glucose and fructose. Despite higher starch concentrations in GW inflorescences, starch reserves were present in the ovules and anthers of PN but not in those of GW. These results suggest that the higher content of reserve and transport carbohydrates in the inflorescences of GW favour flower development and fruit set under optimal environmental conditions. Furthermore, since meiosis represents a key step of female development, the different sugar concentrations in the inflorescences of the two cultivars at stages 15 and 17 could be related to the

sensitivity to flower abscission under climatic stress. In particular, the presence of starch granules in PN ovules and anthers might explain the higher resistance of this cultivar to flower abscission.

Keywords Carbohydrates · Fruit set · Meiosis · Reproductive organ development · *Vitis vinifera* L.

Introduction

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is affected by flower abscission to various extents, meaning that some of the flowers are physiologically removed during development of the inflorescence. Under optimal growth conditions, the intensity of flower abscission remains compatible with economical purposes. However, under environmental stress, flower abscission may increase dramatically depending on the cultivar, reaching up to 80% in cv. Gewurztraminer (GW) (Huglin and Schneider 1998).

The first hallmarks of flower abscission consist of abnormalities in ovary development at the time of meiosis (Fougère-Rifot et al. 1993), which is a key step in the formation of the female organ. Several hypotheses have been proposed to explain flower abscission, such as hormonal balance perturbation (Jackson 1991) or bad climatic conditions during flowering (Jackson 1991). More recently, nutrient deficiency in the inflorescences has been suspected as a putative originator of flower abscission in grapevine. It has been shown that carbon metabolism may be involved in the process of flower necrosis in cv. Pinot noir (PN) (Gu et al. 1996).

In higher plants, carbohydrate supply is of fundamental importance for flowering and the achievement of sexual reproduction. Developing flowers need carbohydrates from the stage of floral initiation (Yu et al. 2000) up to maturation of the floral organs (Clément et al. 1996; Rodrigo et al. 2000) and fruit setting (Jean and Lapointe 2001; Ruiz et al. 2001; Iglesias et al. 2003). The two main carbohydrates involved in flower nutrition are (1) sucrose, as the main circulating form of carbohydrate from the

G. Lebon · C. Magné · C. Clément (✉)
Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes,
URVVC EA 2069, UFR Sciences, Université de Reims
Champagne Ardenne,
Moulin de la Housse,
BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France
e-mail: christophe.clement@univ-reims.fr
Fax: +33-3-26913339

E. Duchêne
INRA de Colmar, Unité de Recherche Vigne et Vin,
28 rue Herrlisheim,
BP 507, 68021 Colmar, France

O. Brun
Mumm-Perrier-Jouet Vignobles et Recherches,
51206 Epemay, France

source tissues (Winter and Huber 2000; Truernit 2001), and (2) starch, which is actively mobilised during the development of floral tissues (Clément et al. 1996; Rodrigo et al. 2000). Sugars supplied to the reproductive structures originate from root and stem reserves (Nishizawa and Shihido 1998) or from photosynthesis performed either in mature leaves (Gregory et al. 1996; Voznesenskaya et al. 1999; Miyazawa and Terashima 2001) or in the flowers themselves (Vemmos and Goldwin 1994; Clément et al. 1997).

In grapevine, the carbohydrates required for inflorescence development may originate either from perennial woody organs or from annual leaves. In spring, carbon reserves of roots are mobilised and sustain the expansion of new young roots, annual stems and leaves, as well as emerging inflorescences (Zapata et al. 2004). During flower development, the leaves acquire their own photosynthetic autonomy and begin to provide photoassimilates to sink organs. At this time there is a global change in the whole plant physiology regarding sugar supply to developing organs. The mobilisation of carbohydrate reserves from the roots is progressively replaced by increasing photosynthesis in the leaves (Zapata et al. 2004). This source transition occurs during the development of sexual organs, making them particularly sensitive to physiological perturbations.

Whatever its cause, any perturbation of sugar physiology during flower development usually leads to gametophyte abortion (Dorion et al. 1996; Jean and Lapointe 2001), reducing the success of fertilisation and the yield for cultivated species (Prymakowska-Bosak et al. 1999; Siddiqi et al. 2000). The reproductive organs are particularly sensitive to modifications of carbohydrate physiology when fertile tissues reach meiosis (Saini 1997; Jean and Lapointe 2001).

Since there is a strong transition in the source of sugars from the roots to the leaves during flower development (Zapata et al. 2004), we suspected that inflorescences are affected by these changes at crucial steps of flower development (Dorion et al. 1996; Jean and Lapointe 2001). Therefore, we attempted to correlate the rate of flower abscission with sugar fluctuations in the inflorescences, focusing on key steps of sexual organ formation. We followed the variations of carbohydrate content and the location of starch in flowers, in parallel with the progress of male and female organ development, in vineyard-grown plants. For this purpose we used cvs. GW and PN, which differ significantly in their fruit set under normal conditions and their sensitivity to flower abscission under climatic stress.

Materials and methods

Plant material and sampling

Thirty-year-old field-grown grapevines *Vitis vinifera* L. flower abscission sensitive cv. GW (clone 47) and the non-sensitive cv. PN (clone 162), grafted on SO4 rootstocks and planted in an INRA

vineyard in Bergheim, France, were used in this study in 2002 and 2003. Plants under investigation were grown in the same location and were subject to rigorously similar cultural practices.

The sampling stages were determined according to the classification of Eichhorn and Lorenz (1977). Inflorescences were followed during their entire development, from the “visible cluster” stage (stage 12) up to fruit set (stage 27), representing six developmental stages: 12, 15, 17, 21, 25 and 27. Moreover, the period between stage 15 and 17 was split into two additional stages: “separated cluster” stage (stage 15), stage 15+2 days (15+2d), stage 15+8 days (15+8d), and “separated floral buds” stage (stage 17). Inflorescences were collected at each development stage and frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until the determination of sugars, or treated immediately after harvest for microscopy analysis.

Dry weight analyses

Dry weight (DW) of inflorescences was estimated after freeze-drying for 72 h with a CSSL device (Serail Lyophilisateur).

Determination of fruit set rate

Fruit set rate is the major parameter used for assessing the success of sexual reproduction. It was evaluated as the ratio of berries over flowers after counting the number of flower scars per inflorescence and the number of berries per bunch (stage 27).

Preparation for microscopy

Flowers were fixed in 2% glutaraldehyde (v/v in a 0.1 M phosphate buffer) at pH 7.2 in the presence of 2% (w/v) sucrose and 1% (v/v) Tween 20 for 24 h under continual agitation at room temperature. After three rinses (5 min each) in buffer with 2% (w/v) sucrose, flowers were postfixed with 1% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer for 4 h. Flowers were then rinsed three times (5 min each) in buffer, dehydrated in an alcohol series, transferred to acetone, and embedded in araldite.

Semi-thin sections (1 µm) were collected on glass slides and the periodic acid Schiff polysaccharide specific reaction was carried out. Sections were first immersed in 1% (w/v) periodic acid for 4 h, then in Schiff's reagent without rinsing for 16 h, and finally in 5% (w/v) sodium metabisulfite for 20 min. Sections were then rinsed in distilled water, air-dried, and mounted in Eukitt.

Carbohydrate analysis

Extraction

Lyophilized inflorescences were ground in a mortar with Fontainebleau sand and 10 volumes of ethanol (80°). Sugars were then extracted for 15 min at 84°C under continual agitation. After adjusting the volume to 5 ml with distilled water, the extract was centrifuged at 4°C for 10 min at 11,000 g. For soluble sugars, the supernatant was used for soluble sugar determination. For starch, the pellet previously obtained was suspended in a mixture containing dimethylsulfoxide:8 N hydrochloric acid (8:2) and starch was dissolved over 30 min at 60°C under continual agitation. After cooling, the extract was centrifuged at 20°C for 10 min at 13,000 g and the supernatant was kept at -80°C until use.

Table 1 Number of flowers and berries per bunch, and rate of fruit set in Pinot Noir (PN) and Gewurztraminer (GW) cultivars. Values are means of six replicates $\pm$ SE

	PN	GW
Number of flowers	206.3 $\pm$ 23.9	231.0 $\pm$ 31.5
Number of berries	134.8 $\pm$ 20.4	188.0 $\pm$ 18.0
Fruit set (%)	65.1 $\pm$ 2.7	81.8 $\pm$ 5.7

Sucrose, glucose and fructose assay

Sucrose, glucose and fructose were assayed because they are the major sugars in grapevine (Glad et al. 1992). D-Glucose was phosphorylated and oxidised in the presence of NADP to gluconate-6-phosphate and NADPH, H⁺. The amount of NADPH, H⁺ formed was determined by means of its absorbance at 340 nm. Fructose was phosphorylated to fructose-6-phosphate by a hexokinase in the presence of ATP. Fructose-6-phosphate was then converted to glucose-6-phosphate by a phosphoglucose isomerase. Glucose-6-phosphate formed was tested as described above and a blank was performed without phosphoglucose isomerase. Sucrose was hydrolyzed to D-glucose and D-fructose in the presence of a β -fructosidase. D-Glucose formed was then determined as described above and compared with a blank without β -fructosidase.

Starch assay

Aliquots of 100 μ l extract were used to determine starch concentration. The aliquot was mixed with 100 μ l Lugol iodine solution (0.03% I₂ and 0.06% KI in diluted 0.05 N HCl). After 15 min, the absorbance was read spectrophotometrically at 600 nm. A blank was performed with the starch solvent (DMSO:HCl, 8:2) instead of the extract.

Statistical analysis

At least five assays were performed for each stage of flower development, and three independent readings were carried out for each extract. For carbohydrate determination, results are expressed in milligrams/gram DW $\pm$ SE. Statistical analyses were carried out using Student's *t* test. A 2% probability was considered significant. For microscopy, four samples were analysed at each phenological stage to check the developmental stage of the anther and the ovule, and to localise starch in the flower organs.

Results

Fruit set

The number of flowers per inflorescence was statistically identical in the two cultivars but the number of berries was higher in GW (Table 1). As a consequence, the percentage of fruit set was 81.8 $\pm$ 5.7% in GW against 65.1 $\pm$ 2.7% in PN.

Inflorescence growth and development

Phenological development was synchronous in the two cultivars and could be divided into three periods (Fig. 1). The inflorescence developed from stage 12 to stage 15 in

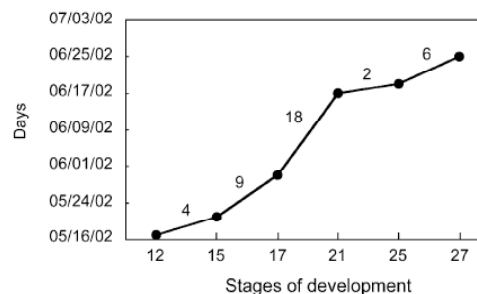


Fig. 1 Phenological development of inflorescences in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cvs. Gewurztraminer (GW) and Pinot noir (PN). Numbers on graph correspond to number of days between two successive stages of development (according to the classification of Eichhom and Lorenz 1977). Stages: 12 Visible clusters, 15 separated clusters, 17 separated floral buds, 21 10% opened flowers (early bloom), 25 90% opened flowers (late bloom), 27 fruit set

4 days, and then to stage 17 within 9 days. Thereafter, development slowed since 18 days were required to reach stage 21 (flowering onset). Full bloom (stage 25) occurred within the following 24 h and an additional 7 days were required to reach fruit set (stage 27), representing about 29 days after stage 12.

During the whole of flower development, PN inflorescences were significantly bigger than those of GW except at the fruit set stage (Fig. 2). From stage 12 to stage 25 (bloom), inflorescence DW regularly increased, from 29 $\pm$ 4 mg to 200 $\pm$ 17 mg in GW and from 27 $\pm$ 8 mg to 396 $\pm$ 24 mg in PN. Afterwards, inflorescence weight rose suddenly in both cultivars, reaching 1,040 $\pm$ 350 mg in GW and 1,450 $\pm$ 320 mg in PN at fruit set (stage 27).

Reproductive organ development

From stage 12 to stage 15, female reproductive cells were sporogenous tissue in the two cultivars (Fig. 3a-c) and reached the macrospore mother cell stage at 15+2d (Fig. 3d). The time-course of female development differed

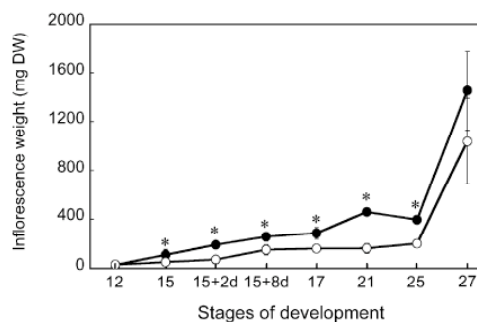


Fig. 2 Weight variations of cvs. GW and PN inflorescences during flower development. Open circles GW, closed circles PN. Stages as in Fig. 1, plus 15+2d separated clusters +2 days, 15+8d separated clusters +8 days. Values are means ($n=5$) $\pm$ SE. Asterisks indicate a 0.1% probability that was considered significant

74

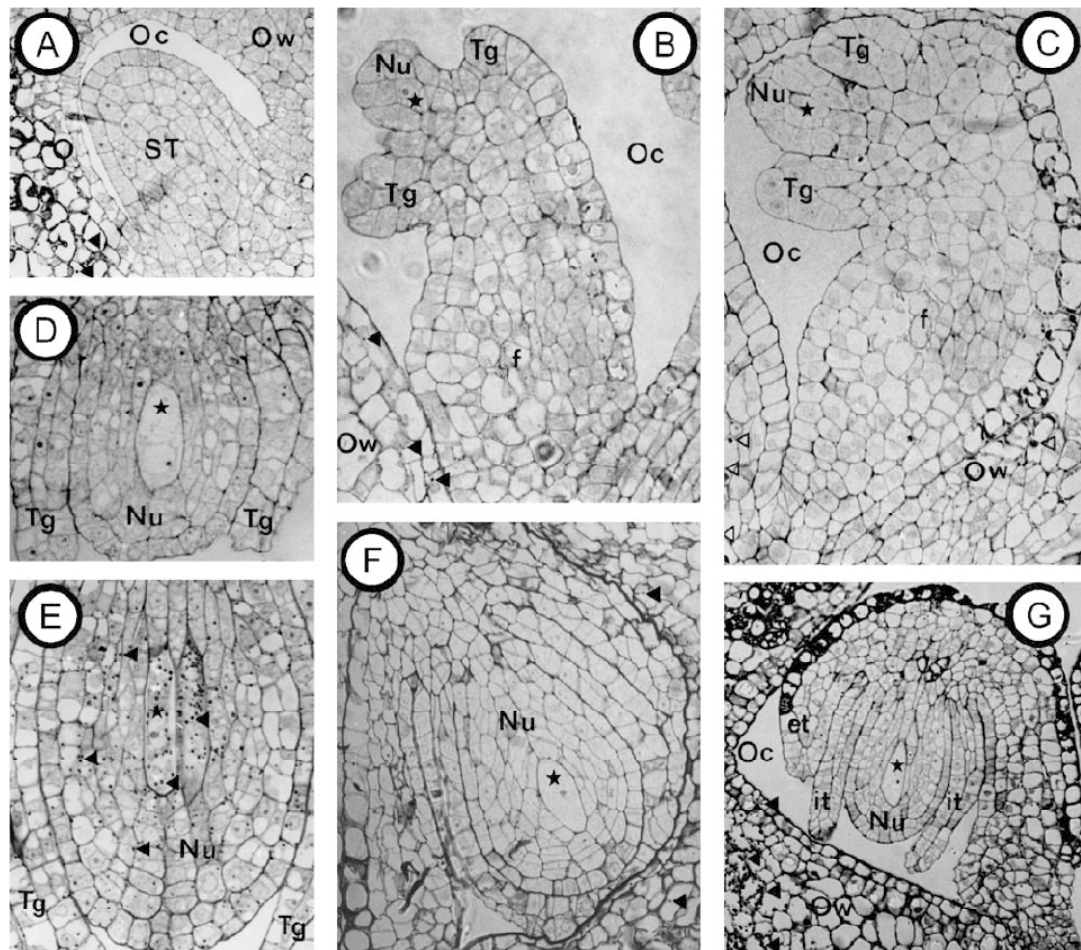


Fig. 3A–G Female organ development and starch localisation; *Ow* ovary wall, *O* ovary, *Oc* ovarian cavity, *f* funicle, *Nu* nucellus, *Tg* tegument, *et* external tegument, *it* internal tegument. A stage 12: Sporogenous tissue (*ST*) stage in PN. Starch grains (*arrowheads*) detected in ovary wall; $\times 1,200$. B Stage 15: archesporous (*star*) stage in PN. Starch (*arrowheads*) located in ovary wall; $\times 500$. C Stage 15: archesporous (*star*) stage in GW. No starch detected in ovary wall, *open arrowheads* polyphenols; $\times 560$. D Stage 15+2d: macrospore

mother cell (*star*) stage in PN. No starch detected; $\times 400$. E Stage 15+8d: embryo sac mother cell (*star*) stage in PN. Macrospore (*star*) and surrounding nucellus contained amylaceous reserves (*arrowheads*); $\times 450$. F Stage 17: embryo sac mother cell (*star*) stage in GW. No starch detected; $\times 250$. G Stage 17: developing embryo sac (*star*) stage in PN. Starch (*arrowheads*) still abundant in ovary wall; $\times 200$

thereafter. In PN, ovules underwent meiosis between stages 15+2d and 15+8d, whereas meiosis occurred between stages 15+8d and 17 in GW. The residual macrospore generating the embryo sac was formed at stage 15+8d in PN (Fig. 3e) and at stage 17 in GW (Fig. 3f). In PN, the embryo sac still developed at stage 17 (Fig. 3g). However, at the onset of anthesis, the embryo sac was fully developed in both cultivars.

The time-course of pollen development was also different in the two cultivars. Sporogenous cells were detected in the anthers of both cultivars at stage 12 (Fig. 4a, b). Meiosis occurred thereafter at stage 15 in PN and between stages 15 and 15+2d in GW, giving rise to

tetrads at stages 15 and 15+2d in PN and GW, respectively (Fig. 4c, d). In PN, tetrads released the microspores in the loculus at stage 15+2d (Fig. 4e) and at the stage 15+8d in GW (Fig. 4f). Microspores underwent vacuolisation until stage 15+8d (Fig. 4g) in PN. Sporadic mitosis occurred at stage 17 (Fig. 4h) and pollen maturation extended to stage 21, leading simultaneously to mature pollen grains at anthesis in both PN and GW.

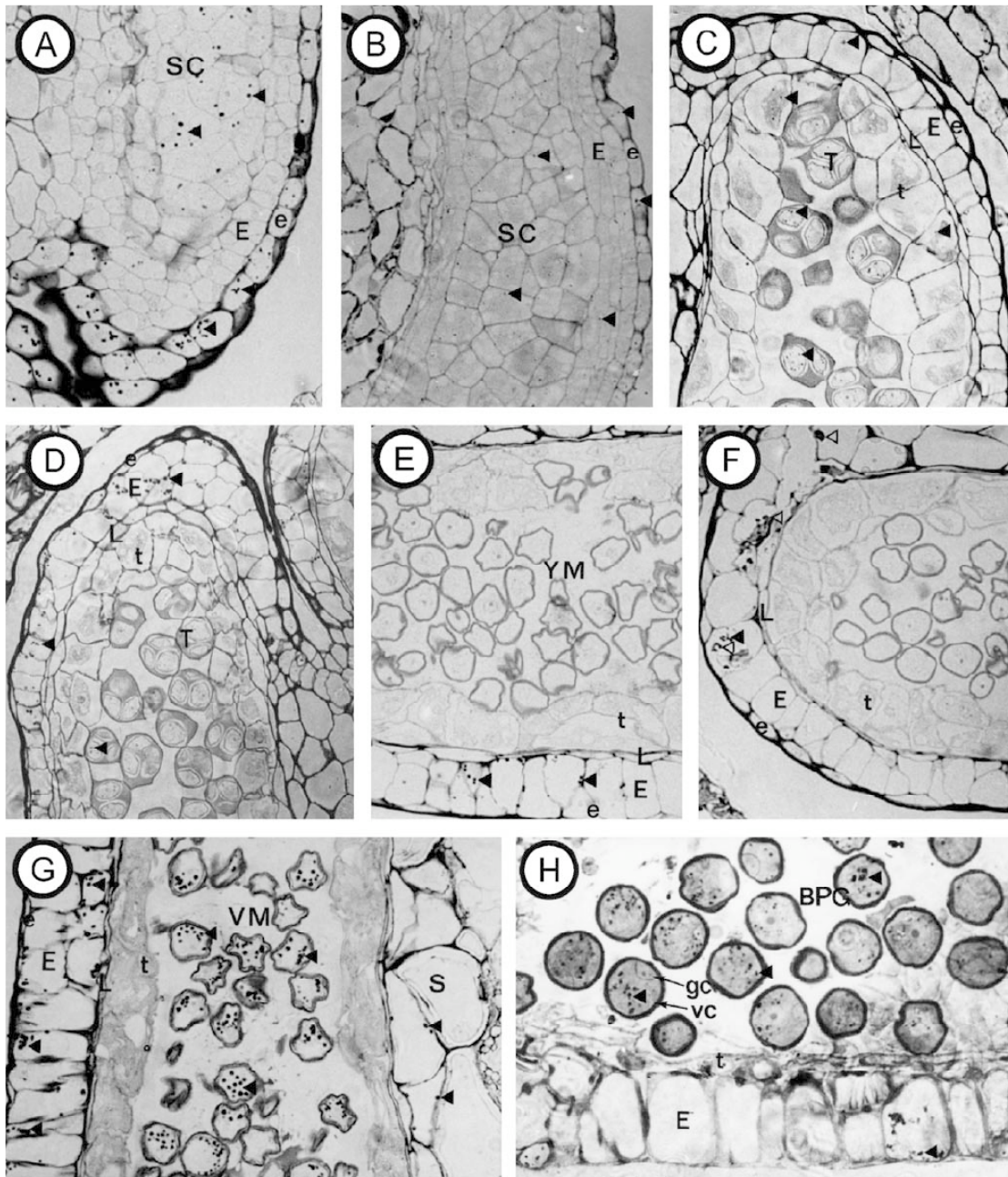


Fig.4A–H Anther development and starch localisation during flower development; SC sporogenous cell, e epidermis, E endothecium, L middle layer, t tapetum, T tetrads, S septum. **A** Stage 12: sporogenous cell in PN. Abundant amylaceous reserves (arrowheads) detected in epidermis and sporogenous cells. No starch detected in endothecium; $\times 500$. **B** Stage 12: sporogenous cell stage in GW. Few starch grains (arrowheads) present in GW in epidermis and sporogenous cells. Endothecium devoid of starch; $\times 500$. **C** Stage 15+2d: tetrads in GW. Starch grains (arrowheads) observed in endothecium, tapetum and tetrads but not in epidermis or middle layer; $\times 400$. **D** Stage 15: late tetrads with primexine stage in PN.

Amylaceous reserves (arrowheads) present only in endothecium and tetrads; $\times 400$. **E** Stage 15+2d: young microspores (YM) stage in PN. Starch present only in endothecium; $\times 700$. **F** Stage 15+8d: young microspore stage in GW. Amylaceous reserves (arrowheads) present only in endothecium; $\times 700$. **G** Stage 15+8d: vacuolated microspore (VM) stage in PN. Amylaceous reserves (arrowheads) abundant in endothecium, middle layer, and septum as well in microspores; $\times 700$. **H** Stage 17: bicellular pollen grain (BPG) stage in PN. Starch grains (arrowheads) present in endothecium (E). Starch (arrowheads) abundant in vegetative cell (vc) of pollen grain, but not in generative cell (gc); $\times 600$

76

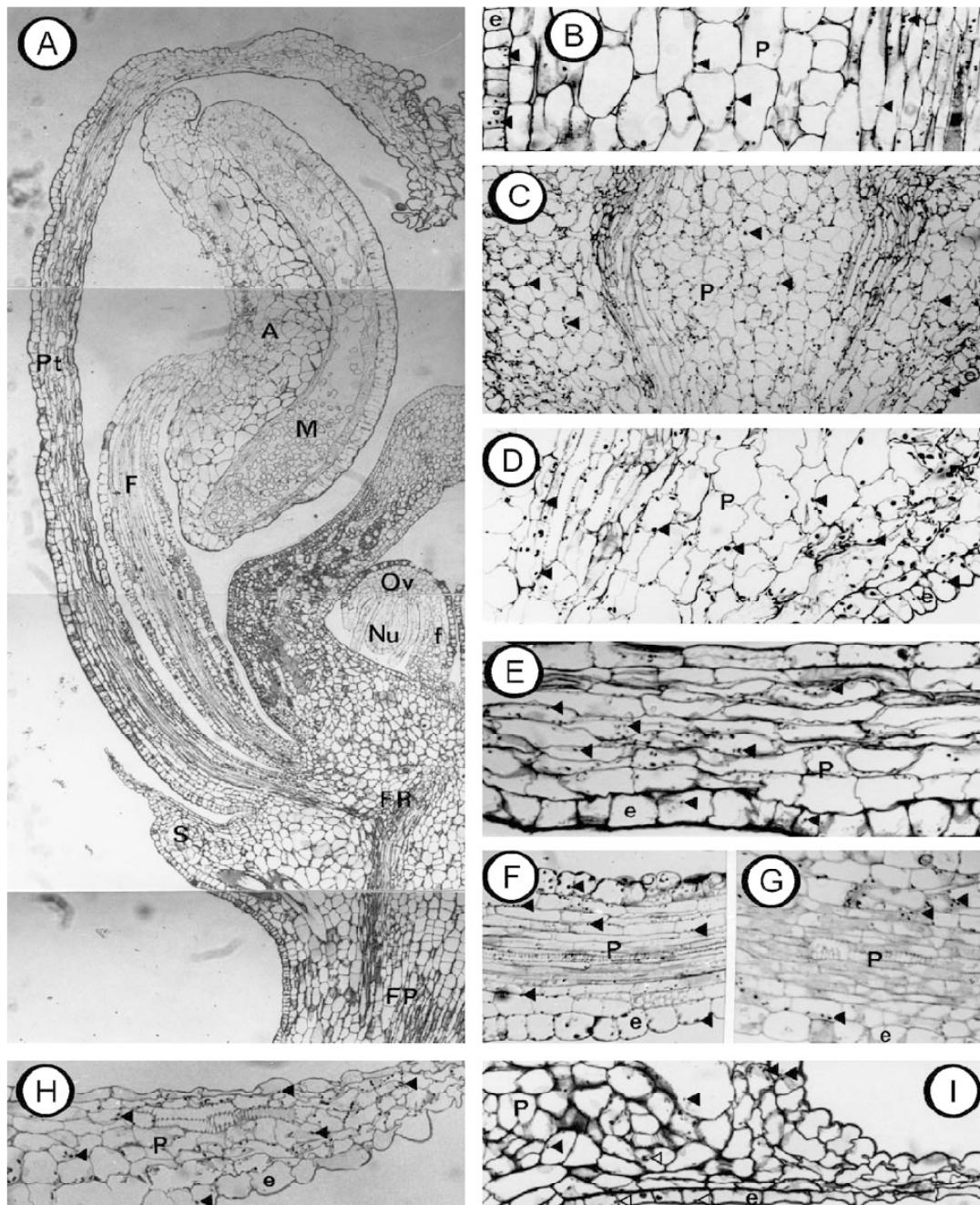


Fig. 5A–I Starch localisation in vegetative parts during flower development; *e* epidermis, *P* parenchyma. **A** Longitudinal section of PN flower at stage 17 showing starch accumulation in various sites. *A* anther, *f* funicle, *F* anther filament, *FP* floral peduncle, *FR* floral receptacle, *M* microspores, *Nu* nucellus, *Ov* ovule, *Pt* petal, *S* sepal $\times 80$. **B** Stage 17: floral peduncle in PN. Starch (arrowheads) observed in epidermis and parenchyma; $\times 200$. **C, D** Stage 17: floral receptacle in PN. Starch grains (arrowheads) abundant and regularly distributed in epidermis, parenchyma and vascular bundles; **C** $\times 180$,

D $\times 450$. **E** Stage 17 petal in PN. Amylaceous reserves (arrowheads) located in epidermis and parenchyma; $\times 280$. **F** Stage 12: anther filament in PN. Starch (arrowheads) present in epidermis and parenchyma; $\times 160$. **G** Stage 17: anther filament in PN. Starch grains (arrowheads) poorly represented in epidermis and parenchyma; $\times 240$. **H** Stage 12: sepal in PN. Starch (arrowheads) located in epidermis and abundant in parenchyma; $\times 350$. **I** Stage 17: sepal in PN. Starch grains (arrowheads) less abundant in epidermis and parenchyma than in previous stage; $\times 320$

Starch location

The presence of starch was examined in each floral organ (Fig. 5a) during the entire developmental period in both cultivars and the location of starch revealed that differences were not cultivar-dependant but stage-dependant, with the exception of the ovule. In sterile organs, amylaceous reserves were abundant in the floral peduncle (Fig. 5b) and receptacle (Figs. 5c, d). Starch was located mainly in the parenchyma or in the epidermis. No starch variation was detected in these organs during the whole of floral development. Similarly, in the petals, starch was constant in the parenchyma during floral development (Fig. 5e). In the sepals (Fig. 5f, g) and the anther filament (Fig. 5 h, i) starch progressively disappeared during development. In these organs, starch was located in both the parenchyma and the epidermis.

Differential starch fluctuations were detected in the fertile organs of the two cultivars. Considering the female organ, starch grains were present in the macrospore and the surrounding nucellus in PN (Fig. 3e) at stage 15+8d, whereas no starch was present in the ovules of GW (Fig. 3f). At stage 17, starch was present in the ovary parenchyma as well as in the integuments throughout floral development in both cultivars (Fig. 3f, g).

In the anther, starch was present in both the sporophytic and gametophytic tissues during pollen development. In the sporophytic cell layers, starch was localised in the epidermis, endothecium, middle layers and tapetum (Fig. 4a, c, d, g). During flower development, this localisation of starch did not vary, and no major difference was observed between the two cultivars. Conversely, in the sporogenous tissues, differences between the two cultivars appeared at premeiosis. Indeed, at stage 12, the sporogenous tissue of PN exhibited abundant amylaceous reserves (Fig. 4a), while no trace was detected in GW (Fig. 4b). Later, at stage 15+8d, microspores of PN had accumulated starch grains (Fig. 4g), but those of GW had not (Fig. 4f).

Carbohydrate content

In the two cultivars, starch concentration in the inflorescences was maximal at stage 12, corresponding to $7.1 \pm 0.5 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ and $8.2 \pm 0.6 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ in GW and PN, respectively (Fig. 6a). Afterwards, starch variation in the inflorescences could be divided into two phases: (1) the first phase extended from stage 12 to stage 17 and consisting of a steady starch decrease, down to $2.7 \pm 0.3 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ and $2.8 \pm 0.4 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ in GW and PN, respectively; (2) the second phase extended from stage 17 to stage 27 and was characterised by a succession of amylogenesis/amyolysis sequences, with a maximum observed at stage 25. Although starch concentration in both GW and PN decreased from stage 12 to stage 17, significant differences were noticed between stages 15 and 17, and particularly at stage 15+2d. At this step (female structures at macrospore mother cell stage and male

structures at tetrad stage), the starch concentration in the inflorescences of GW was 2-fold higher than in those of PN. In addition, the starch level in inflorescences at full bloom (stage 25) was 50% higher in GW than in PN.

In GW inflorescences, the sucrose concentration increased from $2.9 \pm 2.4 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ to $16.6 \pm 1.1 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ between stages 12 and 15+2d, before dropping rapidly to $0.2 \pm 0.2 \text{ mg g DW}^{-1}$ at stage 17 (Fig. 6b). From stage 17 up to fruit set (stage 27), sucrose content alternatively increased and decreased between $0.2 \pm 0.2 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ at stage 17 and $4.5 \pm 1.1 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ at

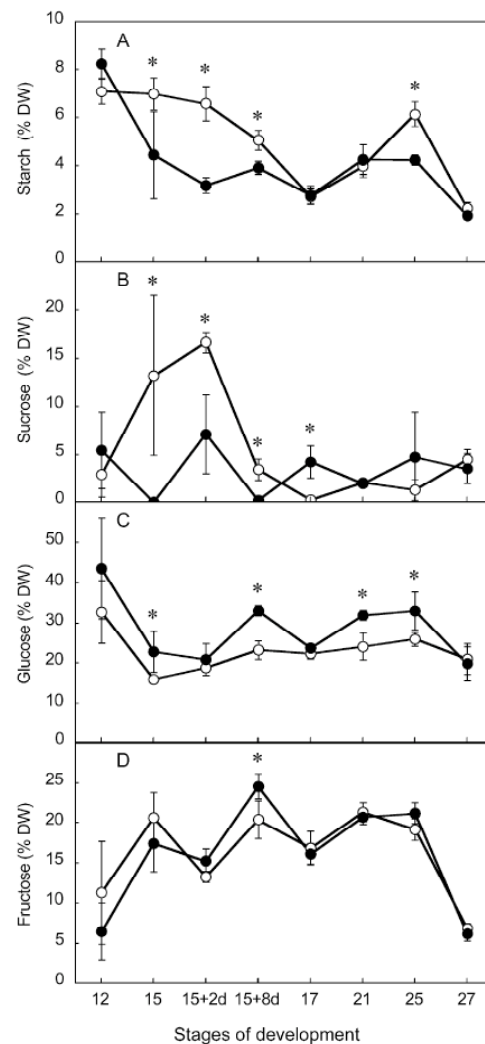


Fig. 6A–D Changes in some carbohydrate content of cvs. GW and PN inflorescences during flower development. Open circles GW, closed circles PN. Starch (A) and soluble carbohydrates sucrose (B), glucose (C) and fructose (D) were measured. Values are means ($n=5$) $\pm$ SE. Asterisks indicate a 2% probability that was considered significant

78

stage 27. In PN inflorescences, the concentration of sucrose fluctuated irregularly between 0 and $7.1 \pm 4.1 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ during the whole flower development. From stage 15 to stage 17, the sucrose level was significantly higher in the inflorescences of GW than in those of PN. However at stage 17, the sucrose concentration was higher in the PN inflorescences.

Glucose was the most represented soluble sugar in the inflorescence during the entire flower development. Glucose concentration in cvs. GW and PN was higher in stage 12, at 32.7 ± 7.8 and $43.5 \pm 12.5 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ inflorescences, respectively (Fig. 6c), decreasing to 15.8 ± 0.8 and $22.7 \pm 5.2 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ in GW and PN, respectively, at stage 15, then remaining stable until stage 25. Finally, glucose concentration at anthesis (stage 25) fell slightly to 20.9 ± 3.8 and $19.7 \pm 4.3 \text{ mg (g DW)}^{-1}$ in GW and PN, respectively. Significant differences between the two cultivars were noticed at stages 15, 15+8d and at anthesis (stage 25). In all cases, glucose content was significantly higher in PN inflorescences than in those of GW.

Fructose concentration presented a similar profile during flower development in both GW and PN cultivars. The lowest fructose levels were observed at stage 12 [11.2 ± 6.4 and $6.5 \pm 3.6 \text{ mg (g DW)}^{-1}$, respectively] and at stage 27 [6.8 ± 0.6 and $6.1 \pm 0.9 \text{ mg (g DW)}^{-1}$, respectively; Fig. 6d]. Between these stages, fructose concentration was higher, ranging from 15 to $25 \text{ mg (g DW)}^{-1}$, and significant differences between the two cultivars were observed at stage 15+8d. At this stage, fructose content was higher in PN inflorescences than in those of GW, at 24.5 ± 1.6 and $20.4 \pm 2.4 \text{ mg (g DW)}^{-1}$, respectively.

Discussion

Chronology of flower development

Following the whole of flower development, we showed that the ontogenesis of male and female organ is not synchronous in cvs. GW and PN. Both female and male meiosis occurred earlier in PN than in GW, the delay corresponding to 2–6 days in the ovule and 2 days in the anther. The criteria used to determine the stage of inflorescence development in grapevine are based on morphological traits (Eichhorn and Lorenz 1977) and do not necessarily reflect the stages of development for the fertile organs, especially at key steps such as meiosis. For example, in cvs. Merlot, Cabernet-Sauvignon and Chardonnay, meiosis occurred 10, 15 and 16 days before anthesis, respectively (Fougère-Rifot et al. 1993). Therefore, the duration of reproductive development between meiosis and bloom is cultivar-dependent. These results are in agreement with previous data obtained in various cultivars of apple (Sato et al. 1988) or in apricot (Albuquerque et al. 2002).

Under unfavourable environmental conditions, asynchronous development of male and female gametophytes may have dramatic consequences on the success of fertilisation and the subsequent yield. In apricot, female

sterility is partly due to delayed ovule development at anthesis and causes a low fruit set (Lillecrapp et al. 1999; Albuquerque et al. 2002). In the case of grapevine, male and female gametophytes were fully developed at anthesis under favourable conditions, enabling some pollination and fertilisation in GW ($81.8 \pm 5.7\%$) and in PN ($65.1 \pm 2.7\%$). However, when climatic stress occurs, the delay of ovule development in GW may generate development abnormalities and lead to abscission.

Carbohydrates in the inflorescences

The main differences in carbohydrate content in the inflorescences of GW and PN were detected between stages 12 and 17. This period coincides with (1) the occurrence of meiosis in male and female organs of both cultivars and (2) a strong transition in the whole plant physiology, since the carbohydrate source originating from root and trunk reserves is progressively replaced by photosynthesis in the leaves (Zapata et al. 2004). During this period starch and sucrose concentrations were higher in GW inflorescences, whereas glucose and fructose concentrations were higher in PN.

Under stress conditions, grapevine accumulates high amounts of starch, which participates in the resistance to unfavourable environmental conditions (Aït Barka and Audran 1996; Saladin et al. 2003). The amount of starch in the ovule at meiosis may be correlated to the sensitivity of grapevine cultivars to flower abscission. Indeed, between stages 15 and 17, starch was present in the ovule of PN but not in GW. In other species, it has been demonstrated that the initiation of ovule formation (Rodrigo et al. 2000), and achievement of ovule development, is conditioned by the presence of starch within the ovular tissues (Rodrigo and Herrero 1998). This strongly suggests that starch content in the female organ is crucial for ovule fate (Rodrigo et al. 2000; Jean and Lapointe 2001; Ruiz et al. 2001). In this respect, the greater sensitivity of GW to flower abscission when the plant is subject to drastic fluctuations in climatic conditions, may be correlated with the lack of amylaceous reserves in the ovule at key steps of development. However, the absence of starch in the ovule of GW does not seem to interfere with development under favourable conditions since the fruit set under such conditions is significantly higher.

Similarly, in the anther prior to meiosis (stage 12), starch is present in the male sporogenous tissue of PN but not in GW. It has been shown that the development of the male gametophyte may be affected under stress conditions, especially when the stress occurs close to meiosis (Dorion et al. 1996; Saini 1997). Again the presence of starch in the male gametophyte may enable PN to more easily counteract the damage caused by climatic changes and allow the proper achievement of pollen development.

At the onset of female and male meiosis, although the global amount of starch is higher in GW inflorescences, the anatomical analysis of starch repartition indicates that amylaceous reserves are more abundant in the ovules and

anthers of PN. These differences are due to the level of starch stored in the stalks (data not shown), explaining the finding that higher amounts of starch could be stored in bunches of GW compared to those of PN.

A strong correlation has often been pointed out in woody plants between successful development of fertile sexual organs and the amount of carbohydrates available in the flower at various stages of development (Rodrigo et al. 2000; Jean and Lapointe 2001; Ruiz et al. 2001; Iglesias et al. 2003). Considering the differential sensitivity to flower abscission of cvs. GW and PN, the higher amount of soluble sugars in GW could explain the higher fruit set in GW under optimal conditions, whereas the presence of starch in PN ovules could contribute to the higher tolerance of this cultivar to flower abscission when abiotic stress cause changes in carbohydrate metabolism (Saini 1997).

Acknowledgements The authors thank Mumm-Perrier-Jouet Vignobles et Recherches (Epernay, France) and the RVVS (Réseau Vigne et Vins Septentrionaux) for their financial support, and F. Gimenez and E. Perrin for their technical assistance.

References

- Aït Barka E, Audran JC (1996) Response of grapevines to subzero temperatures: effect of controlled cooling on sugar reserves of the leaf bud complex preceding and during budding. *Can J Bot* 3:492–505
- Albuquerque N, Burgos L, Egea J (2002) Variability in the developmental stage of apricot ovules at anthesis and its relationship with fruit set. *Ann Appl Biol* 141:147–152
- Clément C, Burrus M, Audran JC (1996) Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium*. *Am J Bot* 83:459–469
- Clément C, Mischler P, Burrus M, Audran JC (1997) Characteristics of the photosynthetic apparatus and CO₂-fixation in the flower bud of *Lilium*. II. Corolla. *Int J Plant Sci* 158:794–800
- Dorion S, Lalonde S, Saini HS (1996) Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiol* 111:137–145
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977) Phäenologische Entwicklungsstadien. *Der Rebe. Nachrichtenbl Dtsch Pflanzenschutzdienstes* (Braunschweig) 29:119–120
- Fougère-Rifot M, Benharbit N, Brun O, Bouard J (1993) Relations entre le développement défectueux des ovaires et l'involution des ovules chez *Vitis vinifera* L. var. Chardonnay. *J Int Sci Vigne Vin* 27:99–112
- Glad C, Regnard JL, Querou Y, Brun O, Morot-Gaudry JF (1992) Flux and chemical composition of xylem exudates from Chardonnay grapevines: temporal evolution and effect of recut. *Am J Enol Viticult* 43:275–282
- Gregory PJ, Palta JA, Batts GR (1996) Root systems and root:mass ratio—carbon allocation under current and projected atmospheric conditions in arable crops. *Plant Soil* 187:221–228
- Gu S, Lombard P, Price S (1996) Effect of shading and nitrogen source on growth, tissue ammonium and nitrate status and inflorescence necrosis in Pinot noir grapevine. *Am J Enol Viticult* 47:173–180
- Huglin P, Schneider C (1998) In: Lavoisier (eds) *Biologie et écologie de la vigne*. Tech and Doc, Paris
- Iglesias DJ, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2003) Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiol* 23:199–204
- Jackson DI (1991) Environmental and hormonal effects on development of early bunch stem necrosis. *Am J Enol Viticult* 42:290–294
- Jean D, Lapointe L (2001) Limited carbohydrate availability as a potential cause of fruit abortion in *Rubus chamaemorus*. *Physiol Plant* 112:379–387
- Lillecrapp AM, Wallwork MA, Sedgley M (1999) Female and male sterility cause fruit set in a clone of the 'Trevatt' variety of apricot (*Prunus armeniaca*). *Sci Hortic* 82:255–263
- Miyazawa SI, Terashima I (2001) Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii*: Relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate. *Plant Cell Environ* 24:279–291
- Nishizawa T, Shishido Y (1998) Changes in sugar and starch concentrations of forced June-bearing strawberry plants as influenced by fruiting. *J Am Soc Hortic Sci* 123:52–55
- Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Slusarczyk J, Kuras M, Lichota J, Kilianczyk B, Jerzmanowski A (1999) Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *Plant Cell* 11:2317–2329
- Rodrigo J, Herrero M (1998) Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex Plant Reprod* 11:86–93
- Rodrigo J, Hormaza JJ, Herrero M (2000) Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiol Plant* 108:35–41
- Ruiz R, Garcia-Luis A, Honerri C, Guardiola JL (2001) Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. *Ann Bot* 87:805–812
- Saini HS (1997) Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex Plant Reprod* 10:67–73
- Saladin G, Magné C, Clément C (2003) Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Rep* 21:821–827
- Sato M, Kanbe K, Nakagawa S, Yuda E, Fukunaga S (1988) Studies on development of the embryo sac and its abnormality in the triploid apple cultivar 'Mutsu'. *J Jpn Soc Hortic Sci* 57:366–372
- Siddiqi I, Ganesh G, Grossniklaus U, Subbiah V (2000) The dyad gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 127:197–207
- Truernit E (2001) Plant physiology: the importance of sucrose transporters. *Curr Biol* 11:169–171
- Vemmos SN, Goldwin GK (1994) The photosynthetic activity of Cox's orange pippin apple flowers relation to fruit setting. *Ann Bot* 73:385–391
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Pyankov VI, Edwards GE (1999) Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsola (Chenopodiaceae). *J Exp Bot* 50:1779–1795
- Winter H, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Biochem Mol* 35:253–289
- Yu TS, Lue WL, Wang SM, Chen JC (2000) Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol* 123:319–325
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004) Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J Plant Physiol* (in press)

Tableau 8. Développement des structures reproductrices mâles et femelles du Gerwurztraminer et du Pinot noir du stade 12 (grappe visible) au stade 21 (10% de fleurs ouvertes).
 Les flèches symbolisent les méioses.

		Stade 12	Stade 15	Stade 15+2 j	Stade 15+8 j	Stade 17	Stade 21
Structures femelles	PN	Tissu sporogène	Archéspore	Cellule-mère de macrospores	↓ Cellule-mère du sac embryonnaire	Jeune sac embryonnaire	Sac embryonnaire
	GW	Tissu sporogène	Tissu sporogène	Cellule-mère de macrospores	Cellule-mère de macrospores ↑	Cellule-mère du sac embryonnaire	Sac embryonnaire
Structures mâles	PN	Tissu sporogène	↓ Tétrades de microspores	Microspores	Microspores	Jeune grain de pollen	Grain de pollen mature
	GW	Tissu sporogène	Cellules-mère de microspores ↑	Tétrades de microspores	Microspores	Microspores	Grain de pollen mature

Les travaux présentés dans cet article montrent des différences majeures entre les deux cépages au niveau du développement des structures reproductrices et de l'évolution du contenu glucidique des inflorescences.

Ainsi, le développement des structures mâles et femelles est plus précoce chez le PN que chez le GW (Tableau 8). Chez le PN, la méiose ovulaire est plus précoce de 2 à 6 jours et la méiose pollinique de 2 jours.

L'évolution glucidique dans les inflorescences au cours de leur développement (du stade grappe visible au stade nouaison) est différente entre les deux cépages. Les principales différences sont observées entre les stades 15 et 17, et notamment au stade 15+8 jours. À ce stade, les inflorescences de GW présentent des taux d'amidon et de saccharose plus importants que celles de PN. Au contraire, les teneurs en hexoses (glucose et fructose) sont plus élevées dans les inflorescences de PN que dans celles de GW. Les deux cépages ont donc un métabolisme glucidique différent.

De plus, entre les stades 15 et 17, les ovules de PN contiennent de l'amidon mais pas ceux de GW. Or, au stade 15+8 jours, la méiose ovulaire a déjà eu lieu chez le PN, mais pas chez le GW (Tableau 8). Comme le contenu en amidon est déterminant pour le devenir des ovules (Rodrigo et Herrero 1998 ; Rodrigo *et al.* 2000), la plus grande sensibilité à la coulure du GW par rapport au PN pourrait être due à la plus faible teneur en amidon des ovules de GW.

Les teneurs en glucides des inflorescences sont différentes entre le GW et le PN. Ces différences sont le résultat d'un métabolisme glucidique différent. En effet, les concentrations de glucides sont régulées par les teneurs de chaque glucide dans les divers niveaux d'organisation de la plante et selon que les organes soient des sources ou des puits métaboliques. Ainsi, les contenus glucidiques régulent la photosynthèse *via* des rétro-contrôles (Koch 1996 ; Paul et Pellny 2003) et modifient l'activité des enzymes du métabolisme glucidique (Nakamura et Yuki 1992 ; Sturm et Tang 1999 ; Hellmann *et al.* 2000 ; Salerno et Curatti 2003) : ceci permet le maintien des concentrations optimales de glucides dans les différentes parties de la plante en fonction des besoins. L'étude des activités enzymatiques relatives au métabolisme glucidique doit donc être entreprise afin de connaître les enzymes responsables des différences observées lors des travaux relatés dans l'article 1.

Publication soumise

Gaël Lebon · Christophe Clément

Changes in enzyme activities of carbohydrate metabolism during the development of grapevine (*Vitis vinifera* L.) flowers

Abstract In order to further understand the relationships between flower development and sugar metabolism in grapevine, we compared the fluctuations of both starch and sucrose in the inflorescences with the activity of their related enzymes from the appearance of flower buds until fruit set. The measurements were carried out on the GW and the PN cvs., differing in their sensitivity to flower abscission. We particularly focused on meiosis, which is a crucial point for the achievement of sexual reproduction. The main differences of carbohydrate metabolism in inflorescences occur during meiosis. In the inflorescences of both cvs., variations of enzyme activities can be correlated to their differences in sugar contents. Starch fluctuations were mediated by the activity of amylases (alpha- and beta-) rather than by starch synthase. The variations of sucrose correlated with the activity of SSd and both Cy and WB Inv but not with the one of SPS. At meiosis, this leads to a higher pool of available hexoses in developing inflorescences of PN than of GW, which may explain the lower sensitivity to flower abscission in PN under stress. Finally, the significant increase of sucrose degrading enzyme activities such as SSd, Cy Inv and WB Inv from stage 17 was interpreted as the first sign of the strong physiological modifications that occur in the ovaries between fertilization and the onset of fruit formation.

G. Lebon · C. Clément (✉)
Laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des Plantes,
URVVC UPRES EA 2069,
Université de Reims Champagne Ardenne,
UFR Sciences,
Moulin de la Housse,
BP 1039,
51687 Reims Cedex 2, France

Keywords carbohydrate metabolism · flower drop · inflorescences · starch · sucrose · *Vitis vinifera* L.

Abbreviations αA : alpha amylase · βA : beta amylase · Cy Inv: cytosolic invertase · GW: Gewurztraminer · PN: Pinot noir · SPS: Sucrose-phosphate synthase · SSd: Sucrose synthase (degradation) · SSs: Sucrose synthase (synthesis) · StSy: Starch Synthase · WB Inv: wall bound invertase

Introduction

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is naturally affected by flower abscission depending on both physiological factors such as carbon nutrition (Lebon et al. 2004) or cultivars (Huglin and Schneider 1998) and environmental factors such as chilling (Ebadi et al. 1995; 1996) or heat (Young et al. 2004). Under optimal growth conditions, the intensity of flower drop represents a specific trait of each cultivar (cv.). For instance, in the Gewurztraminer (GW) cv. flower drop corresponds to 18 % of the total flowers whereas in the Pinot noir (PN) cv. the abscission of flowers reaches 35 % (Lebon et al. 2004). However, when environmental stress occurs, the rate of flower abscission may change dramatically, reaching up to 80% in the GW cv. (Huglin and Schneider 1998). In this respect, the various cultivars (cvs.) of grapevine can be classified in two types according to their sensitivity to flower drop under stressing conditions: (i) sensitive cvs. such as GW, and (ii) non-sensitive cvs. such as PN.

Under optimal growth conditions, the rate of flower abscission is correlated to the pathway of both male and female organ development and to the amount of carbohydrates in the inflorescences (Yu et al. 2000;

King et Ben Tal 2001). Comparing GW and PN, it was shown that the development of reproductive structures in PN is more precocious than in GW (Lebon et al. 2004). Moreover, gametophyte development is dependant on sugar physiology, and any perturbation in carbohydrate metabolism during flower development induces gametophyte abortion (Dorion et al. 1996; Jean and Lapointe 2001), thus reducing the success of fertilization (Prymakowska-Bosak et al. 1999; Siddiqi et al. 2000). In particular, the reproductive organs are sensitive to modifications of carbohydrate physiology when fertile tissues reach meiosis (Saini 1997; Jean and Lapointe 2001). At this key step, the carbohydrate status of grapevine inflorescence depends on the cultivars and can be correlated to the rate of fertilization (Lebon et al. 2004).

The pathway of sugar fluctuations in woody plant organs is the result of complex regulation processes involving photosynthesis (Pego et al. 2000; Paul et al. 2001; Lebon et al. 2005a) and reserve mobilization/restoration (Zapata et al. 2004a, b). Carbon assimilated in photosynthetic leaves is translocated into sucrose to sink organs, where sucrose is converted into glucose and fructose or stored into starch reserves. Most often the control of carbohydrate variations is reliable with feedback regulation of photosynthesis by carbon metabolites (Koch 1996; Paul and Pellny 2003), affecting the related enzyme activities (Nakamura and Yuki 1992; Sturm and Tang 1999; Hellmann et al. 2000; Salerno and Curatti 2003). In the developing inflorescence of grapevine, it was shown that carbohydrates are supplied by reserve mobilization from perennial organs (Zapata et al. 2004a) and by photosynthesis in both leaves (Vanden Heuvel et al. 2002) and inflorescences (Lebon et al. 2005a). Sugar variations in the flowers during early stages of development are determinant for the sensitivity of cvs. to flower abscission (Lebon et al. 2004). Though all the related enzyme activities were followed after fertilization aiming at understanding fruit physiology (Hawker 1969; Takayanagi and Yokotsuka 1997; Dreier et al. 1998), no data is currently available about carbohydrate physiology in the developing inflorescences, despite its crucial role in the achievement of sexual reproduction.

Starch is of great importance as sugar nutrient reserve in the developing flowers (Rodrigo and Herrero 1998; Rodrigo et al. 2000). Starch-degrading enzymes in plant tissues include two kinds of amylases (Smith et al. 2003). The alpha-amylase [α A - EC 3.2.1.1] is an endoenzyme that randomly cuts amylose and amylopectin chains into dextrins. In addition, the beta-amylase [β A - EC 3.2.1.2] is an exoenzyme that attacks the amylose chains on one side, releasing molecules of maltose. These two enzymes reflect

distinct modes of starch mobilization and may represent a potential marker among the various cultivars. The enzymes necessary for starch biosynthesis are starch synthase [StSy - EC 2.4.1.21] for the synthesis of amylose by reaction with ADPGlc and starch branching enzyme [EC 2.4.1.18] for the synthesis of amylopectin by reacting with the amylose chains (Mukerjee and Robyt 2005).

The inflorescence is the plant organ containing the highest concentration of soluble sugars during its development and sucrose represents the main form of circulating sugar in young grapevine inflorescences at key developmental steps (Lebon et al. 2004). Three enzymes are directly involved in sucrose metabolism: (i) sucrose phosphate synthase [SPS - EC 2.4.1.14], which plays a major role in sucrose biosynthesis (Huber and Huber 1996), (ii) sucrose synthase [SS - EC 2.4.1.13], which catalyses the reversible conversion of sucrose and UDP into fructose and UDP-glucose (Sturm and Tang 1999; Wang et al. 2000); SS is also considered to assume sucrose synthesis in some plant tissues (Dejardin et al. 1997). The third is invertase [Inv - EC 3.2.1.26], which is a hydrolase, cleaving sucrose irreversibly into glucose and fructose (Sturm and Tang 1999; Wang et al. 2000). Several Inv isoforms either cytoplasmic (Cy Inv) or wall bound (WB Inv) have been described in flower organs (Miller and Ranwala 1994), pointing to different sucrose utilization pathways as well.

In order to further understand the relationships between flower development and sugar metabolism in grapevine, we assayed related enzymes in the inflorescences accurately from the appearance of flower buds until fruit set. We particularly focused on the meiosis step, which was shown to be a crucial point for the achievement of sexual plant reproduction and reflecting major differences of sugar physiology in the two cultivars (Lebon et al. 2004, 2005b). In this aim, we used the GW and the PN cvs., differing in their sensitivity to flower abscission. We particularly interested in the enzymes involved in the synthesis and degradation of both starch and sucrose since they are the major sugars in the inflorescences of grapevine during development (Glad et al. 1992).

Materials and methods

Plant material and sampling

Thirty-year-old field-grown grapevines (*Vitis vinifera* L.) GW (flower abscission sensitive) cv. (clone 47) and PN (non-sensitive) cv. (clone 162) were grown in Bergheim (France) following similar cultural practices. The sampling stages were determined according to the classification of Eichhorn and Lorenz (1977). Inflorescences were investigated during their whole development, from the "visible cluster" stage (stage 12) up to fruit set (stage 27), representing six

development stages: 12, 15, 17, 21, 25 and 27. For further precision, especially at the key step meiosis, 2 additional stages were added between the “separated cluster” stage (stage 15) and the “separated floral buds” stage (stage 17): stage 15+2 days (15+2d) and stage 15+8 days (15+8d). Inflorescences were collected at the same hour during the day to avoid circadian fluctuations. They were then frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until sugar or enzyme extraction and activity determination.

Carbohydrate extraction

Lyophilized inflorescences were ground in a mortar with Fontainebleau sand and 10 volumes of ethanol 80°. Sugars were then extracted for 15 min at 84°C under continual agitation. After adjusting the volume to 5 mL with distilled water, the extract was centrifuged at 4°C for 10 min at 11,000g. For soluble sugars, the supernatant was used for soluble sugar determination. For starch, the pellet previously obtained was suspended in a mixture containing dimethylsulfoxide:hydrochloric acid 8N (8:2) and starch was dissolved during 30 min at 60°C under continual agitation. After cooling, the extract was centrifuged at 20 °C for 10 min at 13,000g and the supernatant was kept at -80°C until use.

Sucrose assay (Bergmeyer, 1974)

Sucrose was hydrolyzed to D-glucose and D-fructose in the presence of a β -fructosidase. D-glucose was phosphorylated and oxidized in the presence of NADP to gluconate-6-phosphate and NADPH, H⁺. The amount of NADPH, H⁺ formed was determined by means of its absorbance at 340 nm. D-glucose formed was then determined as described above and compared with a blank without β -fructosidase.

Starch assay

Aliquots of 100 μ L of the extract were used to determine starch concentration. The aliquot was mixed with 100 μ L of Lugol iodine solution (38.3 mM KI and 2.8 mM I₂ in 0.25 M HCl). After 15 min, the absorbance was read spectrophotometrically at 620 nm. A blank was performed with the starch solvent (DMSO:HCl, 8:2) instead of the extract. Preparation of enzyme extract Each protocol was performed at 0-4°C according to modified procedures from Nakamura and Yuki (1992). The inflorescences were ground and 500 mg were homogenized with 5 mL of chilled buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 6.5), 8 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF. The homogenate was transferred to Eppendorf tubes and centrifuged for 5 min at 14,000g at 4°C. The supernatant was collected, stored at -80°C and used as enzyme source. The pellet was washed twice, suspended with the grinding solution and used for the assay of wall-bound invertase. Protein concentration in each sample was determined using a Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and BSA as standard.

Enzyme assays

Assays were carried out in the range of enzyme concentrations where the activity increased linearly with time and substrate concentration.

Starch synthesis

Starch synthase (StSy - EC 2.4.1.21) - The assay was conducted according to the modified protocol of Nakamura et al. (1989). An aliquot of 50 μ L of the enzyme extract was mixed to 230 μ L of 1.6 mM ADP-glucose, 0.7 mg amylopectin and 15 mM DTT preparing in 50 mM HEPES-NaOH at pH 7.4. After 20 min of incubation at 30°C, the enzyme was inactivated by placing the mixture in a boiling-water bath for 30 sec. Then 100 μ L of a 50 mM HEPES-NaOH pH 7.4 buffer, containing 4 mM PEP, 200 mM KCl, 10 mM MgCl₂, and pyruvate kinase (1.2 unit) were added and the reaction mixture was incubated for 30 min at 30°C. The ADP produced by the

starch synthase reaction was converted to ATP and the resulting solution was heated in a boiling-water bath for 30 sec and then subjected to centrifugation for 5 min at 10,000g. The supernatant (300 μ L) was mixed to 300 μ L of 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 10 mM glucose, 20 mM MgCl₂, and 2 mM NADP. The starch synthase activity was determined as the increase of absorbance at 340 nm after the addition of 1 μ L each of hexokinase (1.4 units) and G6P dehydrogenase (0.35 unit). Data were displayed in μ g g formed starch per mg of proteins per hour.

Starch degradation

Alpha amylase (α A - EC 3.2.1.1) - To estimate this activity, the α -amylase enzyme was first inactivated by heating 1 mL of enzyme source for 15 min at 70°C (Salas and Cardemil 1986). After centrifugation at 10,000g for 15 min, 100 μ L of supernatant were added to 200 μ L of substrate (0.15% starch, 20 mM CaCl₂, and 50 mM NaCl prepared in 50 mM sodium acetate buffer at pH 4.8). The mixture was incubated for 60 min at 37°C and the reaction stopped by addition of 800 μ L of an iodine solution (38.3 mM KI and 2.8 mM I₂ in 0.25 M HCl) and 3.2 mL of dH₂O. The residual starch content was then determined spectrophotometrically at 620 nm. Data were expressed in μ g of hydrolyzed starch per mg of proteins per hour.

Beta amylase (β A - EC 3.2.1.2) - Estimation of the β -amylase activity was performed at pH 3.6 in order to inhibit the β -amylase (Okamoto and Akazawa 1979). An aliquot of 200 μ L of the enzyme extract was incubated for 60 min at 20°C in 200 μ L of 1% starch and 0.78 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) prepared in 50 mM sodium citrate buffer (pH 3.6). The reaction was stopped by adding 400 μ L of a revelation solution (43.8 mM 3,5-dinitrosalicylic acid, 0.4 M NaOH, and 1.06 M sodium/potassium tartrate). Samples were incubated for 5 min at 95°C, and the absorbance measured at 540 nm. Data were displayed in μ g of formed maltose per mg of proteins per hour.

Sucrose synthesis

Sucrose Synthase (SSs - EC 2.4.1.13) and Sucrose Phosphate Synthase (SPS - EC 2.4.1.14) - The SS synthetic and SPS activities were determined according to Kubo et al. (2001). An aliquot of 100 μ L of enzyme extract was mixed to 50 μ L of 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 100 mM UDP-glucose, 100 mM fructose and 10 mM MgCl₂. The assay was conducted for 30 min at 25°C and terminated by adding 150 μ L of 1 N NaOH. A blank was prepared by adding 1 N NaOH immediately after the onset of the assay. Afterwards, unreacted hexoses in the reaction mixture were destroyed by heating for 10 min at 100°C. To determine the amount of synthesized sucrose, 3 mL of 0.15% anthrone in 13.7 M H₂SO₄ were added and the mixture was incubated for 20 min at 40°C. The SS activity was calculated as the increase of absorbance at 620 nm, and the data were expressed in μ g of formed sucrose per mg of proteins per hour. SPS was assayed following the same protocol than SS, except that fructose was replaced to fructose-6-phosphate.

Sucrose degradation

Sucrose Synthase (SSd - EC 2.4.1.13) - The SS cleavage activity was measured according to Kubo et al. (2001). An aliquot 200 μ L of enzyme source was mixed to 50 μ L of 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 50 mM sucrose. The reaction was performed for 30 min at 25°C and terminated by adding 250 μ L of 1 N NaOH. A blank was prepared by adding 1N NaOH at the onset of the assay. Afterwards, hexoses were destroyed by heating for 10 min at 100°C and an aliquot (50 μ L) was used for sucrose determination using the anthrone method described above. The SSd activity was measured as the decrease in absorbance of 620 nm and expressed in μ g of degraded sucrose per mg of proteins per hour.

Acid invertase (EC 3.2.1.26) - Wall-bound and soluble acid invertase activities were measured according to the modified protocol of Dreier

et al. (1998). The pellet of the enzyme extract was used for wall-bound invertase (WB Inv), whereas the supernatant was used for determining the cytosolic invertase (Cy Inv) activity. An aliquot of 100 μ L was mixed to 400 μ L with 0.2 M acetate buffer (pH 4.0). The reaction was started by adding 800 μ L of 0.225 M sucrose, extended for 30 min at 30°C and was stopped by adding 1 mL of DNSA-reagent (3,5-dinitrosalicylic acid 1%), in 0.5 M KOH and 1 M K/Na-tartrate. Glucose (0.5 μ mol) was supplied to avoid oxygen interference at low reducing sugar concentrations and the mixture was boiled for 10 min. After cooling, the invertase activity was calculated as the mean of absorbance at 560 nm and expressed in μ g formed glucose per mg of proteins per hour. The vacuolar invertase activity was not assayed because not involved in the carbon metabolism of both male and female reproductive structures (Dorion et al. 1996; Sheoran and Saini 1996).

Data analysis

For each stage of flower development, 5 assays were performed from five inflorescences of five different plants, and three independent readings were carried out. Each result was the mean $\pm$ SE of these data. Mean comparison was carried out using Student's *t*-test, and difference was considered as significant at the $P = 0.05$ level.

Results

Carbohydrates

Starch fluctuated differently in the GW and the PN inflorescences during flower development, especially from stage 15 to stage 17, meaning during both male and female meiosis (Fig. 1a). During this period, though starch level decreased continuously in both cvs., it remained 2 fold higher in GW than in PN until stage 17 (2.7 ± 0.3 mg g^{-1} DW in GW and 2.8 ± 0.4 mg g^{-1} DW in PN). Afterwards a wave of amylogenesis/amyololysis was detected in the inflorescences of both cvs., with a higher amount of starch in GW at flower bloom (stage 25). Sucrose variations also showed significant differences between GW and PN inflorescences at the time of meiosis (Fig. 1b). In PN inflorescences, sucrose concentration fluctuated irregularly during the whole of flower development, showing a peak (7.1 ± 4.1 mg g^{-1} DW) at the 15+2d stage. In GW, a peak of sucrose was registered during meiosis, reaching 16.6 ± 1.1 mg g^{-1} DW at stage 15+2d. Sucrose level decreased afterwards and remained low until stage 27.

Starch synthesis

The rate of starch synthesis in the inflorescences was evaluated assaying StSy activity during the whole of flower development (Fig. 2a). In both GW and PN cvs. StSy activity was in a range of 0.085 μ g formed amylose mg protein⁻¹ hour⁻¹ at stage 12 and decreased by 70% at stage 15. Afterwards the pattern of activity

varied according to the cv. In GW, the activity remained low (around 0.02 μ g formed amylose mg protein⁻¹ hour⁻¹) in accordance with starch degradation (Fig. 1a). Thereafter a peak was registered at stage 17 followed by a slight decrease at stages 25 and 27. In PN the variations of StSy activity also corresponded to starch fluctuations in the inflorescences (Fig. 1a). The activity increased up to 0.07 μ g formed amylose mg protein⁻¹ hour⁻¹ at stages 15+8d and remained at the same level until fruit set, though a slight decrease was registered at stage 27.

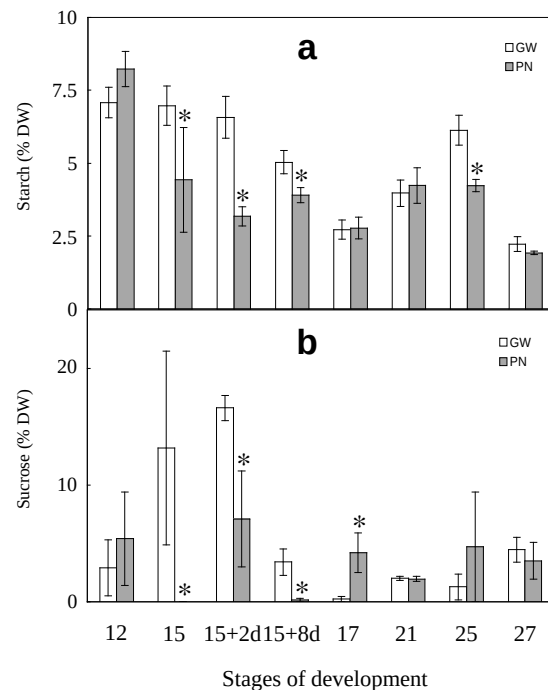


Fig. 1a, b Changes in starch (a) and sucrose (b) contents of the GW and PN cvs. inflorescences during flower development. For each carbohydrate, white bars represent GW and grey bars PN. Values are means ($\pm$ SE) of 5 measurements. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. For each stage, a 5% probability was considered significant and marked by an asterisk.

Starch degradation

Both amylases displayed noticeable differences between the two cvs. in terms of fluctuations during floral development (Fig. 2b, c) but correlated well with the measured variations in starch degradation/synthesis (Fig. 1a). In GW, the α A activity globally coincided with starch variations (Fig. 2b). The highest was reached at stages 12 and 15, ranging 0.21 μ g of starch hydrolyzed mg protein⁻¹ hour⁻¹. The level transitory fell

to 0.05 μg of starch hydrolyzed $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ at stage 15+2d. Then, a new peak of enzyme activity was registered during stages 15+8d and 17 and finally, levels decreased to lower rates during the end of flower

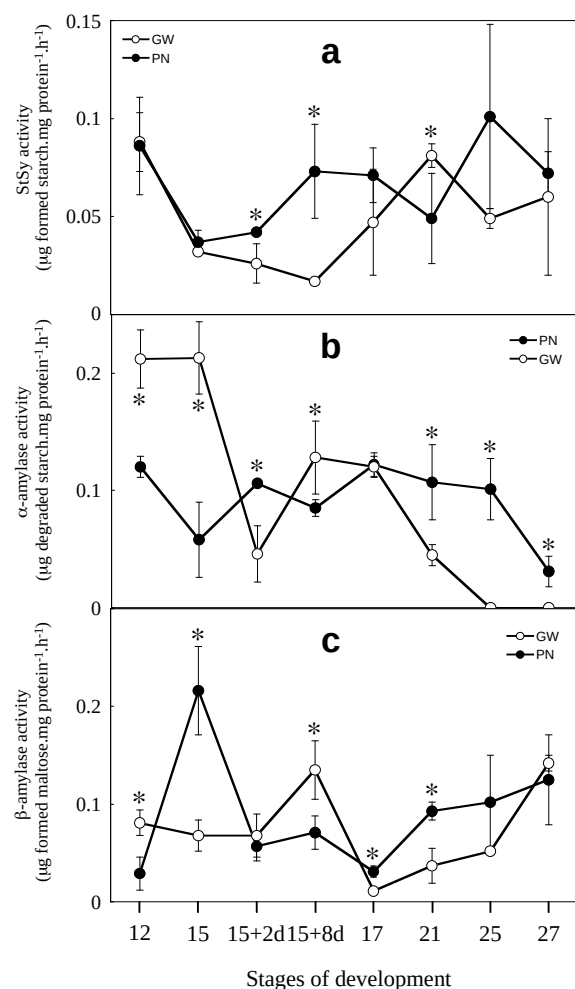


Fig. 2a, b, c Starch (a: StSy, b: α-amylase, c: β-amylase) related enzyme activities during the floral development of grapevine. For each activity, open circles represent GW and closed circles PN. Values are means ($\pm$ SE) of 5 measurements. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. For each stage, a 5% probability was considered significant and marked by an asterisk.

development and fruit set. In PN the α A activity poorly fluctuated as the starch content in the inflorescences. It was ranging approximately at 0.1 μg of hydrolyzed starch $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ from stage 12 to stage 25, despite it slightly diminished at stage 15. A significant decrease was finally registered at stage 27.

The β A activity levels (Fig. 2c), as α A activity, were

in accordance with the pattern of starch fluctuations in the inflorescences (Fig. 1a). In GW, β A activity was constant between stages 12 and 15+2d when starch concentration did not fluctuate. A peak was then reported at stage 15+8d when starch was at the onset of hydrolysis. The activity was then declined between stages 17 and 25 whereas it increased at stage 27, in parallel with starch degradation. In PN, a huge peak reaching 0.22 μg formed maltose $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ was detected at stage 15, corresponding to the simultaneous strongest mobilization of starch. Afterwards the activity was not significantly modified until stage 17 but slowly increased until stage 27, in accordance with starch degradation.

Sucrose synthesis

The synthesis of sucrose in the inflorescences was evaluated by the means of both SPS (Fig. 3a) and SSs (Fig. 3b) activities. In both GW and PN the SPS activity had the same pattern during the whole of flower development (Fig. 3a) and was poorly correlated to sucrose variations (Fig. 1b). The SPS activity was quite constant from the stage 12 to the stage 27, ranging approximately at 0.15 μg formed sucrose $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$, though it temporarily increased by 3 and 6 in GW and PN respectively at stage 21.

The variation of SSs activity had different patterns in the two cvs. (Fig. 3b) but exhibited better correlations with sucrose variations (Fig. 1b) than SPS. In GW no activity was measured at stage 12, whereas a huge peak (0.172 ± 0.050 μg formed sucrose $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$) was registered at stage 15, corresponding to simultaneous increase of sucrose concentrations (Fig. 1b). Afterwards, the activity was low until the stage 27. In PN, SSs activity was 0.167 ± 0.020 μg formed sucrose $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ at the onset of flower development. It declined during the following steps, which could be correlated with decreasing sucrose contents (Fig. 1b). Then a peak of activity (0.140 ± 0.018 μg formed sucrose $\text{mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$) occurred at stage 15+8d, followed by a significant increase of sucrose concentration at stage 17 (Fig. 1b). Thereafter, the SSs activity slightly diminished and was completely arrested at stage 27.

Sucrose degradation

The cleavage of sucrose was assayed by measuring the activity of SSd (Fig. 3c) and of both WB Inv (Fig. 3d)

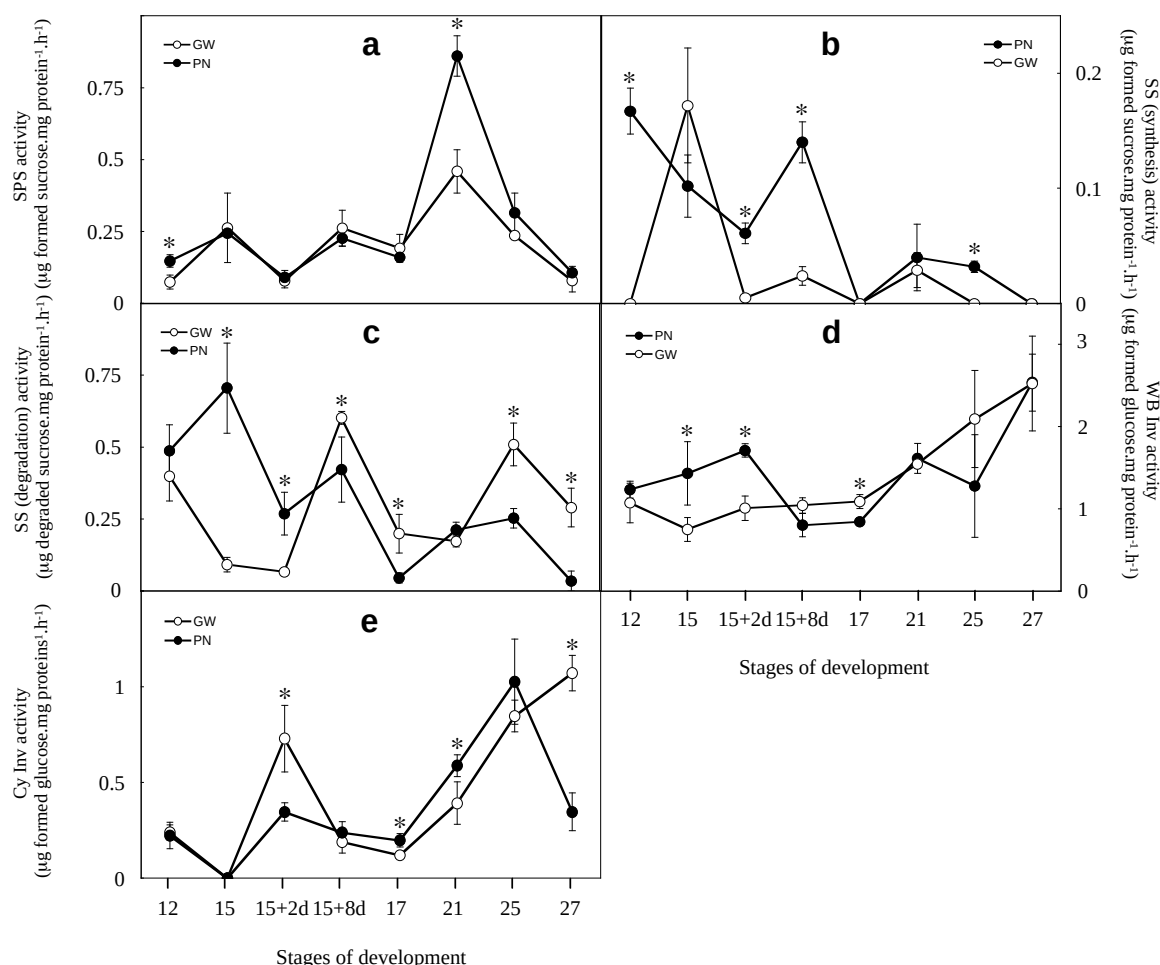


Figure 3a, b, c, d, e Sucrose (a: SPS, b: SS (synthesis), c: SS (degradation), d: WB Inv, e: Cy Inv) related enzyme activities during the floral development of grapevine. For each activity, open circles represent GW and closed circles PN. Values are means ($\pm$ SE) of 5 measurements. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. For each stage, a 5% probability was considered significant and marked by an asterisk.

and Cy Inv (Fig. 3e). The SSd activity fluctuated oppositely to sucrose concentrations in both cvs (Fig. 3c). In GW, SSd activity declined by 75% between

parallel to the one of GW.

The cleavage of sucrose by invertase may occur either in the cell wall (WB Inv) or in the cytosol (Cy

stage 12 to 15 and remained at this level until stage 15+2d, whereas sucrose accumulated in the meantime (Fig. 1b). A peak of SSd activity was registered at stage 15+8d, reaching $0.601 \pm 0.022 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$, concomitantly with sucrose degradation. A second peak was finally observed at stage 25, though sucrose concentration was not significantly modified. In PN, the SSd in the inflorescences presented two peaks at stage 15 and 15+8d, corresponding respectively to 0.705 ± 0.157 and $0.422 \pm 0.113 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ and coinciding with sucrose intense degradation. Later on, the activity of SSd in PN was

Inv). The activity of the WB Inv poorly fluctuated during the inflorescence development (Fig. 3d). In GW, the activity was effective but constant, ranging approximately at $1 \text{ mg degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$, from stages 12 to 17. Afterwards, it progressively increased up to $2.521 \pm 0.113 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ at the onset of fruit growth. The variation of WB Inv in PN inflorescence was globally similar, except that the stability of activity observed from stages 12 to 15+2d did not coincide with simultaneous decrease of sucrose concentration at stage 15.

The activity of Cy Inv was lower than WB Inv and had globally similar patterns in the two cvs. (Fig. 3e) but it could not be correlated to the variations of sucrose contents in the inflorescence, except at stage 15+2d (Fig. 1b). At that time, the Cy Inv activity showed a temporary peak, reaching respectively 0.729 ± 0.174 and $0.347 \pm 0.048 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ in GW and PN, followed by an intense sucrose cleavage in the whole inflorescence (Fig. 1b). From stage 17, the Cy Inv progressively increased until the onset of fruit development, reaching the highest values at stage 25 in PN ($1.026 \pm 0.222 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$) and stage 27 in GW ($1.070 \pm 0.092 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$). In PN inflorescences, the Cy Inv then fell to $0.347 \pm 0.099 \mu\text{g degraded sucrose mg protein}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ at stage 27.

Discussion

In grapevine inflorescences, both the development of reproductive organs and the carbohydrate metabolism are different in the flower abscission sensitive GW and the non sensitive PN. Indeed, the ontogenesis of reproductive organs is not synchronous in GW and PN cvs. since both female and male meiosis occurred earlier in PN than in GW (Lebon et al. 2004). At meiosis, starch and sucrose levels are higher in GW inflorescences than in PN but starch is present in the ovule of PN and not in GW (Lebon et al. 2004). Since the presence of starch in the ovular tissue during development is crucial for the ovule fate (Rodrigo et al. 2000; Jean and Lapointe 2001; Ruiz et al. 2001), especially at meiosis (Dorion et al. 1996; Lalonde et al. 1997), the lack of amylaceous reserves in the ovule of GW at meiosis may explain its sensitivity to flower abscission (Lebon et al. 2004) under stressing conditions.

Fluctuations of starch levels in inflorescences in the flower drop sensitive GW and the non-sensitive PN were relevant to related carbon metabolism enzymes. For the first time, starch and sucrose related enzyme activities were assayed in grapevine inflorescences during flower development, before fruit setting particularly. In both cvs., the variations of starch levels during the whole floral development are closely correlated to both α - and β -amylase activities. In GW inflorescences, starch concentration is inversely linked to the β -amylase activity until stage 15+8d and to the α -amylase activity thereafter. The situation is different in PN since β -amylase activity mostly corresponded to

starch fluctuations during the whole of floral development, although α -amylase activity also acts to the maintenance of starch level after stage 15+2d.

Conversely, starch fluctuations in grapevine inflorescences seem to be poorly related to StSy activity. Our results are in accordance with earlier results obtained in maize. Indeed, fluctuations of starch content in maize ovaries are strongly related to the total amylase activity from 5 days before pollination to 2 days after (Zinselmeier et al. 1999). Also, in rice and wheat, changes of starch contents in anthers from meiosis to mature pollen are not correlated to StSy activity (Sheoran and Saini 1996; Dorion et al. 1996).

In both cvs., the fluctuations of sucrose in inflorescences during floral development is consistent with the activities of the three tested degrading sucrose enzymes. Firstly, fluctuations of inflorescence sucrose contents from the “visible cluster” stage (stage 12) up to fruit set (stage 27) are coherent with SSd activity. In GW and PN inflorescences, each increase of SSd activity coincides with a decrease of sucrose levels and *vice et versa*. In rice and wheat anthers, SSd activity fluctuations had no effect on sucrose contents (Dorion et al. 1996; Sheoran and Saini 1996), except in wheat at anthesis when the stimulation of SSd activity induces a strong decrease of sucrose levels.

Secondly, the fluctuations of Cy Inv and WB Inv activities, from stages 15+2d and 15+8d respectively to 27 (fruit set), may also explain the variation of sucrose content in the inflorescences of both cvs. From stages 15+2d to 27 (fruit set), continual increase of Cv Inv explains the maintenance low sucrose levels (under 5% DW) in both cvs. inflorescences. The variations of vacuolar Inv activity were not assayed because it has been demonstrated that vacuolar Inv had no impact either on sucrose contents of wheat or rice anthers from meiosis to mature pollen (Dorion et al. 1996; Sheoran and Saini 1996), or on fluctuations of sucrose in maize ovaries (Zinselmeier et al. 1999).

In the inflorescences of both cvs., activities of sucrose synthesizing enzymes do not have the same influence. Indeed, the SPS activity does not seem to interfere with sucrose variations, as well as in leaves of wheat (Savitch et al 2000). In the contrary, SSs activity acts in synergy with the activities of other sucrose degrading enzymes (SSd, invertases) from stages 12 to 17, but only in GW inflorescences explaining the high sucrose increase at stage 15.

In grapevine inflorescences sucrose is more efficiently degraded from stage 17 to fruit set, which may compensate the arrest of photosynthesis in the inflorescence. Indeed, chlorophyll concentration regularly diminishes from stage 17, leading to a

decrease of net CO₂ assimilation and to the arrest of net positive photosynthesis at fruit set (stage 27) for both GW and PN inflorescences (Pallioti and Cartechini 2001; Lebon et al. 2005a). Therefore, from stage 17, the inflorescences become a sink for carbohydrates. In grapevine, sucrose is the major form of carbohydrate supply. Moreover, from stage 17, SSd and both invertases (Cy and WB) activities are significantly enhanced from stage 17, leading to a carbohydrate supply enabling to counteract the arrest of inflorescence photosynthesis (Lebon et al. 2005a).

In grapevine, the accumulation of carbohydrates in berries begins during maturation (Hawker et al. 1976; Mullins et al. 1992). Sucrose is thus hydrolyzed, leading to equal concentration in glucose and fructose (Takayanagi and Yokotsuka 1997). It has been demonstrated that the activity of sucrose degrading enzymes in berry is stimulated at fruit set and further increases until veraison (Hawker 1969; Takayanagi and Yokotsuka 1997). Our results show that Cy Inv and WB Inv are activated as early as the 15+8d stage. However, due to the poor concentration of sucrose in the inflorescence until fruit set, the simultaneous increase of glucose and fructose cannot be detected before, through the enzymes are present and active.

During flower development, variations of inflorescence enzyme activities between GW and PN can be correlated to their differences in sugar contents and further to their sensitivity to flower abscission sensitivity. Indeed, the main differences of carbohydrate metabolism in inflorescences occur during female meiosis for both cvs., explaining differences of starch and sucrose levels. Indeed, at male and female meiosis, starch is completely degraded in PN inflorescences (Lebon et al. 2004). The pool of available hexoses in developing inflorescences is thus higher in PN than in GW (Lebon et al. 2004), which may explain the lower sensitivity to flower abscission in PN under stress conditions (Lebon et al. 2004; Zapata et al. 2004b). Finally, the significant increase of sucrose degrading enzyme activities such as SSd, Cy Inv and WB Inv from stage 17 may be interpreted as the first sign of the strong physiological modifications that occurs in the ovaries between fertilization and the onset of fruit formation. This transition is reflected by both the arrest of net positive photosynthesis in the inflorescence (Lebon et al. 2005a) and the early development of berries (Mullins et al. 1992; Coombe and McCarthy 2000; Ollat et al. 2002).

Acknowledgements The authors would like to acknowledge ONIVINS and the Mumm-Perrier-Jouët company for financial supports.

References

- Bergmeyer HU (1974) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim Basel
- Coombe BG, McCarthy MG (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust J Grape Wine Res* 6:131-135
- Dejardin A, Rochat C, Wullemme S, Boutin JP (1997) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell Environ* 20:1421-1430
- Dorion S, Lalonde S, Saini HS (1996) Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiol* 111:137-145
- Dreier LP, Hunter JJ, Ruffner HP (1998) Invertase activity, grape berry development and cell compartmentation. *Plant Physiol Biochem* 36(12):865-872
- Ebadi A, Coombe BG, May P (1995) Fruit-set on small Chardonnay and Shiraz vines grown under varying temperature regimes between budburst and flowering. *Austr J Grape Wine Res* 1:3-10
- Ebadi A, May P, Coombe BG (1996) Effect of short-term temperature and shading on fruit-set, seed and berry development in model vines of *Vitis vinifera*, cvs Chardonnay and Shiraz. *Austr J Grape Wine Res* 2:2-9
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977) Phäenologische Entwicklungsstadien. Der rebe. Nachrichtenb. Deutsch Pflanzenschutz (Braunschweig) 29:119-120
- Glad C., Regnard J.L., Querou Y., Brun O. and Morot-Gaudry J.F. (1992). Flux and chemical composition of xylem exudates from Chardonnay grapevines: temporal evolution and effect of recut. *Am J Enol Vitic*, 43(3):275-282
- Hawker J.S., Ruffner H.P. and Walker R.R. (1976). The sucrose content of some Australian grapes. *Am J Enol Vitic*, 27(3):125-129
- Hawker JS (1969) Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochem* 8:9-17
- Hellmann H, Barker L, Funck D, Frommer WB (2000) The regulation of assimilate allocation and transport. *Austr J Plant Physiol* 27:583-594
- Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:431-444
- Huglin P, Schneider C (1998) Biologie et écologie de la vigne, 2nd edn. Lavoisier Tech Doc, Paris
- Jean D, Lapointe L (2001) Limited carbohydrate availability as a potential cause of fruit abortion in *Rubus chamaemorus*. *Physiol Plant* 112:379-387
- King RW, Ben-Tal Y (2001) A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiol* 125:488-496
- Koch KE (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:509-540
- Kubo T, Hohjo I, Hiratsuka S (2001) Sucrose accumulation and its related enzyme activities in the juice sacs of Satsuma mandarin fruit from trees with different crop loads. *Sci Hortic* 91:215-225
- Lalonde S, Beebe DU, Saini HS (1997) Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sex Plant Reprod* 10:40-48
- Lebon G, Brun O, Magné C, Clément C (2005a) Photosynthesis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) inflorescence. *Tree Physiol* 25(5):633-639
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Clément C (2005b) Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Ann Bot (Lond)* 95:943-948

- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C (2004) Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sex Plant Reprod* 17:71-79
- Miller WB, Ranwala AP (1994) Characterization of three soluble invertase forms from *Lilium longiflorum* flower buds. *Physiol Plant* 92:247-253
- Mukerjee R, Robyt JF (2005) Starch biosynthesis: the primer nonreducing-end mechanism versus the nonprimer reducing-end two-site insertion mechanism. *Carbo Res* 340:245-255
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE (1992) *Biology of the grapevine*, Mullins (Ed), University Press, Cambridge, UK, 239 p.
- Nakamura Y, Yuki K (1992) Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm. *Plant Sci* 82:15-20
- Nakamura Y, Yuki K, Park S, Ohya T (1989) Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant Cell Physiol* 30:833-839
- Okamoto K, Akazawa T (1979) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. 8. Immunohistochemical localization of β -amylase. *Plant Physiol* 64:337-340
- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillère JP, Moing A (2002) Grape berry development: a review. *J Int Sci Vigne Vin* 36(3):109-131
- Pallioti A, Cartechini A (2001) Developmental changes in gas exchange activity in flowers, berries, and tendrils of field-grown Cabernet Sauvignon. *Am J Enol Vitic* 52(4):317-323
- Paul MJ, Pellny TK (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot* 54:539-547
- Paul MJ, Pellny TK, Goddijn O (2001) Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 6(5):197-200
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser C, Smeekens SCM (2000) Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 51:407-416
- Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Slusarczyk J, Kuras M, Lichota J, Kilianczyk B, Jerzmanowski A (1999) Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *Plant Cell* 11:2317-2329
- Rodrigo J, Herrero M (1998). Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex Plant Reprod* 11:86-93
- Rodrigo J, Hormaza JI, Herrero M (2000). Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiol Plant* 108(1):35-41
- Ruiz R, Garcia-Luis A, Honerri C, Guardiola JL (2001) Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. *Ann Bot (Lond)* 87:805-812
- Saini HS (1997) Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex Plant Reprod* 10:67-73
- Salas E, Cardemil L (1986) The multiple forms of α -amylase enzyme of the *Araucaria* species of South America: *Araucaria araucana* (Mol.) Koch and *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kutz. *Plant Physiol* 81:1062-1068
- Salerno GL, Curatti L (2003) Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? *Trends Plant Sci* 8(2):63-69
- Savitch LV, Harney T, Huner NPA (2000) Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiol Plant* 108:270-278
- Sheoran IS, Saini HS (1996) Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sex Plant Reprod* 9:161-169
- Siddiqi I, Ganesh G, Grossniklaus U, Subbiah V (2000) The dyad gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 127:197-207
- Smith AM, Zeeman SC, Thorncroft D, Smith SM (2003) Starch mobilization in leaves. *J Exp Bot* 54:577-583
- Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4(10):401-406
- Takayanagi T, Yokotsuka K (1997) Relationship between sucrose accumulation and sucrose-metabolizing enzymes in developing grapes. *Am J Enol Vitic* 48(4):403-407
- Vanden Heuvel J.E., Leonardos E.D., Proctor J.T.A., Fisher K.H. and Sullivan J.A. (2002). Translocation and partitioning patterns of ¹⁴C photoassimilate from light- and shade-adapted shoots in greenhouse-grown 'Chardonnay' grapevines (*Vitis vinifera* L.). *J Am Soc Hort Sci* 127(6):912-918
- Wang HL, Lee PD, Chen WL, Huang DJ, Su JC (2000) Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. *J Exp Bot* 51:1991-1999
- Young LW, Wilen RW, Bonham-Smith PC (2004) High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *J Exp Bot* 55(396):485-495
- Yu TS, Lue WL, Wang SM, Chen J (2000) Mutation of Arabidopsis plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol*, 12:319-325
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004a) Partitioning and mobilization of qtrch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J Plant Physiol*, 161:1031-1040
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004b) Mobilisation and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Funct Plant Biol*, 31:1127-1135
- Zinselmeier C, Jeong BR, Boyer JS (1999) Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiol*, 121:25-35

Ces travaux ont montré que les différences de teneurs en glucides solubles (glucose, fructose et saccharose) et amidon dans les inflorescences de GW et PN (Lebon *et al.* 2004) sont dues à des différences d'activités enzymatiques du métabolisme glucidique.

Tout d'abord, l'évolution différente des teneurs en amidon dans les inflorescences des deux cépages s'explique plus par les changements d'activités de l' α - et la β -amylase que par ceux de l'amidon synthase. En effet, chez le GW, la β -amylase explique l'évolution d'amidon à partir du stade 12 (grappe visible) jusqu'aux stades 15+2 jours et 27, pour le GW et le PN respectivement. Ensuite, le changement des teneurs en amidon dans les inflorescences est corrélé à l'activité α -amylase à partir du stade 17 pour le GW, dès le stade 15+2 jours pour le PN et jusqu'à la nouaison (stade 27).

Au cours du développement des inflorescences, les activités enzymes liées au saccharose induisent des changements de ses teneurs. Plus précisément, les variations de saccharose sont corrélées avec les activités saccharose synthase (dégradation) et les activités invertases cytosoliques et pariétales. À l'opposé, l'activité saccharose phospho-synthase ne semble pas induire de modifications des teneurs en saccharose dans les inflorescences des deux cépages au cours de leur développement. Ainsi, la seule activité impliquant des effets différents entre les deux cépages est l'activité saccharose synthase (synthèse). En effet, l'évolution de cette activité explique les fluctuations des teneurs en saccharose dans les inflorescences de GW jusqu'à la nouaison. Au contraire, aucune relation n'est observée entre cette activité et les teneurs en saccharose des inflorescences de PN.

Durant le développement des inflorescences, les variations des activités enzymatiques chez le GW et le PN peuvent être corrélées à leurs différences de teneurs en glucides et donc à leur sensibilité à la coulure.

Les résultats présentés dans les articles 1 et 2 montrent que les différences dans les teneurs en glucides des inflorescences sont dues à un métabolisme glucidique différent entre les deux cépages. Chez les plantes pérennes, les glucides ont deux sources possibles, la mobilisation des réserves et la photosynthèse. Chez la vigne, les réserves glucidiques sont essentiellement localisées au niveau des racines et des bois (Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a). Leur étude est cependant difficile à cause de leur longueur et de leur disposition dans les sols (Hellman 2003). De plus, il a été montré que la mise en place et la mobilisation des

réserves chez la vigne étaient différentes entre les cépages (Zapata *et al.* 2004b). Or, chez les plantes, la mise en réserve des glucides dépend de l'apport de photoassimilats issus de la photosynthèse et des besoins de la plante. En effet, lorsque la photosynthèse est excédentaire par rapport aux besoins de la plante, l'excès de photoassimilats est mis en réserve sous forme d'amidon. La photosynthèse et les réserves glucidiques sont donc très liées car ces dernières sont dépendantes de l'excédent photosynthétique. Chez les plantes, la plupart des organes aériens (feuilles, jeunes pousses et inflorescences) contiennent des chlorophylles et assimilent donc le CO₂ grâce à la photosynthèse (Palliotti et Cartechini 2001). La photosynthèse des feuilles et des inflorescences (puis des grappes) des deux cépages doit donc être analysée pour savoir si elle est identique chez un cépage sensible (GW) à la coulure et un cépage peu sensible (PN).

Photosynthesis of the grapevine (*Vitis vinifera*) inflorescence

GAËL LEBON,¹ OLIVIER BRUN,² CHRISTIAN MAGNÉ³ and CHRISTOPHE CLÉMENT^{1,4}

¹ Laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC UPRES EA 2069, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

² Mumm-Perrier-Jouet Vignobles et Recherches, 51206 Epernay, France

³ Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologies des Halophytes et des Algues Marines, Université de Bretagne Occidentale, IUEM, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

⁴ Corresponding author (christophe.clement@univ-reims.fr)

Received March 24, 2004; accepted October 30, 2004; published online March 1, 2005

Summary To further characterize carbohydrate physiology in grapevine flowers, we examined inflorescence autotrophy in the 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' cultivars, which differ in sensitivity to flower abscission. In both cultivars, positive net photosynthesis occurred in inflorescences. The rate of photosynthesis gradually decreased throughout flower development and there was no net carbon assimilation at fruit set. The rate of photosynthesis was positively correlated with chlorophyll concentration but not to stomatal conductance. Throughout flower development, the internal CO₂ concentration increased in inflorescence tissues, suggesting that assimilates are also formed through refixation of respiratory CO₂ by the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) pathway. Significant differences between the two cultivars were recorded during meiosis, when photosynthesis was higher in 'Gewürztraminer.' We conclude that the inflorescence of grapevine contributes to its own carbon nutrition by photosynthesizing throughout flower development. Moreover, the differential patterns of photosynthesis in the inflorescences of 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' might account for their differing fertilization rates and sensitivity to flower abscission.

Keywords: chlorophyll, flower, gas exchanges, Gewürztraminer, Pinot noir.

Introduction

In woody plants, flowering represents the most energy-consuming stage of the annual cycle of development (Finazzo et al. 1994). Because developing flowers consume more carbon than they assimilate, they constitute the strongest sink organ in the plant during the reproductive period. Carbohydrate supply to inflorescences is therefore critical to tree reproduction (Hiege et al. 2002a). In trees, the carbon nutrients required for flower and fruit development are assumed to originate either from photosynthesis in the leaves (Hiege et al. 2002a) or from trunk, branch or root reserves (Sauter and Van Cleve 1994).

In grapevine (*Vitis vinifera* L.), carbohydrate physiology of

the developing inflorescences is poorly understood up to the flowering stage. We previously studied flowering in the 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' cultivars because of their differential sensitivity to flower abscission (Lebon et al. 2004), which likely involves carbohydrate shortage during flowering (Zapata et al. 2004a, 2004b). We found that variations in carbohydrates in the inflorescence are closely linked to the stage of development of both male and female organs. Differences in carbohydrate physiology between the cultivars occur at meiosis and are correlated to the rate of fertilization and fruit set (Lebon et al. 2004).

In grapevine, as in other woody perennial species, mature leaves (e.g., Petrie et al. 2000) and roots (Zapata et al. 2004a) supply the developing flowers with carbohydrates. However, the inflorescence of grapevine is chlorophyllous and may be capable of photosynthesis, thereby contributing to its own carbon nutrition during flower development and fruit set (Niimi and Torikata 1978, Palliotti and Cartechini 2001).

To characterize carbon nutrition in grapevine inflorescences, we studied chlorophyll (Chl) content and CO₂ exchange of inflorescences of field-grown 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' grapevines during flower development, focusing on the key developmental stages of sex organ formation.

Materials and methods

Plant material and sampling

Thirty-year-old grapevine 'Gewürztraminer' (Clone 47) and 'Pinot noir' (Clone 162) cultivars were grown in Bergheim, France, under similar cultural regimes. Inflorescence samples were collected at Stages 12 (first visible cluster), 15, 17, 21 and 23 (bloom; Eichhorn and Lorenz 1977); in addition, transient stages (15 + 2 days (15+2d) and 15 + 8 days (15+8d)) were added. Only the proximal inflorescence of the annual shoot was collected at each development stage. The samples were immediately weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analyzed for Chl pigments. Simulta-

neously, the leaf under the harvested inflorescence was collected because photoassimilates produced by this leaf are predominantly directed toward the inflorescence (Motomura 1982).

Photosynthetic pigments

Pigment extraction was carried out in dim light to minimize phototransformation of Chl. Samples were ground at 4 °C with Fontainebleau sand in 80% (v/v) acetone, in the presence of $10 \text{ g l}^{-1} \text{ MgCO}_3$ to reduce acidity. The crude extract was centrifuged at $10,000 \text{ g}$ for 10 min at 4 °C, and the supernatant was kept at 4 °C. The pellet was homogenized twice with 80% (v/v) acetone and centrifuged at $10,000 \text{ g}$ for 10 min at 4 °C. The three supernatants were pooled and the absorbance determined spectrophotometrically (SmartSpec Model, Bio-Rad, Hercules, CA) at 647 (Chl b) and 663 nm (Chl a). Chlorophyll concentrations were estimated based on the absorbance coefficients determined by Lichtenthaler (1987).

Gas exchange measurements

Net CO_2 assimilation (A), internal CO_2 concentration (c_i) and stomatal conductance (g_s) were measured in inflorescences and leaves at each developmental stage. Measurements were carried out on sunny days between 0900 and 1100 h (Chauumont et al. 1994) with an LI-6400 infra-red gas analysis system (Li-Cor, Lincoln, NE). The temperature in the chamber was 25 ± 1 °C, the air CO_2 concentration was $375 \mu\text{l l}^{-1}$ and the flow rate was $500 \mu\text{mol min}^{-1}$. During measurements, irradiance was artificially maintained at a constant photosynthetic photon flux of $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ from a red-blue light source (Li-Cor 6400-02 I.F.D. Light Source). The LI-6400 was calibrated each morning before measurements as recommended by the manufacturer. Based on the findings of Duchêne et al. (2003), the leaf surface was considered identical in both cultivars with respect to leaf mass. The surface area of each flower was estimated from photographs, based on the assumption that flower buds were cylindrical in shape, and the number of flowers included in the measurement chamber.

Statistical analysis

At least five Chl assays were performed for each stage of flower development. Three independent readings were made for each extract and the standard error (SE) calculated. The data presented for A and g_s are means ($\pm$ SE) of 10 measurements performed on five inflorescences and five leaves. Mean comparisons were made with the Student's t -test. A difference was considered significant at $P = 0.05$.

Results

Photosynthetic pigments

Total Chl concentrations of the inflorescences of both cultivars decreased by 0.05 – $0.025 \text{ mg g}_{\text{FM}}^{-1}$ during flower development (Figure 1A). In both cultivars, the decrease was gradual except for a plateau between Stages 15 and 17. Total Chl concentra-

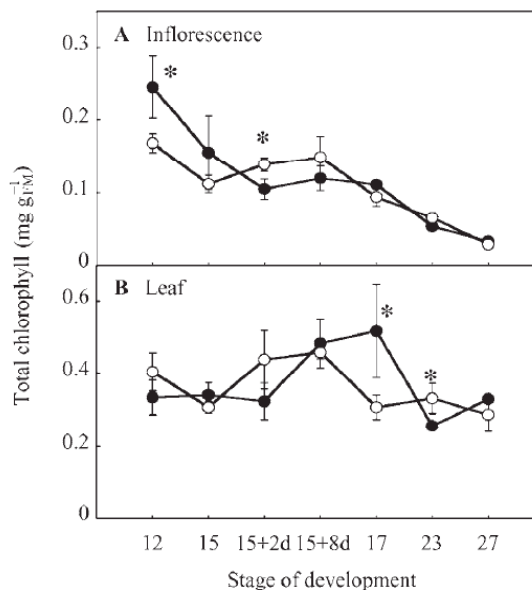


Figure 1. Variations in total chlorophyll concentrations in inflorescences (A) and leaves (B) during grapevine flower development. Symbols: ○ = 'Gewürztraminer'; and ● = 'Pinot noir'. Values are means $\pm$ SE of five assays. Statistical analyses were carried out with the Student's t -test. A 5% probability was considered significant and is marked by an asterisk.

tion in the leaves, which ranged between 0.3 and $0.5 \text{ mg g}_{\text{FM}}^{-1}$, was about double that in the inflorescences (Figure 1B). Leaf Chl concentration was constant during flower development, though a transient accumulation was registered in each cultivar between Stages 15 and 17. In both cultivars, the Chl a/b ratio of inflorescences fluctuated between 2.0 ± 0.1 and 2.6 ± 0.3 during floral development (Figure 2A), but decreased to 1.6 ± 0.1 in 'Gewürztraminer' and to 2.0 ± 0 in 'Pinot noir' at fruit set (Stage 27). The inflorescence chlorophyll ratio was significantly higher in 'Gewürztraminer' than in 'Pinot noir' at Stages 15+2d and 17. In leaves, the Chl a/b ratio oscillated between 2.1 ± 0.2 and 3.1 ± 0.2 (Figure 2B), and no significant differences were recorded between cultivars, except at Stage 17 (higher in 'Gewürztraminer') and Stage 27 (higher in 'Pinot noir').

Gas exchange

In inflorescences, A differed between cultivars during flower development (Figure 3A). It was significantly higher in 'Pinot noir' at Stage 12 and significantly higher in 'Gewürztraminer' between Stages 15+2d and 17. In 'Gewürztraminer' inflorescences, A increased between Stages 12 and 17, then declined, reaching zero at Stage 27. In 'Pinot noir' inflorescences, A decreased between Stages 12 and 15+2d, then increased until Stage 23 before decreasing to zero at fruit set (Stage 27).

Net CO_2 assimilation was two- to sixfold higher in leaves than in inflorescences (Figure 3B). Although A was higher in

PHOTOSYNTHESIS OF GRAPEVINE INFLORESCENCE

635

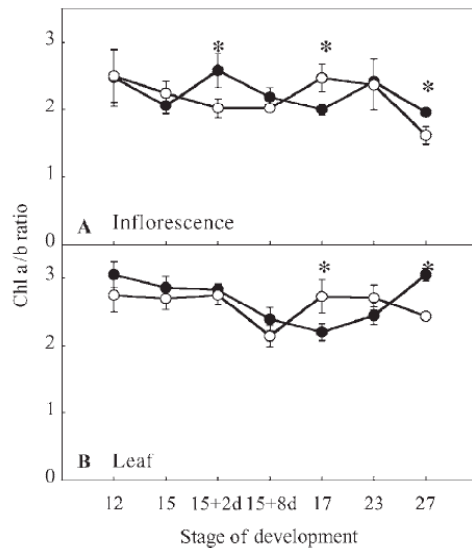


Figure 2. Changes in inflorescence and leaf chlorophyll (Chl) a/b ratios during grapevine flower development. Symbols: ○ = 'Gewürztraminer'; and ● = 'Pinot noir'. Values are means $\pm$ SE of five measurements. Statistical analyses were carried out with the Student's *t*-test. A 5% probability was considered significant and is marked by an asterisk.

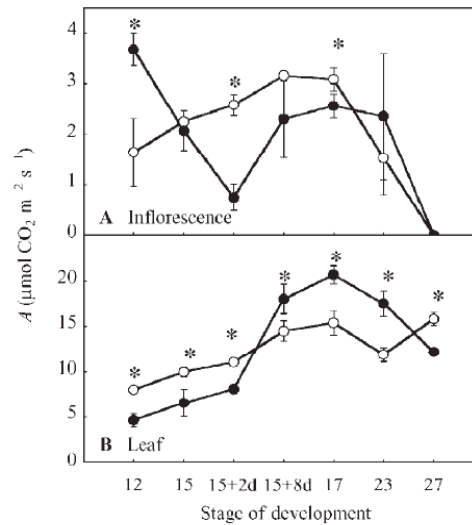


Figure 3. Variations in inflorescence (A) and leaf (B) net CO₂ assimilation during grapevine flower development. Symbols: ○ = 'Gewürztraminer'; and ● = 'Pinot noir'. Values are means $\pm$ SE of five measurements. Statistical analyses were carried out with the Student's *t*-test. A 5% probability was considered significant and is marked by an asterisk.

'Gewürztraminer' leaves at Stages 12, 15, 15+2d and 27, it was higher in 'Pinot noir' leaves from Stages 15+8d to 23. Net CO₂ assimilation increased between Stages 12 and 17 in both 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' leaves, by a factor of two and a factor of 4.8, respectively. Thereafter, leaf *A* decreased until Stage 27 in 'Pinot noir', whereas it decreased until Stage 23 and then increased until Stage 27 in 'Gewürztraminer'.

In both cultivars, *c_i* of the flower buds increased during flower development (Figure 4A), with a twofold increase between Stages 15 and 23 and a 33% increase at Stage 27, which represents the first stage of fruit formation (i.e., fruit set) after fertilization. By contrast, *c_i* in leaf tissues did not vary significantly during flower development up to Stage 23 (Figure 4B); however, it increased similarly in both cultivars at fruit set (Stage 27).

The correlations between *A* and Chl concentration were generally weakest at Stage 23, when most grapevines had opened 50% of their flowers. In 'Gewürztraminer' inflorescences (Figure 5A), *A* was poorly correlated with Chl concentration during floral development ($r^2 = 0.41$); however, the correlation improved when the values for Stage 12 were omitted ($r^2 = 0.76$). In 'Pinot noir' inflorescences (Figure 5B), *A* was poorly correlated with total Chl concentration except when the values for Stage 23 were excluded ($r^2 = 0.77$). In 'Gewürztraminer' leaves, there was no relationship between total Chl concentration and *A* (Figure 5C), whereas in 'Pinot noir' leaves, the correlation coefficient r^2 reached 0.83 when the value for Stage 23 was excluded from the analysis (Figure 5D).

In inflorescences, *g_s* increased continuously during the flower development in both cultivars, but especially in 'Pinot

noir' from Stage 15+8d to Stage 27 (Figure 6A). At fruit set (Stage 27), *g_s* was twofold higher in 'Pinot noir' inflorescences than in 'Gewürztraminer' inflorescences. In leaves, *g_s* exhib-

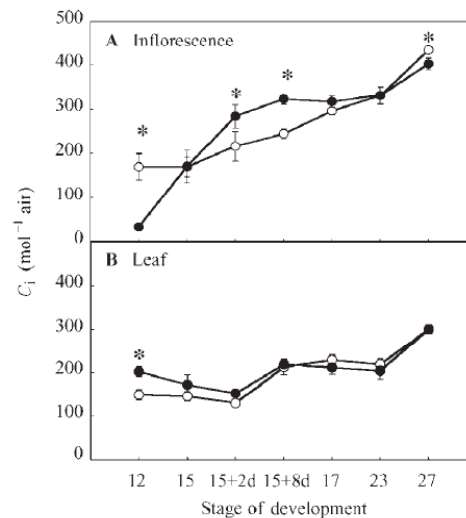


Figure 4. Variations in inflorescence (A) and leaf (B) intercellular CO₂ concentration (*c_i*) during grapevine flower development. Symbols: ○ = 'Gewürztraminer'; and ● = 'Pinot noir'. Values are means $\pm$ SE of five measurements. Statistical analyses were carried out with the Student's *t*-test. A 5% probability was considered significant and is marked by an asterisk.

636

LEBON, BRUN, MAGNÉ AND CLÉMENT

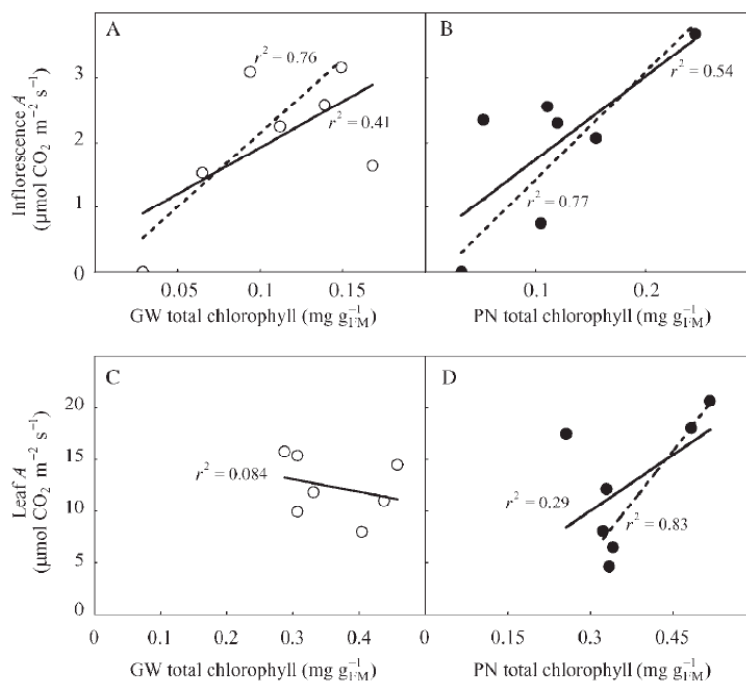


Figure 5. Relationships between net CO₂ assimilation (A) and total chlorophyll concentration in inflorescences (A, B) and leaves (C, D) during flower development in 'Gewürztraminer' (GW) (A, C) and 'Pinot noir' (PN) (B, D). Values are means of five measurements. Symbols: ○ = 'Gewürztraminer'; and ● = 'Pinot noir'. Solid lines correspond to regressions with all values and dashed lines correspond to regressions with all values except one.

ited similar variations in both cultivars (Figure 6B). It was constant from Stages 12 to 15+2d, and then increased until Stage 17. Thereafter, leaf g_s decreased transiently at flowering

(Stage 23) and increased again at fruit set (Stage 27). There was no significant correlation between A and g_s in the inflorescences of either cultivar (Figures 7A and 7B). By contrast, A was strongly correlated to g_s in leaves (Figures 7C and 7D), except at fruit set (Stage 27), when g_s was at its maximum.

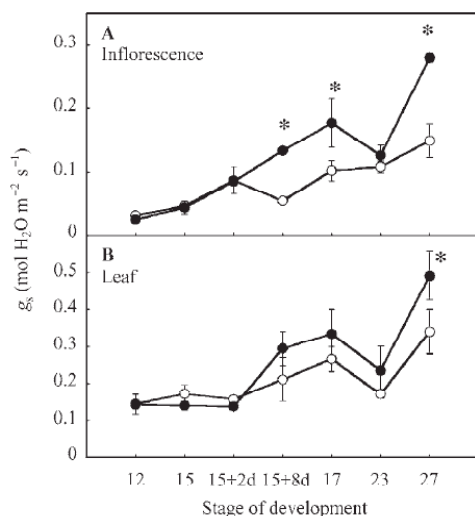


Figure 6. Variations in inflorescence (A) and leaf (B) stomatal conductance (g_s) during grapevine flower development. Symbols: ○ = 'Gewürztraminer'; and ● = 'Pinot noir'. Values are means ($\pm$ SE) of five measurements. Statistical analyses were carried out with the Student's *t*-test. A 5% probability was considered significant and is marked by an asterisk.

Discussion

Photosynthetic pigments

The decreases we measured in Chl concentrations in inflorescences of 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' during flower development were similar to those observed by Niimi and Torikata (1978, 1979) in flowers of *Vitis labruscana* Bailey cv. Delabare, in which Chl concentration decreased before anthesis and continued thereafter. Although the Chl concentrations we determined in leaves and inflorescences following the method and equations described by Lichtenthaler (1987) are lower than those obtained with other solvent extraction methods (Blanke 1990b, 1992), our values were consistent across all samples. Furthermore, we focused on the variation in Chl concentrations among the studied organs during flower development and the differences between the 'Gewürztraminer' and the 'Pinot noir' cultivars, rather than on absolute values.

A Chl a/b ratio of 1.0–1.1, the value usually observed in reproductive organs, indicates that Chl concentrations and photosynthetic rates are barely detectable (Lichtenthaler 1987, Blanke and Lenz 1989). In both leaves and inflorescences of grapevine, the Chl a/b ratio fluctuated between 2 and 3 over the studied period, a reliable indicator of the occurrence of net positive photosynthesis (Lichtenthaler 1987). At fruit set

PHOTOSYNTHESIS OF GRAPEVINE INFLORESCENCE

637

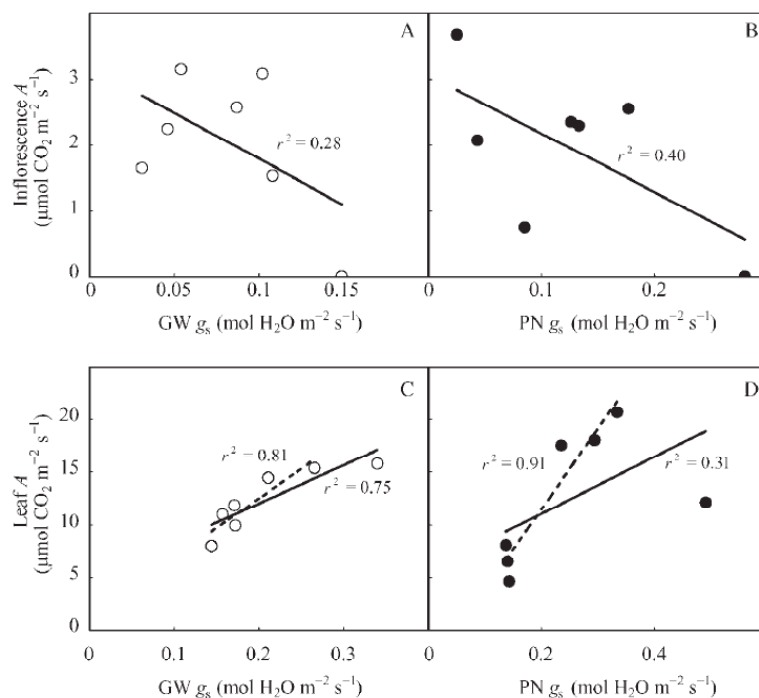


Figure 7. Relationships between net CO₂ assimilation (A) and stomatal conductance (g_s) in inflorescences (A, B) and leaves (C, D) during flower development in 'Gewürztraminer' (GW) and 'Pinot noir' (PN). Values are means of five measurements. Symbols: ○ = GW and ● = PN. Solid lines correspond to regressions with all values and dashed lines correspond to regressions with all values except one.

(Stage 27), the Chl a/b ratio in the inflorescence decreased, which is in accordance with previous findings in other grape varieties (Blanke and Leyhe 1989, Palliotti and Cartechini 2001) and *Vitis* spp. (Niimi and Torikata 1978, 1979), and indicates that the inflorescences were by then fully reliant on the leaves for carbohydrates at this stage.

Gas exchange

We found that the inflorescence of *V. vinifera* is capable of photosynthesis and thus contributes to its own carbon nutrition at every stage of flower development, as reported for *Malus pumila* Mill. (Vemmos and Goldwin 1993, 1994). Although similar results for grapevine have been reported previously, they were obtained with excised flowers of *V. labruscana* (Niimi and Torikata 1978, 1979), which implies that the plants were subject to stress so that the results may not reflect what happens in intact flowers (Leyhe and Blanke 1989). Thus, in 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' grapevines, as in trees, the carbohydrates required for inflorescence development originate from three sources: reserves in woody perennial parts such as stem and roots (Zapata et al. 2004a), leaf photosynthates (Ollat and Gaudillère 2000, Petrie et al. 2000) and photosynthates produced in the inflorescence.

The rate of CO₂ assimilation in the inflorescence was between one half and one sixth that in the leaf, whereas chlorophyll concentration was about half that in the leaf. A similar situation has been described for flowers of *V. labruscana* (Niimi and Torikata 1978, 1979) and *M. pumila* (Vemmos and Goldwin 1994). The density of stomata in inflorescences of fruit trees is usually lower than in leaves (Blanke and Lovatt

1993), which accounts for the lower gas exchange rate per surface area in the inflorescence. Moreover, in grapevine flowers, the highest stomatal density is located on the corolla (also known as the calyptra or cap) (Blanke and Leyhe 1988), which falls from the flower at blooming (Stage 23), thus further decreasing the potential for gas exchange by the inflorescence. However, measured A in inflorescences cannot be attributed solely to gas exchange in the stomata on the corolla because stomata are also present on other flower organs, especially the ovaries (Blanke and Leyhe 1988), which correspond to the berries before fertilization (Blanke 1991), and stalks.

In the inflorescence, variation in g_s can be related to the fate of stomata in flowers and to the surface area of the inflorescence. Stomata are present on the corolla and the ovary, and these stomata become fully functional 2 weeks before anthesis (Blanke and Leyhe 1988), corresponding to a few days after Stage 17. The cap begins to fall at Stage 23, so most stomata are lost from the flower at this stage. These changes likely explain the increase in g_s in the inflorescence up to Stage 17 and the subsequent decrease at Stage 23. The large increase in g_s at fruit set (Stage 27) may coincide with the drastic physiological changes associated with fruit formation (Blanke and Lenz 1989).

The internal CO₂ concentration increased in inflorescence tissues until fruit set, and may have stimulated the fixation of CO₂ originating from mitochondrial respiration through the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31). This process occurs in the cap of grape (Blanke 1990a) and during fruit development (Chollet et al. 1996), es-

pecially in *V. vinifera*. (Blanke and Lenz 1989). Based on the progressive accumulation of internal CO₂ in the inflorescence throughout flower development, we suggest that such a pathway is triggered early in flower development and well before fruit set, at least in the cap (Blanke 1990a). This suggestion is supported by the lack of correlation between *A* and *g_s*, and led us to speculate that the local production of assimilates in the grapevine inflorescence originates from both photosynthesis and respiratory CO₂ refixation, as occurs in apple (Vemmos and Goldwin 1993, 1994).

Our grapevine cultivars exhibited variation in the photosynthetic activity of inflorescences during flower development, which is in agreement with previous studies on CO₂ exchange in the 'Müller-Thurgau' and 'Pinot noir' cultivars (Leyhe and Blanke 1989). Moreover, in the case of 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir', the differences between the cultivars in *A* were significant and may be related to the differential efficiency of reproduction in these cultivars. Lebon et al. (2004) measured variations in sugar concentrations in inflorescences and found a close correlation between the sugar status of the inflorescence at crucial steps of flower development and fruit set.

The contribution of *A* in flowers to the reproductive effort varies with species. In trees, it can represent the main source of carbohydrates, reaching up to 64.5% of the total carbon balance in *Acer platanoides* L. (Bazzaz et al. 1979). However, in fruit trees, *A* in the flowers and fruits usually contributes between 3 and 15% of the carbohydrate requirement, depending on species and environmental conditions (Birkhold et al. 1992, Pavel and DeJong 1993, Marcelis and Baan Hofman-Eijer 1995, Hieke et al. 2002b). In the grapevine cultivars 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir', *A* was two- to sixfold higher in the leaf than in the inflorescence, indicating that the leaf is the main source of photoassimilates for the inflorescence.

Relationships between net CO₂ assimilation, total chlorophyll concentrations and stomata

The regulation of photosynthesis in inflorescences and leaves of 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' appears to proceed in different ways. In the inflorescence, it seems that Chl concentration limits photosynthesis but stomatal conductance is not involved, in agreement with data obtained for temperate trees (Kennedy and Johnson 1981). In leaves, net photosynthesis was limited only by stomatal conductance in 'Gewürztraminer', whereas it was related to both stomatal conductance and total Chl concentration in 'Pinot noir'.

Conclusion

In grapevine, annual development is marked by a transition between a heterotrophic allocation of nutrients, leading to mobilization of starch from the root reserves, and an autotrophic allocation, through the translocation of photoassimilates from fully expanded leaves (Zapata et al. 2004a). This transition coincides with key steps in flower development, which are cultivar-specific (Zapata et al. 2004b), and occurred at different

times in the cultivars we studied. This transition coincides with variations in sugar concentrations in the developing ovules and anthers (Lebon et al. 2004), and so may regulate sugar supply to the inflorescence at crucial steps in male and female organ formation, i.e., at meiosis. Differences in photosynthetic rates in leaves and inflorescences of 'Gewürztraminer' and 'Pinot noir' at meiosis strongly suggest that the heterotrophy–autotrophy transition occurs at different developmental stages in these cultivars and may affect the reproductive process, leading to differential rates of fertilization and fruit set.

Acknowledgments

The authors thank Professor Manuel Dauchez for his help with the statistical analysis of the data.

References

- Bazzaz, F.A., R.W. Carlson and J.L. Harper. 1979. Contribution to reproductive effort by photosynthesis of flowers and fruits. *Nature* 279:554–555.
- Birkhold, K.T., K.E. Koch and R.L. Darnell. 1992. Carbon and nitrogen economy of developing rabbiteye blueberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117:139–145.
- Blanke, M.M. 1990a. Carbon economy of the grape inflorescence. 5. Energy requirement of the flower bud of grape. *Vitic. Enol. Sci.* 45:33–35.
- Blanke, M.M. 1990b. Determination of chlorophyll with DMF. *Vitic. Enol. Sci.* 45:76–78.
- Blanke, M.M. 1991. Carbon economy of the grape inflorescence. 7. X-ray analysis of stomata on the grape berry. *Vitic. Enol. Sci.* 46: 8–10.
- Blanke, M.M. 1992. Determination of chlorophyll using DMSO. *Vitic. Enol. Sci.* 47:32–35.
- Blanke, M.M. and F. Lenz. 1989. Fruit photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 12:31–46.
- Blanke, M.M. and A. Leyhe. 1988. Stomatal and cuticular transpiration of the cap and berry of grape. *J. Plant Physiol.* 132:250–253.
- Blanke, M.M. and A. Leyhe. 1989. Carbon economy of the grape inflorescence. 3. Chlorophyll in the grape inflorescence. *Vitic. Enol. Sci.* 44:188–191.
- Blanke, M.M. and C.J. Lovatt. 1993. Anatomy and transpiration of the avocado inflorescence. *Ann. Bot.* 71:543–547.
- Chaumont, M., J.F. Morot-Gaudry and C.H. Foyer. 1994. Seasonal and diurnal changes in photosynthesis and carbon partitioning in *Vitis vinifera* L. leaves in vines with and without fruit. *J. Exp. Bot.* 45:1235–1243.
- Chollet, R., J. Vidal and M.H. O'Leary. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:273–298.
- Duchêne, E., N. Jaegli, R. Salber and J.P. Gaudillère. 2003. Effects of ripening conditions on the following season's growth and yield components for 'Pinot noir' and 'Gewürztraminer' grapevines (*Vitis vinifera* L.) in a controlled environment. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 37:39–49.
- Eichhorn, K.W. and D.H. Lorenz. 1977. Phäenologische Entwicklungsstadien. *Der Rebe. Nachrichtenb. Deutsche Pflanzenschutz (Braunschweig)* 29:119–120.
- Finazzo, S.F., T.L. Davenport and B. Schaffer. 1994. Partitioning of photoassimilates in avocado (*Persea americana* Mill.) during flowering and fruit set. *Tree Physiol.* 14:153–164.

PHOTOSYNTHESIS OF GRAPEVINE INFLORESCENCE

639

- Hieke, S., C.M. Menzel and P. Lüdgers. 2002a. Shoot development, chlorophyll, gas exchange and carbohydrates in lychee seedlings (*Litchi chinensis*). *Tree Physiol.* 22:947–953.
- Hieke, S., C.M. Menzel and P. Lüdgers. 2002b. Effects of leaf, shoot and fruit development on photosynthesis of lychee trees (*Litchi chinensis*). *Tree Physiol.* 22:955–961.
- Kennedy, R.A. and D. Johnson. 1981. Changes in photosynthetic characteristics during leaf development in apple. *Photosynth. Res.* 2:213–223.
- Lebon, G., E. Duchêne, O. Brun, C. Magné and C. Clément. 2004. Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sex. Plant Reprod.* 17:71–79.
- Leyhe, A. and M.M. Blanke. 1989. Carbon economy of the grape inflorescence. 2. CO₂ exchange of the grape inflorescence. *Vitic. Enol. Sci.* 44:147–150.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350–382.
- Marcelis, L.E.M. and L.R. Baan Hofman-Eijer. 1995. The contribution of fruit photosynthesis to the carbon requirement of cucumber fruit as affected by irradiance, temperature and ontogeny. *Physiol. Plant.* 93:476–483.
- Motomura, Y. 1982. Incorporation of ¹⁴C-assimilates into GA-treated and -untreated inflorescences following assimilation of ¹⁴CO₂ by individual leaves in grape shoot. *Tohoku J. Agric. Res.* 33:1–13.
- Niimi, Y. and H. Torikata. 1978. Changes in cytokinin activities, photosynthesis and respiration of the grape flower clusters during their development. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 47:301–307.
- Niimi, Y. and H. Torikata. 1979. Changes in photosynthesis and respiration during berry development in relation to the ripening of Delaware grapes. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 47:448–453.
- Ollat, N. and J.P. Gaudillère. 2000. Carbon balance in developing grapevine berries. *Acta Hortic.* 526:345–350.
- Pallioti, A. and A. Cartechini. 2001. Developmental changes in gas exchange activity in flowers, berries, and tendrils of field-grown cabernet sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:317–323.
- Pavel, E.W. and T.M. DeJong. 1993. Estimating the photosynthetic contribution of developing peach (*Prunus persica*) fruits to their growth and maintenance carbohydrate requirements. *Physiol. Plant.* 88:331–338.
- Petrie, P.R., M.C.T. Trought and G.S. Howell. 2000. Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. 'Pinot noir') leaves. *Vitis* 39:31–36.
- Sauter, J.J. and B. Van Cleve. 1994. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees* 8:297–304.
- Vemmos, S.N. and G.K. Goldwin. 1993. Stomatal and chlorophyll distribution of Cox's orange pippin apple flowers relative to other cluster parts. *Ann. Bot.* 71:245–250.
- Vemmos, S.N. and G.K. Goldwin. 1994. The photosynthetic activity of Cox's orange pippin apple flowers in relation to fruit setting. *Ann. Bot.* 73:385–391.
- Zapata, C., E. Deléens, S. Chaillou and C. Magné. 2004a. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Plant Physiol.* 161:1031–1040.
- Zapata, C., E. Deléens, S. Chaillou and C. Magné. 2004b. Mobilisation and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Funct. Plant Biol.* 31:1127–1135.

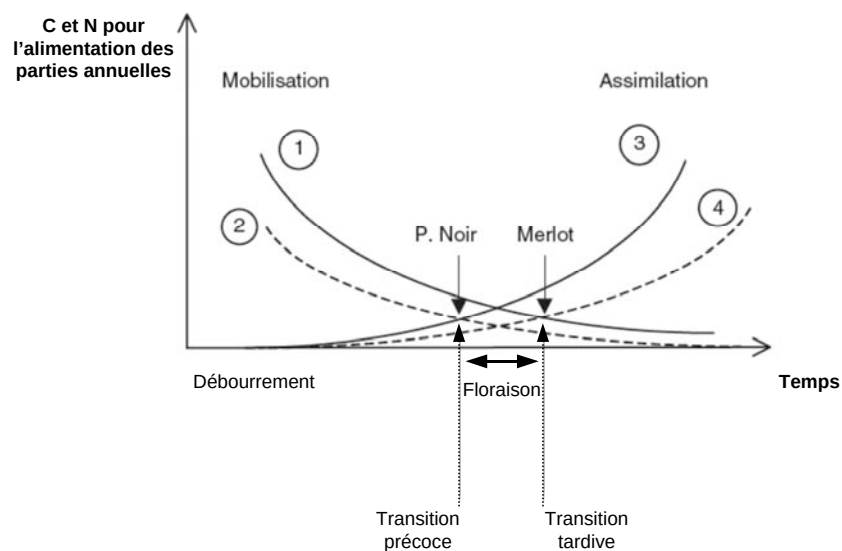


Figure 28. Modèle de prédiction du “mécanisme ” conduisant à la coulure (Zapata *et al.* 2004b).

Ce modèle est basé sur la disponibilité en nutriments de la vigne. Les flèches indiquent la transition entre la mobilisation des réserves et l’assimilation des photoassimilats chez le Pinot noir et le Merlot.

① quantité normale de réserves disponibles; ② faibles quantités de réserves disponibles; ③ reprise normale de l’assimilation; ④ reprise ralentie ou tardive de l’assimilation.

Tableau 9. Paramètres régulant l’assimilation de CO₂ dans les feuilles et les inflorescences de GW et PN.

Feuilles	GW	Conductance stomatique	Teneur en chlorophylles
	PN	Conductance stomatique	
Inflorescences	GW	Teneur en chlorophylles	
	PN	Teneur en chlorophylles	

Les travaux présentés dans cet article montrent que la photosynthèse nette est positive dans les feuilles et les inflorescences des deux cépages. Cependant, ils présentent une assimilation de CO₂ différente au cours du développement des inflorescences.

Tout d'abord, l'assimilation de CO₂ de l'inflorescence est positive jusqu'à la floraison, puis devient nulle à la nouaison. Cependant, les feuilles demeurent les principales sources de photoassimilats de l'inflorescence. En effet, la feuille face à la première inflorescence assimile à elle seule 6 fois plus de CO₂ que l'inflorescence. De plus, l'évolution de la photosynthèse nette positive est différente entre les deux cépages : jusqu'au stade 15+2 jours, elle est supérieure chez le GW, puis devient supérieure chez le PN des stades 15+8 jours à 23 (floraison). Les différences de photosynthèse nette positive dans les inflorescences et les feuilles des 2 cépages à la méiose (stades 15+2 jours et 17) suggèrent que la transition hétérotrophie/autotrophie a lieu à différents stades de développement selon le cépage. Ces différences peuvent affecter le développement reproducteur. En effet, la transition hétérotrophie/autotrophie a lieu au moment de la méiose ovulaire (Lebon *et al.* 2004). Durant cette période, les structures reproductrices femelles sont particulièrement sensibles aux stress et aux modifications du métabolisme glucidique (Saini 1997 ; Jean et Lapointe 2001). À cette période, les réserves amylacées sont consommées (Zapata *et al.* 2004a) et les glucides utilisés par la plante ne proviennent donc plus que de la photosynthèse (Zapata *et al.* 2004b). Une photosynthèse déficiente ou minimale à ce moment produit moins de photoassimilats et provoque un changement des teneurs en glucides dans les organes. Cette carence momentanée en glucides peut, lors de la méiose ovulaire, alors conduire à l'abscission des fleurs, comme l'ont supposé Zapata *et al.* en 2004b pour le Pinot noir et le Merlot (Fig. 28). Ainsi, l'activité photosynthétique faible des feuilles de GW lors de la méiose ovulaire pourrait expliquer sa sensibilité à la coulure plus importante que le PN.

De plus, les mécanismes de régulation de la photosynthèse dans les feuilles sont différents chez le GW et le PN (tableau 9). En effet, dans les feuilles, la photosynthèse nette est régulée par la conductance stomatique chez le GW et le PN et par la teneur en chlorophylles totales chez le PN uniquement. Ensuite, les teneurs en chlorophylles totales des inflorescences limitent l'assimilation de CO₂ de ces organes. Cependant, dans tous les cas, les teneurs en glucides présents dans les feuilles interviennent dans la régulation de l'activité photosynthétique (Koch 1996). Ainsi, avec le mécanisme de rétrocontrôle positif, les faibles

teneurs en glucides dans les feuilles stimulent généralement la photosynthèse alors que l'abondance de glucides l'inhibe (Koch 1996).

Dans cette partie sur la caractérisation au vignoble du GW et du PN présentant une sensibilité différente à la coulure, nous avons analysé le développement des structures reproductrices et le métabolisme glucidique des inflorescences de ces cépages (Lebon *et al.* 2004). Ainsi, nous avons montré que le développement des structures mâles et femelles était plus précoce chez le PN que chez le GW. De plus, les teneurs en glucides dans les inflorescences indiquent que le métabolisme glucidique des inflorescences de GW est différent de celui des inflorescences de PN. L'étude des activités enzymatiques liées au métabolisme glucidique a conforté l'idée que les inflorescences de GW et de PN n'ont pas le même métabolisme glucidique (Lebon *et al.* 2005a). Enfin, l'étude de la photosynthèse des feuilles et des inflorescences de ces deux cépages au cours de leur développement a montré des différences dans l'évolution de l'assimilation du CO₂ et des facteurs limitant cette assimilation chez les deux cépages (Lebon *et al.* 2005b).

Les études présentées dans cette première partie ont été réalisées au vignoble. L'obtention de tels résultats n'est donc possible qu'une fois par an au moment de la floraison. Le fait que la floraison n'ait lieu qu'une fois par an limite considérablement le nombre d'analyses possibles à réaliser sur une même année et rend la reproductibilité des expériences plus dépendante des conditions environnementales au moment de la floraison. Ainsi, il est nécessaire d'avoir un modèle d'étude fiable. Pour cela, ce modèle doit d'abord être reproductible dans le temps et présenter des valeurs identiques quelque soit la saison. De plus, il doit être utilisable tout au long ou une bonne partie de l'année afin de présenter un réel avantage par rapport au vignoble. Enfin, ce modèle doit être suffisamment contrôlable pour observer l'impact des variations mono- ou pluri-factorielles. Le protocole d'obtention de bouture fructifère est connu depuis 40 ans et a subi diverses améliorations (Mullins 1966 ; Mullins et Rajasekaran 1981 ; Gény 1997 ; Ollat *et al.* 1998 ; Collin 2000). Cependant, les études réalisées sur ce modèle ne nous fournissent pas d'éléments de comparaison avec nos données obtenues au vignoble. Il est donc nécessaire d'optimiser le protocole, d'étudier le développement des structures reproductrices et l'évolution des teneurs en glucides dans les différents organes des boutures fructifères au cours du développement des inflorescences.

Chez les plantes, les glucides métabolisés proviennent de la photosynthèse ou de la mobilisation des réserves. Au vignoble, l'étude de la photosynthèse est plus aisée que celle de

la mise en réserve. En effet, l'analyse de l'amidon présent dans les racines est particulièrement fastidieuse due à la longueur (parfois 10 m) et à la quantité de racines par cep. Il est donc utile d'étudier l'impact des réserves présentes dans les bois en hiver sur la floraison afin de faciliter l'obtention et l'analyse des données.

La seconde partie des résultats sera tout d'abord axée sur l'optimisation du modèle bouture fructifère. Ensuite, les données obtenues avec ce modèle (développement des structures reproductrices, localisation et évolution des teneurs en amidon dans ces structures, évolution des teneurs en glucides dans les différentes parties des boutures fructifères) seront comparées avec les résultats acquis au vignoble. Enfin, l'impact de la mise en réserve l'été n sur la floraison de l'été $n+1$ sera analysé sur les trois cépages champenois, le Chardonnay (CH), le Pinot Meunier (PM) et le Pinot noir (PN).

Résultats et Discussions

- Partie 2 -

Expérimentations avec le modèle bouture fructifère et au vignoble



Chez la vigne, il est nécessaire de travailler sur des modèles expérimentaux car la floraison n'a lieu qu'une fois par an au vignoble. Parmi les modèles possibles, la bouture fructifère est utilisée depuis longtemps (Mullins 1966 ; Mullins et Rajasekaran 1981 ; Gény 1997 ; Ollat *et al.* 1998 ; Collin 2000). Cependant, aucune étude n'a été menée sur le développement des structures reproductrices obtenues avec ce modèle. Aussi, nous avons étudié le développement de ces organes et la présence d'amidon dans les inflorescences de GW et PN obtenues à partir de bouture fructifère. Les résultats de ces 2 éléments de caractérisation (développement des structures reproductrices et présence d'amidon dans ces structures) sont présentés dans **l'article 4**.

L'étude des variations de la teneur en glucides dans les différents organes (racines, feuilles et inflorescences) d'une bouture fructifère a ensuite été réalisée. Il est en effet nécessaire de savoir si le métabolisme glucidique des inflorescences de GW et PN est identique dans des plantes entières et dans des boutures fructifères. De plus, ce modèle permet d'expérimenter plus facilement qu'au vignoble. Ainsi, nous avons étudié les relations source/puits et la répartition des glucides dans les différents organes des boutures fructifères. Le changement du rapport source/puits a été réalisée grâce à un effeuillage. Ces résultats seront présentés dans **l'article 5**.

Enfin, le développement reproducteur de la vigne est réparti sur 2 années successives, l'initiation florale débutant l'été précédant l'anthèse (Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Gerrath et Posluszny 1988 ; Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). Les nutriments utilisés par la vigne proviennent de la photosynthèse et de la mobilisation des réserves. L'étude de la photosynthèse a été réalisée précédemment. Cependant, la mise en réserve lors de l'été n influe aussi sur la floraison de l'été $n+1$. Du débourrement à l'anthèse, les réserves sont en effet mobilisées et métabolisées et pourvoient les premières étapes du développement de la fleur. Des effeuillages et des égrappages ont donc été réalisés à la véraison afin de modifier la mise en réserve des ceps. Cette étude, contrairement aux précédentes, a été réalisée sur les 3 principaux cépages champenois (Chardonnay, Pinot Meunier et Pinot noir) pour connaître le comportement des cépages lorsqu'ils sont cultivés dans des régions différentes. Ces résultats seront présentés dans **l'article 6**.

Annals of Botany 95: 943–948, 2005

doi:10.1093/aob/mci108, available online at www.aob.oupjournals.org

Phenology of Flowering and Starch Accumulation in Grape (*Vitis vinifera* L.) Cuttings and Vines

G. LEBON¹, E. DUCHÊNE², O. BRUN³ and C. CLÉMENT^{1,*}

¹Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC UPRES EA 2069, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, F-51687 Reims Cedex 2, France, ²INRA de Colmar, Unité de Recherche Vigne et Vin, 28 rue Herrlisheim, BP 507, F-68021 Colmar, France and

³Mumm-Perrier-Jouet Vignobles et Recherches, F-51206 Epernay, France

Received: 8 September 2004 Returned for revision: 22 October 2004 Accepted: 20 January 2005 Published electronically: 4 March 2005

- **Background and Aims** A reliable protocol for flowering and fruiting in cuttings was developed with the aim of (a) studying inflorescence and flower development in grapevine cuttings and field plants, and (b) assisting haploid plant production.
- **Methods** Inflorescence and flower development was studied in 'Gewurztraminer' (GW) and 'Pinot Noir' (PN) grape vines and cuttings grown in a glasshouse, along with variations in starch in the flowers. As there is a strong relationship between flower development and starch, the starch content of reproductive structures was estimated.
- **Key Results** Inflorescence and flower development were similar in the vines and cuttings with consistent differences between the two cultivars. Indeed, the ontogenesis of male and female organs is not synchronous in GW and PN, with both female and male meiosis occurring earlier in PN than in GW. Moreover, changes of starch reserves were similar in the two plant types.
- **Conclusions** Cuttings have a similar reproductive physiology to vines, and can be used to study grape physiology and to develop haploid plants.

Key words: Cuttings, flowering, reproductive structures, starch, vines, *Vitis vinifera* L.

INTRODUCTION

The life cycle of higher plants varies greatly, depending on the species. In small herbaceous plants such as *Arabidopsis thaliana*, the cycle from seed to seed is 6 weeks, whereas woody plants with a long juvenile phase may not start flowering for several decades. Hence, most of the information on reproduction in plants is obtained from herbaceous models using *Arabidopsis thaliana* (Boss *et al.*, 2004; Jack, 2004), *Nicotiana tabacum* or similar species (Rieu *et al.*, 2003).

There is rich interest in the reproductive physiology of woody plants. For example, it has been shown that there is a strong relationship between flower development and carbohydrates (Rodrigo *et al.*, 2000; Jean and Lapointe, 2001; Ruiz *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2003). In particular, the concentration of starch in the ovule at specific steps of development is closely correlated to fertility. In *Prunus armeniaca*, secondary ovules that degenerate often display starch degradation in their tissues (Rodrigo and Herrero, 1998). Moreover, carbohydrate physiology in flowers is affected by environmental stresses such as drought (Lalonde *et al.*, 1997), chilling (Ebadi *et al.*, 1995) or heat (Young *et al.*, 2004), which lead to partial or total sterility.

In *Vitis vinifera* L., the pathways of inflorescence and flower development contrast with those for many other species in several aspects (Boss *et al.*, 2003), with stresses delaying or stopping reproductive development. For example, low temperatures near flowering affect ovule development and pollen tube growth (Ebadi *et al.*, 1995). These responses are mediated by perturbations in carbohydrate

physiology. Indeed, shading the leaves reduces photosynthesis and carbohydrate supply to the developing inflorescences, causing flower abscission and lower yields (Jackson, 1991). The reaction to stresses differs according to the genotypes (Gu *et al.*, 1996; Zapata *et al.*, 2004). 'Gewurztraminer' and 'Pinot Noir' have different rates of flower abscission, related to the sugar content in the inflorescence during flower development (Lebon *et al.*, 2004). Efforts to understand this behaviour would be improved by developing a reliable model of flowering and carbohydrate physiology.

Grapevine cuttings can flower when grown under controlled conditions (Mullins, 1966; Mullins and Rajasekaran, 1981), although the available protocols are complicated. Moreover, the correspondence between the development of inflorescences *in vitro* and in the vineyard is not well explained. The objective of this work was to provide a simple protocol for flowering in *in vitro* cuttings that mimic sexual reproduction in the field. The development of male and female tissues and the presence of starch within the flowers were followed during ontogenesis in cuttings and the response compared in vineyards. The study was performed in 'Gewurztraminer' and 'Pinot Noir', which differ in fertility and sensitivity to flower abscission (Lebon *et al.*, 2004).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Investigations were carried out on *Vitis vinifera* L. using the flower abscission-sensitive 'Gewurztraminer' (GW) and the non-sensitive 'Pinot Noir' (PN) varieties. Dormant cuttings,

* For correspondence. E-mail christophe.clement@univ-reims.fr

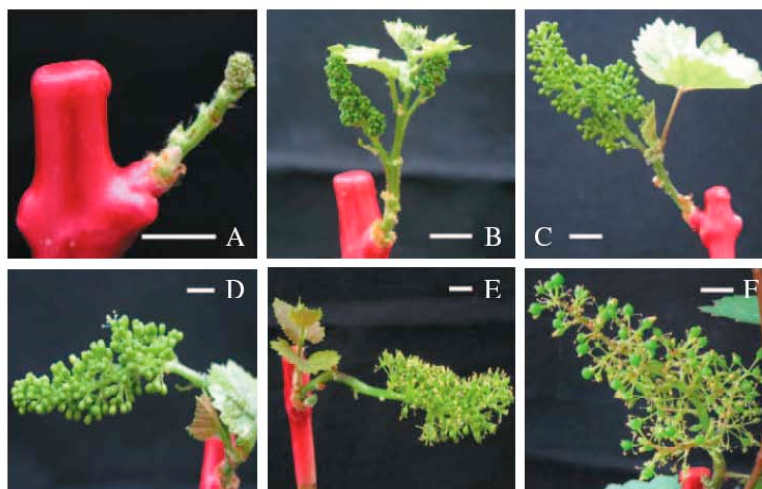


FIG. 1. Phenology of the 'Gewurztraminer' grape cuttings: (A) visible clusters (stage 12); (B) separated clusters (stage 15); (C) separated floral buds (stage 17); (D) flowering onset (stage 21); (E) end of flowering (stage 25); and (F) fruit set (stage 27). Scale bars = 1 cm.

which had been cane-pruned were collected from the INRA vineyard in Bergheim, France (Mullins and Rajasekaran, 1981).

Cuttings were collected at the proximal part of the cane and limited to three nodes, successively named N0 (the proximal), N1 and N2. A key point in the protocol is the sampling of the cane fragments generating the cuttings. The physiology of this fragment, in particular the amount of reserves in the wood, is important for obtaining predictable results. Harvesting fragments from any part of the annual cane provides cuttings with different sugar contents that vary in reproduction. Similarly, fragments from the distal part of the cane have low carbohydrate reserves and flower less (data not shown).

Cuttings were treated with cryptonol (2 % v/v) to prevent contamination, stored in the dark and forced for at least 2 weeks at 4 °C. After 16 h of hydration at 25–30 °C, N0 and N1 were removed and the proximal extremity of the cutting immersed in indole-3-butyric acid (IBA) at 1 g L⁻¹ for 30 s to promote rhizogenesis. This protocol was developed from Mullins (1966) and Mullins and Rajasekaran (1981) with IBA favouring rhizogenesis and thus eliminating the need for a 4-week pre-treatment in which the cuttings are warmed at the base. The IBA-treated cuttings developed within 1 week instead of 4 weeks.

Cuttings were planted in 0.5-L pots containing perlite : sand (1 : 1) and transferred to a greenhouse at 20/30 °C (night/day), with the pots placed on a 30 °C warming blanket. The photoperiod was 16 h using natural daylight or artificial 400 W 'Saudiclaude' lamps supplying 1000 µE m⁻² s⁻¹, and a relative humidity of 50 %. Each pot was watered daily with 100 mL of Coïc and Lesaint medium (Coïc and Lesaint, 1971). Leaves were removed until the first inflorescence appeared (each cuttings was limited to four leaves).

Inflorescences were collected from vineyard and glass-house cuttings (Eichhorn and Lorenz, 1977), from the

visible cluster (stage 12) up to fruit set (stage 27). Since meiosis occurs in these cultivars between stages 15 and 17 in vineyards (Lebon *et al.*, 2004), this period was subdivided (15 + 2 d and 15 + 8 d). Development was quicker in the cuttings and the intermediate stages were defined as 15 + 1 d and 15 + 3 d.

Each developmental stage occurred when at least half of the cuttings were at this stage. The numbers of flowers, berries and seeds per fruit were counted on each cutting (*n* = 10).

Microscopy

Samples were fixed in 2 % glutaraldehyde (v/v in a 0.1 M phosphate buffer) at pH 7.2 in 2 % sucrose (w/v) and 1 % Tween 20 (v/v) for 24 h and agitated at room temperature. After three rinses (5 min) in buffer, the flowers were post-fixed with 1 % osmium tetroxide (w/v) in the buffer without Tween 20 for 4 h. Flowers were then rinsed three times (5 min) in the buffer, dehydrated in an alcohol series, transferred to acetone, and embedded in Araldite.

For starch, 1 µm sections were collected on glass slides, bleached for 30 min with hydrogen peroxide (H₂O₂ 10 volumes), and the periodic acid Schiff (PAS) polysaccharide-specific reaction carried out according to Clément *et al.* (1994). Sections were plunged in 1 % periodic acid (w/v) for 4 h, in Schiff's reagent without rinsing for 16 h, and in 5 % sodium metabisulfite (w/v) for 20 min. Sections were rinsed in distilled water, air-dried, and mounted in Eukitt[®]. For each stage, ten flowers from five inflorescences were used, each inflorescence sampling from a different vine or cutting.

Statistical analysis

For the number of flowers, berries and seeds per fruit, ten inflorescences were used, each inflorescence sampling from a different vine or cutting. Statistical analyses were carried

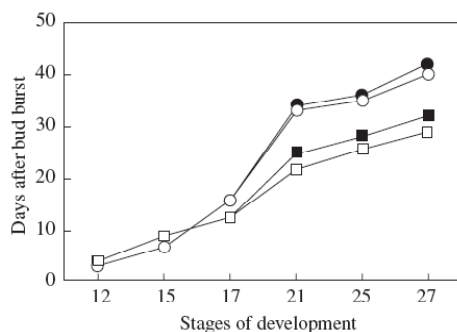


FIG. 2. Development of grape inflorescences in 'Gewurztraminer' (open symbols) and 'Pinot Noir' (closed symbols), in vines (circles) and cuttings (squares). Stage 12, visible clusters; stage 15, separated clusters; stage 17, separated floral buds; stage 21, early bloom (10% opened flowers); stage 25, late bloom (90% opened flowers); and stage 27, fruit set. Ten inflorescences were used, each inflorescence sampling from a different vine or cutting. Data are the mean of ten plants per treatment. The standard errors were smaller than the symbols, and therefore are not shown.

out using Student's *t*-test. A 5% probability was considered significant. For morphology and starch content, ten flowers from five different inflorescences per stage were sampled, each inflorescence sampling from a different vine or cutting; for these parameters, no statistical analysis was performed because observations from the ten flowers considered were similar.

RESULTS AND DISCUSSION

It is possible to mimic flowering and fruit set in the woody grapevine (*Vitis vinifera*) planted under controlled conditions. Both the male and female flowers were similar in the cuttings and field vines.

Phenology

Previous studies on cuttings of grapevine (Mullins, 1966; Mullins and Rajasekaran, 1981) and apple (Höfer and Lespinasse, 1996) were not focused on the ontogenesis of reproductive organs, although it is a key issue in models of flowering. The grapes could be distinguished at stage 15 (Fig. 1B), whereas each flower bud was separated at stage 17 (Fig. 1C). At least 10% and 90% of the flowers were opened, respectively, at stages 21 and 25 (Fig. 1D and E), and thereafter fruit set occurred (Fig. 1F). Development was similar in the two cultivars, and both in vineyards and cuttings (Fig. 2). However, development after stage 17 was more rapid in the field than in the glasshouse.

The PN cuttings had more flowers than the vines, whereas there were no differences in the two types of GW plants (Table 1). There were also no differences between the two cultivars within a plant type. In contrast, the GW plants had more berries than the PN plants, and a higher rate of fruit set. The number of seeds per berry was not affected by cultivar or plant type, with general means of 1.35 ± 0.49 and 1.79 ± 0.97 , respectively (Table 1). Final yield was

TABLE 1. Number of flowers, berries per bunch, seeds per berries, and fruit set in 'Gewurztraminer' (GW) and 'Pinot Noir' (PN) grapes

	PN	GW
No. of flowers		
Vine	206 ± 24^a	231 ± 32^a
Cutting	295 ± 28^b	255 ± 40^{ab}
No. of berries		
Vine	135 ± 20^c	188 ± 18^d
Cutting	162 ± 3^c	226 ± 38^d
Fruit set (%)		
Vine	65 ± 3^e	82 ± 6^f
Cutting	57 ± 6^e	94 ± 6^f
Number seeds per berry		
Vine	1.8 ± 0.8^g	1.6 ± 0.7^g
Cutting	1.4 ± 0.5^g	1.8 ± 1.0^g

For each stage, ten flowers from five inflorescences were used, each inflorescence sampling from a different vine or cutting.

Values are means of ten inflorescences $\pm$ s.e.

Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. Means for a considered parameter were not significantly different when followed by the same letter ($P \geq 0.05$).

TABLE 2. Reproductive stages according to the classification of Eichhorn and Lorenz (1977)

		Developmental stage					
		12	15	15 + 2 d 15 + 1 d	15 + 8 d 15 + 3 d	17	21
Male							
GW							
Vine	SC	mMC	T	m	Vm	MPG	
Cutting	SC	mMC	T	T	Vm	MPG	
PN							
Vine	SC	T	m	Vm	YPG	MPG	
Cutting	SC	T	m	m	YPG	MPG	
Female							
GW							
Vine	ST	ST	MMC	MMC	ESMC	ES	
Cutting	ST	ST	A	A	MMC	ES	
PN							
Vine	ST	A	MMC	ESMC	ES	ES	
Cutting	ST	A	MMC	MMC	ES	ES	

A, Archeospore; SC, sporogenous cells; m, microspores; mMC, microspore mother cell; MMC, macrospore mother cell; Vm, vacuolated microspores; MPG, mature pollen grain; ESMC, embryo sac mother cell; ES, embryo sac; ST, sporogenous tissue; T, tetrads; YES, young embryo sac; YPG, young pollen grain.

For vine and cutting, data are the means of ten flowers from five different inflorescences, and each inflorescence was sampled from a different vine or cutting. For each stage of development, the ten flowers considered show similar results.

similar in the cuttings and vineyard, with respect to number of flowers, number of fruits and seed set.

Development of reproductive organs

Inflorescences in the cuttings developed more rapidly than those from the vineyard plants, with a difference of 12 and 13 d in GW and PN, respectively (Fig. 2). The rate of flower development is dependent on temperature, with

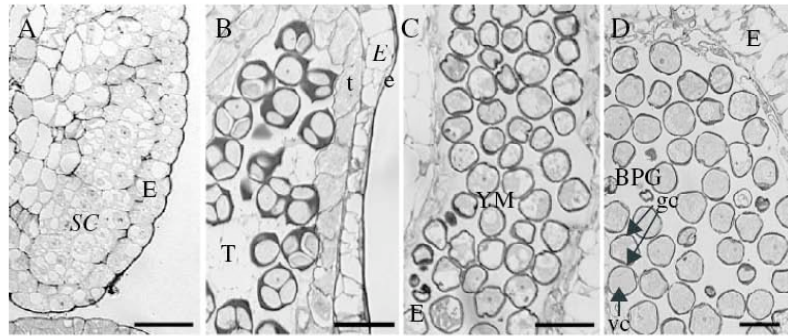


FIG. 3. Development of anthers in 'Gewurztraminer' (GW) cuttings: (A) stage 12, sporogenous cells; (B) stage 15 + 2 d, tetrads; (C) stage 15 + 8 d, young microspores; and (D) stage 17, bicellular pollen grains. BPG, Bicellular pollen grains; e, epidermis; E, endothecium; gc, generative cell; SC, sporogenous cells; t, tapetum; T, tetrads; vc, vegetative cell; Y.M, young microspores. Scale bars = 500 µm.

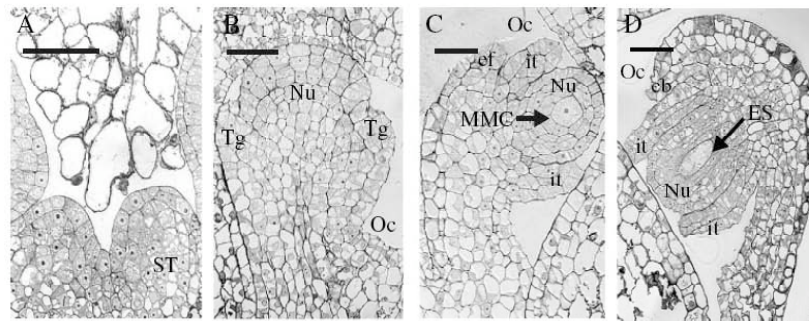


FIG. 4. Development of female flower parts in 'Gewurztraminer' cuttings: (A) stage 12, sporogenous tissue; (B) stage 15, archesporium; (C) stage 17, macrospore mother cell; and (D) stage 23, embryo sac. Arrows in C and D indicate starch grains. ES, Embryo sac; ef, external tegument; f, funicle; it, internal tegument; MMC, macrospore mother cell; Nu, nucellus; Oc, ovarian cavity; ST, sporogenous tissue; Tg, tegument. Scale bars = 250 µm.

extreme temperatures damaging these tissues (Ebadi *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2004). The vineyards are exposed to daily fluctuations of temperature, with relatively low temperatures in the night and early morning, whereas the cuttings were exposed to constant temperature ranging from 20–30 °C.

The chronology of pollen development was identical in the vines and cuttings (Table 2). In GW, stage 12 sporogenous cells (Fig. 3A) multiplied and gave rise to microspore mother cells at stage 15. Male meiosis occurred between stages 15 and 15 + 2 d (Fig. 3B) with microspores released from the tetrads at stage 15 + 8 d (Fig. 3C). Microspores vacuolated thereafter and pollen mitosis took place between stages 17 and 21 (Fig. 3D). At stage 21 (anthesis) mature pollen grains were released from the anthers. Pollen development occurred earlier in PN than in GW (Table 2). Meiosis was registered between stages 12 and 15, whereas pollen mitosis took place between stages 15 + 8 d and 17. These results indicate that cuttings grown under controlled conditions can be used to study pollen development in grape.

There was a slight delay in female meiosis in the cuttings compared with the vines (Table 2). In GW cuttings, within the sporogenous tissue (Fig. 4A) an archesporium developed at stage 15 + 1 d (Fig. 4B), which remained until stage

15 + 3 d. Stage 17 was characterized by the presence of the macrospore mother cell (Fig. 4C) and meiosis occurred thereafter. The embryo sac was formed at stage 21 (Fig. 4D). In the GW vines, the sporogenous tissue multiplied at early stages of development. The macrospore mother cell was seen from stage 15 + 2 d to stage 15 + 8 d. Between stages 15 + 8 d and 17 meiosis occurred, and the three micropylar macrospores degenerated, leading to a single macrospore generating the whole embryo sac at stage 17. At anthesis, the embryo sac contained eight cells and was ready for fertilization.

Female development was faster in PN than in GW (Table 2). In vines, the archesporium appeared at stage 15 and meiosis occurred between stages 15 + 2 d and 15 + 8 d. Afterwards, the embryo sac developed between stages 15 + 8 d and 21. In cuttings, meiosis was slightly delayed between stages 15 + 3 d and 17, but the other steps of development were similar to those in vines.

Location of starch in the anther and the ovule

Changes of starch reserves were similar in the two plant types. Starch was found in all the sporophytic tissues of the anther (epidermis, endothecium and tapetum) in the

TABLE 3. Presence (+) or absence (0) of starch in Gewürztraminer (GW) and Pinot Noir (PN) vines and cuttings

	Gewürztraminer (vine/cutting)						Pinot Noir (vine/cutting)					
	Developmental Stages						Developmental Stages					
	12	15	15 + 2 15 + 1	15 + 8 15 + 3	17	21	12	15	15 + 2 15 + 1	15 + 8 15 + 3	17	21
Male structures												
Epidermis	+/0	+/0	+/0	+/0	+/0		+/0	+/0	+/0	+/0	+/0	
Endothecium	+/0	+/0	+/0	+/0	+/0		0/0	+/0	+/0	+/+	+/+	
Tapetum	+/0	+/0	+/0	+/0	+/0		+/0	+/0	+/0	+/0	+/0	
Pollen	0/0	+/0	+/0	0/0	+/0		+/0	+/0	+/0	+/0	+/0	
Female structures												
Ovary	0/0	0/0	+/0	+/0	+/+	+/+	+/0	+/0	+/0	+/+	+/+	+/+
Nucellus	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	+/0	0/0	0/0
Tegument	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	+/0	0/0	0/0
Embryo sac						0/0					0/0	0/0

For vine and cutting, ten flowers from five different inflorescences were analysed to study the presence of starch, and each inflorescence was sampled from a different vine or cutting. For each stage of development, the ten flowers considered show similar results for starch content. Structures are scored a '+' if the ten inflorescences had starch, and a '0' if the ten inflorescences had no starch.

vines (Table 3). In the gametophytic tissue, starch could be seen in PN microspores at all stages, but not at stages 12 and 15 + 8 d in GW (Table 3). Later on, amylogenesis/amyolysis occurred in the young pollen grains. In the cuttings, starch grains were not detected in sporophytic tissues, except in the endothecium at stages 15 + 3 d and 17 in PN, and only in stage 17 in GW (Table 3). No starch was detected in the gametophytic tissue (Table 3). The anther sporophytic tissues influence the concentrations of sugars in the anther by storing/mobilizing starch and regulate the volume of sugar reaching the pollen grain during development (Clément and Audran, 1995). The difference reported here between vines and cuttings may correspond, in terms of starch in the anther sporophytic tissues, to such buffering action of the sporophytic tissues and obviously does interfere with pollen development.

In the ovules of the vines, concentrations of starch were low except at stage 15 + 8 d in the teguments and nucellus of the PN ovules (not in GW) (Table 3). Nevertheless, amylaceous reserves were detected in ovaries of both cultivars from stage 12 and 15 + 2 d in PN and GW, respectively, to anthesis. In contrast, starch was not detected in the nucellus and teguments of the cuttings during flower development, except at stage 15 + 3 d for PN (Table 3), same as in the vines. In the cuttings, starch accumulation in the ovaries was delayed until stage 17 in GW and stage 15 + 3 d in PN. In grapevine (Lebon *et al.*, 2004), as in other fruit trees (Rodrigo and Herrero, 1998; Rodrigo *et al.*, 2000), the presence or absence of starch in the ovule at meiosis has a key influence on fertilization and fruit set. In the cuttings and vines, the variations in concentrations of starch in the inflorescences and ovules were similar.

There were differences in reproduction between GW and PN grown in the vineyard; GW exhibits faster inflorescence development (Fig. 2), more flowers per inflorescence (Table 1), but a lower flower abscission rate, percentage of fruit set and fewer seeds per fruit (Table 1). Moreover, starch has a greater incidence in PN ovules (Lebon *et al.*, 2004). These differences were also detected in the cuttings

grown under the conditions described here, further showing that the protocol used is reliable.

In grapevine, uncommitted primordium in the latent bud developed into inflorescence primordium and a potential fully developed inflorescence next spring, depending on environmental conditions (Boss *et al.*, 2002). Rapid shoot growth can produce tendrils rather than inflorescences. Further development of the flowers is influenced by variety and environment (Boss *et al.*, 2003). Flower abscission is poorly described in grapevine but can dramatically diminish the yield (Huglin and Schneider, 1998). The supply of carbohydrates to the flower is a key factor in abscission (Gu *et al.*, 1996). A model of flower development in woody species should assist efforts to understand physiological traits that favour inflorescence initiation and flower development.

Cuttings can be used to develop doubled haploid grapevines. Until recently, attempts to obtain *in vitro* microspore embryogenesis from field plants generally resulted in diploid callus from the sporophytic tissues of the anther (Mauro *et al.*, 1986). In apple, the success of microspore embryogenesis is dependent on the donor material. Anthers collected from the field did not produce haploid embryos (Höfer and Lepinasse, 1996), whereas those from cuttings gave doubled haploids (Höfer *et al.*, 1999; Höfer, 2004).

LITERATURE CITED

- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean D. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16: S18–S31.
- Boss PK, Buckeridge EJ, Poole A, Thomas MR. 2003. New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* 30: 593–606.
- Boss PK, Sensi E, Hua C, Davies C, Thomas MR. 2002. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* 162: 887–895.
- Clément C, Audran JC. 1995. Anther wall layers control pollen sugar nutrition in *Lilium*. *Protoplasma* 187: 172–181.
- Clément C, Chavant L, Burrus M, Audran JC. 1994. Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. *Sexual Plant Reproduction* 7: 347–356.

- Coïc F, Lesaint L. 1971. Comment assurer une bonne nutrition en eau et en ions minéraux en horticulture. *Horticulture Française* 8: 11–14.
- Ebadî A, May P, Sedgley M, Coombe BG. 1995. Effect of low temperature near flowering time on ovule development and pollen tube growth in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), cvs Chardonnay and Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 11–18.
- Eichhorn KW, Lorenz DH. 1977. Phäenologische Entwicklungsstadien. Der rebe. Nachrichtenb. *Deutsch Pflanzenschutz (Braunschweig)* 29: 119–120.
- Gu S, Lombard P, Price S. 1996. Effect of shading and nitrogen source on growth, tissue ammonium and nitrate status and inflorescence necrosis in Pinot noir grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 173–180.
- Höfer M. 2004. *In vitro* androgenesis in apple—involvement of the induction phase. *Plant Cell Reports* 22: 365–370.
- Höfer M, Lespinasse Y. 1996. Haploidy in apple. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE, eds. *In vitro haploid production in higher plants*, Vol. 3. Dordrecht: Kluwer, 259–274.
- Höfer M, Touraev A, Heberle-Bors E. 1999. Induction of embryogenesis from isolated microspores. *Plant Cell Reports* 18: 1012–1017.
- Huglin P, Schneider C. 1998. *Biologie et écologie de la vigne*. Paris: Tech and Doc, Lavoisier eds.
- Iglesias DJ, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M. 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiology* 23: 199–204.
- Jack T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16: S1–S17.
- Jackson DL. 1991. Environmental and hormonal effects on development of early bunch stem necrosis. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 290–294.
- Jean D, Lapointe L. 2001. Limited carbohydrate availability as a potential cause of fruit abortion in *Rubus chamaemorus*. *Physiologia Plantarum* 112: 379–387.
- Lalonde S, Beebe DU, Saini HS. 1997. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sexual Plant Reproduction* 10: 40–48.
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C. 2004. Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* 17: 71–79.
- Mauro MC, Nef C, Fallot J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Reports* 5: 377–380.
- Mullins MG. 1966. Test plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature* 209: 419–420.
- Mullins MG, Rajasekaran K. 1981. Fruiting cuttings: revised method for producing test-plants of grapevine cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* 32: 35–40.
- Rieu I, Wolters-Arts M, Derksen J, Mariani C, Weterings K. 2003. Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. *Planta* 217: 131–137.
- Rodrigo J, Herrero M. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction* 11: 86–93.
- Rodrigo J, Hormaza JJ, Herrero M. 2000. Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum* 108: 35–41.
- Ruiz R, Garcia-Luis A, Honerri C, Guardiola JL. 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in Citrus. *Annals of Botany* 87: 805–812.
- Young IW, Wilen RW, Bonham-Smith PC. 2004. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany* 55: 485–495.
- Zapata C, Déléens E, Chaillou S, Magné C. 2004. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* 161: 1031–1040.

Les travaux présentés dans cet article récapitulent les données obtenues avec le modèle bouture fructifère.

Tout d'abord, le protocole optimisé dans cet article permet l'obtention plus rapide de boutures fructifères. En effet, dans les protocoles plus anciens, les sarments sont placés dans une chambre froide et le nœud N0 à la chaleur : cette disposition permet la mise en place des racines peu après le débourrement (Mullins 1966 ; Mullins et Rajasekaran 1981 ; Gény 1997 ; Ollat *et al.* 1998 ; Collin 2000). Dans notre protocole, la rhizogénèse est induite par l'application d'AIB sur le nœud N0, d'où un gain de temps d'un mois environ sur les autres protocoles (Lebon *et al.* 2005c).

De plus, les paramètres de floraison présentés dans l'article montrent que le nombre de fleurs par inflorescence, le nombre de baies par grappe, le taux de nouaison et le nombre de pépins par baie sont identiques au vignoble et dans les inflorescences de bouture fructifère. En effet, les différences observées au vignoble entre le GW et le PN sont aussi obtenues avec les boutures fructifères. Néanmoins, les inflorescences de PN possèdent statistiquement plus de fleurs par inflorescence quand elles sont issues de bouture que lorsqu'elles proviennent du vignoble. Le modèle bouture fructifère est donc un modèle fiable pour ces paramètres.

Ensuite, le développement des structures reproductrices des boutures fructifères est identique à celui observé au vignoble. En effet, le développement des structures mâles et femelles des fleurs de PN est plus précoce que celui des structures de GW. Cette précocité était aussi observée chez les deux cépages au vignoble (Lebon *et al.* 2004). Le modèle bouture fructifère est donc valide pour ce critère.

Enfin, la présence d'amidon dans les ovules lors de la méiose est un facteur clé d'une fécondation et d'une nouaison normales (Herrero et Hormaza 1996 ; Rodrigo et Herrero 1998 ; Rodrigo *et al.* 2000). La présence d'amidon dans les ovules de boutures fructifères est différente entre les deux cépages. L'amidon n'est visible dans les ovules de GW qu'à partir du stade 17 et à partir du stade 15+8 jours dans celles de PN. De plus, le stade d'apparition de l'amidon dans les ovules est plus précoce au vignoble que sur les boutures fructifères. Enfin, la présence d'amidon dans les ovules est plus précoce chez le PN que chez le GW. La présence d'amidon dans les ovules de bouture fructifère ne mime donc pas celle des ovules au vignoble.

Le modèle bouture fructifère est donc un modèle fiable pour l'étude du développement des structures reproductrices. En effet, le développement des structures femelles et mâles des fleurs de bouture fructifère est identique à celui des fleurs du vignoble. Le développement des structures reproductrices n'est qu'un des paramètres montrant la fiabilité du modèle par rapport au vignoble. En effet, les teneurs en glucides (amidon, saccharose, glucose et fructose) dans les différents organes des boutures fructifères, dont les inflorescences, doivent être identiques à celles observées au vignoble (Lebon *et al.* 2004) afin de justifier la validité du modèle. De plus, durant le développement floral, ces teneurs doivent présenter la même évolution dans les inflorescences de bouture fructifère et dans celles du vignoble. Le dosage et l'analyse des teneurs en glucides dans les différents organes (feuilles, inflorescences et racines) de la bouture doivent donc être entrepris tout au long du développement de l'inflorescence.

Publication soumise

Source/sink relations in fruiting cuttings of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during the inflorescence development

Gaël Lebon and Christophe Clément*

Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC UPRES EA, 2069, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Correspondance

*Corresponding author,

e-mail: christophe.clement@univ-reims.fr

In crops, flower and fruit abscission induce significant yield loss. Dependant on the sink strength of each organ, carbohydrate supply to reproductive structures is a putative physiological cause of this phenomenon. In the present work, the effect of defoliation, as an agent of source/sink modifications, was studied in grapevine (*Vitis vinifera* L.) using fruiting cuttings. In control cuttings only four leaves were allowed to develop. In order to modify artificially source/sink interactions, another set of cuttings was systematically defoliated (OL) whereas the last set was characterized by the free development of all the leaves (AL). The results show that developing leaves have a growth-depressing effect on inflorescences and roots, showing their stronger sink strength. Besides, OL and AL treatments modify carbohydrate concentrations in all organs of both cvs., especially in inflorescences at crucial steps of male and female organ formation (meiosis). However the variations did not follow the same pathway in each cv., likely due to different carbohydrate metabolism. Whatever, carbohydrate levels in cuttings inflorescences were different than those of vineyard inflorescences.

Introduction

In crops, many environmental conditions and internal mechanisms provoke flower or fruit abscission, leading to important loss of yield (Stopar 1998, Liu et al. 2004). Various putative events may be involved such as nutritional disorders. In this context carbohydrate starvation in the ovary appeared as a key point in the achievement of a functional ovule (Merjanian and Ravaz 1930, Keller and Koblet 1994, 1995, Caspari et al. 1998). In perennial plants insufficient nutrient supply of the flower causing flower and fruit abscission may also be due either to low CO₂ assimilation or to lack of reserves, especially starch (Wardlaw 1990, Rodrigo et al. 2000, Jean and Lapointe 2001). Besides, vegetative and

reproductive organs are often competing for the same resources provided by photosynthesis and reserve mobilisation (Wardlaw 1990), meaning that flower and fruit abscission could result from this competition. Indeed, growing inflorescences are not the major sink organs during their development (Ho 1988) because growing roots, leaves and stems attract more efficiently nutrients than inflorescences.

In grapevine (*Vitis vinifera* L.), flower and fruitlet drop so-called 'coulure' is the major cause of yield reduction in several areas (Huglin and Schneider 1998). Each grape cultivar (cv.) exhibits particular coulure sensitivity, meaning that a certain amount of flowers will abort whatever the environmental conditions. For example, the Gewurztraminer (GW) is

Abbreviations : cvs., cultivars; GW, Gewurztraminer; PN, Pinot noir.

highly sensitive, whereas the Pinot noir (PN) is less sensitive to coulure (Huglin and Schneider 1998). It has been demonstrated that this differential sensitivity is correlated to various amounts of sugars in the flowers during development (Lebon et al. 2004), suggesting that peculiar source/sink interactions in each cv. may contribute to their differential sensitivity to coulure. After winter dormancy, the inflorescence development that was initiated and arrested at early stages the previous year is newly stimulated in early spring, synchronously with young roots, annual stems and leaves (Srinivasan and Mullins 1981, Mullins et al. 1992, Boss et al. 2003). At this moment, leaf photosynthesis is not efficient since the leaves are not yet functional. Nutrients are thus exclusively provided by reserves stored in perennial woods, until the leaves reach half of their final size (Alleweldt et al. 1982, Petrie et al. 2000). The transition between the heterotrophic (reserve mobilisation) and the autotrophic (photosynthesis in the leaf) phase usually occurs during flowering, but at different steps of the reproductive effort depending on cvs. (Zapata et al. 2004a, b). This means that young vegetative organs compete with growing inflorescences for reserves, which may interfere with flower development. Indeed, the ontogenesis of both ovules and anthers is closely correlated with sugar at key steps of the reproductive cell formation (Lebon et al. 2004). In PN, starch is present in the ovule at female meiosis but not in GW, which may contribute to lower coulure sensitivity of the former cv. under stressing environmental conditions.

In vineyard, the experimental approach of source/sink interaction up to flowering is constraining mainly because 1/ flowering occurs only once a year, 2/ it is difficult to collect all the organs for assessments, i.e. the roots can reach up to 10 m underground (Mullins et al. 1992) and 3/ impacts of experimental source/sink perturbations on the quality of flowering can be measured only the year after. In this context, the fruiting cutting model is of interest because experimental design can be performed all the year (Mullins 1966, Mullins and Rajasekaran 1981, Lebon et al. 2005b). Moreover, this model mimics most of the parameters related to reproduction such as the flower, the berry or the seed sets (Lebon et al. 2005b).

In order to further understand the source/sink interactions in grapevine (*Vitis vinifera* L.) during the development of inflorescences, fruiting cuttings were used under various experimental conditions of defoliation. The growth speed, as well as the sugar content in all the cutting organs were followed along inflorescence development and correlated to the success of the reproduction. The experiments were

performed in the GW and the PN cultivars owing to their differential sensitivity to coulure.

Materials and methods

Plant Material

Investigations were carried out using the flower abscission sensitive GW and the non-sensitive PN. Dormant cuttings were obtained from canes collected from the INRA vineyard in Bergheim, France (Mullins and Rajasekaran 1981, Lebon et al. 2005b).

Cuttings were collected at the proximal part of the cane and limited to 3 nodes, successively named N0 (proximal), N1 and N2. A key point in the protocol is the sampling of the cane fragments generating the cuttings. The physiology of this fragment, in particular the amount of reserves in the wood is important for obtaining predictable results (Lebon et al. 2005b). Cuttings were treated with cryptonol (2% v/v) to prevent contamination, stored in the dark and forced for at least 2 weeks at 4°C. After 16 h of hydration at 25°-30°C, N0 and N1 were removed and the proximal extremity of the cutting was immersed in indole-3-butyric acid (IBA) at 1 g l⁻¹ for 30 s to promote rhizogenesis. This protocol was developed from Mullins (1966) and Mullins and Rajasekaran (1981) and optimized by Lebon et al. (2005b). Cuttings were then planted in 0.5 l pots of perlite:sand (1:1), and transferred to a greenhouse at 20°-30°C (night/day), with the pots placed on a 30°C warming blanket. The photoperiod was 16 h using natural daylight or artificial 400 W "SAUDICLAUDE" lamps supplying 1,000 µE m⁻² s⁻¹ and a relative humidity of 50%. Each pot was watered daily with 100 ml of Coïc and Lesaint (1971) medium.

Source/sink treatments

Treatments were carried out until the first inflorescence appeared and aimed at perturbing the source/sink interaction during the flower development. The 4 leaves (4L) treatment was considered as the control according to the results optimisation of the protocol (Lebon et al. 2005b). For this treatment, the four first leaves appearing after the inflorescences developed and the following ones were removed, explaining the absence of leaves at stage 12. In the no leaf (0L) treatment, plants were totally defoliated, so that the inflorescence is the sole sink for cane reserves. In the all leaf (AL) cuttings, all the leaves and vegetative stems were allowed to develop in order to understand the competition between the vegetative and the reproductive aerial organs.

Dry weight

Inflorescences were collected, from the visible cluster (stage 12) up to the fruit set (stage 27) (Eichhorn and Lorenz 1977). Since meiosis in these cultivars occurs between stages 15 and 17 (Lebon et al. 2005b), this period was subdivided (15+1 day and 15+3 days). At

each stage, all the inflorescences, leaves and roots were sampled, frozen in liquid N₂, and stored at -80°C until the determination of sugars. Dry weight (DW) of inflorescences was estimated after freeze-drying for 72 h with a CS5L device (Serail Lyophilisateur®).

Carbohydrate analysis

Extraction. Inflorescences, roots and leaves were lyophilized 72 h at -80°C with a CS5L device (Serail Lyophilisateur®), and ground in a mortar with Fontainebleau sand and 10 volumes of ethanol 80°. Sugars were then extracted for 15 min at 84°C under continual agitation. After adjusting the volume to 5 ml with distilled water, the extract was centrifuged at 4°C for 10 min at 11 000 g. The supernatant was used for soluble sugar determination. For starch, the pellet was suspended in a mixture containing dimethylsulfoxide:hydrochloric acid 8 N (8:2) and starch was dissolved during 30 min at 60°C under continual agitation. After cooling, the extract was centrifuged at 20°C for 10 min at 13 000 g and the supernatant was kept at -80°C until use.

Sucrose, glucose and fructose assay (Bergmeyer 1974). Sucrose, glucose and fructose were assayed because they are the major sugars in grapevine (Glad et al. 1992). D-glucose was phosphorylated and oxidized in the presence of NADP to gluconate-6-phosphate and NADPH, H⁺. The amount of NADPH, H⁺ formed was determined by means of its absorbance at 340 nm. Fructose was phosphorylated to fructose-6-phosphate by a hexokinase in the presence of ATP. Fructose-6-phosphate was then converted to glucose-6-phosphate by a phosphoglucose isomerase. Glucose-6-phosphate formed was tested as described above and a blank was performed without phosphoglucose isomerase. Sucrose was hydrolyzed to D-glucose and D-fructose in the presence of a β -fructosidase. D-glucose formed was then determined as described above and compared with a blank without β -fructosidase.

Starch assay. Aliquots of 100 ml of the extract were used to determine starch concentration. The aliquot was mixed with 100 ml of Lugol iodine solution (0.03% I₂ and 0.06% KI in diluted 0.05 N HCl). After 15 min, the absorbance was read spectrophotometrically at 600 nm.

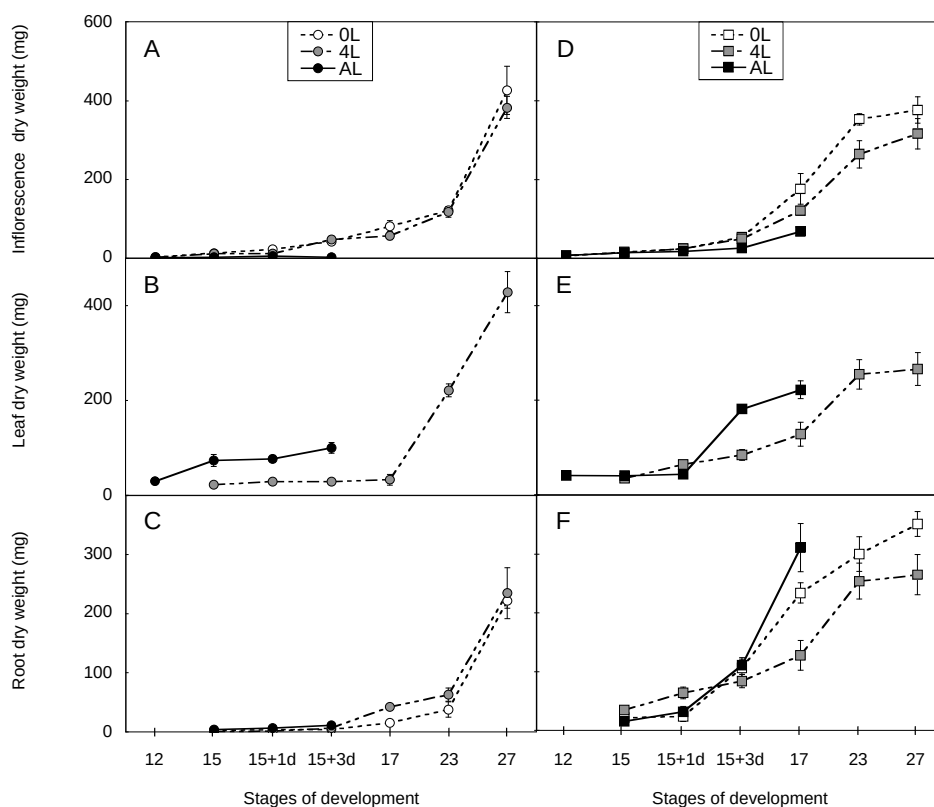


Fig. 1. Dry weight variations in different organs of GW (A, B, C) and PN (D, E, F) fruiting cuttings during their development: (A-D) inflorescences; (B-E) leaves and (C-F) roots. Measures are stopped when plants are AL-treated due to inflorescence necrosis. Values are means ($n = 5$) $\pm$ SE.

A blank was performed with the starch solvent (DMSO:HCl, 8:2) instead of the extract.

Statistical analysis

At least five assays were performed for each stage of flower development, and three independent readings were carried out for each extract. For carbohydrate determination, results are expressed in % dry weight $\pm$ SE. Statistical analyses were carried out using a Student's *t* test. A 2% probability was considered significant.

Results

In the control (4L) and OL cuttings, the dry weight of inflorescences followed the same pathway in both cvs. (Fig. 1A, D). It was characterized by an exponential increase from stage 15+3d up to fruit set (stage 27). In AL treated cuttings, the inflorescences exhibited a significantly weaker growth. Later on, in both cvs., the AL treatment induced necrosis of the inflorescence, precisely at stages 15+3d in GW and 17 in PN inflorescences (Fig. 1A, D).

Leaves appeared on cuttings at different moments depending on the treatment. In AL cuttings, leaves appeared at stage 12 whereas they emerged only at

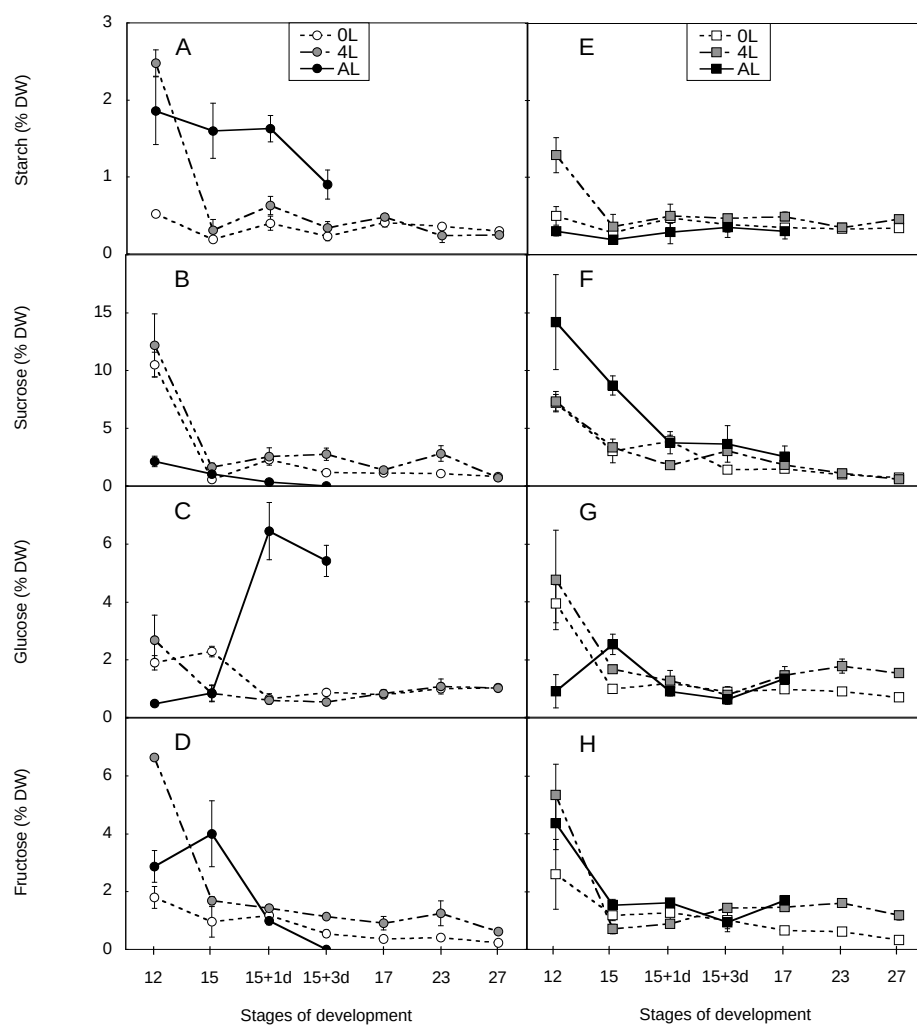


Fig. 2. Changes in some carbohydrate levels in inflorescences of GW (A, B, C, D) and PN (E, F, G, H) fruiting cuttings during their development: (A-E) starch; (B-F) sucrose; (C-G) glucose and (D-H) fructose. Measures are stopped when plants are AL-treated due to inflorescence necrosis. Values are means ($n = 5$) $\pm$ SE.

stage 15 in 4L-treated plants (Fig. 1B, E). At stage 15+3 days, AL cuttings leaves of GW and PN respectively weighted 3.4-fold and 2.2-fold more than 4L ones. Considering the three treatments, roots appeared on the fruiting cutting from stage 15 in both cvs. (Fig.1C, F). In GW root development was synchronous in the three treatments, whereas in PN, root growth was significantly favoured in AL and OL cuttings when compared to 4L ones.

Carbohydrate contents

Inflorescences. In GW inflorescences of 4L cuttings starch concentrations decreased from 2.48 ± 0.17 to

$0.31 \pm 0.14\%$ DW from stage 12 to stage 15 and remained statistically constant during the end of flower development (Fig. 2A). In AL cuttings the inflorescence exhibited the highest amount of starch that was stable from stage 12 until stage 15+1d. Afterwards, it decreased dramatically to $0.9 \pm 0.19\%$ DW at stage 15+3d (Fig. 2A) and the inflorescence thus degenerated. In 4L and OL cuttings, the inflorescences had the same starch concentration from stage 15 up to fruit set. In these cuttings, soluble carbohydrate concentrations followed the same variations (Fig. 2B, C, D), though sucrose and fructose concentrations were higher in 4L treated cuttings. In the inflorescences of AL cuttings, sucrose concentration was lower than in other

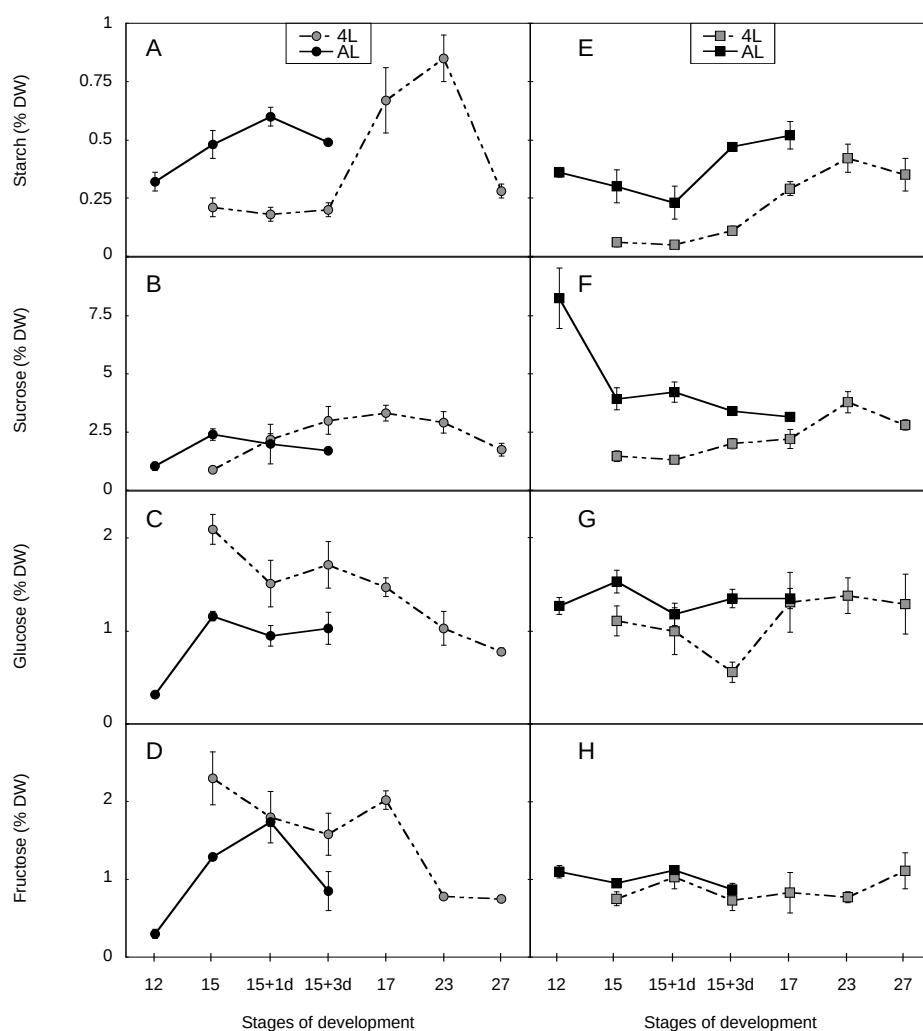


Fig. 3. Changes in some carbohydrate levels in leaves of GW (A, B, C, D) and PN (E, F, G, H) fruiting cuttings during their development: (A-E) starch; (B-F) sucrose; (C-G) glucose and (D-H) fructose. Measures are stopped when plants are AL-treated due to inflorescence necrosis. Values are means ($n = 5$) $\pm$ SE.

treatments, whereas glucose concentration was higher at stages 15+1d and 15+3d and fructose at stage 15 (Fig. 2B, C).

Whatever the treatment, starch variations in the inflorescences of PN had the same profile and fluctuated between 0.19 ± 0.03 and $0.5 \pm 0.15\%$ DW, except in 4L-treated inflorescences at stage 12 (Fig. 2E). Similarly, fluctuations of sucrose concentrations were similar whatever the treatment (Fig. 2F): after a significant decrease from stage 12 to stage 15+1d, sucrose concentration slowly dropped down and

reached very low values at fruit set (stage 27). The three treatments induced the same pattern in glucose and fructose variations in inflorescences with a decrease from the stages 12 to 15, except for the glucose in inflorescences of AL cuttings at stage 12 (Fig. 2G, H). Thereafter, hexose levels in inflorescences of 4L and AL cuttings were constant around 1% DW until fruit set although it decreased regularly down to $0.33 \pm 0.01\%$ DW in OL cuttings. Moreover, hexoses were significantly more abundant in inflorescences of 4L- than in those of OL- cuttings.

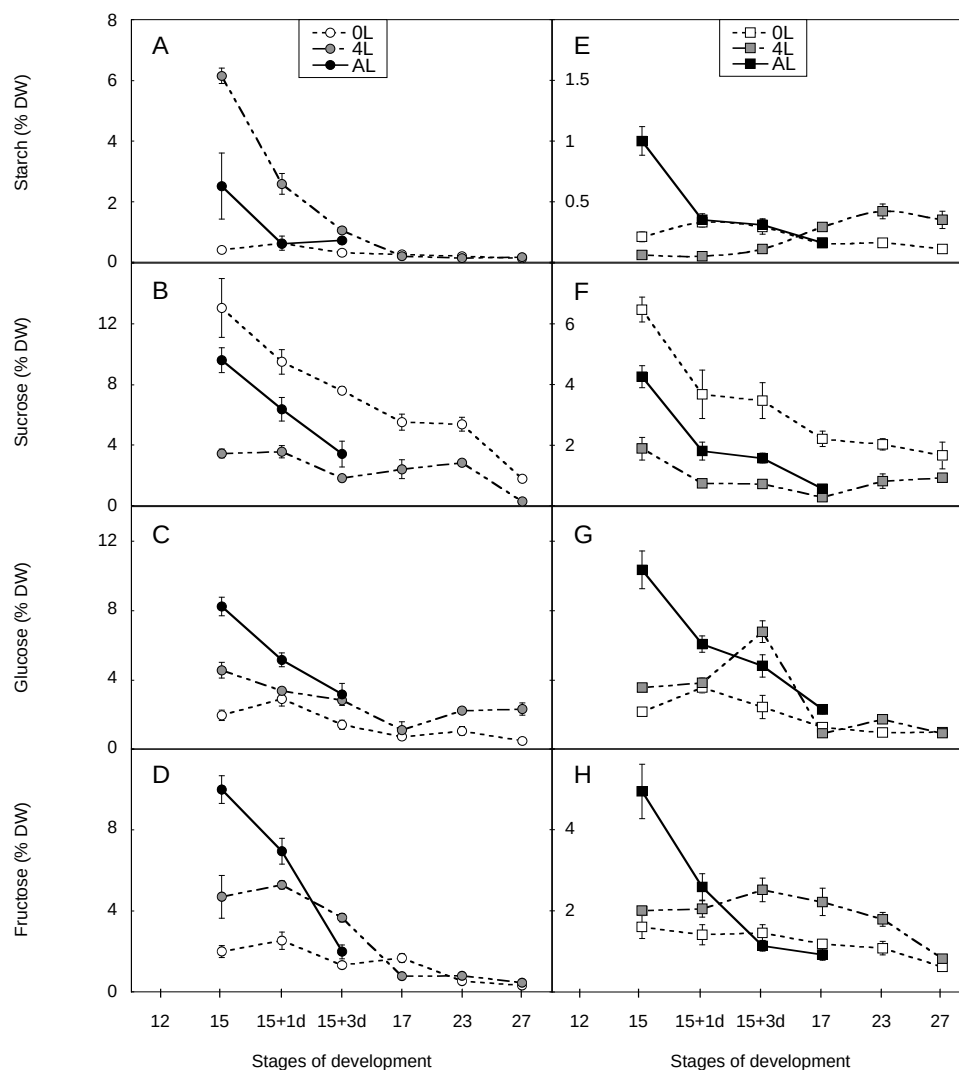


Fig. 4. Changes in some carbohydrate levels in roots of GW (A, B, C, D) and PN (E, F, G, H) fruiting cuttings during their development: (A-E) starch; (B-F) sucrose; (C-G) glucose and (D-H) fructose. Measures are stopped when plants are AL-treated due to inflorescence necrosis. Values are means ($n = 5$) $\pm$ SE.

Leaves. Considering leaves, no results were obtained in the OL treatment since leaves were systematically removed. The AL treatment induced higher starch levels in GW leaves than the 4L treatment (Fig. 3A). However, in this cv. sucrose concentrated in leaves of 4L cuttings after the stage 15+1d (Fig. 3B), as well as glucose and fructose (Fig. 3C, D). In PN, the AL treatment generated a higher accumulation of carbohydrates (at least starch, sucrose and glucose) when compared to the 4L treatment (Fig. 3E, F, G, H). **Roots.** In the roots of cuttings, carbohydrate concentrations decreased from stage 15 to stage 27 whatever the treatment and the cultivar (Fig. 4). In roots of 4L GW cuttings, starch level decreased rapidly from stages 15 to 17, and thereafter remained constant at 0.15% DW (Fig. 4A). In the OL cuttings starch concentration in roots is constant during the whole of floral development (Fig. 4A). Regarding sucrose, the OL treatment induced the highest concentrations, whereas the 4L treatment mostly reduced the sucrose level during the whole inflorescence development (Fig. 4B). Considering glucose, roots of OL cuttings exhibited the lowest glucose concentration from stage 15 to stage 27 (Fig. 4C). In the meantime, roots of 4L and AL cuttings accumulated glucose respectively from 1.5- to 4.8-fold and from 1.8- to 4.2-fold more than the roots of OL cuttings. Fructose content in roots of AL cuttings dropped rapidly between stages 15 and 15+3d from 10 ± 0.68 to $1.98 \pm 0.35\%$ DW (Fig. 4D). OL and 4L treatments provoked a slight fructose decrease to reach 0.35 ± 0.06 and $0.45 \pm 0.03\%$ DW, respectively.

All the treatments provoked similar responses in the PN cuttings. In roots of 4L cuttings, starch level increased from stages 15 to 23 (from 0.06 ± 0.02 to $0.42 \pm 0.06\%$ DW), and remained constant until fruit set (Fig. 4E). The profile of starch levels in roots of AL and OL cuttings was opposite. Indeed, in roots of OL cuttings starch contents decreased slowly along inflorescence development. In roots of AL cuttings, starch content decreased by 2.9 between stages 15 and 15+1d, and thereafter had the same values than roots of OL cuttings. As in GW roots, the OL treatment induced the highest sucrose concentration and the 4L-one the lowest one (Fig. 4F). In the case of glucose, the AL treatment induced a constant decrease of glucose concentrations in roots from stage 15 to 17 (Fig. 4G), whereas the two other treatments provoked globally the same pattern in glucose levels. Finally, the AL treatment induced a 5.4-fold decrease of fructose levels in roots from stage 15 to 17 to reach $0.92 \pm 0.14\%$ DW (Fig. 4H). Although the fluctuation of fructose content in roots was similar in OL and 4L cuttings, levels of fructose were significantly higher in roots of 4L cuttings.

Discussion

In fruiting cuttings of grapevine, there is a

competition between the vegetative and the reproductive organs for the carbohydrates that can be mobilised from the woody perennial tissues of the plant. In this artificial model, the vegetative stems, leaves and roots are stronger sinks than the inflorescences which are deprived of sugars and thus degenerate when vegetative stem growth is not experimentally limited.

In both cultivars, during the first stages of flower development, leaves and stems have a growth-depressing effect on inflorescences and induce carbohydrate retention of these organs as observed previously (Mullins 1967, 1968, Mullins and Rajasekaran 1981). As in other species, grapevine stems, inflorescences and roots compete for nutrient supply. In spring during bud burst, CO₂ assimilation in the leaves is not sufficient to allow their development explaining that leaves represent a strong sink for photoassimilates rather than a source (Wardlaw 1990, Jean and Lapointe 2001). In the meantime, emerging inflorescences have a limited ability to attract photoassimilates when compared to stem development (Mullins et al. 1992). In our study, the sink strength of the stem in the AL cuttings is revealed by the simultaneous growth of leaves and the low growth followed by the necrosis of inflorescences. This may be explained by the continuous need of sugar by developing new leaves in the AL cuttings, whereas in the 4L ones, the stem growth and the subsequent carbohydrates request is limited by the removal of any new leaf or shoot meristems. Moreover, the constant decrease of root carbohydrate levels at the benefit of leaves exhibiting constant or increasing sugar contents further illustrates this phenomenon. Indeed, as in tomato, the relative sink strength of leaf and shoot apex is higher than the root one (Shishido et al. 1999).

The various treatments modify carbohydrate contents of vegetative (leaf and roots) and reproductive (inflorescences) organs in both cvs. In both GW and PN, the content of sugars in the inflorescence globally increased (especially fructose) following the 4L-treatment, whereas in the inflorescence of the OL cuttings, the carbohydrate level is not influenced. In papaya, a 60% defoliation induces the decrease of fruit carbohydrate contents (Zhou et al. 2000). Moreover, the enzymes involved in carbohydrate metabolism are known to have differential activities in the inflorescences of the both cvs. (Lebon et al. submitted), explaining that sugars are accumulated in different forms.

In both tested cvs. carbohydrates accumulate in the leaves of AL cuttings when compared to 4L ones, mainly soluble carbohydrates in PN and starch in GW. This accumulation of sugars in leaves is in contradiction with previous results obtained in cherry (Layne and Flore 1993): 75% defoliation provokes an increase of leaf sucrose and starch due to a stimulation of CO₂ assimilation. The accumulation of sugar may thus be the consequence of a higher CO₂ assimilation or/and a stronger reserve mobilisation.

In cutting roots of both cvs., the OL treatment modifies carbohydrate levels, as revealed by an increase of sucrose content and a synchronous decrease of glucose and fructose contents. These modifications are

due to the major source status of roots (Loescher et al. 1990, Bates et al. 2002, Zapata et al. 2002a), and to their minor sink importance (Candolfi-Vasconcelos et al. 1994, Shishido et al. 1999). The source status of roots implies that they intensely synthesize sucrose, which is the major form of carbohydrate transport. Thus, the variations of sucrose levels are the consequence of some carbohydrate metabolism related enzymes, such as the reduction of invertase and the increase of sucrose synthase activities (Weschke et al. 2003, Koch 2004). Indeed, we have previously demonstrated that the fluctuations of sucrose content in inflorescences correspond to the variations of cytosolic and wall-bound invertases, as well as sucrose synthase (synthesis) activities (Lebon et al. submitted).

Moreover, roots become the only carbohydrate source when leaves are removed (OL treatment), explaining their decrease of starch content, as observed in young and old stolons of white clover (Gallagher et al. 1997). Furthermore, root carbohydrates are reduced during the inflorescence development whatever the treatment. This was already reported in fruiting cuttings (Bartolini et al. 1996) and may be due to carbohydrate needs of developing vegetative and reproductive organs (Jean and Lapointe 2001).

Carbohydrate variations in vegetative and reproductive organs are different between GW and PN. GW roots and leaves accumulate higher quantities of starch and fructose than PN ones. Different patterns of carbohydrate distribution are ever found in inflorescences between these cultivars (Lebon et al. 2004). And these cultivar distinctions are due to different carbohydrate metabolism (Lebon et al. 2005a, Lebon et al. submitted). Thus, GW fruiting cuttings principally favour carbohydrate accumulation in roots and leaves, and significantly more than PN. Preferentially storing carbohydrate reserves in vegetative organs rather than in inflorescences could explain the higher sensitivity of GW to flower abscission. Carbohydrate levels of inflorescences are crucial for flower fate (Rodrigo et al. 2000, Jean and Lapointe 2001, Ruiz et al. 2001, Iglesias et al. 2003) and GW inflorescences contain low carbohydrate levels during development. Therefore, it is likely that GW inflorescences have not enough available sugars to counteract environmental stresses, especially when they occur during meiosis, explaining their sensitivity to coulure.

In cuttings as in vineyard, GW and PN inflorescences exhibit major differences of carbohydrate levels during the crucial steps in male and female organ formation, i.e., at meiosis. In both cvs., female meiosis occurs from stages 15 to 17, and cvs. exhibit different pattern of carbohydrate distribution during this period: in PN, developing inflorescences mainly accumulate hexoses, whereas in GW ones starch and sucrose are stored (Lebon et al. 2004). The higher pool of available hexoses in PN developing inflorescences may explain the lower sensitivity to flower abscission in PN under stress

conditions (Lebon et al. 2004, Zapata et al. 2004b). Moreover, this critical period is marked by the transition between mobilization of starch from the root reserves and the translocation of photosynthates from fully expanded leaves (Zapata et al. 2004a), and coincides with variations of carbohydrates in inflorescences (Lebon et al. 2005a). However, although carbohydrate level differences exist in GW and PN inflorescences, these variations during flower development of fruiting cuttings differ than those observed in vineyard. Indeed, contrarily to vineyard, sucrose is more accumulated in PN inflorescences than in GW ones, and other carbohydrate levels are identically concentrated in the both cultivars. These differences between fruiting cutting and vineyard are likely caused by different carbohydrate metabolism due to the absence of root during the first steps of the inflorescence development. Indeed, during this period, carbohydrate supply only originates from wood reserves. Although the development of reproductive structures is identical in fruiting cutting and vineyard (Lebon et al. 2005b), the fluctuation of carbohydrate levels differs between these two models.

Acknowledgements - The authors thank C. Guèze for technical assistance and acknowledge ONIVINS and the Mumm-Perrier-Jouët company for financial supports.

References

- Alleweldt G, Eibach R, Rühl E (1982) Investigations on gas exchange in grapevine. I. Influence of temperature, leaf age and daytime on net photosynthesis and transpiration. *Vitis* 21: 93-100
- Bartolini G, Pestelli P, Topni MA, Di Monte G (1996) Rooting and carbohydrates availability in *Vitis* 140 Ruggeri stem cuttings. *Vitis* 35(1): 11-14
- Bates TR, Dunst RM, Joy P (2002) Seasonal dry matter, starch, and nutrient distribution in 'Concord' grapevine roots. *HortScience* 37(2): 313-316
- Bergmeyer HU (1974) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim Basel
- Boss PK, Buckeridge EJ, Poole A, Thomas MR (2003) New insights into grapevine flowering. *Funct Plant Biol* 30: 593-606
- Candolfi-Vasconcelos MC, Candolfi MP, Koblet W (1994). Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta* 192: 567-573
- Caspari HW, Lang A, Alspach P (1998) Effects of girdling and leaf removal on fruit set and vegetative growth in grape. *Am J Enol Vitic* 49: 359-366
- Coïc F, Lesaint L (1971) Comment assurer une bonne nutrition en eau et en ions minéraux en horticulture. *Hortic Française* 8: 11-14
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977) Phäenologische Entwicklungsstadien. Der rebe. *Nachrichtenb. Deutsch Pflanzenschutzd (Braunschweig)* 29: 119-120
- Gallagher JA, Volenec JJ, Turner LB, Pollock CJ (1997) Starch hydrolytic enzyme activities following defoliation of white clover. *Crop Sci* 37: 1812-1818
- Glad C, Regnard JL, Querou Y, Brun O, Morot-Gaudry JF (1992) Flux and chemical composition of xylem exudates from Chardonnay grapevines: temporal evolution and effect of recut. *Am J Enol Vitic* 43: 275-282

- Ho LC (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 355-378
- Huglin P, Schneider C (1998) Biologie et écologie de la vigne. Lavoisier Tech. Doc. 2nd edition, 372 pp
- Iglesias DJ, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2003) Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiol* 23: 199-204
- Jean D, Lapointe L (2001) Limited carbohydrate availability as a potential cause of fruit abortion in *Rubus chamaemorus*. *Physiol Plant* 112: 379-387
- Keller M, Koblet W (1994) Is carbon starvation rather than excessive nitrogen supply the cause of inflorescence necrosis in *Vitis vinifera* L.? *Vitis* 33: 81-86
- Keller M, Koblet W (1995) Dry matter and leaf area partitioning, bud fertility and second season growth of *Vitis vinifera* L.: responses to nitrogen supply and limiting irradiance. *Vitis* 34: 77-83
- Koch KE (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 7: 235-246
- Layne DR, Flore JA (1993) Physiological responses of *Prunus cerasus* to whole-plant source manipulation. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations and carbohydrate concentrations. *Physiol Plant* 88: 44-51
- Lebon G, Brun O, Magné C, Clément C (2004) Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sex Plant Reprod* 17: 71-79
- Lebon G, Brun O, Magné C, Clément C (2005a) Photosynthesis of the grape (*Vitis vinifera*) inflorescence. *Tree Physiol* 25: 633-639
- Lebon G, Clément C (submitted) Changes in enzyme activities of carbohydrate metabolism during the development of grapevine (*Vitis vinifera* L.) flowers. *Planta*
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Clément C (2005b) Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Ann Bot (Lond)* 95: 943-948
- Liu F, Jensen CR, Andersen MN (2004) Pod set related to photosynthetic rate and endogenous ABA in soybeans subjected to different water regimes and exogenous ABA and BA at early reproductive stages. *Ann Bot (Lond)* 94: 405-411
- Loescher WH, McCamant T, Keller JD (1990) Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *HortScience* 25(3): 274-281
- Merjanian A, Ravaz V (1930) Sur la coulure de la vigne. *Prog Agri Vitic* 49: 545-550
- Mullins MG (1966) Test plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature* 209: 419-420
- Mullins MG (1967) Morphogenetic effects of roots and of some synthetic cytokinins in *Vitis vinifera* L. *J Exp Bot* 18(55): 206-214
- Mullins MG (1968) Regulation of inflorescence growth in cuttings of the grape vine (*Vitis vinifera* L.). *J Exp Bot* 19(60): 532-543
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE (1992) Biology of the grapevine. Mullins (Ed), University Press, Cambridge, UK, 239 pp
- Mullins MG, Rajasekaran K (1981) Fruiting cuttings: revised method for producing test-plants of grapevine cultivars. *Am J Enol Vitic* 32(1): 35-40
- Petrie PR, Trought MCT, Howell GS (2000) Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Vitis* 39: 31-36
- Rodrigo J, Hormaza JJ, Herrero M (2000) Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiol Plant* 108: 35-41
- Ruiz R, Garcia-Luis A, Honerri C, Guardiola JL (2001) Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. *Ann Bot* 87: 805-812
- Shishido Y, Kumakura H, Nishizawa T (1999) Carbon balance of a whole tomato plant and the contribution of source leaves to sink growth using the ¹⁴CO₂ steady-state feeding method. *Physiol Plant* 106: 402-408
- Srinivasan C, Mullins MG (1981) Physiology of flowering in the grapevine. A review. *Am J Enol Vitic* 32(1): 47-63
- Stopar M (1998) Apple fruitlet thinning and photosynthate supply. *J Hort Sci Biotechnol* 73(4): 461-466
- Wardlaw IF (1990) The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol* 116: 341-381
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U (2003) The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratio in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* 33: 395-411
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004a) Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J Plant Physiol* 161: 1031-1040
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004b) Mobilisation and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Funct Plant Biol* 31: 1127-1135
- Zhou L, Christopher DA, Paull RE (2000) Defoliation and fruit removal effects on papaya fruit production, sugar accumulation, and sucrose metabolism. *J Amer Soc Hort Sci* 125(5): 644-652

Les travaux présentés dans cet article permettent d'appréhender les relations source/puits avec le modèle bouture fructifère.

Tout d'abord, les résultats obtenus suite aux différents traitements montrent la force puits des différents organes présents sur une bouture fructifère. Ainsi, les feuilles sont les puits majoritaires lors du développement des boutures fructifères (Mullins 1968 ; Mullins *et al.* 1992). En effet, lorsque la croissance de ces dernières n'est pas limitée, les inflorescences se dessèchent, puis tombent. Ensuite, les inflorescences sont un puits plus puissant que les racines car, suite au traitement 0 feuille (défoliation totale), les teneurs en glucides des racines diminuent au profit des inflorescences. Les différents organes en croissance d'une bouture fructifère sont donc des puits plus ou moins importants pour les nutriments : les feuilles sont les puits majoritaires, les inflorescences les puits intermédiaires et les racines les puits minoritaires.

Ensuite, les divers traitements (0, 4 et toutes feuilles) réalisés sur les boutures fructifères de GW et de PN modifient les concentrations en glucides des organes végétatifs (feuilles et racines) et reproducteurs (inflorescences). Ainsi, le traitement "toutes feuilles" induit un comportement différent entre les feuilles des 2 cépages avec une augmentation des teneurs en glucides dans les feuilles de PN mais une augmentation de la concentration d'amidon et une diminution des teneurs en hexoses (glucose et fructose) dans les feuilles de GW.

Enfin, les évolutions des teneurs en glucides dans les inflorescences est différente entre celles du vignoble et celles issues des boutures fructifères. En effet, au vignoble, les inflorescences de GW et de PN montrent une différence majeure des concentrations d'amidon, de saccharose, de glucose et fructose. Cette différence pourrait même contribuer à expliquer la différence de sensibilité à la coulure entre les 2 cépages (Lebon *et al.* 2004). Cependant, ces disparités ne sont pas présentes dans les inflorescences issues des boutures fructifères. Ceci peut s'expliquer par la simplification du modèle bouture fructifère par rapport au vignoble. En effet, ce modèle ne possède que peu de racines au début du développement des inflorescences alors qu'au vignoble, les racines jouent un rôle capital d'apport de nutriments entre le débourrement et le début de la floraison (Scholefield *et al.* 1978 ; Bates *et al.* 1998 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004a, b). Ainsi, les réserves nécessaires au développement normal des inflorescences de boutures fructifères proviennent uniquement du bois ayant permis la confection de la bouture. Or, ce

bois ne contient que 10% des réserves amylacées chez la vigne (Eifert *et al.* 1960 ; Bouard 1966 ; Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a). Ce manque de réserves glucidiques peut expliquer les différences de teneurs en glucides entre les inflorescences du vignoble et celles issues des boutures fructifères.

Le modèle bouture fructifère ne semble donc pas être un modèle fiable pour l'étude du métabolisme glucidique des inflorescences de vigne. Pour ces analyses, les expérimentations au vignoble semblent donc être nécessaires et plus appropriées même si elles ne sont réalisables qu'une fois par an.

Chez la vigne, le développement des structures reproductrices se déroule sur 2 années successives (Srinivasan et Mullins 1976, 1981 ; Gerrath et Posluszny 1988 ; Mullins *et al.* 1992 ; Boss *et al.* 2003). De plus, les glucides utilisés du débourrement jusqu'à la floraison proviennent essentiellement des réserves accumulées l'été précédent à partir des photoassimilats synthétisés en excès (Eifert *et al.* 1960 ; Bouard 1966 ; Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a). Les inflorescences en développement sont très sensibles aux stress durant cette période où ont lieu les méioses ovulaires et polliniques (Lebon *et al.* 2004). Or, les glucides jouent un rôle protecteur contre les stress et permettent un développement normal des structures reproductrices (Herrero et Hormaza 1996 ; Rodrigo et Herrero 1998 ; Rodrigo *et al.* 2000 ; Savitch *et al.* 2000). Il est donc important de connaître l'impact de la mise en réserve lors de l'été_n sur la floraison de l'été_{n+1}. Ainsi, nous avons étudié les conséquences d'un effeuillage total ou d'un égrappage total à la véraison_n sur les différents paramètres de floraison lors de l'été_{n+1}. Cette étude a été réalisée sur les 3 principaux cépages champenois (CH, PM et PN).

Publication soumise

Impact of reserve restoration on flowering and fruit set in grapevine (*Vitis vinifera* L.)

Gaël Lebon¹, Thomas Mineur², Damien Le Sueur², Laurent Panigai² and Christophe Clément^{1,*}

¹ Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC UPRES EA, 2069, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

² Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, 5, rue Henri-Martin, BP 135, 51204 Epernay Cédex, France

Abstract

In grapevine, carbohydrate supply originates from photosynthesis and reserve mobilisation. During summer, photosynthesis allows the reserve restitution, and inflorescence bud initiation occurs in the same time. Understanding the impact of various reserve synthesis during the summer on the flowering and fruit set the following year is important for the comprehension of relations between carbohydrates and flowering in grapevine. At veraison, defoliation and fruit removing are realised on Chardonnay, Pinot Meunier and Pinot noir cultivars, and impacts of these treatments are observed the following year. For the three cultivars, total defoliation induces a significant decrease of starch and total carbohydrate levels in woods, and diminution of the numbers of flowers per inflorescences, berries per bunch and bunch weights. Total fruit removal induces to the decrease of starch concentration, and has different effects on total carbohydrate levels depending to the cultivars. Moreover, removing fruits doesn't affect the efficiency of sexual reproduction. Furthermore, the major parameters of the sexual reproduction efficiency are strongly related to carbohydrate contents in winter woods. All these results are discussed in order to better understand the relations between carbohydrate reserves and the efficiency of sexual reproduction.

Key words: carbohydrate reserves, flowering, fruit set, sexual reproduction, *Vitis Vinifera* L.

Introduction

In grapevine (*Vitis vinifera* L.) as in other woody plants of temperate climate, the development of reproductive (inflorescences) and vegetative organs (annual stems, roots and leaves) is initiated during the previous year (Srinivasan and Mullins, 1981; May, 2000; Boss *et al.*, 2003). During autumn, the whole plant enters dormancy and the reproductive and vegetative primordia endure the winter as quiescent primordia (May, 2000). At the end of the winter, the primordia leave their quiescent state, and continue their development during the spring (Boss *et al.*, 2003). At this moment, preformed shoots and inflorescences grow rapidly and their needs in nutrient are considerable (Scholefield *et al.*, 1978; Huglin and Schneider, 1998). The carbohydrates required for annual development originate either from photoassimilates synthesized in leaves or from reserves accumulated in perennial woody organs the year before (Mullins *et al.*, 1992; Sauter and Van Cleve, 1994; Rodrigo *et al.*, 2000; Hieke *et al.*, 2002).

In grapevine, young developing leaves cannot perform photosynthesis in early spring and thus represent carbohydrate sinks until they reach about one third of their final size (Alleweldt *et al.*, 1982; Petrie *et al.*, 2000). The sink/source transition of leaves occurs at the onset of flowering (Zapata *et al.*, 2004a), suggesting that the early development of annual organs from the winter bud till flowering is supported by carbohydrates accumulated in perennial organs during the previous year. In the inflorescences, the supply of carbohydrates during key steps of flower formation such as meiosis is determinant in the achievement of functional flowers and in the fruit set (Lebon *et al.*, 2004). In this respect, it has been shown that

the requested sugars for the developing inflorescences in grapevine are provided by photosynthesis in both the leaves and the inflorescences (Lebon *et al.*, 2005a).

One specific trait of woody plants growing in temperate climate is the importance of sugar reserves stored during the winter (Loescher *et al.*, 1990; Mooney and Gartner, 1991). In grapevine, starch is the major accumulated carbohydrate (Bouard, 1966; Mullins *et al.*, 1992) and is located in the ray storage tissues (parenchyma) of roots and canes (Zapata *et al.*, 2004a). However, soluble carbohydrates (sucrose, fructose and glucose) are also present in perennial organs during winter allowing to resist cold injury by decreasing the freezing temperature of the sieve (Huglin and Schneider, 1998; Glad *et al.* 1992). Moreover, it has been shown that carbohydrates mobilized from reserves in canes and roots are used by the rapid growth of inflorescences and vegetative structures in early spring (Scholefield *et al.*, 1978). Carbon reserves are thus progressively mobilized from perennial wood and sustain the expansion of new young roots, annual stems and leaves, as well as emerging inflorescences (Zapata *et al.*, 2004a). This pool of carbon is restored in perennial organs by the photosynthetic activity in the mature leaves, extending from flowering to leaf senescence, especially during berry ripening (Candolfi-Vasconcelos *et al.*, 1994; Chaumont *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1997). These data suggest that the perturbation of reserve restoration during berry ripening in wood may affect the development of annual organs the year after, especially inflorescences. Despite the crucial role of carbohydrates in the achievement of flowering and fruit set, the influence of source/sink strength of the plant during the period of intense reserve restoration and its related impact on flowering was only poorly studied in grapevine.

The aim of this study was to investigate the influence of the whole plant sugar physiology on flowering and fruit set the year after treatment. Therefore, we modified the carbon balance of vineyard grown plants from the onset of berry ripening (veraison) by perturbing the accumulation of reserves using defoliation or cluster removing.

Materials and methods

Plant Material

Investigations were carried out using the three Champagne cultivars Chardonnay (CH), Pinot Meunier (PM) and Pinot noir (PN) grown in the vineyard of Plumecoq (Marne, France). Treatments were carried out at the onset of veraison and aimed at perturbing the restitution of reserves in the perennial parts of the plant. Control plants were grown according to the Chablis method. S called R- plants were totally defoliated aiming at decreasing the total amount of reserves, whereas in R+ plants all the grapes were removed to favour the restoration of reserves in woody organs. At winter, prunings were collected in order to evaluate the amount of carbohydrates in perennial organs. Treatments were realized either once or two years consecutively.

Carbohydrate extraction

After being lyophilized for 72 h with a CS5L device (Serail Lyophilisateur[®]), prunings and canes of fruiting cuttings were first ground with a heavy duty cutting mill SM 2000 (Retsch[®]) and, thereafter, with a laboratory mortar grinder Pulverisette[®]2 (Fritsch[®]). The powder was mixed with 10 volumes of ethanol 80°. Sugars were then extracted for 15 min at 84°C under continual agitation. After adjusting the volume to 5 mL with distilled water, the extract was centrifuged at 4°C for 10 min at 11 000 g. The supernatant was used for soluble sugar determination. For starch, the pellet previously obtained was suspended in a mixture containing dimethylsulfoxide:hydrochloric acid 8 N (8:2) and starch was dissolved during 30 min at 60°C under continual agitation. After cooling, the extract was centrifuged at 20°C for 10 min at 13 000 g and the supernatant was kept at -80°C until use.

Sucrose, glucose and fructose assay (Boehringer[®] Mannheim enzymatic kit)

Sucrose, glucose and fructose were assayed because they are the major sugars in grapevine (Glad *et al.*, 1992). Briefly, D-glucose was phosphorylated and oxidized in the presence of NADP to gluconate-6-phosphate and NADPH, H⁺. The amount of NADPH, H⁺ formed was determined by means of its absorbance at 340 nm. Fructose was phosphorylated to fructose-6-phosphate by a hexokinase in the presence of ATP. Fructose-6-phosphate was then converted to glucose-6-phosphate by a phosphoglucose isomerase. Glucose-6-phosphate formed was tested as described above and a blank was performed without phosphoglucose isomerase. Sucrose was hydrolyzed to D-glucose and D-fructose in the presence of a β -fructosidase. D-glucose formed was then determined as described above and compared with a blank without β -fructosidase.

Starch assay

Aliquots of 100 μ L of the extract were used to determine starch concentration. The aliquot was mixed with 100 μ L of Lugol iodine solution (0.03% I₂ and 0.06% KI in diluted 0.05 N HCl). After 15 min, the absorbance was read spectrophotometrically at 600 nm. A blank was performed with the starch solvent (DMSO:HCl, 8:2) instead of the extract.

Total carbohydrates

The total amount of carbohydrates in the prunings was calculated by adding the concentrations of starch, sucrose, glucose and fructose. The results were expressed as percentages of dry weight (% DW).

Estimation of the efficiency of sexual reproduction

Fruit set rate is the major parameter used for assessing the success of sexual reproduction and for evaluating the impact of reserves on flowering. It was estimated in vineyard as the ratio of berries over flowers after counting the number of flower scars per inflorescence and the number of berries per bunch. The number of flowers and berry per inflorescence was counted at flowering and fruit set. The number of bunches per vine was counted before veraison, and the number of seeds per berry was determined in order to estimate the fertilization rate. At harvest, the weight of bunches (individual or per plant) was measured.

Relations between carbohydrate contents in prunings and efficiency of sexual reproduction

To understand the putative correlation between carbohydrate contents in prunings and the efficiency of sexual reproduction during the following year, the relation between each value of sugar content and each parameter of sexual reproduction was determined and considered as significant when higher than 0.8 (Lebon *et al.*, 2005a).

Statistical analysis

In vineyard, 16 replicates were performed for each treatment and 16 plants were considered as control. Results were expressed as a mean of the 16 values and error bars represented standard errors for fruiting cuttings and vineyard, respectively. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test and regression analysis. A 5% probability was considered significant.

Results

Carbohydrate contents in prunings

In prunings, starch appeared as the major carbohydrate and its concentration fluctuated similarly in the 3 tested cvs (Fig. 1A). No real difference was noticed between 1 and 2 years treated plants, though some significant but low differences were reported in the R- CH and in the R+ PM and PN cvs. After R- treatment, starch concentration was significantly reduced by half, whereas in the R+ plants, the values of starch content were close to those of the control but remained lower in the 3 tested cvs.

Sucrose content in prunings fluctuated differently in 1 and 2 years treated plants, as well as in the 3 tested cvs. (Fig. 1B). In CH, R- treatment induced a 1- to 4-fold decrease of sucrose content in 1 and 2 years treated plants respectively. In R+ treated plants, sucrose concentration was reduced by 8 in 1 year treated plant but was significantly similar to the control in the 2 years treated plants. In PM, sucrose was 4 fold less important in the control plants when compared to CH (Fig. 1B). In once treated plants, sucrose was reduced by half following both R- and R+ treatments. Oppositely, in twice treated plants, sucrose content was similar to the control following R- treatment and significantly higher after R+ treatment. In PN, total defoliation (R- treatment) had opposite effect in 1 and 2 years treated plants, as revealed by the significant increase of sucrose concentration in the former case and the absence of noticeable effects in the latter.

The variations of glucose contents in the prunings varied according to the cv (Fig. 1C). In CH the sole significant difference was recorded in 1 year treated prunings following R- treatment and consisted in a slight increase of glucose content. In 1 year treated PM, the R- treatment induced a 3-fold reduction of glucose content, whereas the R+ treatment generated a 25% increase. In twice treated PM, total fruit removal (R+ treatment) or total defoliation (R- treatment) had similar effects and resulted in a slight decrease of glucose concentration. The behaviour of PN

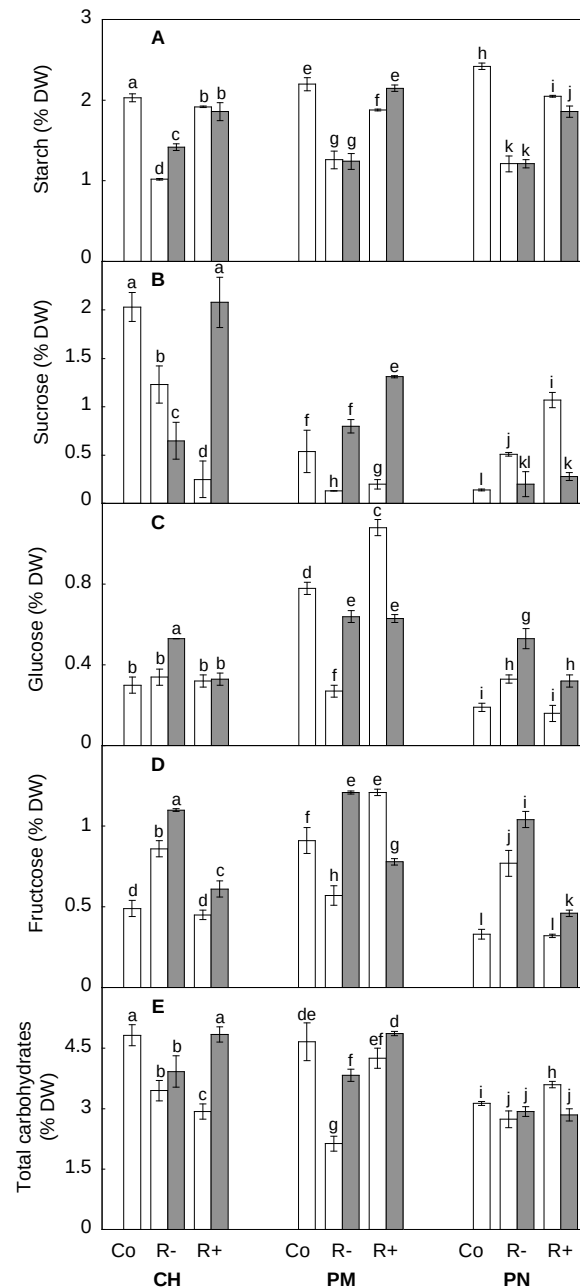


Fig. 1. The effects of total defoliation (R-) and total fruit removal (R+) on contents of starch (A), sucrose (B), glucose (C), fructose (D) and total carbohydrates (E) in following winter prunings compared to control (Co) for the three Champagne cultivars Chardonnay (CH), Pinot Meunier (PM) and Pinot noir (PN). White and grey bars represent the one year-treated and the two consecutive year-treated vines, respectively. Values are means ($\pm$ SE) of 16 assays. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. Means for a considered parameter and a cultivar were not significantly different when marked by the same letter ($P=0.05$).

was globally similar to the one of CH.

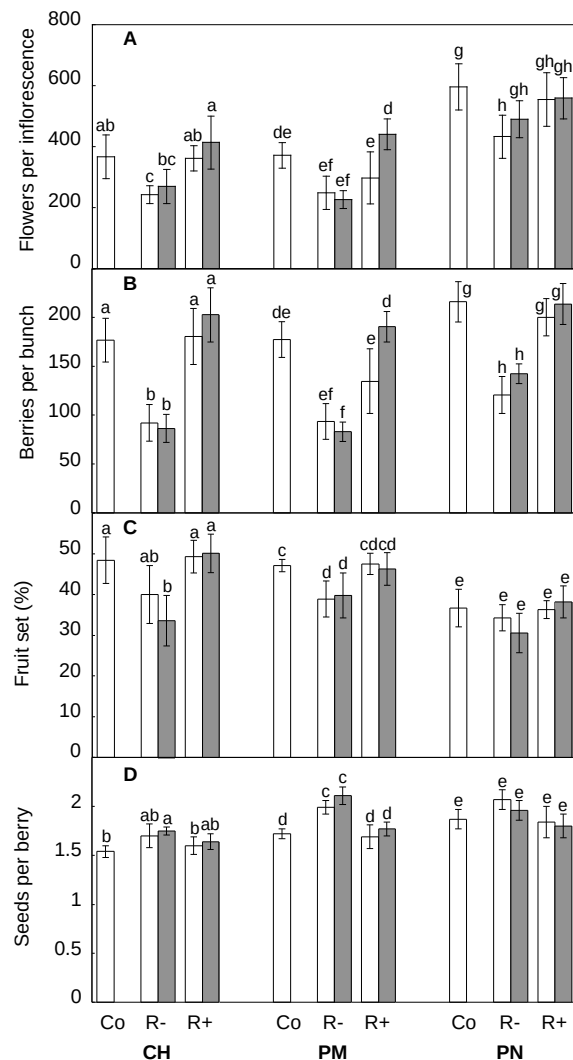


Fig. 2. The effects of total defoliation (R-) and total fruit removal (R+) at veraison on flowers per inflorescence (A), berries per bunch (B), fruit set rate (C), and seeds per berry (D) the following year compared to control (Co) for the three Champagne cultivars Chardonnay (CH), Pinot Meunier (PM) and Pinot noir (PN). White and grey bars represent the one year-treated and the two consecutive year-treated vines, respectively. Values are means ($\pm$ SE) of 16 assays. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. Means for a considered parameter and a cultivar were not significantly different when marked by the same letter ($P=0.05$).

Regarding fructose, both CH and PN cvs. had the same behaviour (Fig. 1D): the R-treatment resulted in an increase of fructose contents in both once and twice treated

plants, whereas the R+ treatments did not induce drastic modifications. In PM the treatments had opposite effects in 1 and 2 years treated plants. The fructose content was reduced following R- treatment in once treated plants but increased in twice treated grapevines. The R+ treatment had inverse effects.

Considering total carbohydrates, both treatments had similar effects in the 3 tested cvs. (Fig. 1E). The R-treatment induced a significant decrease of sugars in the wood of prunings with a higher impact in 1 year treated plant. Contrarily the R+ treatment did not generate drastic modifications of the sugar content when compared to controls, except in 1 year R+ CH.

Efficiency of sexual reproduction

The effect of both R- and R+ treatments on the efficiency of sexual reproduction was homogeneous in the 3 tested cvs. (Figs. 2 and 3).

The number of flowers per inflorescence significantly decreased following 1 or 2 consecutive R- treatments whereas it was not affected by the R+ treatments (Fig. 2A). Similarly, 1 or 2 consecutive R- treatments induced a 2-fold reduction of the number of berries per bunch but the R+ treatment had no detectable effect (Fig. 2B). In CH and PM cvs., the fruit set was similarly affected by the total defoliation or the grape removal, meaning that the fruit set was reduced following the R- treatment and remained stable following the R+ treatment (Fig. 2C). But these treatments had no effects on the fruit set of the PN cv. The number of seeds per berry globally increased whatever the treatment in CH, and following the 1 e R- treatment in PM (Fig. 2D). In R+ treated PM and in PN, no significant effects were recorded.

The R- treatment significantly decreased the number of bunches per plant in CH and PM but not in PN (Fig. 3A). Oppositely, once CH and twice PN R+ treated plants had significantly more bunches than the control. Considering both the bunch weight and weight of bunches per vine, the results were similar in the 3 tested cultivars, meaning that the R- treatment significantly reduced by half the weight of bunches (Figs. 3B, 3C). The absence of results in the R+ treatments is due to the fact that the R+ treatment consisted in removing the bunches at the beginning of veraison.

Relations between carbohydrate contents in prunings and efficiency of sexual reproduction

In PM, strong correlations existed between starch content in prunings and all the parameters of sexual reproduction, with correlation factors ranging between 0.8041 and 1 (Table 1). In this cultivar, no other correlation could be found between any of carbohydrate and a studied parameter. In CH, most of parameters of sexual reproduction could be related either to starch or to fructose

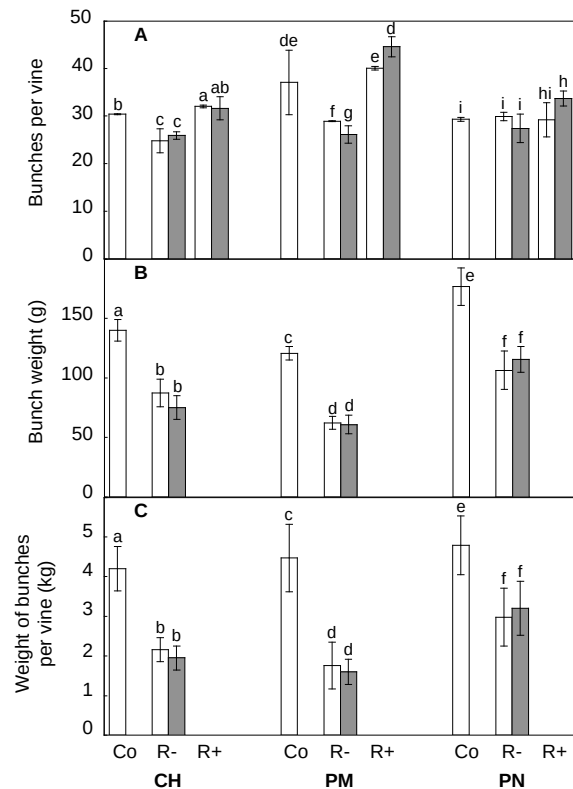


Fig. 3. The effects of total defoliation (R-) and total fruit removal (R+) at veraison on bunches per vine (A), bunch weight at harvest (B), and weight of bunches per vine at harvest (C) the following year compared to control (Co) for the three Champagne cultivars Chardonnay (CH), Pinot Meunier (PM) and Pinot noir (PN). White and grey bars represent the one year-treated and the two consecutive year-treated vines, respectively. No R+ data was available because vines were used for following year treatments. Values are means (±SE) of 16 assays. Statistical analyses were carried out using Student's *t*-test. Means for a considered parameter and a cultivar were not significantly different when marked by the same letter ($P=0.05$).

contents in prunings. Similarly, in PN the parameters of sexual reproduction could be correlated to starch or to fructose contents in prunings, with r^2 ranging between 0.8108 and 0.9876 (Table 1). In the 3 tested cvs., sucrose, glucose and the total carbohydrates could be only poorly correlated to the various parameters reported in this study. analysis. A 5% probability was considered significant.

Discussion

The perturbation of the carbon balance in grapevine from veraison by total leaf or grape removal affects the restoration of reserves in perennial organs and next influence the intensity of sexual reproduction afterwards 1 rwards by modifying the number of inflorescences, as well

as the number of flowers per inflorescence and the seed set.

Carbohydrate storage occurred mainly from veraison to leaf senescence

The total defoliation (R- treatment) at veraison causes various effects on wood carbohydrate concentrations. Indeed, a 2-fold decrease of starch content in the wood occurs whatever the cv. and the number of treatments, meaning that most of carbohydrate reserve restoration takes place after veraison. This further indicates that the intensity of sink strength in the whole plant considerably increases at veraison, due to both the accumulation of sugars in the ripening berries (Bennett *et al.*, 2002) and to the restitution of reserves (Zapata *et al.*, 2004a, b). Contrarily to previous study claimed from work performed on the Chardonnay cv. (Bennett *et al.*, 2002), starch storage is not completed at veraison since the impact of R-treatment induces a significant decrease of starch levels in vines. In plants, low sugar concentrations stimulate photosynthesis, enabling to compensate the lack of nutrients (Koch, 1996). In this optic, grapevine is able to partially compensate temporary lack of reserve mobilisation or defoliation by increasing photosynthetic capacity of the remaining leaf area (Scholefield *et al.*, 1978; Boucher *et al.*, 1987; Layne and Flore, 1995) or by stimulating the existing leaves to function more efficiently (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990, 1991; Petrie *et al.*, 2000). Indeed, it has been shown that a stress caused by a reduction of the source to sink ratio could be compensated by an increase of photosynthesis efficiency of the remaining leaves (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990). Nevertheless, partial defoliation within the same year was enough to decrease starch content in trunks or leaves (Koblet *et al.*, 1994; Tartachnyk and Blanke, 2004) but it has poor influence during the following year (Scholefield *et al.*, 1978; Howell *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 2002).

Total fruit removal (R+) at veraison did not result in higher starch accumulation in prunings. However, previous studies have shown that fruit removal generates an increase of starch levels in apple (Gucci *et al.*, 1991; Wibbe and Blanke, 1995; Tartachnyk and Blanke, 2004) and grape leaves (Chaumont *et al.*, 1994). The temporary increase of starch content in leaves could be explained by the lower needs of photoassimilates in the whole plant caused by the removal of the sink fruits (Hansen and Ryugo, 1979; Wibbe and Blanke, 1995). Indeed, the loss of sink increases leaf carbohydrate accumulation and induces a subsequent feedback inhibition of photosynthesis (Gucci *et al.*, 1991; Tartachnyk and Blanke, 2004) preventing an additional accumulation of sugars in the wood.

Table 1. The relationships between carbohydrates in winter prunings (starch, sucrose, glucose, fructose and total carbohydrates) and the yield components for the three cultivars Chardonnay (CH), Pinot Meunier (PM) and Pinot noir (PN), considering the two treatments at veraison (total defoliation R- and total fruit removal R+) and the control (Co).

Each table data is the r^2 of the relation between the two considered parameters.

		Flowers	Berries	Fruit set	Seeds	Bunches	Bunch weight	Wine weight
Starch	CH	0.8097	0.7749	0.5830	0.6492	0.8612	0.6976	0.7796
	PM	0.8253	0.9495	0.8820	0.8163	0.8041	1	0.999
	PN	0.8709	0.8442	0.5502	0.5673	0.5647	0.9856	0.9876
Sucrose	CH	0.2009	0.1712	0.1635	0.1534	0.0403	0.9370	0.8842
	PM	0.3856	0.2449	0.0391	0.0002	0.1491	0.0116	0.0062
	PN	0.0041	0.0004	0.327	0.0087	0.0058	0.5104	0.5015
Glucose	CH	0.2893	0.4055	0.0637	0.6514	0.3300	0.5794	0.4863
	PM	0.0502	0.1317	0.6133	0.4262	0.2625	0.4866	0.4575
	PN	0.3389	0.4085	0.6126	0.2010	0.0608	0.5397	0.5486
Fructose	CH	0.6059	0.7836	0.9231	0.8776	0.7536	0.9511	0.9031
	PM	0.0680	0.0275	0.0698	0.0015	0.0018	0.0002	0.0002
	PN	0.6056	0.7200	0.8108	0.4914	0.1922	0.7645	0.7720
Total	CH	0.2465	0.1481	0.0631	0.0849	0.0563	0.7510	0.8270
Carbohydrates	PM	0.5274	0.5960	0.6810	0.3857	0.5061	0.5453	0.5162
	PN	0.2958	0.2549	0.0578	0.2644	0.0806	0.8567	0.8504

Impact of treatments on inflorescence initiation and flower abscission

In the three tested cultivars, total defoliation at veraison significantly affects the intensity of flowering by decreasing both the number of inflorescences per plant and the number of flowers per inflorescence. Carbohydrate supply represents a key point for the achievement of the reproductive process from floral evocation, throughout flower development and next during fruit setting (Aloni *et al.*, 1997; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000; Hieke *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2001). In grapevine, uncommitted primordium in the latent bud develops into inflorescence primordium within the year preceding the emergence of the bunch depending on both varietal and environmental conditions (Srinivasan and Mullins, 1981; May, 2000; Boss *et al.*, 2002; 2003). At this period, an adequate supply of assimilates is essential for maximum flower development (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990). Our results indicate that the deficiency of carbon nutrients by leaf removal at veraison generates a reduction of bunch number. This suggests that carbon nutrition after veraison is determinant for the quantitative transition from uncommitted to inflorescence primordium, thus influencing the number of inflorescence the following year. Similarly, total defoliation at full bloom 1 and 2 weeks after induces a 3-fold decrease bud burst during the following season (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990). So, defoliation from full bloom to veraison had impacts on the current and the following year of treatment revealed by the decrease of 1/ the formed bud number during current summer and 2/ the bud burst the following spring. Defoliation stress cannot be totally recovered during the current year even if this treatment is followed by one season of normal cultural practice because the flower

initiation occurs at previous summer (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990).

The number of flowers per inflorescence is also affected by the perturbation of the carbon balance. In woody plants, inflorescences develop during early spring, competing with young non-photosynthetic leaves for reserve nutrients from wood (Finazzo *et al.*, 1994). Our results show that available carbohydrates are significantly lower in R- treated plants, which decreases the number of flowers per inflorescence. This demonstrates that the development of flowers in grapevine is highly dependent upon the reserves accumulated in the perennial organs (Zapata *et al.*, 2004a; Lebon *et al.*, 2004; 2005b). Nevertheless, the fertility of the remaining flowers in treated plants is comparable to the one in the control since the fruit and seed sets are not significantly different. These data suggest that the whole plant is able to integrate the amount of available reserves devoted to reproduction and adjusts the number of initiated inflorescences and flowers according to. This conclusion is supported by previous assumption that carbohydrate reserves are only sufficient for flowering and fruit set in grapevine (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990). However, others have demonstrated that carbohydrates source from current photosynthesis controls fruit set (Caspari *et al.*, 1998), and that berry growth was highly dependent on current photosynthate supply and unaffected by carbohydrate reserve stress (Bennett *et al.*, 2002).

Moreover, the total defoliation results in the significant decrease of carbohydrate reserves, number of inflorescences per plant and number of flowers per inflorescence, which finally induces a yield reduction the year after. Indeed, total defoliation at harvest time of Sultana Chardonnay vines decreased the yield (kg per vine) by 25 to 50% according to the year (Scholefield *et al.*,

1978). Similarly in Chardonnay, removing 75% of leaves 4 and 8 weeks after bloom significantly decreases the number of flowers per inflorescence, the number of berries per bunch, the cluster weight and the vine yield the following year (Bennett *et al.*, 2002). Altogether, these results clearly show the importance post-bloom period for the next year flowering and yield. In grapevine (*Vitis vinifera* L.), inflorescence initiation occurs during the summer of the previous season (Srinivasan and Mullins, 1981; May, 2000; Boss *et al.*, 2003). If this mechanism is perturbed by carbohydrate starvation, the efficiency of flowering will be affected the following year.

Impacts of treatments during two consecutive years

Impact of R+ treatment on carbohydrate levels in one-year canes and on flowering parameters exhibited no major differences after one and two years of treatments. The reserve restoration was not enhanced by R+ treatment, likely because of a feedback regulation of photosynthesis. Indeed, fruit removal reduces CO₂ assimilation in some species due to a lack of sink activity (Gucci *et al.*, 1991; Wibbe and Blanke, 1995; Iglesias *et al.*, 2002; Tartachnyk and Blanke, 2004). These results show that the control practice permits to have the most successful source/sink ratio leading to the optimal flowering and yield the year after.

Besides, a second successive R- treatment does not emphasize the decrease of starch reserves, flowering and yield parameters. These results show that the minimal levels of starch and carbohydrates are obtained after one severe defoliation treatment. The photosynthesis during the following year of treatment 1 nt is not modified by the previous R- treatment (data not shown), showing that the low level of reserves due to defoliation does not induce compensating higher photosynthesis the following year. Therefore, the impact of veraison defoliation has maximal effect when performed once.

Relations between carbohydrate contents in prunings and efficiency of sexual reproduction

Reliable relationships can be established between the amount of carbohydrates and various traits of sexual reproduction reported in this work. In particular our data show that fruit set can be correlated to starch content of prunings in PM and to fructose level in CH and PN. Similarly previous works have shown that fruit set is correlated to the amount of sugars supplied by current photosynthesis (Hunter and Visser, 1990; Caspari *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 2002).

The estimation of the plant capacity to produce flowers and fruits is an important matter for grapevine growers. Up to now, correlations were described between starch content in the winter roots and the efficiency of reproduction during the following annual cycle (Bennett *et al.*, 2002).

Using the concentration of carbohydrates in the woody organs (winter prunings) of grapevine, it is thus possible to predict in winter time the reproduction potential of the plant and subsequently to estimate the yield during the following year. However, such prediction should be understood as the maximum of flowering that might be obtained under optimal climate since the development of the flowers is also dependant on the environmental conditions (Boss *et al.*, 2003).

Conclusion

From the onset of veraison, the supply of photoassimilates is essential for berry ripening and the formation of inflorescence primordia that will develop the year after. Total defoliation significantly reduces the amount of reserves in trunks and subsequently affects the achievement of sexual reproduction. These conclusions demonstrate that the reproduction in grapevine is at least partly regulated by the amount of carbohydrate reserves accumulated from the onset of veraison. It is further possible to estimate the plant reproductive potential determining the concentration of starch and sucrose in the winter prunings.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the ONIVINS and the Mumm-Perrier-Jouët Champagne industry for financial supports.

References

- Alleweldt G, Eibach R, Rühl E. 1982. Investigations on gas exchange in grapevine. I. Influence of temperature, leaf age and daytime on net photosynthesis and transpiration. *Vitis* **21**, 93-100.
- Aloni B, Karni L, Zaidman Z, Schaffer AA. 1997. The relationship between sucrose supply, sucrose-cleaving enzymes and flower abortion in pepper. *Annals of Botany* **79**, 601-605.
- Bennett J, Trought MCT, Jarvis P. 2002. The importance of over-wintering carbohydrates on inflorescence development and yield potential. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* **456**, 70-72.
- Boss PK, Buckeridge EJ, Poole A, Thomas MR. 2003. New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* **30**, 593-606.
- Boss PK, Sensi E, Hua C, Davies C, Thomas MR. 2002. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* **162**, 887-895.

- Bouard DJ.** 1966. Recherches physiologiques sur la vigne et en particulier sur l'aouement des sarments. PhD thesis, University of Bordeaux, France.
- Boucher TJ, Pferffer DG, Barden JA, Williams JM.** 1987. Effects of simulated insect injury on net photosynthesis of potted grapevines. *HortScience* **22**, 927-928.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Candolfi MP, Koblet W.** 1994. Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta* **192**, 567-573.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Koblet W.** 1990. Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - Evidence of compensation and stress recovering. *Vitis* **29**, 199-221.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Koblet W.** 1991. Influences of partial defoliation on gas exchange parameters and chlorophyll content of field-grown grapevines: mechanisms and limitations of the compensation capacity. *Vitis* **30**, 129-141.
- Caspari HW, Lang A, Alspach P.** 1998. Effects of girdling and leaf removal on fruit set and vegetative growth in grape. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**(4), 359-366.
- Chaumont M, Morot-Gaudry JF, Foyer CH.** 1994. Seasonal and diurnal changes in photosynthesis and carbon partitioning in *Vitis vinifera* L. leaves in vines with and without fruit. *Journal of Experimental Botany* **45**(278), 1235-1243.
- Finazzo SF, Davenport TL, Schaffer B.** 1994. Partitioning of photoassimilates in avocado (*Persea americana* Mill.) during flowering and fruit set. *Tree Physiology* **14**, 153-164.
- Glad C, Regnard JL, Querou Y, Brun O, Morot-Gaudry JF.** 1992. Flux and chemical composition of xylem exudates from Chardonnay grapevines: temporal evolution and effect of recut. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**(3), 275-282.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M.** 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in *Citrus*. *Planta* **210**, 636-643.
- Gucci R, Xiloyannis C, Flore JA.** 1991. Gas exchange parameters, water relations and carbohydrate partitioning in leaves of field-grown *Prunus domestica* following fruit removal. *Physiologia Plantarum* **83**, 497-505.
- Hansen P, Ryugo K.** 1979. Translocation and metabolism of carbohydrate fraction of ¹⁴C-photosynthates in 'French Prune' *Prunus domestica* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **104**, 622-629.
- Hieke S, Menzel CM, Lüdders P.** 2002. Shoot development, chlorophyll, gas exchange and carbohydrates in lychee seedlings (*Litchi chinensis*). *Tree Physiology* **22**(13), 947-953.
- Howell GS, Candolfi-Vasconcelos MC, Koblet W.** 1994. Response of Pinot noir grapevine growth, yield, and fruit composition to defoliation the previous growing season. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**(2), 188-191.
- Huglin P, Schneider C.** 1998. Biologie et écologie de la vigne, 2nd edn. Lavoisier Tech Doc, Paris.
- Hunter JJ, Visser JH.** 1990. The effect of partial defoliation on growth characteristics of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon II. Reproductive growth. *South African Journal of Enology and Viticulture* **11**(1), 26-32.
- Iglesias DJ, Lliso I, Tadeo FR, Talon M.** 2002. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* **116**, 563-572.
- Koblet W, Candolfi-Vasconcelos MC, Zweifel W, Howell GS.** 1994. Influence of leaf removal, rootstock, and training system on yield and fruit composition of Pinot noir grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**(2), 181-187.
- Koch KE.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 509-540.
- Layne DR, Flore JA.** 1995. End product inhibition of photosynthesis in *Prunus cerasus* L. in response to whole-plant source-sink manipulation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**, 783-785.
- Lebon G, Brun O, Magné C, Clément C.** 2005a. Photosynthesis of the grape (*Vitis vinifera* L.) inflorescence. *Tree Physiology* **25**, 627-633.
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Clément C.** 2005b. Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany*, **95**, 943-948.
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C.** 2004. Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* **17**, 71-79.
- Loescher WH, McCamant T, Keller JD.** 1990. Carbohydrates reserves, translocation and storage in woody plant roots. *HortScience* **25**, 274-81.
- May P.** 2000. From bud to berry, with special reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 82-98.
- Miller DP, Howell GS, Flore JA.** 1997. Influence of shoot number and crop load on potted Chambourcin grapevines. II: Whole-vine vs. single-leaf photosynthesis. *Vitis* **36**, 109-114.
- Mooney HA, Gartner BL.** 1991. The reserve economy of vines. In: Putz FE, Mooney HA, eds. *The biology of vine*. Cambridge: Cambridge University Press, 161-79.
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE.** 1992. Biology of the grapevine. Mullins MG, ed. Cambridge: Cambridge University Press, 239p.
- Petrie PR, Trought MCT, Howell GS.** 2000. Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Vitis* **39**, 31-36.
- Rodrigo J, Hormaza JJ, Herrero M.** 2000. Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum* **108**, 35-41.
- Ruiz R, Garcia-Luis A, Honerri C, Guardiola JL.** 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. *Annals of Botany* **87**, 805-812.

- Sauter JJ, Van Cleve B.** 1994. Storage, mobilization and inter-relations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees* **8**, 297-304.
- Scholefield PB, Neales TP, May P.** 1978. Carbon balance of the sultana vine (*Vitis vinifera* L.) and the effects of autumn defoliation by harvest pruning. *Australian Journal of Plant Physiology* **5**, 561-570.
- Srinivasan C, Mullins MG.** 1981. Physiology of flowering in the grapevine. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **32**(1), 47-63.
- Tartachnyk II, Blanke MM.** 2004. Effect of delayed fruit harvest on photosynthesis, transpiration and nutrient remobilization of apple leaves. *New Phytologist* **164**, 441-450.
- Wibbe ML, Blanke MM.** 1995. Effects of defruiting on source-sink relationship, carbon budget, leaf carbohydrate content and water use efficiency of apple trees. *Physiologia Plantarum* **94**, 529-533.
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C.** 2004a. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* **161**, 1031-1040.
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C.** 2004b. Mobilisation and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Functional Plant Biology* **31**, 1127-1135.

Les travaux exposés dans cet article confirment que la mise en réserve des glucides à partir de la véraison de l'année n influe sur la floraison de l'année $n+1$.

Chez les 3 cépages champenois, la mise en réserve des glucides a principalement lieu de la floraison à la sénescence des feuilles (Scholefield *et al.* 1978). Ces résultats montrent l'importance des feuilles après les vendanges. En effet, leur photosynthèse, bien qu'elle ne soit plus nécessaire au développement des baies, produit des photoassimilats mis en réserve sous forme d'amidon dans les racines et les tiges (Eifert *et al.* 1960 ; Bouard 1966 ; Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a). Ces réserves seront alors utilisées du débourrement à la floraison l'année suivante (Scholefield *et al.* 1978 ; Bates *et al.* 1998 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004a, b). Il est donc nécessaire de laisser les feuilles sur les vignes jusqu'à leur chute afin de permettre une mise en réserve maximale d'amidon dans les racines et les bois.

De plus, la floraison normale est dépendante d'une quantité suffisante de réserve amylacées. En effet, une mise en réserve déficiente (induite par le traitement 0 feuille) provoque une diminution significative de l'initiation des inflorescences et une augmentation de l'abscission des fleurs. En effet, le nombre de grappes (donc d'inflorescences) et le nombre de fleurs par inflorescences décroissent chez les vignes dont les réserves amylacées sont faibles. Au final, ces paramètres induisent une diminution significative du rendement. La photosynthèse des feuilles et des inflorescences lors de l'année $n+1$ n'est donc pas suffisante pour compenser une déficience des réserves. Ainsi, les réserves amylacées influenceraient le nombre d'inflorescences et le nombre de fleurs, alors que les photoassimilats issus de la photosynthèse interviendraient pour le développement des baies (Bennett *et al.*, 2002).

Ensuite, le contrôle utilisé lors de notre étude est une coupe Chablis normale. Lors de nos expérimentations, l'égrappage a été réalisé pour augmenter la quantité de réserves amylacées dans les racines et les bois. Cependant, aucune différence n'a été observée entre le contrôle et le traitement R+ probablement à cause d'un possible manque de puits nutritionnels dû à l'absence de grappes. Ainsi, le contrôle (taille Chablis) semble être le compromis optimum pour une mise en réserve maximale de l'amidon grâce à un nombre de puits (grappes) suffisant. La photosynthèse survient alors aux besoins glucidiques de la plante (développement des baies et mise en réserve de l'amidon).

Enfin, les résultats obtenus lors de ces travaux ont permis d'établir une corrélation entre la quantité de glucides présents dans les bois et les différents paramètres de floraison. Ainsi, cette étude doit être répétée encore une année afin d'offrir aux viticulteurs un outil de prédiction de récolte simple et précoce. En effet, ce dernier pourra prédire sa récolte grâce à un simple dosage de glucides dans les bois de taille.

Dans cette partie sur les expérimentations sur la vigne, nous avons tout d'abord optimisé le modèle bouture fructifère (Lebon *et al.* 2005c). Nous avons ainsi observé et comparé le développement des structures reproductrices et l'évolution de leurs teneurs en amidon dans les inflorescences issues de boutures fructifères et du vignoble (Lebon *et al.* 2005c). Pour ces critères, le modèle "bouture fructifère" est un modèle fiable permettant des expérimentations tout au long de l'année. De plus, l'étude des relations source/puits sur ce modèle a montré que les feuilles sont les puits majoritaires chez la vigne alors que les inflorescences sont des puits intermédiaires et les racines les puits minoritaires (Lebon *et al.* 2005d). Cette étude a aussi montré que l'évolution et les valeurs des teneurs en glucides différaient entre les inflorescences issues de boutures et celles du vignoble (Lebon *et al.* 2005d). Le modèle "bouture fructifère" est donc fiable pour les études portant sur le développement des structures reproductrices, mais ne semble pas être adapté à l'étude du métabolisme glucidique des inflorescences pour laquelle il diffère trop des résultats obtenus au vignoble (Lebon *et al.* 2004).

Enfin, les expérimentations réalisées au vignoble ont montré l'importance de la mise en réserve des glucides à partir de la véraison de l'année n sur la floraison de l'année $n+1$ (Lebon *et al.* 2005e). De plus, cette étude a mis en évidence une relation entre les teneurs en glucides dans les bois et les paramètres de la floraison : cette relation est un outil de prédiction des récoltes solide facilement exploitable par les viticulteurs.

Conclusions



Les résultats obtenus lors de cette thèse montrent qu'il existe de nombreux critères de différenciation entre un cépage sensible à la coulure (GW) et un cépage peu sensible (PN). De plus, l'optimisation du protocole d'obtention des boutures fructifères a permis de mieux appréhender les relations source/puits au niveau des inflorescences de vigne lors de leur développement, donc la compétition entre les organes végétatifs (feuilles, racines et tiges) et reproducteurs (inflorescences). Enfin, l'expérimentation mise en place sur les 3 cépages champenois a mis en évidence l'importance de la mise en réserve lors de l'été_n sur la floraison de l'été_{n+1}. Ces études ont ainsi permis de répondre à plusieurs questions.

1. Quelles différences existent-ils entre un cépage sensible à la coulure (GW) et un cépage peu sensible (PN) au vignoble ?

Les études que nous avons menées sur le GW et le PN au vignoble ont montré des différences majeures de développement des structures reproductrices et de physiologie des glucides entre ces deux cépages.

Au vignoble, le développement des structures reproductrices varie entre le GW et le PN. En effet, les structures reproductrices mâles et femelles de PN se développent plus précocement que celles de GW. Les deux cépages étudiés sont cultivés dans la même parcelle, c'est-à-dire que les facteurs non contrôlables intervenant sur le développement des structures reproductrices sont identiques pour le GW et le PN. Les différences observées dans le développement des structures reproductrices sont donc liées aux caractéristiques propres à chaque cépage. Habituellement, la classification de Baggiolini (1952) ou celle d'Eichhorn et Lorenz (1977) sont utilisées pour déterminer le stade de développement des inflorescences de vigne. Cependant, ces classifications sont uniquement basées sur des critères morphologiques externes et le développement des structures reproductrices n'est pas pris en compte. Notre étude montre que les critères externes ne sont pas des marqueurs de l'état de développement des structures reproductrices : **le développement phénologique des inflorescences est en effet identique entre le GW et le PN alors que le développement de leurs structures reproductrices est différent**. Or, seul ce critère indique réellement l'état de développement des organes reproducteurs. Il ne faut donc plus se baser uniquement sur les classifications de Baggiolini (1952) ou d'Eichhorn et Lorenz (1977), mais connaître également le stade de développement des structures reproductrices avant de comparer des cépages.

De plus, le contenu glucidique des inflorescences diffère entre les deux cépages. Les différences majeures dans les teneurs en glucides des inflorescences de GW et PN sont détectées entre les stades 12 et 17, durant les méioses polliniques et ovulaires. Bien que les teneurs en amidon sont plus élevées dans les inflorescences de GW, les ovules de PN contiennent de l'amidon durant tout leur développement alors que les ovules de GW n'en possèdent qu'à partir du stade 17. Chez de nombreuses espèces comme l'abricot, la présence d'amidon dans les ovules conditionne la formation de l'ovule et son développement (Rodrigo et Herrero 1998). L'amidon est donc indispensable dans les tissus femelles pour le devenir de l'ovule (Rodrigo *et al.* 2000 ; Jean et Lapointe 2001 ; Ruiz *et al.* 2001). La présence d'amidon dans les ovules de PN pourrait ainsi contribuer donc à une sensibilité moindre de ce cultivar à la coulure. L'ensemble de ces résultats montre que **le contenu glucidique des inflorescences des deux cépages semble être le résultat d'un métabolisme glucidique différent entre le GW et le PN.**

Par ailleurs, les activités des enzymes du métabolisme glucidique sont cohérentes avec les variations des teneurs en glucides des inflorescences et les différences observées entre les 2 cépages (Lebon *et al.* 2004). Ainsi, les fluctuations d'amidon dans les inflorescences des deux cépages sont dues à l'activité enzymatique de l' α - et de la β -amylase. En effet, l'activité β -amylase explique les variations d'amidon au début du développement des inflorescences, puis l'activité α -amylase induit les changements de teneurs en amidon jusqu'à la nouaison. Les deux cépages différencieraient dans leur métabolisme lié à l'amidon, ce qui expliquerait les variations de ses teneurs dans leurs inflorescences. Plus particulièrement, les dissemblances de teneurs en amidon observées entre les deux cépages du stade 15 au stade 17 sont la conséquence d'un métabolisme glucidique différent entre le GW et le PN. De plus, il est à noter que la régulation des teneurs en glucides dans les inflorescences est principalement due aux enzymes de dégradation. Les concentrations en glucides seraient donc le résultat d'un feedback métabolique. **L'évolution des teneurs en glucides (glucose, fructose, saccharose et amidon) dans les inflorescences est donc le résultat d'un métabolisme glucidique différent entre le GW et le PN, notamment entre les stades 15 et 17.**

Enfin, la photosynthèse des feuilles et des inflorescences (puis des grappes) de GW et de PN est différente au cours du développement floral. L'évolution de l'assimilation de CO₂ des feuilles montre une inversion entre les stades 15+2 jours et 15+8 jours. À cette période, la photosynthèse nette des feuilles de PN devient supérieure à celle des feuilles de GW alors

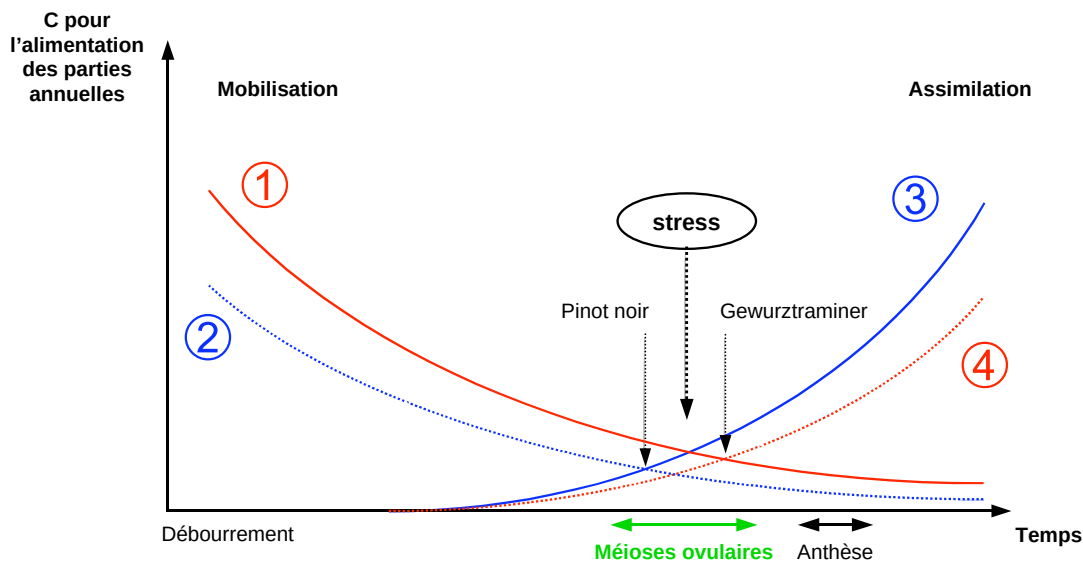


Figure 29. Modèle d'explication de la sensibilité différente à la coulure du Pinot noir et du Gewurztraminer.

Ce modèle est basé sur la disponibilité en nutriments de la vigne. Les courbes rouges représentent le Gewurztraminer et les courbes bleues le Pinot noir, alors que les flèches indiquent la transition entre la mobilisation des réserves et l'assimilation des photoassimilats des 2 cépages.

① quantité normale de réserves disponibles ; ② faibles quantités de réserves disponibles ; ③ reprise normale de l'assimilation ; ④ reprise ralentie ou tardive de l'assimilation.

Lors d'un stress à une période spécifique (voir graphe), les ovules de PN ont déjà subi leur méiose et la plante est autotrophe alors que les ovules de GW sont au stade cellules-mère de macrospores et que la plante est encore dépendante de ses réserves amylacées. Ainsi, les ovules de PN ont déjà passé l'étape critique et sensible de leur développement, mais pas celles de GW. Ceci pourrait expliquer la plus grande sensibilité à la coulure du GW par rapport au PN car les ovules de GW doivent encore subir leur méiose. Dans tous les cas, la coulure semble être la conséquence d'un ensemble de paramètres développementaux (méiose ovulaire tardive), métaboliques (transition mobilisation des réserves/photosynthèse tardive due à un métabolisme glucidique différent et à une photosynthèse différente des feuilles et des inflorescences) et environnementaux (mauvaises conditions climatiques avant ou pendant la méiose ovulaire).

qu'auparavant, les feuilles de GW assimilaient plus efficacement le CO₂. En effet, la conductance stomatique régule la photosynthèse nette des feuilles de GW et de PN. Cependant, chez le PN uniquement, la teneur en chlorophylles totales intervient aussi dans la régulation de l'assimilation de CO₂ des feuilles. De plus, tous les changements de photosynthèse interviennent entre les stades 15+2 jours et 15+8 jours. Or, la méiose ovulaire du PN se déroule entre ces stades : ceci montre que de nombreux changements développementaux et physiologiques ont lieu à cette période. De plus, **la photosynthèse des inflorescences est différente entre les deux cépages jusqu'à la nouaison**. À ce stade, l'assimilation de CO₂ de cet organe devient nulle. Les glucides nécessaires au développement des grappes proviennent donc exclusivement de la photosynthèse des feuilles et de la mobilisation des réserves. Les grappes sont par conséquent totalement dépendantes des feuilles, des bois et des racines pour leur nutrition. Leur développement n'est cependant possible que si elles attirent suffisamment de nutriments des organes sources. Les grappes doivent donc capter des nutriments aux dépens des pousses en croissance et de la mise en réserve. Ceci explique que, chez la plupart des espèces végétales, les grappes sont les puits majoritaires (Ho 1988).

Chez la vigne, de nombreux éléments interviennent dans le mécanisme de la coulure dont les teneurs en azote (Paczek 2002) ou en polyamines (Colin 2000). Parmi les causes probables expliquant la différence de sensibilité à la coulure du GW et du PN, les facteurs physiologiques (développement des structures reproductrices, métabolisme glucidique, photosynthèse des feuilles et des inflorescences) semblent être caractéristiques de chaque cépage peu avant l'anthèse ainsi que les conditions environnementales (Fig. 29). En effet, durant la période comprise entre les stades 15 et 17, le développement des structures reproductrices et des changements physiologiques se déroulent dans les inflorescences de vigne. À cette période, la méiose ovulaire a lieu chez les deux cépages. Cette période est une étape très sensible aux stress environnementaux qui peut provoquer l'avortement des ovules. Dans ce cas, la présence d'amidon dans les ovaires de PN et son absence dans celles de GW expliquerait la sensibilité moins importante du PN par rapport au GW : la présence d'amidon dans les tissus femelles est en effet indispensable au développement normal de l'ovule. De plus, à cette même période, le métabolisme glucidique des inflorescences de GW est différent de celui des inflorescences de PN. En effet, les inflorescences présentent des teneurs en glucides solubles (glucose et fructose) supérieures à celles observées dans les inflorescences de GW : la plus grande disponibilité de ces sucres solubles du PN à

Tableau 10. Développement des structures reproductrices mâles et femelles du Gerwurztraminer et du Pinot noir au vignoble et avec le modèle bouture fructifère (BF) (Lebon *et al.* 2005c).

Les flèches symbolisent les méioses.

A archéspore ; CMm cellule mère de microspore ; CMM cellule mère de macrospore ; CMSE cellule mère du sac embryonnaire ; CS cellules sporogènes ; GPM grain de pollen mature ; JGP jeune grain de pollen ; m microspores ; mV microspores vacuolisées ; SE sac embryonnaire ; T tétrades ; TS tissu sporogène.

Stades de développement		Vignoble BF	12	15	15+2 jours 15+1 jour	15+8 jours 15+3 jours	17	21	
Structures mâles	GW	vignoble	CS	CMm	↓	T	m	mV	GPM
		BF	CS	CMm	↓	T		mV	GPM
	PN	vignoble	CS	↓	T	m	mV	JGP	JGP
		BF	CS	↓	T		m	JPG	JGP
Structures femelles	GW	vignoble	TS	TS	CMM	CMM	↓	CMSE	SE
		BF	TS	TS		A		CMM	↓
	PN	vignoble	TS	A	CMM	↓	CMSE	SE	SE
		BF	TS	A		CMM	↓	SE	SE

l'approche de l'anthèse expliquerait sa tolérance à la coulure. Ensuite, à cette période clé du développement des structures reproductrices femelles, les concentrations en glucides dans les inflorescences diffèrent entre les deux cépages à cause de leur métabolisme glucidique. En effet, les concentrations de glucides dans les inflorescences des deux cépages sont le résultat de régulations différentes. Enfin, entre les stades 15 et 17, la photosynthèse nette des feuilles s'inversent entre les feuilles de GW et les feuilles de PN, qui présentent alors une assimilation de CO₂ supérieure à celle des feuilles de GW. Pendant la méiose ovulaire, l'apport en photoassimilats des feuilles aux inflorescences est donc supérieur chez le PN, ce qui expliquerait la meilleure tolérance de ce cépage contre les stress environnementaux.

L'ensemble de ces différences sont cohérentes avec une tolérance à la coulure plus importante chez le PN.

2. Le modèle bouture fructifère est-il un bon modèle d'étude ?

Le modèle bouture fructifère a été choisi et optimisé car il permet le développement des organes végétatifs (racines, feuilles, pousses) et reproducteurs (inflorescences puis grappes). De plus, ce modèle se rapproche davantage de la plante au vignoble que les plants cultivés *in vitro* (qui ne donnent pas d'inflorescences) et est moins contraignant que les plantes en pot. Les boutures fructifères ont-elles cependant le même comportement que les plantes au vignoble pour les critères de différenciation entre les cépages plus ou moins sensibles à la coulure ?

Tout d'abord, le développement des structures reproductrices mâles et femelles est quasi-identique chez les fleurs provenant de boutures fructifères et chez celles provenant du vignoble (Tableau 10). La méiose pollinique a lieu entre les mêmes stades dans les fleurs au vignoble et dans celles du modèle bouture fructifère. En effet, elle se déroule entre les stades 12 et 15 chez le PN et entre les stades 15 et 15+1 jour et 15+2 jours chez les fleurs de GW avec le modèle boutures fructifères et au vignoble. La précocité de la méiose chez le PN est donc respectée avec le modèle bouture fructifère. La méiose ovulaire est décalée entre les fleurs du vignoble et celles obtenues par bouture fructifère. Ainsi, chez les deux cépages, elle est plus tardive chez les fleurs issues de boutures fructifères. La méiose ovulaire a donc lieu entre les stades 15+2 jours et 15+8 jours et entre les stades 15+3 jours et 17 chez le PN au vignoble comme dans les boutures fructifères. Chez les fleurs de GW au vignoble et des

boutures fructifères, elle se déroule entre les stades 15+8 jours et 17 et entre les stades 17 et 21. Ainsi, comme au vignoble, la méiose ovulaire a d'abord lieu chez le PN bien qu'elle soit plus tardive dans les fleurs de boutures fructifères. La méiose ovulaire est donc juste décalée d'un stade de développement entre le vignoble et le modèle bouture fructifère. **Pour les deux cépages, le modèle bouture fructifère respecte la chronologie des méioses pollinique et ovulaire observée au vignoble, bien que la méiose ovulaire est plus tardive au vignoble que sur le modèle bouture fructifère.**

De plus, comme au vignoble, la présence d'amidon dans les ovules est différente entre les boutures fructifères des deux cépages. En effet, l'amidon est présent plus tardivement dans les ovules de GW que dans ceux de PN. Ensuite, les ovules de fleurs du vignoble accumulent plus précocement de l'amidon que celles provenant de boutures fructifères. Néanmoins, comme au vignoble, l'amidon est visible à un stade plus précoce chez le PN que chez le GW. **L'accumulation et la présence d'amidon dans les ovules est donc plus tardive sur les boutures fructifères qu'au vignoble même si, comme au vignoble, cette accumulation est plus précoce chez le PN que chez le GW.**

Ensuite, les mesures des paramètres relatifs à la floraison montrent que les données obtenues avec le modèle bouture fructifère sont identiques à celles obtenues au vignoble. En fait, le nombre de baies par grappe, le nombre de pépins par baie et le pourcentage de nouaison sont identiques entre le modèle et le vignoble. Cependant, les inflorescences des boutures fructifères contiennent statistiquement plus de fleurs que celles issues du vignoble. **Dans leur ensemble, les paramètres liés à la floraison sont identiques entre le modèle bouture fructifère et le vignoble, excepté le nombre de fleurs par inflorescence du PN.**

De plus, l'évolution des teneurs en glucides dans les inflorescences diffère entre le vignoble et les boutures fructifères. En effet, les concentrations en glucides (amidon, saccharose, glucose et fructose) chutent fortement durant les 2 premiers stades du développement des inflorescences quelque soit le traitement appliqué aux boutures fructifères. Ces diminutions ne semblent pas spécifiques d'un cépage car le GW et le PN les subissent. Ensuite, peu de différences apparaissent entre le GW et le PN, notamment lors de la méiose ovulaire. Cette observation diffère fortement des résultats obtenus au vignoble où des différences significatives entre les cépages apparaissent au moment de la méiose ovulaire pour l'amidon, le saccharose, le glucose et le fructose (Lebon *et al.* 2004). La composition

glucidique différente dans les inflorescences de GW et de PN sont capitales car elle représente au moins un élément d'explication de la sensibilité différentielle des cépages à la coulure. Ces différences peuvent s'expliquer par l'absence de racine dans lesquelles l'amidon est majoritairement stocké (Eifert *et al.* 1960 ; Bouard 1966 ; Bates *et al.* 2002 ; Zapata *et al.* 2004a). En effet, contrairement aux plantes cultivées au vignoble, les boutures ne possèdent pas de réserves au niveau des racines car elles en sont dépourvues au moment de la mise en pot. Le système racinaire se développe en effet progressivement après la mise en pot. Ainsi, peu avant le débourrement, l'amidon apporté aux différents organes de la bouture fructifère viens uniquement des réserves du bois. **Les boutures fructifères ne semblent donc ne pas être un modèle fiable pour l'étude des glucides présents dans les inflorescences. L'absence de racines exportatrices d'amidon induit en effet des teneurs différentes en glucides de celles observées au vignoble.**

Les boutures fructifères peuvent être utilisées comme modèle simplifié de la vigne pour étudier certains paramètres. En effet, ce modèle est fiable pour l'observation du développement des structures reproductrices mâles et femelles. Ainsi, les boutures représentent un avantage certain par rapport au vignoble car elles permettent d'étudier les structures reproductrices toute l'année et non pas seulement en été. L'analyse de ces structures ne peut se faire qu'à partir de matériel frais et ne peut donc pas être reporté quand ce matériel provient du vignoble. Avec le modèle bouture fructifère, les différents stades de développement des structures mâles et femelles peuvent être obtenus toute l'année. De plus, la floraison peut être étudiée à partir de ce modèle car les données agronomiques sont identiques à celles du vignoble. Ainsi, les nombres de fleurs par inflorescence, de baies par grappe, de pépins par baie et le taux de nouaison obtenus avec les boutures fructifères sont semblables aux données obtenues au vignoble.

Cependant, l'étude de la présence d'amidon dans les ovules ne peut être réalisée avec le modèle bouture fructifère. En effet, l'accumulation d'amidon dans ces structures diffère selon que l'étude ait été effectuée à partir de fleurs provenant du vignoble ou de fleurs issues de bouture fructifère. Enfin, le métabolisme glucidique des inflorescences ne peut être appréhendé de manière identique au vignoble et avec les boutures fructifères. En effet, les boutures sont dans ce cas un modèle trop simplifié : les boutures ne possèdent en effet pas de racines au début de leur développement. L'apport d'amidon aux inflorescences peu avant le débourrement n'est donc pas possible et provoque des différences majeures de

Mise en réserves des glucidiques lors de l'année n :

- Reprise du développement des structures végétatives et reproductrices peu avant le débourrement de l'année $n+1$
- Détermination du nombre de fleurs par inflorescences de l'année $n+1$

Photosynthèse de l'année $n+1$:

- Nouaison de l'année $n+1$
- Développement des fruits de l'année $n+1$
- Détermination du nombre d'inflorescences de l'année $n+2$
- Mise en réserve pour l'année $n+2$ des photoassimilats excédentaires au développement des structures reproductrices et végétatives.

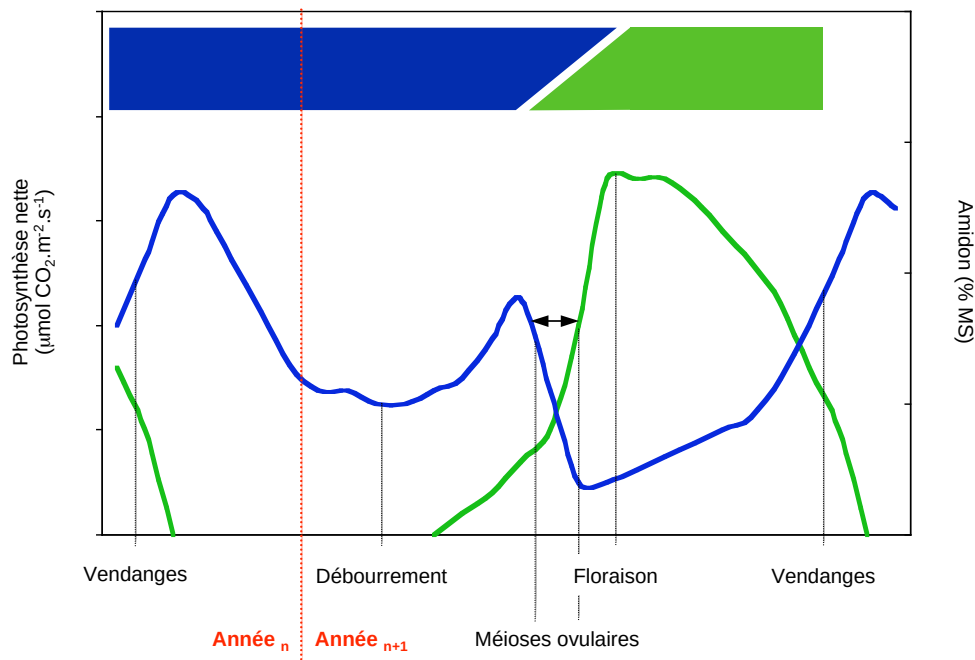


Figure 30. Cycle annuel de l'évolution de la teneur en amidon dans les parties pérennes et de la photosynthèse chez la Vigne. Importance relative de ces 2 paramètres sur le développement des organes reproducteurs et des baies.

La courbe bleue représente la teneur en amidon dans les parties pérennes et la courbe verte la photosynthèse. Les barres bleue et verte indiquent l'importance relative des réserves glucidiques et de la photosynthèse dans le développement des organes reproducteurs et des baies.

Plus précisément, par rapport aux travaux de Zapata (1998), la transition hétérotrophie/autotrophie a lieu avant la floraison autour de la période de méiose des ovules. Les réserves glucidiques jouent un rôle important dans la détermination du nombre d'inflorescences et du nombre de fleurs par inflorescences alors que l'assimilation photosynthétique interviendrait pour la nouaison et le développement des baies (Schultz *et al.* 1996 ; Bennett *et al.* 2002).

teneurs en amidon, saccharose, glucose et fructose entre les inflorescences issues de bouture fructifère et celles issues du vignoble.

Les boutures fructifères sont donc un modèle simplifié fiable d'étude de la floraison chez la vigne. Cependant, l'utilisation de ce modèle pour des expérimentations nécessite une étude préalable des similitudes et des différences de chaque paramètre obtenu au vignoble et avec ce modèle.

3. Quelle est l'influence de la mise en réserve des glucides lors de l'année n sur la floraison de l'année $n+1$?

L'étude de la mise en réserve et de l'impact de ces réserves sur la floraison menée au cours de 2 années successives a mis en évidence leur rôle primordial sur la floraison.

Tout d'abord, les glucides sont très fortement mis en réserve à partir de la véraison jusqu'à la sénescence (Lebon *et al.* 2005e). Contrairement aux conclusions d'une étude menée sur le Chardonnay (Bennett *et al.* 2002), la mise en réserve des glucides dans les bois n'est pas complète à la véraison. Il est donc important pour les viticulteurs de laisser les feuilles sur les plants de vigne après les vendanges. En effet, même si l'assimilation du CO_2 est moins importante après la véraison que durant l'été (Stoev 1952 ; Schultz *et al.* 1996 ; Bertamini et Nedunchezian 2003b), l'absence des grappes, et donc des puits majoritaires, permet aux photoassimilats de restaurer la quantité de réserves glucidiques nécessaires à la reprise du développement des structures végétatives et reproductrices peu avant le débourrement (Bates *et al.* 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004a, b). Comme nous l'avons vu précédemment, les réserves glucidiques sont importantes car elles sont les seules sources de glucides avant que la photosynthèse soit exportatrice et que la plante soit autotrophe. Ainsi, plus une plante accumulera de réserves glucidiques lors de l'été de l'année n , plus la transition hétérotrophie/autotrophie pourra avoir lieu tardivement lors de l'année $n+1$ sans avoir d'incidence sur la floraison. **La photosynthèse après la véraison de l'année n est nécessaire à la plante pour la restauration de ses réserves glucidiques qui seront utilisées durant la reprise du développement végétatif et reproducteur l'année $n+1$ (Fig. 30).**

Ensuite, la mise en réserve des glucides lors de l'année n influence de nombreux paramètres liés à la floraison. En effet, une faible mise en réserve induit des diminutions significatives du nombre de fleurs par inflorescence, du nombre de baies par grappe et du poids des grappes. L'assimilation de CO_2 lors de l'année $n+1$ n'intervient donc pas pour compenser une mise en réserve insuffisante lors de l'année n . De plus, les taux de nouaison de l'année $n+1$ ne sont pas affectés par la mise en réserve. **La vigne est donc capable d'ajuster le nombre de fleurs, puis de baies, en fonction des teneurs en glucides présentes dans les bois, montrant les capacités de cette plante à ajuster sa production à ses capacités.**

Enfin, l'étude de l'influence de la mise en réserve des glucides lors de l'année n sur la floraison de l'année $n+1$ a permis de mettre en relation les teneurs en glucides dans les bois et différents paramètres de la floraison. Ainsi, nous avons pu observer que ces paramètres étaient corrélés les uns avec les autres. Les paramètres de la floraison de l'année $n+1$ (nombre de fleurs par inflorescence, nombre de baies par grappe, poids de la récolte) peuvent être déterminés suite à un simple dosage de glucides (amidon et fructose) dans les bois de coupe durant l'hiver. Cet outil de prédiction des récoltes est donc facile à utiliser et très précoce. Cependant, des analyses complémentaires portant sur plusieurs années doivent être entreprises afin de parfaire cet outil.

La mise en réserve des glucides a lieu de la floraison jusqu'à (la sénescence et) la chute des feuilles. De plus, à partir de la véraison, la photosynthèse joue un grand rôle dans la mise en réserve des glucides puisqu'une grande partie de ces réserves sont accumulées à partir de cette période (Fig. 30). La quantité de glucides mise en réserve lors de l'année n est importante car elle influence de nombreux paramètres de la floraison de l'année $n+1$. Ainsi, une faible quantité de réserves glucidiques diminuera fortement les rendements de l'année suivante. Enfin, cette étude a permis d'obtenir un outil précoce de prédiction des récoltes à partir des teneurs en glucides des bois.

Perspectives



Les travaux initiés au cours de cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives de recherche concernant la floraison chez la vigne, les régulations du métabolisme glucidique dans les inflorescences et le devenir des photoassimilats et des réserves amylacées dans la plante.

4. Floraison

L'étude de la floraison et, en particulier du développement des structures reproductrices, a été réalisée au vignoble durant des campagnes à conditions climatiques standards (Langellier 2002 ; Langellier *et al.* 2003). En effet, aucun événement climatique particulier n'a perturbé nos analyses. Cependant, il est fréquent que des conditions particulièrement stressantes (froid, sécheresse ou précipitations importantes) surviennent durant la période de développement des structures reproductrices de la vigne. Ces facteurs environnementaux sont connus comme influant sur le succès reproducteur à plusieurs niveaux. Le manque d'eau affecte ainsi le développement des structures mâles et conduit souvent à leur avortement (Saini 1997). Chez la fève, cette absence d'eau fait même avorter l'ensemble de la fleur (Karamanos et Gimenez 1991). De même, les basses températures peuvent ralentir le développement des organes reproducteurs (Ebadi *et al.* 1995b) et diminuer le taux de nouaison (Ebadi *et al.* 1995a). Ainsi, les gelées tardives sont en général un facteur important de la perte de production (Addicott et Lynch 1955). Il serait donc intéressant d'**étudier l'impact de stress environnementaux (sécheresse et basses températures) contribuant à modifier l'équilibre physiologique de la plante pendant le développement floral**. Ces stress devraient notamment être appliqués sur des boutures fructifères lors des étapes clé du développement des structures reproductrices que sont les méioses ovulaires et polliniques, entre les stades 15 et 17. En effet, durant ces phases importantes du développement, les structures reproductrices sont très sensibles aux stress environnementaux (Dorion *et al.* 1996 ; Saini 1997). Les stress auraient alors un impact plus important et pourraient mener à l'avortement de ces structures, et donc à la coulure. Pour ces plantes, il serait intéressant de trouver un protocole induisant la coulure des fleurs. Ce modèle artificiel de coulure servirait alors tout au long de l'année et permettrait la multiplication des analyses. Chez la vigne, la coulure des fleurs de boutures fructifères a déjà été obtenue, mais elle était due à l'application de composés chimiques tels que les inhibiteurs de synthèse de polyamines (Aziz *et al.* 2001 ; Aziz 2003) et l'azote (Paczek 2002). En effet, la présence de 2 mM d' α -difluorométhylarginine (inhibiteur de l'arginine décarboxylase), de cyclohexylamine ou de β -

hydroxyéthylhydrazine (inhibiteurs de la spermidine synthase et des polyamines oxydases) dans la solution nutritive alimentant les boutures fructifères induit une augmentation de l'abscission de leurs organes floraux peu après (Aziz *et al.* 2001 ; Aziz 2003). Par ailleurs, les boutures fructifères cultivées dans un milieu à 1 mM d'azote sous forme de NO_3^- présentent une coulure excessive et celles cultivées dans un milieu à 12 mM se dessèchent et se nécrosent (Paczek 2002).

Les résultats présentés précédemment ont montré l'importance de la mise en réserve lors de l'année n sur le nombre de d'inflorescences et le nombre le nombre de fleurs par inflorescence l'année $n+1$ des 3 cépages champenois (Partie 2 - Publication 6). Une étude récente a montré que des orthologues de gènes intervenant dans la floraison d'*Arabidopsis thaliana* (*LEAFY*, *APETALA1*, *AGAMOUS*, *TERMINAL FLOWER1* et *SEPALLATA3*) sont présents chez le Riesling (Joly *et al.* 2004). L'expression de ces gènes est même nécessaire pour l'ontogenèse des fleurs car seuls les bourgeons latents qui se développent en pousses avec inflorescences les expriment. De plus, les variations de teneurs en glucides dans les méristèmes ont un impact direct sur le processus de floraison (Bernier *et al.* 1993). Comme la mise en réserve des glucides influe sur le nombre de fleurs par inflorescences, il serait intéressant d'**étudier l'impact des différents traitements appliqués l'année n (effeuillage total, égrappage total et témoin) sur l'expression des gènes intervenant lors de la floraison l'année $n+1$** . Cette étude porterait sur les différents stades du développement floral, du bourgeon d'hiver jusqu'aux fleurs ayant subi la méiose ovulaire (après le stade 17). Pour ce faire, la mise au point d'une puce à ADN avec l'ensemble de ces gènes présents chez le Riesling (Joly *et al.* 2004) devrait être entreprise. D'autres puces à ADN chez la vigne devraient être utilisées afin d'élargir le nombre de gènes analysés. Ces études permettraient de connaître l'expression de chaque gène en fonction des différents niveaux de mise en réserve. Les résultats attendus de cette étude sont la répression ou l'induction de l'expression de certains gènes en fonction de la quantité de réserve glucidique. De plus, la localisation de ces protéines au niveau de la fleur serait réalisée par hybridation *in situ* lors de son développement. Il est en effet important de connaître les tissus dans lesquels sont exprimées les protéines.

Une étude parallèle avec le modèle bouture fructifère devrait être menée afin de connaître plus précisément l'impact des glucides sur la floraison. L'utilité du modèle résidera dans la possibilité d'alimenter les plantes avec des solutions glucidiques dont la composition

est connue. Les glucides choisis sont le glucose, le fructose et le saccharose car ils sont majoritaires chez la vigne (Glad *et al.* 1992). De plus, leur rôle dans l'initiation de la floraison est déjà très largement documentée (Bernier *et al.* 1993 ; Lejeune *et al.* 1993 ; Levy et Dean 1998 ; Zhou *et al.* 1998 ; Gazzarrini et McCourt 2001). Les concentrations de glucides seraient variables afin de connaître les seuils d'activation et de répression de l'expression des gènes : dans tous les cas, les concentrations employées seraient comparables à celles qui sont employées dans d'autres études et varieraient entre 0 et 5%. Là aussi, cette étude serait basée sur une puce à ADN avec les gènes *LEAFY*, *APETALA1*, *AGAMOUS*, *TERMINAL FLOWER1* et *SEPALLATA3* de vigne afin de différencier les différents niveaux d'expression de ces gènes.

5. Régulation du métabolisme glucidique lors du développement floral

Les analyses que nous avons menées au vignoble sur le métabolisme glucidique ont montré que l'évolution des teneurs en glucides (glucose, fructose, saccharose et amidon) dans les inflorescences est le résultat d'un métabolisme glucidique différent entre le GW et le PN et serait une des causes expliquant la sensibilité différente à la coulure de ces cépages. Pendant tout le développement des fleurs, ces concentrations sont le résultat d'un équilibre entre plusieurs processus. Aussi, il serait intéressant d'***appliquer divers traitements chimiques visant à modifier le métabolisme glucidique de la plante pendant le développement floral.***

Plusieurs mécanismes peuvent être la cible de ces traitements. La photosynthèse étant à la base du métabolisme glucidique, la répression de son fonctionnement devrait être entreprise afin de connaître le rôle des réserves glucidiques dans la floraison. Tout d'abord, l'application d'inhibiteurs de photosynthèse, comme l'atrazine qui inhibe la photosynthèse au niveau du photosystème II en bloquant le transport des électrons et le transfert de l'énergie lumineuse, à certaines périodes du développement floral permettrait de connaître son importance sur la croissance des inflorescences, puis des grappes. La période comprise entre les stades 15 et 17 devrait être particulièrement étudiée car la photosynthèse y devient en effet la source principale de glucides (Fig. 30). L'inhibition de la photosynthèse à ces stades ferait devenir les réserves amylacées comme seules sources de glucides disponibles pour l'ensemble du développement, des inflorescences jusqu'aux grappes.

Dans le but de réduire l'activité photosynthétique, l'apport exogène de glucides à la plante permettrait de modifier la photosynthèse. En effet, l'abondance de glucides dans les cellules inhibe la photosynthèse, la croissance et la mise en réserve des glucides *via* un rétro-contrôle négatif (Koch 1996). Déjà, quelques gènes spécifiques de la vigne codant pour des protéines impliquées dans la photosynthèse et dans le métabolisme glucidique sont connus (Bézier 2003). Leur utilisation sur une puce à ADN permettrait alors de connaître les gènes dont l'expression est régulée par les glucides. En parallèle à cette étude moléculaire, des mesures de l'activité photosynthétique grâce au Li-Cor et des teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b, caroténoïdes) devront être entreprises.

À l'opposé, l'importance de la photosynthèse de chaque organe pour son développement et sa croissance devrait aussi être étudiée. En effet, nous avons montré que les feuilles et les inflorescences assimilent le CO₂ (Lebon *et al.* 2005b). Cependant, nous ne savons pas si les inflorescences peuvent se développer uniquement grâce aux photoassimilats qu'elles produisent. L'annulation des pédoncules floraux et des pétioles des feuilles permettrait de stopper tout apport de glucides *via* la sève élaborée. Cette technique très simple apporterait de nombreuses informations sur les relations sources/puits.

Aussi, l'inhibition du transport des glucides au niveau des feuilles et/ou des inflorescences devrait être envisagée grâce à des techniques non destructrices. Pour cela, l'utilisation d'inhibiteurs de transport des glucides, comme la phlorizine (inhibiteur du transport des hexoses), devrait être analysée. L'application de telles substances sur les différents organes permettrait en effet de modifier les apports de glucides aux différents organes sans induire de stress physiques (contrairement à l'annulation) (Getz *et al.* 1987 ; Stubbs *et al.* 2004).

De nombreuses activités enzymatiques liées au métabolisme glucidique ont été dosées, ce qui a montré qu'elles sont la cause des différences de concentrations en glucides des inflorescences de GW et de PN (Lebon *et al.* 2005a). Cependant, d'autres enzymes interviennent en amont de ce métabolisme et y participent. Ainsi, il faudrait doser l'activité enzymatique RubisCo (ribulose biphosphate carboxylase/oxygénase). Cette enzyme est en effet indispensable à la photosynthèse car elle seule permet la fixation du CO₂ atmosphérique ; sans son action, aucun glucide ne peut être formé. Ainsi, une faible activité ou une concentration insuffisante de cette enzyme dans les feuilles provoque une diminution significative de la photosynthèse (Hunter *et al.* 1994). De plus, l'activité enzymatique PEP

carboxylase (phosphoenolpyruvate carboxylase) devrait être dosée. Cette enzyme est une des enzymes fixant du carbone suite à la synthèse d'oxaloacétate et à la libération de Pi à partir du PEP (phosphoenolpyruvate) et HCO_3^- (Izui *et al.* 2004). Elle permet ainsi le réapprovisionnement d'oxaloacétate nécessaire à la respiration. Une faible activité de cette enzyme réduirait voire arrêterait la respiration cellulaire, empêchant alors toute production d'énergie.

L'étude des activités enzymatiques n'est pas suffisante pour bien appréhender les régulations du métabolisme glucidique. ***Les analyses plus fines de régulation des gènes doivent donc être entreprises.*** L'étude de l'expression de certains gènes du métabolisme glucidique semble être primordiale pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la floraison chez la vigne.

L'expression des gènes codant pour les invertases doit être étudiée durant le développement de la fleur. En effet, l'activité de ces gènes est très fortement régulée par les hexoses (Roitsch et Gonzalez 2004) et ces enzymes interviennent dans de nombreux mécanismes dont la répartition des glucides dans les différents organes de la plante (Ehness *et al.* 1997), le développement des structures reproductrices (Goetz *et al.* 2001) et les réponses aux stress (Roitsch et Gonzalez 2004). Par ailleurs, l' α - et la β -amylases jouent un rôle capital dans le métabolisme glucidique car elles dégradent l'amidon et permettent ainsi l'utilisation des réserves par la plante (Smith *et al.* 2003). Aussi, l'activité de ces enzymes présente des différences significatives entre le GW et le PN. Ensuite, l'expression du gène codant pour la PEPcarboxylase et celles des gènes nucléaire et plastidial codant pour la RubisCo devrait être analysée car ces enzymes sont à la base du métabolisme glucidique. Il serait de plus intéressant de connaître les écarts d'expression de ce gène au niveau des fleurs et des feuilles. Enfin, la translocation des glucides des organes source vers les organes puits nécessitent le transport de la forme de transport des glucides, le saccharose. Les transporteurs de saccharose jouent donc un rôle prépondérant dans la translocation et l'apport des glucides aux organes puits (Bush 1999 ; Lalonde *et al.* 1999). L'étude de l'expression et de la régulation des gènes des transporteurs de glucides, et notamment ceux de saccharose, permettrait de mieux comprendre les relations source/puits entre les différents tissus.

6. Suivi des photoassimilats et des réserves glucidiques

Les données obtenues lors des expérimentations de cette thèse ont montré que l'assimilation du CO₂ variait entre les 2 cépages et pourrait expliquer leur sensibilité différente à la coulure (Lebon *et al.* 2005b). De plus, la mise en réserve des glucides est dépendante de la photosynthèse, qui est exportatrice de la floraison à la chute des feuilles (Stoev 1952 ; Schultz *et al.* 1996 ; Bertamini et Nedunchezian 2003b). La photosynthèse semble donc être un des facteurs centraux de la sensibilité à la coulure. Cependant, le devenir des photoassimilats n'a pas été étudié lors de cette thèse. Il serait donc intéressant de ***suivre le devenir de ces glucides dans la plante au cours du temps grâce à l'utilisation de substances marquées (¹³CO₂) sur des plantes en pot.*** Actuellement, l'utilisation de tels produits est largement développée pour mieux appréhender la physiologie de la vigne (Vanden Heuvel *et al.* 2002 ; Morinaga *et al.* 2003). Cette technique semble tout à fait adaptée dans le cadre d'une étude sur les photoassimilats. Elle permettra ainsi de connaître la distribution des produits de photosynthèse dans les différents organes reproducteurs et végétatifs de la plante au cours d'une campagne, et donc l'attractivité de chaque organe en fonction de sa force-puits. Certaines plantes marquées devront cependant être conservées 1, 2 ou 3 années supplémentaires car une partie des photoassimilats est mise en réserve et utilisée les années suivantes ; il sera donc possible de connaître la distribution des réserves accumulées lors de l'année n , présents dans les parties végétatives et reproductrices des années $n+1$ et $n+2$ et la durée du stockage des réserves glucidiques chez la vigne.

Parallèlement à l'étude sur le devenir des photoassimilats, il serait utile de ***connaître l'apport des réserves et leur distribution respective dans les différents organes végétatifs et reproducteurs au cours du développement floral grâce à l'utilisation de saccharose ¹⁴C sur des plantes en pot et/ou sur boutures fructifères.*** Le saccharose étant la forme majeur sous laquelle les glucides sont transportés, un isotope marqué devra être utilisé afin de faciliter sa migration dans la plante. Il est important de connaître le devenir des réserves amylacées car elles sont la seule source de glucides avant la mise en place de la photosynthèse (Scholefield *et al.* 1978 ; Huglin et Schneider 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004b). Elles assurent donc le développement des structures reproductrices et végétatives au printemps (Bates *et al.* 1998 ; Zapata 1998 ; Zapata *et al.* 2004a, b).

La mise en place de ces 2 expériences permettrait de connaître l'apport glucidique de la photosynthèse et de la mobilisation des réserves pour chaque organe lors de la floraison.

7. Outil de prédiction des récoltes

Les derniers travaux présentés lors de cette thèse (Partie 2 - Publication 6) montraient la possibilité de prévoir le nombre de fleurs par inflorescence, le nombre de baies par grappes et le poids de la future récolte grâce aux teneurs en glucides des bois coupés l'hiver. Afin de valider cet outil de prédiction des récoltes, il paraît nécessaire de refaire des expérimentations au vignoble afin de vérifier de la fiabilité du modèle. De plus, ce contrôle permettra d'affiner les résultats et de pouvoir transmettre un outil fiable et facilement utilisable par les professionnels. Ensuite, les résultats montrent que la maîtrise des rendements serait possible en contrôlant la quantité de réserves des bois. Il serait donc utile de contrôler plus précisément la mise en réserve de l'année n afin d'atteindre les rendements désirés de l'année $n+1$. En effet, une diminution des rendements actuels vers les normes I.N.A.O. ferait économiser de la main d'œuvre aux viticulteurs. Changer la période d'effeuillage afin d'atteindre les quantités de réserves attendues dans les bois permettrait ainsi de limiter les rendements.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992)** Ethylene in plant biology. 2nd Edition, Academic Press, San Diego, 414 p.
- Adachi M, Kawabata S, Sakiyama R (2000)** Effects of temperature and stem length on changes in carbohydrate content in summer-grown cut chrysanthemums during development and senescence. *Postharvest Biology and Technology* **20**, 63-70.
- Adams DO, Yang SF (1977)** Methionine metabolism in apple tissue. Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiology* **60**, 892-896.
- Addicott FT, Lynch RS (1955)** Physiology of abscission. *Annual Reviews of Plant Physiology* **6**, 211-238.
- Addicott FT, Lyon JL (1973)** Physiological ecology of abscission. In *Shedding of Plant Parts*, ed. Kozlowski TT, NY : Academic, pp. 85-124.
- Agaoglu YS (1971)** A study of the differentiation and the development of floral parts in grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **10**, 20-26.
- Agüero C, Riquelme C, Tizio R (1995)** Embryo rescue from seedless grapevines (*Vitis vinifera* L.) treated with growth retardants. *Vitis* **34(2)**, 73-76.
- Aigrain P (2002)** Conjoncture mondiale - note Office International de la Vigne et du Vin. *Onivins Infos* **94**, 1-16.
- Aït Barka E, Audran JC (1996)** Réponse des vignes champenoises aux températures négatives : effet d'un refroidissement contrôlé sur les réserves glucidiques du complexe gemmaire avant et au cours du débourrement. *Canadian Journal of Botany* **74**, 492-505.
- Allen DJ, Ort DR (2001)** Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* **6(1)**, 36-42.
- Allen DJ, Ratner K, Giller YE, Gussakovsky EE, Shahak Y, Ort DR (2000)** An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Experimental Botany* **51(352)**, 1893-1902.
- Allen JF, Alexciev K, Hakansson G (1995)** Photosynthesis : regulation by redox signalling. *Current Biology* **5(8)**, 569-572.
- Alleweldt G, Balkelma GH (1965)** Über die anlage von infloreszenz-und Blüten-primordien in den Winternospen der Rebe. *Zeitung von Acker-Pflanzenbau* **123**, 59-74.

- Aloni B, Peet M, Pharr M, Karni L (2001)** The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiologia Plantarum* **112**, 505-512.
- Araki T (2001)** Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(1), 63-68.
- Aranjuelo I, Irigoyen JJ, Perez P, Martinez-Carrasco R, Sanchez-Diaz M (2005)** The use of temperature gradient tunnels for studying the combined effect of CO₂, temperature and water availability in N₂ fixing alfalfa plants. *Annals of Applied Biology* **146**(1), 51-60.
- Araujo FJ, Williams LE (1988)** Dry matter and nitrogen partitioning and root growth of young field-grown Thompson Seedless grapevines. *Vitis* **27**, 21-32.
- Archbold DD, Dennis FG (1985)** Strawberry receptacle growth and endogenous IAA content as affected by growth regulator application and achene removal. *Journal of American Society of Horticultural Science* **110**, 816-820.
- Aziz A (2003)** Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in *Vitis vinifera* L.: possible relationships with initial fruitlet abscission. *Journal of Experimental Botany* **54**(381), 355-363.
- Aziz A, Brun O, Audran JC (2001)** Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Physiologia Plantarum* **113**, 50-58.
- Baggiolini M (1952)** Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture* **8**(1), 4-6.
- Balibrea ME, Santa Cruz AM, Bolarin MC, Perez-Alfocea F (1996)** Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. *Plant Science* **118**, 47-55.
- Bates TR, Dunst RM, Joy P (2002)** Seasonal dry matter, starch, and nutrient distribution in 'concord' grapevine roots. *HortScience* **37**, 313-316.
- Batley NH, Tooke F (2002)** Molecular control and variation in the floral transition. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 62-68.
- Bazzaz FA, Carlson RW, Harper JL (1979)** Contribution to reproductive effort by photosynthesis of flowers and fruits. *Nature* **279**, 554-555.
- Benharbit el Alami N (1995)** Recherches sur le développement normal et anormal du gynécée de *Vitis vinifera* L. du bouton floral à la fleur fécondée. Importance des tanins vacuolaires et relation avec la coulure. Thèse, Université de Bordeaux II, 131 p.

- Bennett J, Trought MCT, Jarvis P (2002)** The importance of over-wintering carbohydrates on inflorescence development and yield potential. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* **456**, 70-72.
- Bergmann DC (2004)** Integrating signals in stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 26-32.
- Bernard AC, Chalias C (1986)** Chronologie de la sporogénèse, dans le midi, chez *Vitis vinifera* L. *Progrès Agricole et Viticole* **103(12)**, 311-317.
- Bernard AC, Chalias C (1987)** Chronologie de la sporogénèse chez *Vitis vinifera* L. *Progrès Agricole et Viticole* **112**, 80-86.
- Bernier G (1988)** The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 175-219.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P (1993)** Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* **5**, 1147-1155.
- Bernier G, Kinet JM, Sachs RM (1981)** The physiology of flowering. Volume I, CRC Press, Boca Raton.
- Berry J, Björkman O (1980)** Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 491-543.
- Bertamini M, Nedunchezian N (2003a)** Photoinhibition of photosynthesis in mature and young leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Science* **164(4)**, 635-644.
- Bertamini M, Nedunchezian N (2003b)** Photosynthetic functioning of individual grapevine leaves (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) during ontogeny in the field. *Vitis* **42(1)**, 13-17.
- Bessis R (1965)** Recherches sur la fertilité et les corrélations de croissance entre bourgeons chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). Thèse, Université de Dijon, 238 p.
- Bessis R, Charpentier N, Hilt C, Fournioux JC (2000)** Grapevine fruit set : physiology of the abscission zone. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 125-130.
- Bessis R, Fournioux JC (1992)** Abscission zone and berry drop in grapevine. *Vitis* **31(1)**, 9-21.
- Bettner W, Müller U, Schall B (1986)** Untersuchungen zum Wachstumsrhythmus und zum Gehalt an Nährstoffen in ein-jährigen Rebtrieben bei den Sorten Kerner und Optima. Teil 1 : Wachstumsrhythmus ; Teil 2 : Nährstoffgehalt. *Wein Wissenschaft* **41**, 147-169.
- Bézier A (2003)** Caractérisation de gènes de défense exprimés par la vigne en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea* par la technique de Differential Display RT-PCR. Thèse, Université de Reims, 337 p.
- Bieleski R, Elgar J, Heyes J (2000)** Mechanical aspects of rapid flower opening in Asiatic

- lily. *Annals of Botany* **86**, 1175-1183.
- Birkhold KT, Koch KE, Darnell RL (1992)** Carbon and nitrogen economy of developing rabbiteye blueberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**, 139-145.
- Bodson M, Outlaw WHJR (1985)** Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiology* **79**, 420-424.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004)** Multiple pathways in the decision to flower : enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* **16**, S18-S31.
- Boss PK, Buckeridge EJ, Poole A, Thomas MR (2003)** New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* **30**, 593-606.
- Boss PK, Thomas MR (2002)** Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**, 847-850.
- Bota J, Stasyk O, Flexas J, Medrano H (2004)** Effect of water stress on partitioning of ¹⁴C-labelled photosynthates in *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology* **31**, 697-708.
- Bouard J (1966)** Recherches physiologiques sur la vigne et en particulier sur l'aoûtement des sarments. Thèse, Université of Bordeaux.
- Bouard J (1978)** Possibilités de développement des ovules et qualité des pépins de raisin en fonction du rang des grappes sur des sarments. Génétique et amélioration de la Vigne, INRA Edition, 59-67.
- Bouard J, Broquedis M, Koussa T (1996)** L'acide abscissique et son rôle dans la dormance des bourgeons latents de vigne et dans la véraison des baies de raisin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **HS**.
- Branas J (1957)** La coulure, maladie physiologique. *Progrès Agricole et Viticole* **74**, 273-279.
- Britz SJ, Robinson M (2001)** Chronic ozone exposure and photosynthate partitioning into starch in soybean leaves. *International Journal of Plant Science* **162(1)**, 111-117.
- Bush DR (1999)** Sugar transporters in plant biology. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 187-191.
- Buttrose MS (1970)** Fruitfulness in grapevines : the response of different cultivars to light, temperature and day length. *Vitis* **9**, 455-464.
- Buttrose MS (1974)** Climatic factors and fruitfulness in grapevines. *Horticultural Abstracts* **44**, 319-326.
- Buttrose MS, Hale CR (1973)** Effect of temperature on development of the grapevine inflorescence after bud burst. *American Journal of Enology and Viticulture* **24**, 14-16.

- Byers RE, Carbaugh DH, Presley CN, Wolf TK (1991)** The influence of low light on apple fruit abscission. *Journal of Horticultural Science* **66**, 7-17.
- Byers RE, Lyons CG, Yoder KS, Barden JA, Young RW (1985)** Peach and apple thinning by shading and photosynthetic inhibition. *Journal of Horticultural Science* **60**, 465-472.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Candolfi MP, Koblet W (1994)** Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta* **192**, 567-573.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Koblet W (1990)** Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - evidence of compensation and stress recovering. *Vitis* **29**, 199-221.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Koblet W (1991)** Influences of partial defoliation on gas exchange parameters and chlorophyll content of field-grown grapevines: mechanisms and limitations of the compensation capacity. *Vitis* **30**, 129-141.
- Caporali E, Spada A, Marziani G, Failla O, Scienza A (2003)** The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*. *Sexual Plant Reproduction* **15**, 291-300.
- Carbonneau A (1983)** Stérilités mâles et femelles dans le genre *Vitis* I et II. Modélisation de leur hérédité. Conséquence en génétique et sélection. *Agronomie* **3(7)**, 635-649.
- Carew JG, Mahmood K, Darby J, Hadley P, Battey NH (2003)** The effect of temperature, photosynthetic photon flux density, and photoperiod on the vegetative growth and flowering of 'Autumn Bliss' raspberry. *Journal of American Society for Horticultural Science* **128(3)**, 291-296.
- Cargnello G, Carraro L, Lombardo G, Gerola FM (1980)** Pollen morphology of Picolit grown in different italian regions. *Vitis* **19**, 201-206.
- Caspari H, Lang A, Alspach P (1998)** Effects of Girdling and Leaf Removal on Fruit Set and Vegetative Growth in Grape. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 359-366.
- Chadefaud M, Emberger L (1960)** Les végétaux vasculaires. Traité de Botanique, Volume 2. Masson, Paris. 1450 p.
- Charlesworth D (1989)** Evolution of low female fertility in plants : pollen limitation, resource allocation and genetic load. *Trends in Ecology and Evolution* **4**, 289-292.
- Chaumont M (1995)** Régulation de la photosynthèse chez la vigne (*Vitis vinifera* L.) dans différentes conditions d'environnement. Thèse, Université Paris XI-Orsay, 98 p.

- Chaumont M, Morot-Gaudry JF, Foyer CH (1994)** Seasonal and diurnal changes in photosynthesis and carbon partitioning in *Vitis vinifera* leaves in vines with and without fruit. *Journal of Experimental Botany* **45**(278), 1235-1243.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Latché A, Lamon J, Bouzayen M (2004)** Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science* **167**, 1301-1305.
- Cheung AY (1996)** Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. *Trends in Plant Science* **1**(2), 45-51.
- Chuck G, Hake S (2005)** regulation of developmental transitions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 67-70.
- Clark SE (2001)** Meristems : start your signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 28-32.
- Clément C, Burrus M, Audran JC (1996)** Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium*. *American Journal of Botany* **83**(4), 459-469.
- Clément C, Chavant L, Burrus M, Audran JC (1994)** Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. *Sexual Plant Reproduction* **7**, 347-356.
- Clément C, Mischler P, Burrus M, Audran JC (1997)** Characteristics of the photosynthetic apparatus and CO₂-fixation in the flower bud of *Lilium*. II. Corolla. *International Journal of Plant Science* **158**, 794-800.
- Colin L (2000)** Influence de traitements à base de polyamines et d'inhibiteurs de leur biosynthèse sur les teneurs des différentes polyamines et de l'acide abscissique au cours de la floraison des grappes et au début du développement des baies de raisin. Relations avec la coulure et le millérandage. Thèse, Université Bordeaux 2, 214 p.
- Collier DE (1997)** Changes in respiration, protein and carbohydrates of tulip tepals and *Alstroemeria* petals during development. *Journal of Plant Physiology* **150**, 446-451.
- Considine JA, Knox RB (1979)** Development and histochemistry of the pistil of the grape, *Vitis vinifera*. *Annals of Botany* **43**, 11-22.
- Coombe BG (1992)** Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 101-110.
- Coombe BG, Bovio M, Schneider A (1987)** Solute accumulation by grape pericarp cells. *Journal of Experimental Botany* **38**(196), 1789-1798.
- Coombe BG, McCarthy MG (2000)** Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 131-135.

- Corbesier L, Bernier G, Périlleux C (2002)** C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Physiology* **43**(6), 684-688.
- Corbesier L, Havelane A, Lejeune P, Bernier G, Périlleux C (2001)** N content of phloem and xylem exudates during the transition to flowering in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **24**, 367-375.
- Corbesier L, Lejeune P, Bernier G (1998)** The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana* : comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* **206**, 131-137.
- de Souza CR, Maroco JP, dos Santos TP, Rodrigues ML, Lopes CM, Pereira JS, Chaves MM (2003)** Partial rootzone drying : regulation of stomatal aperture and carbon assimilation in field-grown grapevines (*Vitis vinifera* cv. Moscatel). *Functional Plant Biology* **30**, 653-662.
- del Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C (2005)** Hormonal control of the plant cycle. *Physiologia Plantarum* **123**, 173-183.
- Dickens CWS et van Staden J (1988)** The induction of flowering *in vitro*. *South African Journal of Botany* **54**, 325-344.
- Dielen V, Lecouvet V, Dupont S, Kinet JM (2001)** *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering *uniflora* mutant. *Journal of Experimental Botany* **52**(357), 715-723.
- Dokoozlian NK, Ebisuda NC, Hashim JM (2001)** Gibberellic acid bloom sprays reduce fruit set improve package yield of “Autumn Royal” table grapes. *Journal of American Pomological Society* **55**(1), 52-57.
- Dorion S, Lalonde S, Saini HS (1996)** Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiology* **111**, 137-145.
- Downton WJS, Grant WJR, Loveys BR (1987)** Diurnal changes in the photosynthesis of field-grown grape vines. *New Phytologist* **105**, 71-80.
- Dry PR, Coombe BG (1994)** Primary bud-axis necrosis of grapevines. I. Natural incidence and correlation with vigor. *Vitis* **33**, 225-230.
- Duchêne E, Monamy C, Langellier F, Jaegli N, Salber R, Meluc D, Panigai L (2003)** Effects of the ripening conditions in the vineyard on growth and yield components in

- the following season. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **37(2)**, 103-116.
- Düring H (2003)** Stomatal and mesophyll conductances control CO₂ transfer to chloroplasts in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **42(2)**, 65-68.
- Dutruc-Rosset G (2001)** Extrait du rapport sur la vitiviniculture mondiale, 26^{ème} Congrès, Adélaïde, Australie. *Lettre de l'Office International de la Vigne et du Vin* 1-4.
- Ebadi A, Coombe BG et May P (1995a)** Fruit-set on small Chardonnay and Shiraz vines grown under varying temperature regimes between budburst and flowering. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1**, 3-10.
- Ebadi A, May P, Sedgley M, Coombe BG (1995b)** Effect of low temperature near flowering time on ovule development and pollen tube growth in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), cvs Chardonnay and Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1**, 11-18.
- Ebadi A, Sedgley M, May P, Coombe BG (1996)** Seed development and abortion in *Vitis vinifera* L., cv. Chardonnay. *International Journal of Plant Sciences* **157(6)**, 703-712.
- Egea-Cortines M, Mierahi Y (1991)** Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. In *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, eds. Slocum R et Flores HE, CRC Press, Boca Raton, pp. 144-154.
- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T (1997)** Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* **9**, 1825-1841.
- Eichhorn KW, Lorenz H (1977)** Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. Nachrichten des deutschen Pflanzen - schutzdienst Deutsche. *Weinbau* **29**, 119-120.
- Eifert J, Panczel M, Eifert A (1960)** Änderung des Starke und Zuckergehaltes der Rebe während der Ruheperiode. *Vitis* **2**, 257-264.
- Eimert K, Wang Sm, Lue W, Chen J (1995)** Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in Arabidopsis. *The Plant Cell* **7**, 1703-1712.
- Eisinger W, Swartz TE, Bogomolni RA, Taiz L (2000)** The ultraviolet action spectrum for stomatal opening in broad bean. *Plant Physiology* **122**, 99-105.
- Erickson AN, Markhart AH (2002)** Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell and Environment* **25(1)**, 123-130.

- Escalona JM, Flexas J, Medrano H (1999)** Stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 421-433.
- Ewart A, Kliewer WM (1977)** Effects of controlled day and night temperatures and nitrogen on fruit set, ovule fertility and fruit composition of several wine grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* **28(2)**, 88-95.
- Ezzili B (1997)** Influence des gibberellines sur la fertilité et la teneur en éléments minéraux des feuilles de cépage Grenache noir (*Vitis vinifera* L.). *MHA* **8(23)**, 34-39.
- Finkelstein RR, Gibson SI (2002)** ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 26-32.
- Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H (2002)** Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions : an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* **29**, 461-471.
- Flexas J, Escalona JM, Medrano H (1998)** Down-regulation of photosynthesis by drought under field condition in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**, 893-900.
- Flexas J, Escalona JM, Medrano H (1999)** Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment* **22**, 39-48.
- Fougère-Rifot M, Benharbit El Alami N, Brun O, Bouard J (1993)** Relations entre le développement défectueux des ovaires et l'involution des ovules chez *Vitis vinifera* L. var. Chardonnay.. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **27(2)**, 99-112.
- Fougère-Rifot M, Bouard J (1992)** Evolution de l'ovaire en rapport avec la coulure chez deux variétés de *Vitis vinifera* L., le Merlot et le Chardonnay. *De la Vigne au Vin : les actualités de la Recherche, INRA-VITI* **92**, 22-26.
- Fougère-Rifot M, Park HS, Benharbit El Alami N, Bouard J (1996)** Anomalies de la structure des fleurs de vigne et des baies de raisin en relation avec la coulure et le millérandage. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **HS**, 47-52.
- Fournioux JC (2001)** Demonstration of a correlation between young leaves, apex and young bunches specific to a young grapevine cutting in the first period of its development. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **35(3)**, 117-127.

- Foyer C, Vanacker H, Gomez LD, Harbinson J (2002)** Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures : review. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 659-668.
- Franssen-Verheijen AAW, Willemse MTM (1993)** Microphylar exudate in *Gasteria* (Aloaceae) and its possible function in pollen tube growth. *American Journal of Botany* **80**, 253-262.
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA, Baker NR (1998)** Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* **116**, 571-580.
- Gaude T, McCormick S (1999)** Signaling in pollen-pistil interactions. *Cell and Developmental Biology* **10**, 139-147.
- Gazzarrini S, McCourt P (2001)** Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 387-391.
- Gény L (1997)** Les polyamines libres et conjuguées dans le modèle ‘‘boutures fructifères’’ de Vigne. Influence de l’azote et du potassium et des inhibiteurs de la biosynthèse des polyamines. Thèse, Université Bordeaux 2, 220 p.
- Gény L, Ollat N, Soyer JP (1998)** Les boutures fructifères de vigne : validation d’un modèle d’étude de la physiologie de la vigne. II. Etude du développement de la grappe. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **32(2)**, 83-90.
- Gerrath JM (1993)** Developmental morphology and anatomy of grape flowers. *Horticultural Review* **13**, 315-337.
- Gerrath JM, Posluszny U (1988)** Morphological and anatomical development in the Vitaceae. II. Floral development in *Vitis riparia*. *Canadian Journal of Botany* **66**, 1334-1351.
- Getz HP, Knauer D, Willenbrink J (1987)** Transport of sugars across the plasma membrane of beetroot protoplasts. *Planta* **171**, 185-196.
- Gibson SI (2005)** Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 93-102.
- Glad C (1992)** Origine, gestion et transport des assimilats chez la vigne. Thèse, Université Paris 6, 69 p.
- Glad C, Regnard JL, Querou Y, Brun O, Morot-Gaudry JF (1992)** Flux and chemical composition of xylem exudates from Chardonnay grapevines : temporal evolution and effect of recut. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 275-282.

- Goetz M, Godt DE, Guivarch A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T (2001)** Induction of male-sterility by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6522-6527.
- Goldschmidt EE, Koch KE (1996)** Citrus. In Photoassimilate distribution in plants and crops : source-sink relations. Eds. E. Zaminski and AA Schaffer. Marcel Dekker, New York, 797-823.
- Gomez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2000)** Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in *Citrus*. *Planta* **210**, 636-643.
- Gonzalez-Carranza ZH, Lozoya-Gloria E, Roberts JA (1997)** Recent developments in abscission : shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science* **3(1)**, 10-14.
- Grantz DA, Assmann SM (1991)** Stomatal response to blue light : water use efficiency in sugarcane and soybean. *Plant, Cell and Environment* **14**, 683-690.
- Griffon E (1905)** L'assimilation chlorophyllienne chez les jeunes pousses des plantes. Application à la vigne. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* **140**, 1148-1151.
- Haldimann P, Feller U (2005)** Growth at moderately elevated temperature alters the physiological response of photosynthetic apparatus to heat stress in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment* **28**, 302-317.
- Hale C, Weaver RJ (1962)** The effect of developmental stage on direction of translocation of photosynthate in *Vitis vinifera*. *Hilgardia* **33(3)**, 89-131.
- Hammond JBW (1982)** Changes in amylase activity during rose bud opening. *Scientia Horticulturae* **16**, 283-289.
- Hellman EW (2003)** Grapevine structure and function. In Oregon Viticulture. Oregon State University Press. Corvallis, Oregon, 264 p.
- Hellmann H, Barker L, Funck D, Frommer WB (2000)** The regulation of assimilate allocation and transport. *Australian Journal of Plant Physiology* **27(6)**, 583-594.
- Hendrickson L, Ball MC, Wood JT, Chow WS, Furbank RT (2004)** Low temperature effects on photosynthesis and growth of grapevine. *Plant, Cell and Environment* **27**, 795-809.
- Herrero M (2001)** Ovary signals for directional pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* **14**, 3-7.
- Herrero M, Dickinson HG (1979)** Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida* : changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *Journal of Cell*

- Science* **36**, 1-18.
- Herrero M, Hormaza JI (1996)** Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* **9**, 343-347.
- Hieke S, Menzel CM, Lüdders P (2002)** Effects of leaf, shoot and fruit development on photosynthesis of lychee trees (*Litchi chinensis*). *Tree Physiology* **22**, 955-961.
- Hilt C (2001)** Etude du fonctionnement de la zone d'abscission chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). Relations avec l'éthylène. Thèse, Université de Bourgogne, 120 p.
- Hilt C, Bessis R (2000)** An *in vitro* model to study abscission in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **39(2)**, 85-86.
- Hilt C, Bessis R (2003)** Abscission of grapevine fruitlets in relation to ethylene biosynthesis. *Vitis* **42(1)**, 1-3.
- Ho LC (1988)** Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology* **39**, 355-378.
- Hopkins WG (1999)** Physiologie végétale. 2nd Edition, De Boeck Université Editions, San Bruxelles, 514 p.
- Hoque E, Remus G (1999)** Natural UV-screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) needles. *Photochemistry and Photobiology* **69**, 177-192.
- Houssa P, Bernier G, Kinet JM (1991)** Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in leaf exudate of the short-day plant, *Xanthium strumarium* L. during floral transition. *Journal of Plant Physiology* **138**, 24-28.
- Huglin P (1960)** Altération de la floraison de la vigne. Annales de l'Amélioration des Plantes, pp. 351-358.
- Huglin P (1986)** Biologie et écologie de la vigne. Payot (Eds), Lausanne, 371 p.
- Huglin P, Balthazard J (1961)** Observations préliminaires concernant la coulure du Muscat Ottonel. *Vins d'Alsace* 122-129.
- Huglin P, Schneider C (1998)** Biologie et écologie de la vigne. Lavoisier Tech. Doc. 2^{ème} édition, 372 p.
- Hunter JJ, Skrivan R, Ruffner HP (1994)** Diurnal and seasonal physiological changes in *Vitis vinifera* : CO₂ assimilation rates, sugar levels and sucrolytic activity. *Vitis* **33**, 189-195.
- Iba K (2002)** Acclimate response to temperature stress in higher plants : approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 225-245.
- Iglesias DJ, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2003)** Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiology* **23**, 199-204.

- Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y (2004)** Phosphoenolpyruvate carboxylase : a new era of structural biology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **55**, 69-84.
- Jackson DI (1991)** Environmental and hormonal effects on development of early bunch stem necrosis. *American Journal of Enology and Viticulture* **42(4)**, 290-294.
- Jackson DI, Coombe BG (1988)** Early bunch stem necrosis in grapes : a cause of poor fruit set. *Vitis* **27**, 57-61
- Jackson JE, Palmer JW (1977)** Effects of shade on the growth and cropping of apple trees. II. Effects on components of yield. *Journal of Horticultural Science* **52**, 253-266.
- Jang JC, Sheen J (1994)** Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* **6**, 1665-1679.
- Jean D, Lapointe L (2001)** Limited carbohydrate availability as a potential cause of fruit abortion in *Rubus chamaemorus*. *Physiologia Plantarum* **112**, 379-387.
- Jiang H, Egli DB (1993)** Shade induced changes in flower and pod number and flower and fruit abscission in soybean. *Agronomy Journal* **85**, 221-225.
- Johnson AG, Day TA (2002)** Enhancement of photosynthesis in *Sorghum bicolor* by ultraviolet radiation. *Physiologia Plantarum* **116**, 554-562.
- Johnson H (1989)** Une histoire mondiale du vin de l'antiquité à nos jours, Editions Hachette, France, 478 p.
- Joly D, Perrin M, Gertz C, Kronenberger J, Demangeat G, Masson JE (2004)** Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Science* **166**, 1427-1436.
- Karamanos AJ, Gimenez C (1991)** Physiological factors limiting growth and yield of faba beans. *Options Méditerranéennes, Série Séminaires* **10**, 79-90.
- Kende H, Zeevaart JAD (1997)** The five "classical" plant hormones. *The Plant Cell* **9(7)**, 1197-1210.
- Keutgen N, Chen K (2001)** Responses of citrus leaf photosynthesis, chlorophyll fluorescence, macronutrient and carbohydrate contents to elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1307-1316.
- Khurshid T, Jackson DI, Rowe RN (1992)** Effect of plant growth regulators on flower development in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **20**, 351-356.
- King RW, Ben-Tal Y (2001)** A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiology* **125**, 488-496.
- King RW, Evans LT (1991)** Shoot apex sugars in relation to long-day induction of flowering

- in *Lolium temulentum* L. *Australian Journal Plant Physiology* **18**, 121–35.
- Kliewer WM (1977)** Effect of high temperatures during the bloom-set period on fruit set, ovule fertility and berry growth of several grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* **28**(4), 215-222.
- Koblet W (1969)** Mouvement des assimilats dans les tiges de Vigne et influence de la surface foliaire sur le rendement et la qualité des raisins. *Wein Wissenschaft* **819**, 277-319.
- Koch KE (1996)** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 509-540.
- Kokubum M, Shimada S, Takahashi M (2001)** Flower abortion caused by preanthesis water deficit is not attributed to impairment of pollen in soybean. *Crop Science* **41**, 1517-1521.
- Komarova EN, Milyaeva EL (1991)** Changes in content and distribution of starch in stem apices of bicolored cone flower during the period of flowering evocation. *Soviet Journal of Plant Physiology* **38**, 46-50.
- Komeda Y (2004)** Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 521-535.
- Komor E, Thom M, Maretzki A (1981)** The mechanism of sugar uptake by sugarcane suspension cells. *Planta* **153**(2), 181-192.
- Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M (1993)** Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates : a mechanism for the ‘sink regulation’ of photosynthesis ? *Plant Journal* **3**(6), 817-828.
- Kriedemann PE (1968)** Photosynthesis in vine leaves as a function of light intensity, temperature and leaf age. *Vitis* **7**, 213-220.
- Kriedemann PE, Lenz F (1972)** The response of vine leaf photosynthesis to shoot tip excision and stem cincturing. *Vitis* **11**, 193-197.
- Labarca C, Loewus F (1973)** Nutritional role of pistil exudate in pollen-tube wall formation in *Lilium longiflorum*. 2. Production and utilization of exudate from stigma and stylar canal. *Plant Physiology* **52**, 87-92.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999)** The dual function of sugar carriers : transport and sugar sensing. *The Plant Cell* **11**, 707-726.
- Langellier F (2002)** Météo. Septembre 2002. *Le Vigneron Champenois* **9**, 14-18.
- Langellier F, Dolédec AF, Panigai L (2003)** Météo 2003 : l’année de tous les dangers. *Le Vigneron Champenois* **9**, 20-33.

- Lavie P (1970)** Contribution à l'étude caryosystématique des Vitacées. Thèse, Université de Montpellier I, 292 p.
- Law RD, Crafts-Brandner SJ (1999)** Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology* **120**, 173-181.
- Lebon G, Brun O, Magné C, Clément C (2005b)** Photosynthesis of the grape (*Vitis vinifera* L.) inflorescence. *Tree Physiology*, **25**, 627-633.
- Lebon G, Clément C (2005a)** Changes in enzyme activities of carbohydrate metabolism during the development of grapevine (*Vitis vinifera* L.) flowers. *Planta* (soumise).
- Lebon G, Clément C (2005d)** Source/sink relations in fruiting cuttings of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during the inflorescence development. *Physiologia Plantarum* (soumise).
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Clément C (2005c)** Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany* **95(6)**, 943-948.
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C (2004)** Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* **17(2)**, 71-79.
- Lebon G, Mineur T, Le Sueur D, Panigai L, Clément C (2005e)** Impact of reserve restoration on flowering and fruit set in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* (soumise).
- Lejeune P, Bernier G, Kinet JM (1991)** Sucrose levels in leaf exudates as a function of floral induction in the long day plant *Sinapis alba*. *Plant Physiology and Biochemistry* **29**, 153-157.
- Lejeune P, Bernier G, Requier MC, Kinet JM (1993)** Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Planta* **190**, 71-74.
- Levy YY, Dean C (1998)** The transition to flowering. *The Plant Cell* **10**, 1973-1989.
- Lewis CE, Noctor G, Causton D, Foyer CH (2000)** Regulation of assimilate partitioning in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 507-519.
- Lieberman M, Mapson LW (1964)** Geneiss and biogenesis of ethylene. *Nature* **204**, 343-345.
- Lilov D, Andonova T (1976)** Cytokinins, growth, flower and fruit formation in *Vitis vinifera*. *Vitis* **15**, 160-170.

- Liu F, Jensen CR, Andersen MN (2004)** Pod set related to photosynthetic rate and endogenous ABA in soybeans subjected to different water regimes and exogenous ABA and BA at early reproductive stages. *Annals of Botany* **94**, 405-411.
- Liu X, Huang B (2000)** Carbohydrate accumulation in relation to heat stress tolerance in two creeping bentgrass cultivars. *Journal of the American Society for the Horticultural Science* **125**(4), 442-447.
- Loescher WH, McCamaant T, Keller JD (1990)** Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *HortScience* **25**, 274-281.
- Lohaus G, Heldt HW, Osmond CB (2000)** Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum* : relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biology* **2**, 161-167.
- Lush WM, Grieser F, Wolters-Arts M (1998)** Directional guidance of *Nicotiana glauca* pollen tubes *in vitro* and on the stigma. *Plant Physiology* **118**, 733-741.
- Mahmood K, Carew JG, Hadley P, Battey NH (2000)** The effect of chilling and post-chilling temperatures on growth and flowering of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **75**(5), 598-601.
- Mantha SV, Johnson GA, Day TA (2001)** Evidence from action and fluorescence spectra that UV-induced violet-blue-green fluorescence enhances leaf photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* **73**(3), 249-256.
- Marcelis LEM, Baan Hofman-Eijer LR (1995)** The contribution of fruit photosynthesis to the carbon requirement of cucumber fruit as affected by irradiance, temperature and ontogeny. *Physiologia Plantarum* **93**, 476-483.
- Marès H (1868)** Sur la floraison chez la vigne. Académie des Sciences Lettres, 1277, Montpellier, 36 p.
- Maroco JP, Rodrigues ML, Lopes C, Chaves MM (2002)** Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought - metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology* **29**, 451-459.
- Matthews MA, Anderson MM (1988)** Fruit ripening in *Vitis vinifera* L. : responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture* **39**, 313-320.
- May P (2000)** From bud to berry, with special reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 82-98.

- May P, Antcliff A (1963)** The effect of shading on fruitfulness and yield in the sultana. *Journal of Horticultural Science* **38**, 85-94.
- McConchie R, Lang S, Gross KC (1991)** Carbohydrate depletion and leaf blackening in *Protea neriifolia*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**, 1019-1024.
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J (2002)** Regulation of photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought : stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* **89**, 895-905.
- Medrano H, Escalona JM, Cifre J, Bota J, Flexas J (2003)** A ten-year study on the physiology of two Spanish grapevine cultivars under field conditions : effects of water availability from leaf photosynthesis to grape yield and quality. *Functional Plant Biology* **30**, 607-619.
- Mehouachi J, Serna D, Zaragoza S, Agusti M, Talon M, Primo-Millo E (1995)** Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Science* **107**, 189-197.
- Merjanian A, Ravaz L (1930)** Sur la coulure de la vigne. *Pogress Agricole et Viticole* **47**, 545-550.
- Moon J, Lee H, Kim M, Lee I (2005)** Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **46(2)**, 292-299.
- Moore BD, Cheng SH, Sims D, Seeman JR (1999)** The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment* **22**, 567-582.
- Morinaga K, Imai S, Yakushiji H, Koshita Y (2003)** Effects of fruit load on partitioning of ¹⁵N and ¹³C, respiration, and growth of grapevine roots at different fruit stages. *Scientia Horticulturae* **97**, 239-253.
- Motomura Y (1982)** Incorporation of ¹⁴C-assimilates into GA-treated and -untreated inflorescences following assimilation of ¹⁴CO₂ by individual leaves in grape shoot. *Tohoku Journal of Agricultural Research* **33**, 1-13.
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002)** Control of flowering time : interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell Supplement*, S111-S130.
- Mullins MG (1966)** Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature* **209**, 419-420.
- Mullins MG (1967)** Morphogenetic effects of roots and of some synthetic cytokinins in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany* **18(55)**, 206-214.

- Mullins MG (1968)** Regulation of inflorescence growth in cuttings of the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* **19(60)**, 532-543.
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE (1992)** Biology of the grapevine, Mullins (Ed), University Press, Cambridge, Royaume-Uni, 239 p.
- Mullins MG, Rajasekaran K (1981)** Fruiting cuttings : revised method for producing test plants of grapevine cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* **32(1)**, 35-40.
- Myers SC, Savelle AT, Tustin DS, Byers RE (2002)** Partial flower thinning increases shoot growth, fruit size, and subsequent flower formation of peach. *HortScience* **37(4)**, 647-650.
- Nakamura Y, Yuki K (1992)** Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm. *Plant Science* **82**, 15-20.
- Namuco OS, O'Toole JC (1986)** Reproductive stage water stress and sterility. I. Effect of stress during meiosis. *Crop Science* **26**, 317-321.
- Nitsch JP, Nitsch C, Pratt CS, Shaulis NJ (1957)** Auxins in the Concord and Concord Seedless grapes in relation to berry development and drop. *Plant Physiology Supplement*.
- Nogues S, Cotxarrera L, Alegre L, Trillas MI (2002)** Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist* **154(1)**, 461-470.
- Normanly J, Slovin JP, Cohen JD (1995)** Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiology* **107**, 323-329.
- Ogata T, Hirota T, Shiozaki S, Horiuchi S, Kawase K, Ohashi M (2002)** Effects of aminoethoxyvinylglycine and high temperatures on fruit set and fruit characteristics of heat-cultured Satsuma mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **71(3)**, 348-354.
- Ohto M, Onai K, Furukaawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K (2001)** Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 252-261.
- Oliveira CM, Priestley CA (1988)** Carbohydrate reserves in deciduous fruit trees. *Horticultural Review* **10**, 403-430.
- Ollat N (1997)** Bases physiologiques et anatomiques de la croissance des baies de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Thèse, ENSAM, 131 p.

- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillère JP, Moing A (2002)** Grape berry development : a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **36(3)**, 109-131.
- Ollat N, Gaudillère JP (2000)** Carbon balance in developing grapevine berries. *Acta Horticulturae* **526**, 345-350.
- Ollat N, Géný L, Soyer JP (1998)** Les boutures fructifères : validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. I. Principales caractéristiques de l'appareil végétatif. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **32(1)**, 1-9.
- Osborne DJ (1989)** Abscission. *Critical Reviews in Plant Sciences* **8**, 103-129.
- Pacini E (1996)** Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction* **9**, 362-366.
- Paczek V (2002)** Métabolisme azoté au cours de la formation des organes floraux chez la vigne : cas de la coulure. Thèse, Université Paris XI, 159 p.
- Palliotti A, Cartechini A (2001)** Developmental changes in gas exchange activity in flowers, berries, and tendrils of field-grown Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **52(4)**, 317-323.
- Patakas A, Nikolaou N, Zioziou E, Radoglou K, Noitsakis B (2002)** The role of organic soluble and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science* **163**, 361-367.
- Patil VN, Chauhan PS, Shivankar RS, Vilhekar SH, Waghmare VS (2001)** Effect of plant growth regulators on survival and vegetative growth of grapevine cuttings. *Agricultural Science Digest* **21(2)**, 97-99.
- Paul M, Pellny T, Goddijn O (2001)** Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends in Plant Science* **6(5)**, 197-200.
- Paul MJ, Pellny TK (2003)** Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**, 539-547.
- Pavel EW, DeJong TM (1993)** Estimating the photosynthetic contribution of developing peach (*Prunus persica*) fruits to their growth and maintenance carbohydrate requirements. *Physiologia Plantarum* **88**, 331-338.
- Pelah D, Wang W, Altman O, Bartels D (1997)** Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiologia Plantarum* **99**, 153-159.
- Perera NH, Hartmann E, Holaday AS (1995)** Regulation of cotton photosynthesis during moderate chilling. *Plant Science* **111**, 133-143.

- Petrie PR, Trought MCT, Howell GS (2000)** Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Vitis* **39(1)**, 31-36.
- Planchon JE (1887)** Monographie des Ampéliadeae vraies. *Monographia Phanerogamerum* **5**, 305-364.
- Posluszny U, Gerrath JM (1986)** The vegetative and floral development of the hybrid grape cultivar 'Ventura'. *Canadian Journal of Botany* **64**, 1620-1631.
- Pouget R (1981)** Action de la température sur la différenciation des inflorescences et des fleurs durant les phases de pré-débourrement des bourgeons latents de la vigne. *Connaissances de la Vigne et du Vin* **15**, 65-79.
- Pratt C (1971)** Reproductive anatomy in cultivated grapes. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **22(2)**, 92-109.
- Pryke JA, Bernier G (1978)** Acid invertase activity in the apex of *Sinapis alba* during transition to flowering. *Annals of Botany* **42**, 747-49.
- Reeves PH, Coupland G (2001)** Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiology* **126**, 1085-1091.
- Reynier A (1989)** Manuel de viticulture, 5^{ème} édition. Baillière JB (Ed), Lavoisier, Paris, France, 406 p.
- Rideout JW, Raper CD, Miner GS (1992)** Changes in ratio of soluble sugars and free amino nitrogen in the apical meristem during floral transition of tobacco. *International Journal of Plant Science* **153**, 78-88.
- Rives M (1961)** La coulure de la vigne. *Bulletin Technique d'Informations des Ingénieurs de Servives Agricoles* **64**, 1-3.
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH (2002)** Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 131-158.
- Rodrigo J, Herrero M (1998)** Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction* **11**, 86-93.
- Rodrigo J, Herrero M (2002)** Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae* **92**, 125-135.
- Rodrigo J, Hormaza JI, Herrero M (2000)** Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum* **108**, 35-41.
- Roitsch T (1999)** Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 198-206.

- Roitsch T, Gonzalez MC (2004)** Function and regulation of plant invertases : sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9(12)**, 606-613.
- Roldan M, Gomez-Mena C, Ruiz-Garcia L, Salinas J, Martinez-Zapater JM (1999)** Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *The Plant Cell* **20(5)**, 581-590.
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002)** Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell Supplement*, S185-S205.
- Rouse DT, Sheldon CC, Bagnall DJ, Peacock J, Dennis ES (2002)** FLC, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *Plant Journal* **29(2)**, 183-191.
- Ruiz R, Garcia-Luis A, Honerri C, Guardiola JL (2001)** Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. *Annals of Botany* **87**, 805-812.
- Ruperti B, Bonghi C, Tonutti P, Ramina A (1998)** Ethylene biosynthesis in peach fruitlet abscission. *Plant, Cell and Environment* **21**, 731-737.
- Sachs RM, Hackett WP (1977)** Chemical control of flowering. *Acta Horticulturae* **68**, 29-49.
- Saini HS (1997)** Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sexual Plant Reproduction* **10**, 67-73.
- Saini HS, Aspinall D (1981)** Effect of water deficit on sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany* **48**, 623-633.
- Saladin G, Magné C, Clément C (2003a)** Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports* **21**, 821-827.
- Saladin G, Magné C, Clément C (2003b)** Effects of fludioxonil and pyrimethanil, two fungicides used against *Botrytis cinerea*, on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Pest Management Science* **59(10)**, 1083-1092.
- Saladin G, Magné C, Clément C (2003c)** Effects of flumioxazin herbicide on carbon nutrition of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4017-4022.
- Salerno GL, Curatti L (2003)** Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why ? *Trends in Plant Science* **8(2)**, 63-69.
- Sanchez AM, Bosch M, Bots M, Nieuwland J, Feron R, Mariani C (2004)** Pistil factors controlling pollination. *The Plant Cell Supplement*, S98-S106.

- Sato S, Peet MM, Thomas JF (2000)** Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant, Cell and Environment* **23**, 719-726.
- Sato S, Peet MM, Thomas JF (2002)** Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lypersicon esculentum* Mill. Exposed to moderately elevated temperatures. *Journal of Experimental Botany* **53(371)**, 1187-1195.
- Sauter JJ, Van Cleve B (1994)** Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees* **8**, 297-304.
- Savitch LV, Harney T, Huner NPA (2000)** Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **108(3)**, 270-278.
- Scholefield PB, Neales TP, May P (1978)** Carbon balance of the sultana vine (*Vitis vinifera* L.) and the effects of autumn defoliation by harvest pruning. *Australian Journal of Plant Physiology* **5**, 561-570.
- Scholefield PB, Ward RC (1975)** Scanning electron microscopy of the developmental stages of the Sultana inflorescence. *Vitis* **14**, 14-19.
- Schultz HR (2003)** Extension of a Farquhar model for limitations of leaf photosynthesis induced by light environment, phenology and leaf age in grapevines (*Vitis vinifera* L. cvv. White Riesling and Zinfandel). *Functional Plant Biology* **30**, 673-687.
- Schultz HR, Kiefer W, Gruppe W (1996)** Photosynthetic duration, carboxylation efficiency and stomatal limitation of sun and shade leaves of different ages in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **35(4)**, 169-176.
- Sexton R (1995)** Abscission. In Handbook of plant and crop physiology. Pessarakli M (Ed), Marcel Dekker, New-York, pp. 497-525.
- Sexton R, Lewis LN, Trewavas AJ, Kelly P (1985)** Ethylene and abscission. In Ethylene and Plant Development. Roberts JA et Tucker GA (Eds), Butterworths, London, pp. 173-196.
- Sharkey TD (2005)** Effects of moderate heat stress on photosynthesis : importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment* **28**, 269-277.
- Sheen J (1990)** Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* **2**, 1027-1033.
- Sheen J (1994)** Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Research* **39**, 427-438.

- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999)** Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 410-418.
- Simon JL, Schwarzenbach J, Mischler M, Eggenberger W, Koblet W (1977)** Viticulture. Association Suisse des Ingénieurs Agronomes (Ed), Payot Lausanne, Suisse, 195 p.
- Smeekens S (2000)** Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 49-81.
- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM (2003)** Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany* **54**, 577-583.
- Solhaug KA, Aares E (1994)** Remobilization of fructans in *Phippsia algida* during rapid inflorescence development. *Physiologia Plantarum* **91**, 219-225.
- Sowinski P, Dalbiak A, Tadeusiak J, Ochodzki P (1999)** Relations between carbohydrate accumulation in leaves, sucrose phosphate synthase activity and photoassimilate transport in chilling treated maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **21(4)**, 375-381.
- Srinivasan C, Mullins MG (1976)** Reproductive anatomy of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) : origin and development of the Anlage and its derivatives. *Annals of Botany* **38**, 1079-1084.
- Srinivasan C, Mullins MG (1978)** Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) : formation of inflorescences *in vitro* by isolated tendrils. *Plant Physiology* **61**, 127-130.
- Srinivasan C, Mullins MG (1979)** Flowering in *Vitis* : conversion of tendrils into inflorescences and bunches of grapes. *Planta* **145**, 187-192.
- Srinivasan C, Mullins MG (1980a)** Effects of temperature and growth regulators on formation of Anlagen, tendrils and inflorescence in *Vitis vinifera* L. *Annals of Botany* **45**, 439-446.
- Srinivasan C, Mullins MG (1980b)** Flowering in *Vitis* : effects of genotype on cytokinin-induced conversion of tendrils into inflorescences. *Vitis* **19**, 293-300.
- Srinivasan C, Mullins MG (1981)** Physiology of flowering in the grapevine. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **32(1)**, 47-63.
- Staudt G (1982)** Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum *in vivo* bei *Vitis* und die Abhängigkeit von der Temperatur. *Vitis* **21**, 205-216.
- Stef C (2005)** Un beau potentiel malgré une légère coulure. *La Vigne* **167**, 6.
- Stephenson AG (1980)** Fruit set, herbivory, fruit reduction, and the fruiting strategy of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). *Ecology* **61**, 57-64.

- Stephenson AG (1981)** Flower and fruit abortion : proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematic* **12**, 253-279.
- Stoev KD (1952)** Analyse biochimique de la Vigne au cours du développement de son cycle annuel. *Viticulture and Enology* **12**, 42-49.
- Stoev KD (1962)** Causes déterminant les altérations de la floraison de la vigne. *Bulletin de l'O.I.V.* **374**, 476-478.
- Stoev KD, Slavtcheva T (1982)** La photosynthèse chez la vigne (*V. vinifera* L.) et les facteurs écologiques. *Connaissances Vigne et Vin* **16**, 171-185.
- Stopar M (1998)** Apple fruitlet thinning and photosynthate supply. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73(4)**, 461-466.
- Stubbs VEC, Standing D, Knox OGG, Killham K, Bengough AG, Griffiths B (2004)** Root border cells take up and release glucose-C. *Annals of Botany* **93**, 221-224.
- Sturm A, Tang GQ (1999)** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* **4(10)**, 401-406.
- Sugiura A, Utsunomiya N, Tomana T (1976)** Induction of inflorescence by CCC application on primary shoots of grapevines. *Vitis* **15**, 88-95.
- Swanson R, Edlund AF, Preuss D (2003)** Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annual Review of Genetic* **38**, 793-818.
- Tirosh T, Mayak S (1988)** Changes in starch content during the development of carnation petals. *Journal of Plant Physiology* **133**, 361-363.
- Toussaint X (1983)** Coulure et millérandage. *Vititech* **68**, 14-15.
- Trusty SE, Miller WB (1991)** Postproduction carbohydrate levels in pot chrysanthemums. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**, 1013-1018.
- Ussahatanonta S, Jackson DI, Rowe RN (1996)** Effects of nutrient and nutrient and water stress on vegetative and reproductive growth in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2**, 64-69.
- Valladares F, Pearcy RW (1997)** Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* **20**, 25-36.
- Vallania R, Botta R, Me G (1987)** Investigations on anomalies of ovule development and on pollination in mutated grapevines, cv. Barbera. *Vitis* **26**, 1-8.
- Van Doorn WG, van Meeteren U (2003)** Flower opening and closure : a review. *Journal of Experimental Botany* **54(389)**, 1801-1812.

- Van Heerden PDR, Viljoen MM, De Villiers MF, Krüger GHJ (2004)** Limitation of photosynthetic carbon metabolism by dark chilling in temperate and tropical soybean genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 117-124.
- van Meeteren U, van Gelder H, van de Peppel AC (1995)** Aspects of carbohydrate balance during floret opening in freesia. *Acta Horticulturae* **405**, 117-122.
- Vanden Heuvel JE, Leonardos ED, Proctor JDA, Fisher KH, Sullivan JA (2002)** Translocation and partitioning patterns of ^{14}C photoassimilate from light and shade adapted shoots in greenhouse grown "Chardonnay" grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**, 912-918.
- Vara Prasad PV, Craufurd PQ, Kakani VG, Wheeler TR, Boote KJ (2001)** Influence of high temperature during pre- and post-anthesis stages of floral development on fruit-set and pollen germination in peanut. *Australian Journal of Plant Physiology* **28(3)**, 233-240.
- Vara Prasad PV, Craufurd PQ, Summerfield RJ (1999a)** Fruit number in relation to pollen production and viability in groundnut exposed to short episodes of heat stress. *Annals of Botany* **84**, 381-386.
- Vara Prasad PV, Craufurd PQ, Summerfield RJ (1999b)** Sensitivity of peanut to timing of heat stress during reproductive development. *Crop Science* **39**, 1352-1357.
- Vara Prasad PV, Craufurd PQ, Summerfield RJ, Wheeler TR (2000)** Effects of short episodes of heat stress on flower production and fruit-set of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Experimental Botany* **51(345)**, 777-784.
- Vasudevan L, Wolf TK, Welbaum GG, Wisniewski ME (1998)** Anatomical developments and effects of artificial shade on bud necrosis of Riesling grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **49(4)**, 429-439.
- Vemmos SN, Goldwin GK (1993)** Stomatal and chlorophyll distribution of Cox's orange pippin apple flowers relative to other cluster parts. *Annals of Botany* **71**, 245-250.
- Vemmos SN, Goldwin GK (1994)** The photosynthetic activity of Cox's orange pippin apple flowers relation to fruit setting. *Annals of Botany* **73**, 385-391.
- Vergauwen R, van den Ende W, van Laere A (2000)** The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1261-1266.
- Vu JC, Yelenoski G, Bauscher MG (1985)** Photosynthetic activity in the flower buds of "Valencia" orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Plant Physiology* **78**, 420-423.
- Wang YT, Breen PJ (1984)** Respiration and weight changes of easter lily flowers during development. *HortScience* **19**, 702-703.

- Wang YT, Breen PJ (1986)** Partitioning of ^{14}C assimilate in easter lily as affected by growth stage and flower removal. *Scientia Horticulturae* **29**, 273-281.
- Wang YT, Breen PJ (1987)** Distribution, storage, and remobilization of ^{14}C -labeled assimilate in easter lily. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **112**, 569-573.
- Wang YT, Gregg LL (1992)** Developmental stage, light, and foliage removal affect flowering and bud weight of easter lily. *HortScience* **27(7)**, 824-826.
- Weaver RJ, Pool RM (1971)** Berry response of 'Thompson Seedless' and 'Perlette' grapes to application of gibberellic acid. *Journal of American Society for Horticultural Science* **96**, 162-166.
- Weaver RJ, Van Overbeek J, Pool RM (1965)** Induction of fruit set in *Vitis vinifera* L. by a kinin. *Nature* **206**, 952-953.
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge UI (2000)** Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**, 787-802.
- Weiss D, Schönfeld M, Halevy AH (1988)** Photosynthetic activities in the *Petunia* corolla. *Plant Physiology* **87**, 667-670.
- Weterings K, Russell SD (2004)** Experimental analysis of the fertilization process. *The Plant Cell Supplement*, S107-S118.
- Wheeler TR, Chatzialioglou A, Craufurd PQ, Ellis RH, Summerfield RJ (1997)** Dry matter partitioning in peanut exposed to high temperature stress. *Crop Science* **37**, 1507-1513.
- Winkler AJ, Williams WO (1938)** Carbohydrates metabolism of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology* **20**, 412-432.
- Wolf TK, Warren MK (1995)** Shoot growth rate and density affect bud necrosis of 'Riesling' grapevines. *Journal of American Society for Horticultural Science* **120**, 989-996.
- Woodward AW, Bartel B (2005)** Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Yamane K, Kawabata S, Sakiyama R (1991)** Changes in water relations, carbohydrate contents and acid invertase activity associated with perianth elongation during anthesis of cut gladiolus flowers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **60**, 421-428.
- Yang SF (1985)** Biosynthesis and action of ethylene. *Horticultural Science* **20**, 41-45.

- Yang SF, Hoffman NE (1984)** Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 155-189.
- Yanofsky MF (1995)** Floral meristem to floral organs : genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 167-188.
- Yin C, peng Y, Zang R, Zhu Y, Li C (2005)** Adaptative responses of *Populus kangdingensis* to drought stress. *Physiologia Plantarum* **123**, 445-451.
- Young LW, Wilen RW, Bonham-Smith PC (2004)** High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany* **55(396)**, 485-495.
- Yu TS, Lue WL, Wang SM, Chen J (2000)** Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiology* **12**, 319-325.
- Zapata C (1998)** Suivi pluriannuel de la mise en place et de la mobilisation des réserves carbonées et azotées chez deux cépages de vigne (*Vitis vinifera* L.) présentant une sensibilité différente à la coulure. Thèse, I.N.A. Paris Grignon, 107 p.
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004a)** Partitioning and mobilization of qtrch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* **161**, 1031-1040.
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C (2004b)** Mobilisation and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Functional Plant Biology* **31**, 1127-1135.
- Zhou L, Christopher DA, Paull RE (2000)** Defoliation and fruit removal effects on Papaya fruit production, sugar accumulation, and sucrose metabolism. *Journal of American Society for Horticultural Science* **125(5)**, 644-652.
- Zhou L, Jang JC, Jones TL, Sheen J (1998)** Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10294-10299.
- Zik M, Irish VF (2003)** Flower development : initiation, differentiation, and diversification. *Annual Review of Cell Development and Biology* **19**, 119-140.
- Zufferey V, Murisier F (2000)** Photosynthèse des feuilles de vigne (cv. Chasselas). I. Influence de la lumière et de la température. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **32(6)**, 341-346.

- Zufferey V, Murisier F (2002)** Photosynthèse des feuilles de vigne (cv. Chasselas). II. Adaptation aux conditions environnementales. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **34(3)**, 197-200.
- Zufferey V, Murisier F, Aerny J, Gindroz V (1999)** Bilans journaliers de photosynthèse nette chez la vigne (cv. Chasselas) avec des rangs orientés nord-sud et est-ouest. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **31(5)**, 247-252.
- Zufferey V, Murisier F, Schultz HR (2000)** A model analysis of the photosynthetic response of *Vitis vinifera* L. cvs Riesling and Chasselas leaves in the field : I. Interaction of age, light and temperature. *Vitis* **39(1)**, 19-26.

Résumé

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est naturellement affectée par l'abscission et la chute des fleurs (coulure) durant le développement des inflorescences. Ce phénomène est dépendant de facteurs physiologiques et environnementaux et tous les cépages y sont sensibles à un degré plus ou moins important. Les causes exactes de la coulure demeurent encore inconnues à ce jour. Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur le métabolisme des sucres dans les inflorescences durant le développement des fleurs en utilisant des cépages de sensibilité différente à la coulure. Nous avons travaillé sur des plantes cultivées au vignoble et nous avons optimisé un système expérimental mimant le développement floral en conditions contrôlées à partir de boutures fructifères.

De nombreux critères de différenciation existent entre le Gewurztraminer (GW), cépage sensible à la coulure et le Pinot noir (PN), cépage peu sensible. Ainsi, les structures reproductrices mâles et femelles de PN se développent plus précocement que celles de GW. De plus, les teneurs en glucides (amidon, saccharose, glucose et fructose) des inflorescences diffèrent entre les deux cépages lors du développement floral, notamment entre les stades 15 et 17, période des méioses polliniques et ovulaires et stades clés dans le développement reproducteur. Les différences constatées se manifestent, entre autres, par la présence d'amidon dans les ovules de PN, contrairement à ceux du GW. La mesure des activités enzymatiques du métabolisme glucidique ont confirmé que, durant la période 15-17, les deux cépages utilisent les sucres de manière différente. Nous avons par ailleurs démontré l'existence d'une photosynthèse nette positive dans les inflorescences des deux cépages, avec des intensités fluctuantes, notamment entre les stades 15 et 17. La tolérance plus importante à la coulure du PN pourrait donc résulter d'un métabolisme glucidique différent, permettant d'éviter toute carence glucidique lors de la méiose en cas de stress environnementaux.

Afin de confirmer l'impact de la physiologie des glucides dans le développement floral, nous avons tenté de perturber le métabolisme carboné en agissant sur la mise en réserve dans les organes pérennes, au vignoble et sur boutures fructifères. Les résultats obtenus démontrent dans les deux cépages l'importance de la mise en réserves de l'été_n sur la floraison de l'année_{n+1} et ce, à la fois sur le nombre d'inflorescences par pied et sur le nombre de fleurs par inflorescence.

Mots clés : coulure, floraison, métabolisme glucidique, photosynthèse, réserves carbonées, structures reproductrices, *Vitis vinifera* L.