

N° d'ordre : 2577

Thèse

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE TOULOUSE**

Formation doctorale : Sciences Agronomiques

Par Faouzi ATTIA

**EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LE COMPORTEMENT
ECOPHYSIOLOGIQUE ET LA MATURITE PHENOLIQUE DE LA
VIGNE *Vitis vinifera* L.: ETUDE DE CINQ CEPAGES AUTOCHTONES DE
MIDI-PYRENEES**

Soutenue le 18 décembre 2007 devant le jury composé de :

Ahmed LEBRIHI	Professeur à l'INP/ENSAT	Président
Jean François MOROT-GAUDRY	Directeur de Recherches I.N.R.A.	Rapporteur
Salem BEN EL HADJ	Professeur à l'INAT	Rapporteur
Alain BLAISE	Professeur à l'Université de Montpellier I	Examineur
Vitale NUZZO	Professeur à l'Université Basilicata	Examineur
François BOUTEAU	HDR à l'Université Paris Diderot	Examineur
Marc Pierre GARCIA	HDR à l'INP/ENSAT	Directeur de thèse
Thierry LAMAZE	Professeur à l'Université Paul Sabatier	Co-Directeur de thèse
Mohamed BRAHAM	Directeur de Recherches I.O.	Invité

AVANT-PROPOS

Cette thèse de doctorat délivrée par l'Institut National Polytechnique de Toulouse a été réalisée dans le Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées (CVŒMP), sous la direction de Monsieur Marc Pierre GARCIA et la co-direction de Monsieur Thierry LAMAZE du Centre d'Etudes Spatiales de la BIOSphère (CESBIO) de l'Université Paul Sabatier. Les aspects de signalisation cellulaire ont été encadrés par Monsieur François BOUTEAU au Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes (LEM) de l'Université Paris Diderot.

Ce travail est présenté sous la forme d'une synthèse des connaissances en français dont on dispose, pour traiter le problème de stress hydrique. Sur cette base, nous nous sommes posés des questions initiales et nous avons défini notre stratégie d'étude. Les résultats sont présentés sous forme de six publications rédigées en anglais et réparties en trois chapitres avec une présentation introductive en français pour chacun.

Nous entendons par « Stress hydrique » des conditions de l'environnement (liés à l'eau) qui entraînent une diminution du développement et/ou de la qualité des raisins en deçà du potentiel génétique de la plante. Il faut noter donc qu'une contrainte hydrique ne génère pas systématiquement un stress, tout dépend de l'acclimatation - adaptation de la plante.

Valorisation scientifique des résultats obtenus :

Publications en cours

1/ Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Marc Garcia¹ and Thierry Lamaze⁴, ?. Stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis under water deficit and elevated CO₂ in three grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.). *To be submitted in December 2007. PHOTOSYNTHETICA*,

2/ Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Vitale Nuzzo⁴, Marc Garcia¹ and Thierry Lamaze⁵, ?. Ecophysiological responses of three grapevines varieties (*Vitis vinifera* L.) to water stress under ambient and elevated carbon dioxide levels. *To be submitted in December 2007 SOUTH AFRICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE*.

3/ Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Elisabeth Besnard⁴ Thierry Lamaze⁵ and Marc Garcia¹, ?. Effects of water availability on leaf gas exchange and berry mass repartition in Cot and Négrette grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.). *To be submitted in December 2007 SOUTH AFRICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE*.

4/ Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Vitale Nuzzo⁴, François Dedieu⁵, Thierry Lamaze⁶ and Marc Garcia¹, ?. Effects of water availability from leaf photosynthesis to grape phenolic maturity of Tannat and Duras grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.). *To be submitted in December 2007 AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE*.

5/ Faouzi Attia¹ Marc Garcia¹ François Garcia² Fethi Ben Mariem³ Laurent Martinez⁴ Thierry Lamaze⁵, ?. Processed Calcite Particles Improved Leaf Photosynthesis of Potted Cot Grapevines During Water Stress Conditions. *Submitted to JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE*

6/ Attia Faouzi¹, Errakhi Rafik², Garcia Faouzi³, Lamaze Thierry⁴, Garcia Marc¹ and Bouteau François², ?. Early MEG -induced cellular responses, implication for stomatal closure. In Preparation.

Publications acceptées dans des revues à comité de lecture

- ATTIA F., GARCIA F., BESNARD E., LAMAZE T. & GARCIA M., 2007. Effect of rootstock on organic acids in leaves and berries and on must and wine acidity of two red wine grape cultivars Malbec and Negrette (*Vitis vinifera* L.) grown hydroponically. *Acta Hort. (ISHS)* 754:473-482.
- ATTIA F., BESNARD E., LAFFARGUE F., FORT D. & GARCIA M., 2004. Relationship between terroir and acidity for the red wine grape cultivar Malbec N or Cot n (*Vitis vinifera* L.) in AOC Cahors and Côtes du frontonnais. South African Journal for Enology and Viticulture (SASEV) *Proceedings Joint International Conference on Viticulture Zoning SASEV*, Cape Town, South Africa; 306-313.
- ATTIA F., IBRAHIM H., CADET A. AND GARCIA M., 2004. Evaluation of leave, must and wine cation contents and of must and wine acidity of five red wine grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) grafted onto 3309 Couderc and grown hydroponically. *Acta Hort. (ISHS)* 652:255-263.

Communications dans des séminaires ou à des congrès

- ATTIA F., GARCIA F., DEDIEU F., BEN MARIEM F., KASRAOUI M.F., LAMAZE T. et GARCIA., 2007. Effet du stress hydrique sur la photosynthèse et la maturité phénolique du cépage Fer Servadou. *8ème Symposium International d'Œnologie, Bordeaux 25-27 juin France.*
- ATTIA F., GARCIA F., CÎMPIEANU C.B., BEN MARIEM F., KASRAOUI M.F., LAMAZE T. and GARCIA M.¹. 2006. Effect of water stress and elevated CO₂ on gas exchange, photochemical efficiency and leaf water potential of the Négrette (*Vitis. Vinifera* L.). *ANNALES OF THE UNIVERSITY OF CRAIOVA*; 11-16.
- ATTIA F., GARCIA F., BESNARD E. & GARCIA M. 2005. Improvement of organic acids extraction and determination methods from leaves and berries of two grape cultivars: Cot and Négrette. *INVINO ANALYTICA SCIENTIA 2005*; Montpellier, juillet 2005 - FRANCE July.

REMERCIEMENTS

Une thèse, tant nominative soit elle, est avant tout un travail de réflexion collective, donc au terme de ce travail, il m'est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur *Marc GARCIA* HDR à l'INP/ENSAT l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (INP/ENSAT) et Directeur du Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées et du DNO de Toulouse pour m'avoir accepté, en stage de master, au DNO, et en thèse de doctorat dans son laboratoire au C.V.C.E.M.P. Je le remercie d'abord pour ses qualités humaines, pour l'attention qu'il m'a accordée à la direction, à l'orientation et à la réalisation de mes travaux de recherches ; sa contribution à la rédaction du présent manuscrit et surtout la prise en charge financière des actions de recherches réalisées, m'ont été d'une précieuse aide; qu'il trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime.

Je remercie Monsieur *Thierry LAMAZE*, Professeur à l'Université Paul Sabatier et chercheur au CESBIO qui a bien voulu accepter la charge de co-diriger cette thèse ; sa rigueur, ses suggestions nombreuses et ses conseils éclairés m'ont été d'un précieux concours pour valoriser les résultats obtenus et à la rédaction des articles. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères pour tout le temps qu'il m'a consacré (sa rigueur scientifique sans faille m'a remis de nombreuses fois dans le droit chemin). J'espère pouvoir continuer à collaborer avec lui.

Je suis très honoré que Monsieur *Abmed LEBRIHI*, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT) et Directeur de l'école, ait voulu accepter de présider mon jury et je l'en remercie.

Je remercie également Monsieur *Jean François MOROT-GAUDRY*, Directeur de Recherches à l'INRA Versailles, et suis très honoré qu'il ait bien voulu accepter d'être le rapporteur. Ses compétences et son renom mondial comme spécialiste des aspects physiologiques de la photosynthèse me sont d'un concours précieux pour améliorer et valoriser les résultats obtenus.

Tous mes remerciements vont aussi à Monsieur *Salem BEN EL HADJ*, Professeur à l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT). Mes remerciements les plus sincères pour tout le temps qu'il m'a consacré lors de ma formation d'ingénieur à l'INAT, au cours du master recherche A.A.P.V. et maintenant comme rapporteur de mes travaux de thèse. Votre attention particulière, votre sens du partage

et vos qualités humaines m'ont été très précieux au cours de mon parcours universitaire.

Je tiens à remercier Monsieur *François BOUTEAU*, Maître de Conférences HDR à l'Université Paris Diderot, de m'avoir accepté dans son laboratoire pour la réalisation de la partie signalisation cellulaire. Ses conseils, ses critiques constructives m'ont été très utiles pour mener ce travail.

Je remercie également Messieurs *Alain BLAIZE*, Professeur à l'Université Montpellier I et Directeur du Centre de Formation et de Recherches en Œnologie ; et Directeur du DNO de Montpellier ; *Vitale NUZZO*, Professeur à l'Universita' degli Studi della Basilicata (Italie) Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell'Ambiente ; *Mohamed BRAHAM*, Directeur de Recherches à l'Institut de l'Olivier et Directeur du Laboratoire des Systèmes de Productions Oléicoles et Arboricoles (SPOA) ; qui m'ont honoré en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie Monsieur *Cédric CABANES*, Président de la Société Agronutrition, pour l'aide qu'il m'a apporté, pour son soutien financier pour la réalisation des travaux sur le Megagreen, la confiance qu'il m'a accordé et pour la chance qu'il m'a donnée de travailler par la suite au sein de sa société. J'espère que je ne le décevrais pas. Je tiens aussi à remercier pour son amitié et son aide, Monsieur *Laurent MARTINEZ*, Président de l'ADCOT et Ingénieur agronome à Agronutrition, avec qui j'ai beaucoup apprécié de travailler, collaborer et d'échanger à travers les activités de l'ADCOT et de recherche & développement.

Je remercie particulièrement Monsieur *François GARCIA*, Maître de Conférences au Centre de Formation et de Recherches en Œnologie à la Faculté de Pharmacie de Montpellier I, pour son aide et ses connaissances, qui m'ont été d'un grand secours en particulier lors du traitement des résultats et leur valorisation scientifique. Je tiens à adresser aussi particulièrement mes remerciements les plus sincères à Monsieur *Fethi Ben MERIEM*, Ingénieur de recherches à l'Institut de l'Olivier, pour l'aide qu'il m'a apporté tout au long de mes travaux de recherches, pour son amitié et pour m'avoir permis de partager son savoir et son expérience dans la recherche. Aussi je remercie messieurs *Foued LABIDI* et *Hessine BEN ABDALLAH* et madame *Wafa GHARIANI*, pour leur aide durant leurs séjours à Toulouse.

C'est aussi un grand plaisir d'exprimer ma gratitude au personnel du Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées : *Marie Carmen MONJE* maître de conférences et HDR à l'ENSAT, *François DEDIEU* et *Jean Pierre MACOU* de m'avoir accepté parmi eux et de m'avoir aidé au cours de ce travail ; de même je remercie messieurs *Jérôme SILVESTRE* et *Georges MERLINA* Ingénieurs de

Recherches à l'ENSAT pour leur aide. Aussi je remercie mes amis doctorus emiritus *Hamdy IBRAHIM*, *Mohamed TOUMI* et *Alexandra CADET* et les stagiaires avec qui j'ai eu énormément de plaisir à partager des moments de sympathie. Pareillement, je remercie mes amis du laboratoire microbiologie de l'ENSAT : Monsieur le professeur Nessredine Sabaou, Noureddine, Abdelghani, Badgi, Ali, Echarki,

Je veux remercier du fond du cœur mes meilleurs amis avec qui je n'oublierai jamais cette expérience humaine très enrichissante pour moi : Faouzi (t'as été toujours là quand j'avais besoin t'es le fréro qui m'a toujours soutenu) ; Sami (j'ai appris à te connaître j'en suis ravi, t'es plein de qualités surtout en tant que président du DBZ, je sais que t'iras loin), Rafik (je ne sais pas quoi dire de toi, tu le sais...) ; Walid (je suis ravi et très heureux de ta connaissance et de ton amitié, ...), Didier (ton amitié et ton aide me sont très précieux merci beaucoup), Edourd (t'es un gas sympa), Johan (la classe ...), Stéphane (les belles soirées bien arrosées), Soumia (je te souhaite beaucoup de réussite, peut être un prix Nobel à partager), Amandine (merci beaucoup pour tout, t'es présidente Emiritus).

Je ne peux pas oublier « ma famille d'accueil » ma maman *Paule*, mon Cousin *Christian TABARELLI* ma cousine *Jessy* merci infiniment pour les moments de détente et pour leur soutien et leurs encouragements dans les moments de doute. Ainsi que mon cher ami *Benoît SEVERAC* ainsi que sa famille, *thank you for all...*

Enfin toute ma reconnaissance est adressée à ma famille, mes parents **Fredj** et **Gamra** à qui je dois mon éducation, ma réussite dans la vie et dans mes études et j'espère qu'ils excuseront mon absence tout au long de ces dernières années, à mes sœurs **Faouzia**, **Souad**, **Sonia** et **Laïfa** et mes frères **Lassad**, **Mounir** et **Naceur**, pour tous ce qu'ils ont fait pour moi, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis au cours de mes études : CHOKRANE JAZILAN.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.

SOMMAIRE

Introduction Générale.....	11
CHAPITRE I	
Revue Bibliographique.....	13
I. BOTANIQUE ET IMPORTANCE DE LA VIGNE.....	13
II. LE VIGNOBLE DE LA REGION MIDI-PYRENEES	14
II.1.NATURE DES SOLS DES VIGNOBLES PYRENEENS	14
II.2.CARACTERISTIQUES DES CLIMATS DE LA REGION MIDI-PYRENEES	16
II.3.LES CEPAGES AUTOCHTONES DES VIGNOBLES PYRENEENS.....	18
II.3.1. <i>Le cépage Vitis vinifera L. COT</i>	18
II.3.2. <i>Le cépage Vitis vinifera L. NEGRETTE</i>	19
II.3.3. <i>Le cépage Vitis vinifera L. TANNAT</i>	20
II.3.4. <i>Le cépage Vitis vinifera L. FER SERVADOU</i>	21
II.3.5. <i>Le cépage Vitis vinifera L. DURAS</i>	22
II.4. LE PORTE-GREFFE 3309 COUDERC.....	23
II.4.1 <i>Description du porte-greffe 3309C</i>	23
II.4.2 <i>Aptitudes du porte-greffe 3309C:</i>	23
III. CONDUITE ET PHENOLOGIE DE LA VIGNE.....	24
III. 1.CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE LA VIGNE.....	24
III. 2.DEVELOPPEMENT ET MATURATION DES BAIES DE RAISIN	26
III. 3.COMPOSITION DES BAIES DE RAISIN	28
IV. LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN.....	31
IV.1.LES COMPOSES NON-FLAVONOÏDES	31
IV. 1. 1. <i>Les acides phénoliques</i>	31
IV. 1. 2. <i>Les stilbènes</i>	32
IV. 2.LES COMPOSES FLAVONOÏDES.....	32
IV.2. 1. <i>Les flavonols</i>	34
IV.2. 2. <i>Les anthocyanes</i>	34
IV. 2. 3. <i>Les tanins condensés (flavan-3-ols)</i>	38
V. NOTION DE STRESS HYDRIQUE CHEZ LA VIGNE.....	41
V.1. LA DEMANDE HYDRIQUE DE LA VIGNE	41
V.2. UN DES PRINCIPAUX FACTEURS LIMITANT LA PRODUCTION: LA SECHERESSE ESTIVALE	42
V.3. LE CHANGEMENT CLIMATIQUE.....	42
V.4. UTILISATION DES INDICATEURS DE STRESS EN RELATION AVEC LE STATUT HYDRIQUE CHEZ LA VIGNE	43
V.5. EFFETS DU STRESS HYDRIQUE SUR LE COMPORTEMENT PHYSIOLOGIQUE	44
V.5. 1. <i>Effet du stress hydrique sur la production</i>	44
V.5. 2. <i>Effet du stress hydrique sur la surface assimilatrice</i>	44
V.5. 3. <i>Effet du stress hydrique sur l'activité photosynthétique</i>	45
V. 6. MECANISMES D'ADAPTATION A LA CONTRAINTE HYDRIQUE	45
V. 6. 1. <i>Eviter la contrainte hydrique</i>	45

V. 6. 2.	<i>Tolérer la contrainte hydrique</i>	48
V.6. 3.	<i>Les mécanismes de la tolérance à la contrainte hydrique</i>	48
V.7.	INCIDENCE DU REGIME HYDRIQUE SUR LE FONCTIONNEMENT DE LA VIGNE	49
V.7.1.	<i>Photosynthèse et transpiration en situation de stress hydrique</i>	50
V.7.2.	<i>Température d'organes et la transpiration</i>	51
V.7.3.	<i>La fluorescence chlorophyllienne en situation de stress hydrique</i>	51
V.7.4.	<i>Limitations de la croissance des organes de la plante</i>	54

VI. OBJECTIFS DU TRAVAIL	55
---------------------------------------	-----------

CHAPITRE II

Matériels et méthodes	56
------------------------------------	-----------

I. INTRODUCTION	56
------------------------------	-----------

II. MATERIEL VEGETAL	56
-----------------------------------	-----------

III. CULTURE EN CONDITIONS CONTROLEES (EN SERRE)	56
---	-----------

III. 1. ESSAI CEPAGES.....	56
III. 2.SYSTEME DE CONDUITE ET TRAVAUX EN VERT.....	57
III.3.ONTRAINTE HYDRIQUE EN SERRE POUR LES VIGNES	57
III. 4.STADE DE MESURE ET PARAMETRES ETUDIES	58
III. 5.LES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES	58
II.5.1. <i>Relation hydrique</i>	58
II.5.2. <i>Photosynthèse et paramètres associés</i>	59
II.5.3. <i>Paramètres de la fluorescence des chlorophylles</i>	59
III. 6. LES CARACTERES AGRONOMIQUES DE LA MATURETE DU RAISIN.....	60
III. 6. 1. <i>Prélèvements des baies</i>	60
III. 6. 2. <i>Composition des baies de raisin</i>	60

IV. ESSAI D'APPLICATION D'UNE CALCITE MICRONISEE SUR LA VIGNE	62
--	-----------

IV. 1.MATERIEL VEGETAL.....	62
IV. 2.CONTRAINTE HYDRIQUE EN SERRE POUR LES VIGNES	62
IV. 3.APPLICATION D'UNE CALCITE MICRONISEE SUR DES VIGNES EN SITUATION DE STRESS HYDRIQUE	63
IV. 3.1. <i>Particularité</i>	63
IV. 3.2. <i>Traitements appliqués avec une calcite micronisée (Megagreen®)</i>	63
IV. 4.LES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES.....	64

V.MISE EN EVIDENCE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE DE MEGAGREEN SUR LES PLANTES ET L'INDUCTION DES PROCESSUS DE FERMETURE DES STOMATES	64
--	-----------

V. 1.CONDITIONS DE CULTURE DU MATERIEL VEGETAL	64
V. 2.ELECTROPHYSIOLOGIE : MESURES DU POTENTIEL DE MEMBRANE ET DES COURANTS IONIQUES	64
V. 2.1. <i>Les électrodes</i>	65
V. 2.2. <i>Le système expérimental</i>	65
V. 2.3. <i>Mise en place du matériel</i>	65
V. 2.4. <i>Mesure des courants par la technique de voltage imposé à une électrode</i>	66
V. 3.MESURE DES VARIATIONS DU pH EXTRACELLULAIRE	66
V. 4.MESURE DE PEROXYDE D'HYDROGENE (H ₂ O ₂).....	66

V. 5.MESURE DU CALCIUM CYTOPLASMIQUE..... 67

VI.ANALYSES DE DONNEES ET ANALYSES STATISTIQUES.....67

CHAPITRE III

Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique de la vigne *Vitis vinifera* L. cvs Cot, Négrette et Fer Servadou.....68

ARTICLE I.

STOMATAL AND NON-STOMATAL LIMITATION OF PHOTOSYNTHESIS UNDER WATER DEFICIT AND ELEVATED CO₂ IN THREE GRAPEVINE VARIETIES (*VITIS VINIFERA* L.).....72

ARTICLE II.

ECOPHYSIOLOGICAL RESPONSES OF THREE GRAPEVINES VARIETIES (*VITIS VINIFERA* L.) TO WATER STRESS UNDER AMBIENT AND ELEVATED CARBON DIOXIDE LEVELS.....85

CHAPITRE IV

Effet du stress hydrique sur la maturité phénolique du raisin : études des cépages *Vitis vinifera* L. cvs Cot, Négrette, Tannat et Duras.....103

ARTICLE I.

EFFECTS OF WATER AVAILABILITY ON LEAF GAS EXCHANGE AND BERRY MASS REPARTITION IN COT AND NÉGRETTÉ GRAPEVINE CULTIVARS (*VITIS VINIFERA* L.).....106

ARTICLE II.

EFFECTS OF WATER AVAILABILITY FROM LEAF PHOTOSYNTHESIS TO GRAPE PHENOLIC MATURITY OF TANNAT AND DURAS GRAPEVINE CULTIVARS (*VITIS VINIFERA* L.).....126

CHAPITRE V

Effet d'une calcite micronisée sur le comportement écophysologique et la signalisation cellulaire chez la vigne *Vitis vinifera* L. en conditions de stress hydrique147

ARTICLE I.

PROCESSED CALCITE PARTICLES IMPROVED LEAF PHOTOSYNTHESIS OF POTTED COT GRAPEVINES DURING WATER STRESS CONDITIONS.....150

ARTICLE II.

EARLY MEGAGREEN-INDUCED CELLULAR RESPONSES, IMPLICATION FOR STOMATAL CLOSURE.....167

CHAPITRE VI

Conclusion et Perspectives.....183

Références bibliographiques.....185

RESUME

Eu égard aux changements climatiques, la vigne est de plus en plus soumise à des conditions de sécheresse estivale prononcée, provoquant un stress hydrique important. Cette étude a porté sur les cinq principaux cépages du vignoble midi pyrénéen : Cot, Négrette, Tannat, Fer Servadou et Duras en situation de stress hydrique. Les études ont été réalisées en culture hydroponique sous serre en conditions contrôlées.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'état hydrique et le comportement écophysiolgique (photosynthèse et fluorescence) de trois cépages Cot, Négrette et Fer Servadou en conditions de cultures normales et sous stress hydrique. Les résultats obtenus montrent un comportement différent des cépages vis-à-vis de la limitation de la photosynthèse. Soumis à une concentration élevée de CO₂, l'activité photosynthétique du Fer Servadou est rétablie ; confirmant que la limitation est essentiellement stomatique et que celle-ci est étroitement liée à la conductibilité hydraulique du cépage. Ces limitation stomatique et non-stomatique sont non seulement liées à la sensibilité du cépage après installation de la contrainte, mais aussi à ses propriétés hydrauliques.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés d'une part aux conséquences de limitation de l'assimilation de carbone à l'échelle saisonnière sous contrainte hydrique, et d'autre part aux processus de maturité phénolique de la baie de raisin. Les effets de l'alimentation hydrique sur les caractères morphologiques de la baie ainsi que sur les teneurs en composés phénoliques ont été mis en relation avec le poids frais de la baie. Les résultats obtenus montrent une différence du comportement du cépage par rapport à l'évolution des anthocyanes et des tanins au cours de la période de maturité. La variation la plus importante de ses paramètres est essentiellement due aux variations du poids frais de la baie.

Des travaux ont été menés pour caractériser certains effets de l'application d'un produit, limitant les stress hydrique, à l'échelle de la plante entière en situation de contrainte hydrique (*Vitis vinifera* L.) et celle au niveau cellulaire (*Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana plumbaginifolia*). L'application du produit sur le cépage Cot stimule l'activité photosynthétique en augmentant la conductance stomatique. L'efficacité photosynthétique de l'utilisation de l'eau est améliorée car l'assimilation du CO₂ est plus importante que la transpiration. Les résultats obtenus sur les suspensions cellulaires montrent que le produit provoque une augmentation de calcium dans le cytosol, induit un efflux d'anions, une alcalinisation du milieu et une production d'espèces actives de l'oxygène. Ceci suggère une action de type éliciteur. Les effets sont dose-dépendants.

MOTS CLES : *Vitis vinifera* L., stress hydrique, maturité phénolique, photosynthèse, conductance stomatique, anthocyanes, calcite micronisée, signalisation cellulaire.

INTRODUCTION GENERALE

Le raisin produit à partir du genre *Vitis* est le fruit au premier rang parmi les productions fruitières dans le monde, du point de vue de sa production ainsi que son importance économique. Pour la France, la production de raisin et la superficie cultivée en représentent respectivement 11 et 10 % de la production et de la superficie mondiales. La vigne est une plante pérenne dont les exigences écologiques, font qu'elle est souvent cultivée dans des zones climatiques où l'eau est le facteur limitant, et elle est le plus souvent implantée sur des sols très pauvres au niveau agronomique qui accentue encore l'effet de ce facteur. La législation actuelle des Appellations d'Origines Contrôlées (AOC) fait que l'irrigation est très contrôlée, soumise à autorisation, et souvent impossible à pratiquer sur un grand nombre de vignobles.

Depuis plusieurs années, les météorologistes constatent des modifications des conditions climatiques à l'échelle mondiale, et surtout régionale, allant vers un réchauffement de la planète. Ce changement climatique entraîne des conditions de sécheresse estivale prononcée, provoquant un stress hydrique important sur la vigne. En effet, la sécheresse de 1976 avait été vécue comme un événement exceptionnel. Les sécheresses plus récentes, du début des années 1990 et surtout celles de 2003 et de 2005, ont été davantage perçues comme une des manifestations possibles du "changement climatique" annonçant un retour plus fréquent de ces "anomalies" qui, de statut de catastrophe exceptionnelle, pourraient passer au statut de phénomène récurrent. Le comportement écophysologique de la vigne et la maturité du raisin en particulier les composés phénoliques sont étroitement liés à ces conditions, on constate alors une baisse du rendement avec une diminution de la taille des baies, en particulier, les grandes et une modification de leur composition liée à cette variation.

Parmi les composés les plus importants de la baie on trouve : les sucres, les acides organiques, les composés aromatiques et les composés phénoliques. Parmi ceux-ci on peut distinguer les anthocyanes, pigments responsables de la couleur rouge des baies et des vins qui sont localisés dans la pellicule des cépages à baies noires. Il y a aussi, les tanins qui sont essentiellement localisés dans la pellicule et les pépins.

Dans ce contexte, les vignobles de la région Midi-Pyrénées colonisent historiquement des terrains qui ont des caractéristiques très différentes. D'une part les conditions climatiques multiples auxquelles ils sont soumis à des influences montagnardes (des Pyrénées et du Massif Central) à des influences océanique et méditerranéenne. D'autre part ils sont implantés sur des sols d'origines très diverses ; les sols calcaires (dépôts molassiques ou sols de Causses), les sols acides (dépôts alluviaux décalcifiés ou sols détritiques d'origine granitiques ou métamorphiques). En plus cette région présente une collection de cépages autochtones offrant aux vignerons la possibilité de faire des vins très typés et originaux. L'étude de l'incidence de la sécheresse ou du régime hydrique limitant sur la physiologie de la vigne et la qualité des raisins a été étudiée par de nombreux auteurs. Cependant, de très rares travaux ont été réalisés sur les cépages régionaux du vignoble Midi-Pyrénées.

Au vu de cette problématique et afin de répondre ne serait ce que partiellement à l'attente de la filière vitivinicole nous nous proposons d'étudier les aspects relatifs aux effets d'une contrainte hydrique, depuis la véraison jusqu'à la maturité, sur les échanges gazeux (photosynthèse et fluorescence chlorophyllienne), les relations hydriques, la cinétique de maturité phénolique ainsi que la qualité des raisins à maturité des principaux cépages Tannat, Cot, Négrette, Duras et Fer Servadou. Une attention particulière sera portée sur l'influence d'une pulvérisation de calcite micronisé sur le fonctionnement photosynthétique de la vigne et ses mécanismes de signalisation cellulaire.

I. Botanique et importance de la vigne

La vigne cultivée pour la production de vin, *Vitis vinifera* L., est une liane pérenne, ligneuse, à tiges sarmenteuses qui appartient à la famille des Vitacées, autrefois appelée Ampélidées ou Ampélidacées. Cette espèce est originaire des zones septentrionales tempérées d'Amérique, d'Asie et d'Europe. La famille botanique a une large et très complexe diversité génétique constituée de 16 groupes, qui peuvent être répartis en trois groupes principaux éco-géographiques *occidentalis*, *pontica*, and *orientalis* (Aradhya *et al.*, 2003). Il existe dix genres et plus d'un millier d'espèces vivant sous des climats tempérés, dans ces zones se trouve la majorité des vignobles cultivés, ainsi que dans les régions tropicales et subtropicales (Galet, 1993).

Le genre *Vitis* est composé par deux sous-genres: *Muscadinia* et *Euvitis*, dont la quasi-totalité des vignes cultivées font partie. A l'intérieur d'*Euvitis* on distingue trois groupes : un groupe euro-asiatique (formé par *V. vinifera* Linné et *V. vinifera silvestris*), un groupe asiatique (une dizaine d'espèces, peu étudiées) et un groupe américain (une vingtaine d'espèces de grande utilisation viticole) (Huglin, 1986).

La vigne dans son ensemble peut se développer dans presque tous les climats et dans toutes les régions du monde de par les grandes capacités d'adaptation de ses nombreuses espèces. Certaines espèces sont mieux adaptées aux régions très chaudes, principalement *V. coriacea* et *V. gigas*. D'autres sont plus répandues dans les régions tempérées notamment *V. vinifera*, *V. labrusca* et *V. riparia*. Néanmoins, à l'échelle mondiale *V. vinifera* est l'espèce viticole la plus commune et la plus importante au niveau économique (Galet, 1993). Malgré l'existence des milliers de cépages (Galet, 2000), le marché mondial du vin est dominé par un nombre réduit de cépages (Cramer *et al.*, 2007)

Le raisin issue à partir du genre *Vitis* est le fruit au premier rang des productions fruitières dans le monde du point de vue quantité et importance économique (Vivier et Pretorius, 2002). La production mondiale de raisin en 2005 était de 67, 696 millions de tonnes pour une superficie totale de 7,385 millions de ha (FAOSTAT data, 2005; <http://faostat.fao.org>). La production totale de raisin et la superficie totale occupée par la vigne en France représentent 10,16 et 11,67 % respectivement de la production et de la superficie mondiales. Malgré sa grande importance économique dans le contexte mondial la vigne constitue un modèle biologique peu étudié qui ne mobilise pas des moyens de recherche importants permettant d'aboutir rapidement à des avancées fondamentales dans la connaissance du végétal.

Il reste donc à mener des nombreuses études pour mieux comprendre les aspects fondamentaux de cette plante, sur sa physiologie et les interactions avec le milieu physique de cette plante. Ces études permettraient de dégager les voies qui pourraient être utilisées pour améliorer les performances agronomiques de cette culture dans le cadre d'une viticulture raisonnée.

Le vignoble de la région Midi-Pyrénées

Le vignoble s'étend sur 46231 ha et produit 3349180 hl dont 52% de vins rouges et rosés et 48% de blancs. La production des vins Appellation d'Origine Contrôlée est de 836997 hl dont 159000 hl destinés à la production d'Armagnac et de Flocc de Gascogne.

Les vignobles constituent une véritable mosaïque de petites entités implantées (Fig 1):

- sur la bordure nord du Bassin Aquitain, où l'on rencontre les vignobles de Gaillac, de Cahors et des Coteaux du Quercy en terminant par Bergerac;
- sur les terrasses de la Garonne et de ses affluents jusqu'au Pays Toulousain où l'on trouve les Côtes de Duras, les Côtes de Marmandais, les Côtes de Buzet, les Côtes de Brulhois et enfin les Côtes du Frontonnais, ainsi que ses satellites Lavilledieu et Saint Sardos, ce dernier vignoble étant en passe d'obtenir l'appellation d'origine;
- sur le Bassin de l'Adour et jouxtant les Pyrénées sont implantés les vignobles de Madiran, du Pacherenc du Vic Bilh et des Côtes de Gascogne, puis ceux de Jurançon, du Béarn, du Béarn-Belloq qui se poursuivent jusque dans les Landes par le Tursan;
- enfin, les vignobles « des montagnes »: des Pyrénées avec celui d'Irouleguy et ceux du Massif central: Marcillac, Entraygues et le Fel, Estaing et les Côtes du Millau.

Ces vignobles colonisent des terroirs qui ont des caractéristiques très différentes :

- d'une part, ils sont implantés sur des sols d'origines très diverses : des sols calcaires (dépôts molassiques ou sols de Causses), des sols acides (dépôts alluviaux décalcifiés ou sols détritiques d'origine granitique ou métamorphique).

- d'autre part, des conditions climatiques multiples auxquelles ils sont soumis : influences montagnardes (des Pyrénées et du Massif Central), influences océanique et méditerranéenne

Cette situation déjà unique en France est associée au fait que chaque appellation possède des cépages autochtones qui permettent aussi de « typer les vins » et qui leur confèrent des caractéristiques originales et différentes de ceux produits dans les autres vignobles.

Cette typicité, est donc l'atout majeur des vins du Sud Ouest qu'ils doivent absolument conserver pour être compétitifs, et pouvoir encore se développer malgré une concurrence nationale et internationale de plus en plus vive.

II.1. Nature des sols des vignobles pyrénéens

Les vignobles du Sud-Ouest de la France sont pour la plupart installés sur les terrains sédimentaires d'âge tertiaire du Bassin Aquitain, ou bien sur les alluvions des terrasses formées par les fleuves et leurs affluents au cours du quaternaire. Deux exceptions toutefois: au sud, le piémont pyrénéen produit l'Irouléguay, le vin des basques; au nord-est; dans le Massif-Central, les vignobles de Marcillac, d'Entraygues et du Fel, d'Estaing, et des Côtes de Millau ; les vignobles sont implantés sur des terrasses rocailleuses en grande partie constituées de schistes.

Le bassin d'Aquitaine correspond à un remplissage, épais de plus de 1500 m en son centre, de couches sédimentaires détritiques fines, appelées « molasse », disposées horizontalement. La molasse porte ce nom car elle provoque une topographie de collines à croupes molles caractérisant la grande majorité de ce bassin. Leur composition est triple: argile, sable et calcaire. La présence de ces trois constituants est variable en toutes proportions. Ce terme de molasse utilisé par les géologues, correspond à ce que les viticulteurs du bassin d'Aquitaine appellent l'« argilo-calcaire ou terreforts ».

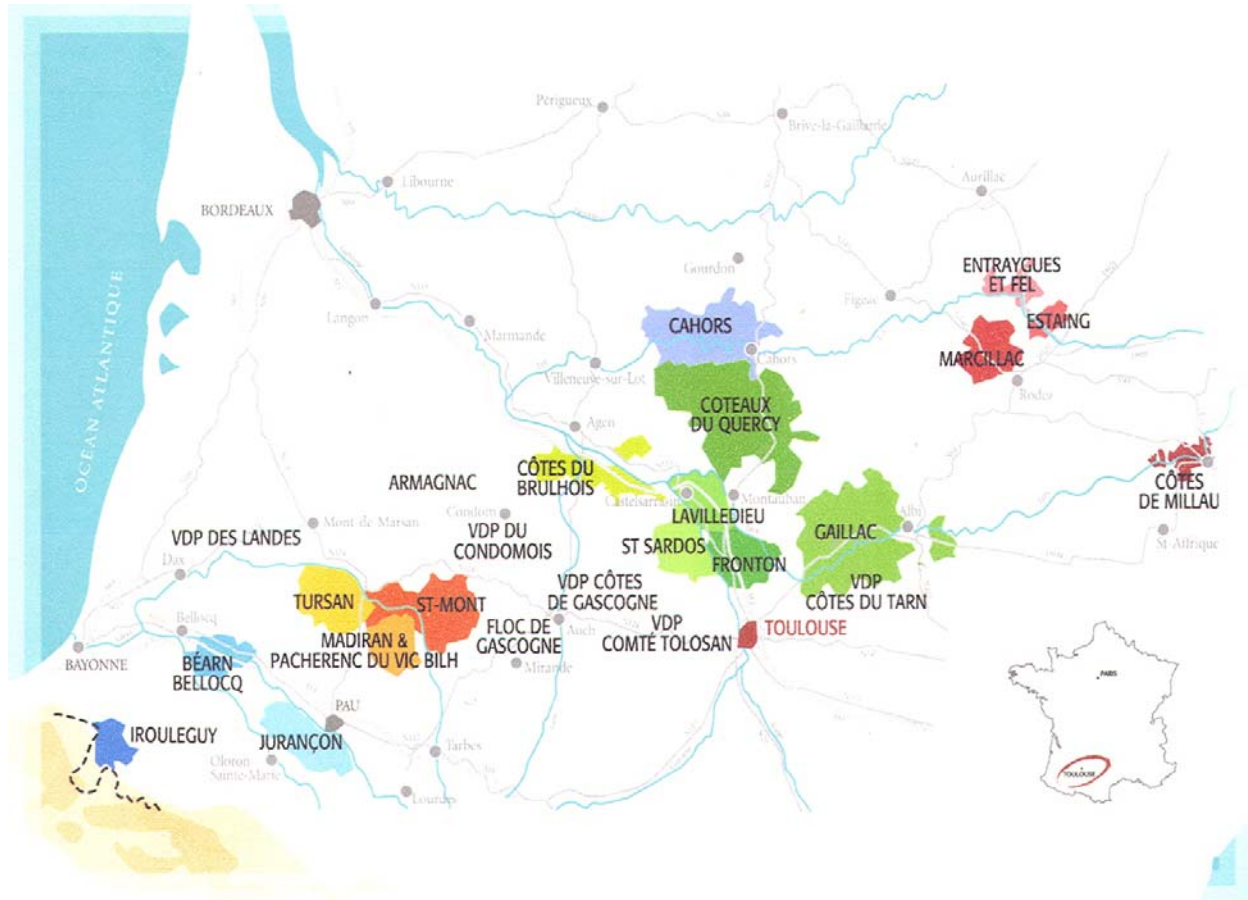


Figure 1 : Les vignobles du Bassin de Production Sud-Ouest de la France.

Intercalées dans cet ensemble molassique, des couches de calcaire de couleur claire, de quelques mètres d'épaisseur sur quelques kilomètres d'extension, forment localement des petits abrupts dans la topographie. Ceux-ci, le plus souvent d'origine lacustre, renferment vers le nord-ouest du bassin d'Aquitaine des fossiles marins.

Dans cette ancienne plaine molassique, les rivières actuelles ont creusé des vallées puis les ont remblayées d'alluvions plus ou moins grossières et ont recréusé ces dernières en fonction des vicissitudes des périodes glaciaires et interglaciaires ayant caractérisé les climats successifs durant l'ère quaternaire; on peut ainsi observer, sur les flancs des rivières les plus importantes, plusieurs terrasses alluviales étagées. Sur sa bordure nord-est, émergent au dessous des molasses, les terrains du substrat constituant le plus souvent des plateaux appelés Causses. A peine déformés par quelques failles et de rares plis à large rayon de courbure, ces terrains datent pour la plupart de l'ère secondaire (jurassique et crétacé). Ils sont généralement constitués de calcaires soit massifs, soit en plaquettes. Localement, des placages de terrains "sidérolithiques", sables argileux rouges riches en fer, recouvrent de façon irrégulière les calcaires des Causses.

Au sud du bassin d'Aquitaine, dans le Piémont pyrénéen, là aussi, plus que les terrains, ce sont les microclimats variés dus à une topographie accidentée, qui favorisent le développement de merveilleux vignobles.

Enfin vers l'est de ce Bassin, on pénètre dans le Massif -Central, vieille montagne érodée laissant apparaître en surface des couches métamorphiques violemment déformées et recristallisées et des terrains magmatiques. Les vignobles profitent ici de sols évolués mais leur emplacement est surtout dirigé par les microclimats localement favorables.

II.2. Caractéristiques des climats de la région Midi-Pyrénées

La France, par sa latitude, est située dans la zone tempérée. Mais le territoire de la France est relativement étendu et englobe des régions climatiques assez différentes, de sorte que les trois grandes tendances principales du climat européen s'y retrouvent : océanique à l'ouest, continentale à l'est et méditerranéenne au sud-est, avec des dégradés entre chaque aire. On peut ajouter à ces trois tendances le climat montagnard, présent principalement dans les Alpes, les Pyrénées, mais aussi dans le Massif central, les Vosges et le Jura.

En France, de septembre 2004 à septembre 2005, une grande partie du territoire a connu une pluviométrie inférieure d'un tiers à la moyenne des 50 dernières années, et une sécheresse d'une intensité comparable à celles de 1976 et de 1989. Sur les 8 dernières années, une vingtaine de départements connaissent des limitations de consommation d'eau en année "normale" ; ce chiffre est doublé les années relativement sèches (1998, 2004), et atteint plus de 60 les années les plus sèches (2003, 2005). Même en année humide (2001), environ 6 départements connaissent des limitations d'usage de l'eau.

Le vignoble du bassin d'Aquitaine est donc soumis à des influences océaniques prédominantes mais aussi à des influences méditerranéennes et montagnardes (dues aux Pyrénées et au Massif Central Fig. 2). Dans les vignobles pyrénéens, les températures sont plutôt douces en hiver (4 à 7°C) : il neige très rarement. Les pluies sont abondantes au printemps. Les étés toutefois sont d'autant plus chauds et secs (19 à 22°C) que l'on se déplace vers l'est du bassin en raison de l'influence méditerranéenne accentuée par le vent d'Autan, tandis que les orages de grêle sont souvent menaçants.

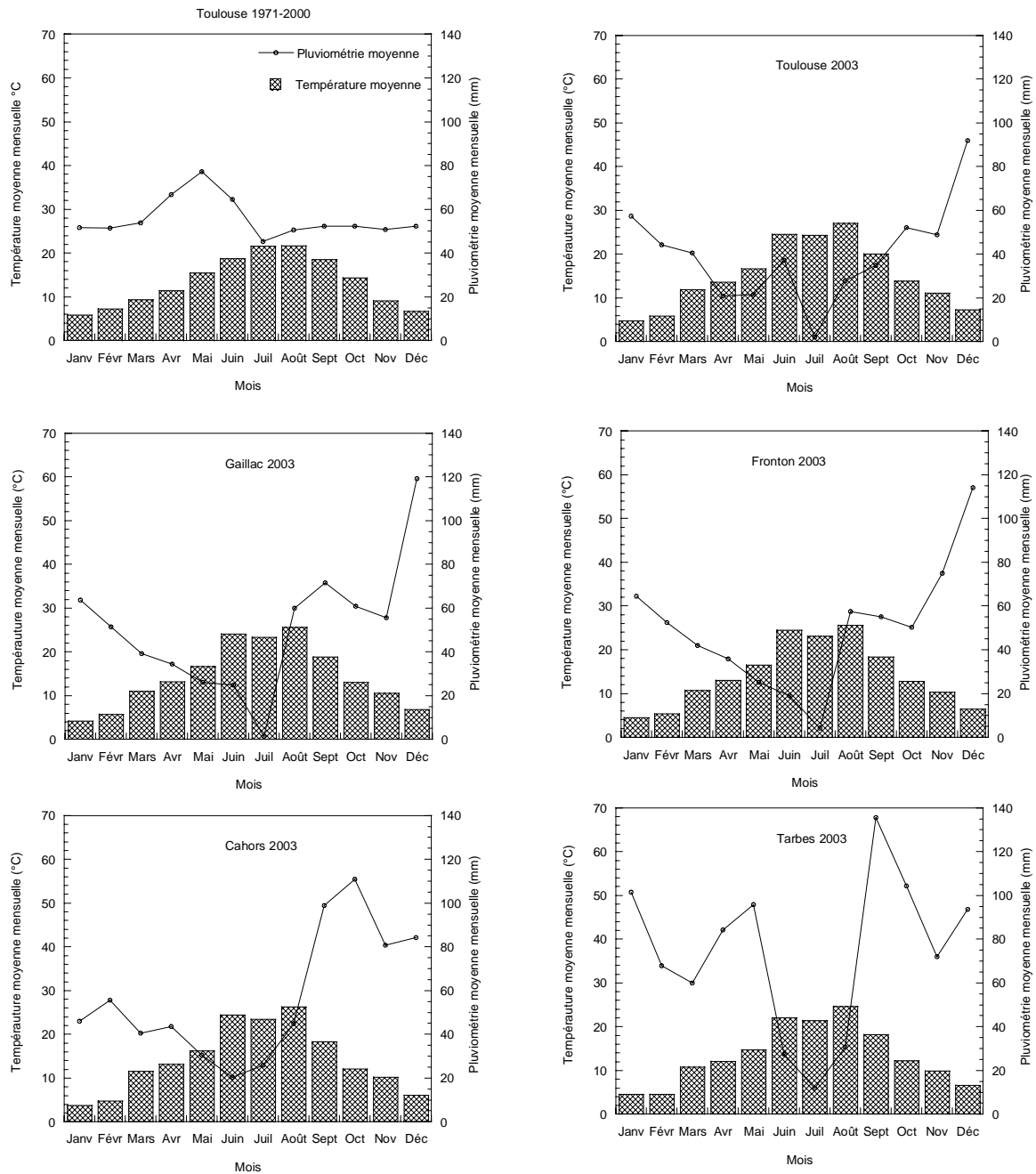


Figure 2 : Diagrammes ombrothermiques de Toulouse (moyenne 1971-2000 et 2003) en comparaison avec ceux de Fronton, Gaillac, Cahors et Tarbes pour l'année 2003.

Les automnes offrent un bon ensoleillement, favorable à la maturation des raisins, en raison d'un foehn fréquent, par régime de sud, du aux reliefs des Pyrénées, ou de la Montagne Noire. Comme le montre la figure (2), le climat toulousain est soumis à des influences océaniques et méditerranéennes. Pour la période 1971-2000, la pluviométrie moyenne annuelle de Toulouse est de 668,5 mm, la température moyenne annuelle est de 13,3°C et la durée d'insolation annuelle de 2009,8 heures. Il existe une grande variabilité entre les années par rapport à l'évolution moyenne (Fig. 2). Aussi pour l'année 2003 les stations de Toulouse, Fronton, Gaillac, Cahors et Tarbes illustrent la tendance actuelle vers une période de sécheresse estivale plus au moins longue et ceci pendant la période allant du stade floraison jusqu'à maturité du raisin.

II.3. Les cépages autochtones des vignobles pyrénéens

La collection de cépages autochtones offre aux vignerons la possibilité de faire des vins très typés et originaux. Selon Lavignac (2001) les principaux cépages de la région ont les caractéristiques suivantes

II.3.1. Le cépage *Vitis vinifera* L. COT

II.3.1.1. Origine

Le Cot fait partie de la famille des Cotoïdes, cépages très présents dans le Sud-Ouest dont ils sont originaires. Certains auteurs ont cru reconnaître dans ce cépage également dénommé Auxerrois, un cépage décrit par Columelle sous le nom d'Aminées (cépage très prisé des abeilles) dans son important traité d'agronomie *De re rustica* au 1^{er} siècle de notre ère. Baudel (1972) écrit: «Les chantes et historiens ont une tendance répandue à émettre l'hypothèse que notre Auxerrois n'est autre que l'ancien «Aminée» de la campagne napolitaine chantée par Horace et Virgile». Des lambrusques indigènes ont pu se métisser avec des cépages de Rome, ou plutôt des cépages de Campanie, et donner le Cot que nous connaissons actuellement. Monsieur Vassal de Monviel, originaire du Quercy et propriétaire du château libournais de «Pressac» entre 1734 et 1747, a introduit sur son domaine le cépage Auxerrois qui a alors pris la dénomination de Noir de Pressac dans cette région. Avant la crise phylloxérique, le Cot était le cépage le plus important du Sud-Ouest, de la Gironde au Gaillacois, connu sous le nom de Prunelard musqué, cité par Bousquet (1885) et par Riol (1913). Seillan (1872) cite le Petit Vesparo comme premier cépage noir du Gers bien avant le Tannat. En 1784, le subdélégué de Libourne écrit en ces termes à Dupré de Saint-Maur: «Le Noir de Pressac est de deux espèces, une à queue rouge, une à queue blanche. La première est de goût supérieur»

II.3.1.2. Éléments de description

Bourgeonnement cotonneux blanc à liseré carminé. Jeunes feuilles en forme de cœur, duveteuses à plages bronzées. Feuilles adultes entières ou trilobées. Sinus pétiolaire ouvert en V ou en U. Grappes moyennes à baies rondes.

II.3.1.3. Caractéristiques et aire de diffusion du Cot

C'est un producteur moyen qui ne doit pas être planté sur des sols trop fertiles car il devient capricieux et à tendance à couler. Le Cot donnait autrefois les «vins noirs» alcoolisés de Cahors et du Brulhois qui servaient de vins dits «médecins» aux vins de Bordeaux avant 1789. Actuellement, les vins de Cot sont charpentés et représentent une gamme typique des vins du Sud-Ouest. La superficie du vignoble de l'AOC Cahors est de 4242 ha assurant une production annuelle de l'ordre de 240 000 hl. Dans cette appellation le Cot représente 70% de l'encépagement. Il donne des vins colorés, aux tanins abondants, aux arômes soutenus, de mure, prunelle, épices et herbes aromatiques et après vieillissement de truffe. Il possède une certaine acidité quelquefois trop présente sur des terroirs peu qualitatifs.

L'aire de diffusion du Cot est aujourd'hui beaucoup plus restreinte. Cépage principal à Cahors, il figure aussi dans le Blayais et le Bourgeais en Gironde ainsi que dans le Brulhois. A l'échelle mondiale, le Cot ou AUXEROIS ou MALBEC est très cultivé dans beaucoup de pays et en particulier en Amérique du Sud.

II.3.2. Le cépage *Vitis vinifera* L. NEGRETTE

II.3.2.1. Origines

La Négrette fait partie de la famille des Cotoïdes du Sud-Ouest. Une légende veut que ce cépage provienne du Moyen Orient d'où il aurait été introduit par les Templiers. Le vignoble du Frontonnais étant situé dans la zone la plus occidentale des implantations romaines, on peut imaginer que la Négrette, comme d'ailleurs le Cot à Cahors, soit la descendance de la fécondation d'une lambrusque indigène par le pollen d'un cépage méditerranéen. Tallavigne, *in* Viala et Vermorel (1910), signale son importance au XIV^{ième} siècle dans le vignoble de Gaillac, dans le Tarn, dans les vignobles de Fronton, Villaudric, Carbonne et Cazères, en Haute-Garonne, et même dans six cantons du Gers sous le nom de Vesparo. Or, dans le Gers, le cépage principal en rouge était, à cette époque, le Cot, désigné aussi Vesparo. Nous sommes donc conduits à en déduire qu'il y a eu confusion de l'auteur pour ce département. Tallavigne cite pourtant des erreurs d'identification réalisées par quelques autres auteurs ayant mal étudié la Négrette: le comte Odart y voyait un Pinot, Guyot un Cabernet, d'Armailhacq un Malbeck (Cot) et Pulliat un Mourvèdre. Toujours selon Tallavigne, l'origine de la Négrette est inconnu mais il estime que, malgré les noms de Négret, Négretta, Negretto qui lui sont attribués, il ne peut s'agir d'une origine italienne contrairement à ce que pourrait laisser supposer la consonance des deux derniers synonymes.

La Négrette c'est fixée dans la Haute-Garonne, le Tarn-et-Garonne et autrefois dans le Tarn d'où elle a disparu ainsi que le Cot au profit du Duras et du Fer. Elle est absente des vignobles pyrénéens car elle est sensible à la pourriture grise. C'est un cépage population dont existaient trois types qui différaient par la forme de leurs baies

II.3.2.2. Éléments de description

Bourgeonnement cotonneux blanc à liseré carminé. Jeunes feuilles duveteuses très cotonneuses en dessous. Feuilles adultes quinquelobées, sinus latéraux supérieurs peu profonds, inférieurs plus marqués en lyre. Grappes moyennes à baies rondes. La Négrette est un cépage productif à débourrement précoce, sensible à l'oïdium et à la pourriture grise.

II.3.2.3. Caractéristiques et aire de diffusion de la Négrette

La Négrette est le cépage principal des Côtes du Frontonnais auquel il donne un caractère unique, il représente 50 à 70% de l'encépagement. Dans cette appellation, le vignoble s'étend sur une superficie de 2400 ha de vigne assurant une production de 110 000 hl/an. Ce cépage constitue aussi la base principale de l'encépagement des vignobles de Villaudric dans la Haute-Garonne et de Lavilledieu dans le Tarn-et-Garonne.

La Négrette est particulièrement adaptée aux sols pauvres d'alluvions très lessivées de cette région. Elle n'aime pas l'humidité et pourrie facilement car sa pellicule est très fine, le vent d'Autan desséchant a un effet très positif en empêchant le développement du botrytis. Elle produit un vin typé qui peut se déguster dès le printemps. Les vins de Négrette sont très aromatiques de fleurs (violette, pivoine) de fruits rouges bien murs (cassis, mûre), avec quelques fois des notes de réglisse, mais elle manque un peu de tanins et surtout d'acidité ce qui rend les vins facilement oxydables. Les vins de Négrette sont très agréables à boire jeunes, atout non négligeable dans le concert des vins de gardes. On ajoute actuellement de la Syrah, des Cabernet. Autrefois, les parcelles de Négrette comportaient 15 % de cépages tardifs et acides tels la Chalosse, la Rougette, le Négret castrais (Mauiac noir ou Bouysselou à Fronton).

II.3.3. Le cépage *Vitis vinifera* L. TANNAT

II.3.3.1. Origine

La Tannat fait partie de la grande famille des Cotoïdes originaire du Sud-Ouest. Il est sans aucun doute issu d'un métissage avec un cépage pyrénéen car son lobe médian est très semblable à ceux caractéristiques des cépages indigènes de ce massif montagneux. Il est proche du Baroque B et Levadoux (1960) voit dans le Lauzet originaire du Béarn une forme peut-être issue du Tannat ou bien l'inverse. Peu cultivé jusqu'au début du XIX^{ème} siècle, il a remplacé peu à peu, vu sa grande fertilité, d'autres cépages moins productifs et plus sensibles aux maladies.

II.3.3.2. Eléments de description

Bourgeonnement blanc à liseré rosé. Jeunes feuilles en forme de cœur, duveteuses et bronzées. Feuilles adultes quiquelobées, gaufrées d'un vert très foncé. Limbe médian triangulaire dont la partie inférieure se révolue à la manière du bouc d'une chèvre. Grandes grappes ailées à baies rondes très serrées mais à long pédoncule.

II.3.3.3. Caractéristiques et aire de diffusion du Tannat

Ce cépage est productif mais tardif, donne un vin tannique nécessitant un vieillissement ou un assemblage. On trouve le Tannat dans les vignobles pyrénéens à vin rouge surtout à Madiran, Il a récemment été introduit à Cahors et dans le Tarn-et-Garonne. Le vignoble de l'AOC Madiran s'étend sur 1300 ha, avec une production annuelle de 70000hl. Ce cépage donne sa typicité à l'AOC Madiran (il représente 60% au maximum et 40% au minimum de l'encépagement), à l'heure actuelle 53% environ. C'est un cépage très vigoureux, qui produit un vin robuste et charpenté ne pouvant être bu qu'après plusieurs années de vieillissement, et qui comme son nom l'indique est très riche en tanins. Cette intensité tannique exceptionnelle, sa

richesse naturelle en alcool, et son acidité suffisante confèrent au Tannat toutes les composantes essentielles à un grand vin de garde.

II.3.4. Le cépage *Vitis vinifera* L. FER SERVADOU

II.3.4.1. Origine

Ce cépage de la grande famille des Carmenets est originaire du Pays basque espagnol. Son abondante synonymie témoigne de sa grande dispersion des Pyrénées à la Vendée (Vairon) en passant par le Bordelais (Here - bois droit). Issu de lambrusques, il a été répandu par les moines bénédictins de Madiran et de Conques qui avaient reconnu sa rusticité permettant sa culture dans les Pyrénées et l'Aveyron. Girou de Buzareingues le mentionne en 1830, sous le nom de Mansois ou Saumoncés, comme cépage ayant tendance à remplacer le Menut (Cabernet-Sauvignon) à Marcillac (Aveyron).

Cultivé en mélange jusqu'au XIX^{ième} siècle, il était confondu avec le Castets dans le Tarn, le Verdot ou le Béquignol en Gironde.

Cazeaux Cazalet (in Viala et Vermorel, 1910) décrit sous le nom de Fer le Béquignol, cépage de la vallée de la Dordogne. Cette dénomination était encore utilisée à Sauveterre-de-Guyenne, vers 1960, tandis que le Fer (Fer Servadou) était nommé Here ou Bois droit ou Panereuilh. De Lapparent (in Viala et Vermorel, 1900) décrit le Fer Servadou sous le nom de Mourac; il donne comme synonymes Camirouch dans la vallée du Salat (Ariège), Saoubadé dans la vallée de Luchon, Arech (qui signifie rustique) dans la vallée de Rivière (Haute-Garonne) et seulement Fer dans les communes voisines des Hautes-Pyrénées.

L'auteur le cite comme cépage très important à Jurançon, très répandu dans les vallées pyrénéennes; il signale en revanche son introduction récente à Monein (Pyrénées-Atlantiques) où il est peu répandu.

II.3.4.2. Éléments de description

Bourgeonnement cotonneux blanc rosé. Jeunes feuilles duveteuses légèrement bronzées. Feuilles adultes petites à moyennes tri à quinquelobées présentant un dimorphisme foliaire unique. Grappes moyennes à baies ovoïdes dont le goût rappelle celui du Cabernet Sauvignon. Le débourrement est précoce mais la maturation tardive (2^{ème} époque). Ce cépage rustique, résiste quelque peu au mildiou et aux vers de la grappe, mais craint l'oïdium.

II.3.4.3. Caractéristiques et aire de diffusion du Fer Servadou

Ce cépage rustique mais capricieux, à maturation tardive, présente un bouquet très particulier à comparer à celui du Cabernet Sauvignon. Il type les vins de Saint-Mont ou de Gaillac auxquels il contribue, mais en quantité moindre qu'à Marcillac (Aveyron).

Le Fer est vinifié à l'état pur à Marcillac, en assemblage à Gaillac, Madiran et Saint-Mont ainsi que dans tout le Sud-Ouest sans pour autant atteindre l'importance reconnue au siècle dernier. Les vins de Fer ont une couleur grenat soutenue. Ils peuvent être dégustés jeunes ou après vieillissement, le plus souvent après passage en fût. Les vins jeunes ont un nez fruité (framboise, cassis), pouvant évoluer avec l'âge vers des arômes de cacao. En bouche, bien que les tanins soient bien présents, ils sont toujours très fondus. Cependant, comme le Cabernet Sauvignon (Roujou de Boubée *et al.*, 2000) et le Sauvignon blanc (Augustyn *et al.*, 1982 ; Lacey *et al.*,

1991), ils présentent souvent, selon les terroirs et l'état de maturité, des arômes végétaux et herbacés de type «poivron vert» liés à de fortes teneurs en 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP).

II.3.5. Le cépage *Vitis vinifera* L. DURAS

II.3.5.1. Origine

Comme pour les cépages du Sud-Ouest dénommés Bordelais (Mérille, Tannat, Baroque...), le Duras n'a aucun rapport avec la ville de Duras, siège d'un duché du Lot-et-Garonne qui comporte un vignoble réputé dont il est absent.

On retrouve en revanche, avec quelques variantes morphologiques au niveau du feuillage notamment, un Duras de Gimalac ou Brinck au Fei (hameau de la commune d'Engualès, dans le Cantal, faisant partie du vignoble d'Entraygues et du Fel) et, autrefois, un Duraze à Pamiers (Ariège). De Tallavignes (in Viala et Vermorel, 1910) écrit « le Duras est cultivé dans le Tarn et l'Ariège depuis un temps immémorial. Le 8 novembre 1484, maître de Pachino, notaire à Lavaur, enregistre un bail à complant en Duras. (Le bail à complant : le propriétaire du sol loue la terre à un fermier qui s'engage à la planter en vigne. Ledit fermier recevra en retour une partie de la parcelle et exploitera le reste moyennant le paiement au propriétaire ou le don d'une partie de la récolte.)

Ce cépage était à la base des vignobles dits «des Baudets et des Cendressés» à Pamiers. À Gaillac, avec le Brocol (Fert, d'après l'auteur) et la Négrette, il donne un vin d'une finesse spéciale. Malheureusement ce cépage a trop souvent été remplacé par le fertile Valdiguié. La création du vignoble de Gaillac remonte au II^{ème} siècle avant J.C. On peut donc être amené à penser que le cépage Duracina signalé par Columelle et Platon, et introduit par les premiers colons romains dans la région méditerranéenne, se serait répandu dans le gaillacois ainsi que dans le Dauphiné où l'on trouve un cépage dénommé Dureza.

La ressemblance du feuillage du Duras avec celui du Canaril de l'Ariège prouve toutefois qu'il est bien originaire de l'est de la région Midi-Pyrénées.

II.3.5.2. Éléments de description

Bourgeonnement cotonneux blanc à liseré carminé. Jeunes feuilles duveteuses, jaunâtres avec des plages légèrement bronzées. Feuilles adultes quinquelobées très découpées. Sinus pétiolaire recouvrant des nervures violacées. Grandes grappes ailées à petites baies ovoïdes. Le Duras dit de Cimalac, cultivé en Aveyron, a des feuilles très vertes, un peu plus lissées, les nervures moins violacées, le bois brun et la grappe longue très serrée.

II.3.5.3. Caractéristiques et aire de diffusion du Duras

C'est un cépage productif, sensible aux gelées, à l'oïdium et au black-rot. On distinguait autrefois un Duras mâle peu fertile et un Duras femelle très fertile ; seul ce dernier a subsisté.

Le Duras est uniquement cultivé dans le gaillacois en association avec le Fer ou braucol et quelque peu en aveyron. L'a superficie du vignoble gaillacois est de 3850 ha assurant une production annuelle de 180000 hl. Ce cépage préfère des sols sablonneux et légers aux calcaires maigres, bien exposés car il est sensible à l'oïdium. En assemblage il apporte finesse, couleur et degrés d'alcool. Les tanins frais et élégants développent un bouquet délicat avec des notes épicées et une grande rondeur et longueur en bouche.

II.4. Le porte-greffe 3309 COUDERC

Dans la région Midi-Pyrénées, le porte-greffe le plus répondu est le 3309 Couderc. Selon [Ambrosi et al., \(1997\)](#) ce porte greffe est issu d'un croisement entre *Vitis riparia* var. tomentos et *Vitis rupestris martin* en 1881 par Georges Couderc. Il est plus proche de *Rupestris* que *Riparia*, il s'en différencie par une vigueur plus importante et une grande sensibilité à la Chlorose et au calcaire actif (11% ou I.P.C = 10). Après avoir été longtemps (jusqu'au 1963) le second porte-greffe multiplié dans les vignes mères, il a été rétrogradé à la quatrième place, derrière le SO4, le 41 B et le 110 R. Sa superficie a augmenté, passant de 274 ha en 1984 à 329 ha en 1990. Son utilisation au vignoble représente sensiblement 100 000 ha de vignes greffées, 83.3 % de vignes mères sont en matériel certifié.

C'est un porte-greffe largement répondu pas seulement en France mais aussi en Italie, au Nord-Est des Etats Unis et au Canada.

II.4.1 Description du porte-greffe 3309C

Selon [Galet \(2000\)](#), le porte-greffe 3309C présente les caractéristiques suivantes :

- Bourgeonnement glabre, vert brillant,
- Jeunes feuilles glabres, brillantes,
- Feuilles cunéiformes 136-3-35, entières 11, unies, épaisses, brillantes (limbes glabres), vert foncé, sinus pétiolaire en V à bords convexes chez les jeunes feuilles et devenant en U ouvert chez les feuilles adultes, N faiblement pubescentes, des quelques poils séleux aux bifurcations des nervures, pratiquement glabre, dents ogivales moyennes ; pétioles courts, glabres.
- Fleurs unisexuées mâle par avortement, généralement stériles mais fructifiant parfois sur les souches vigoureuses ;
- Rameaux glabres, anguleux, défeuillaison moyenne, plus tardive que 101-14 M.G.,
- Sarment anguleux à écorce rouge violacé ; bourgeons petits, pointus.

II.4.2 Aptitudes du porte-greffe 3309C :

Selon [Galet \(2000\)](#) le porte-greffe 3309C présente les aptitudes suivantes :

- C'est un porte-greffe utilisé dans les vignobles de qualité,
- Le 3309 est un producteur moyen de bois : 25000 à 35000 mètres pour 40 à 60 000 boutures pépinières par hectare,
- La reprise au bouturage est bonne, ainsi que celle au greffage,
- La résistance phylloxérique est très bonne,
- La résistance à la chlorose est moyenne jusqu'à 11% de calcaire actif.
- Il est sensible au nématode endoparasites (*Meloidogyne*) quelle que soit l'espèce.
- 14 clones ont été agréés (N°8, 111, 111T, 143, 144, 145, 146, 147, 173, 187, 188, 189, 220, et 221) dont les plus importants sont les clones 144 (72 ha), 143 (52 ha) et 111 (47 ha) pour un total de 197 ha en matériel certifié et peu pour les clones 145, 146, et 147.

III. Conduite et phénologie de la vigne

Les plants de vigne cultivés sont constitués d'une structure permanente, formée par le tronc et les racines pérennes, qui dure toute la vie de la plante et qui s'accroît chaque année. Une autre partie, aérienne et souterraine, repousse annuellement; elle est récupérée à la récolte sous la forme de grappes ou enlevée lors des interventions de conduite pour se recycler dans le sol.

La conduite de la vigne consiste à amener la croissance des ceps, dans des formes et des limites géométriques définies par le viticulteur, par le biais des opérations culturales telles que la taille de formation et les tailles d'entretien. Plusieurs types de conduite existent pour la vigne; les systèmes les plus courants sont le Guyot, le Cordon de Royat, la Lyre, l'Espalier, le Gobelet, etc. Le type de taille en Guyot double est l'un des modes de conduite, le plus répandu avec le Cordon de Royat.

En cours de la saison de croissance, différentes techniques culturales sont mises en oeuvre pour maîtriser le développement de la plante. L'épamprage est pratiqué pendant les premiers stades de croissance pour éliminer les pousses non fructifères (gourmands) et de ce fait éviter la concurrence pour l'eau et les nutriments pour les pousses fructifères. L'écimage et le rognage sont des techniques accomplies plusieurs fois pendant la saison de végétation pour maintenir respectivement la hauteur et la largeur autorisées des haies. L'effeuillage se pratique vers la véraison afin d'éliminer les feuilles et entre-coeurs situés dans la zone des grappes pour améliorer l'insolation, la température et l'aération des grappes afin de faciliter le mûrissement des raisins.

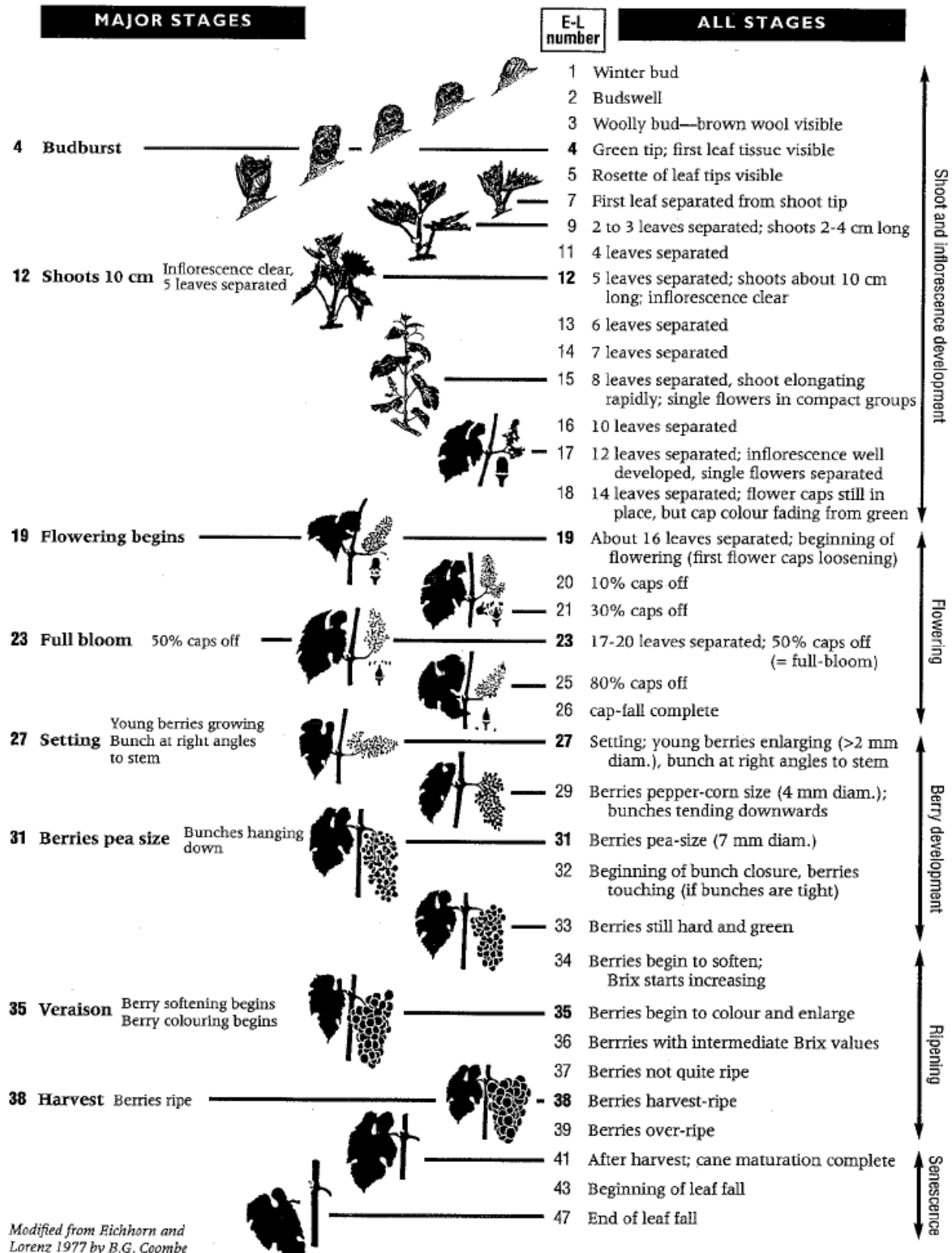
III. 1. Cycle de développement de la vigne

La croissance annuelle de la vigne débute au printemps, après la levée de la dormance des bourgeons, et se déroule sur sept mois environ, jusqu'à le mi-automne. Le cycle est composé par plusieurs stades phénologiques, dénommés presque tous par rapport à l'évolution de la grappe : débourrement, floraison, nouaison, fermeture et maturité (Fig. 3). La saison se termine avec la tombée de feuilles et le début du repos hivernal.

Le débourrement est la phase où les feuilles apparaissent et les pousses commencent à se former. Elle est composée de quatre étapes : gonflement du bourgeon, bourgeon en coton, pointe verte et première feuille étalée. La floraison est le stade où les inflorescences apparaissent à la base des rameaux; la récolte dépend en grande partie de l'intensité et de la bonne mise en place de la floraison. Cette étape est suivie par la nouaison, laquelle se manifeste par une croissance lente des fruits, due notamment à la division cellulaire après la fécondation, avec des petits grains verts, riches en chlorophylle.

L'étape suivante est la fermeture de la grappe, stade où la croissance des baies fait rapprocher les fruits les uns des autres pour « fermer » les espaces existant dans la grappe. Jusqu'ici les fruits sont photosynthétiques. La véraison commence vers le mois d'août et consiste en des

Grapevine growth stages – The modified E-L system



Modified from Eichhorn and Lorenz 1977 by B.G. Coombe

Figure 3 : Stades phénologiques repères de la vigne (Coombe, 1995)

changements radicaux : les baies des variétés rouges passent graduellement de la couleur verte à une tonalité violacée avec un arrêt de la photosynthèse, leurs cellules accumulent de l'eau et des sucres, les tiges se lignifient et brunissent de la base vers le sommet avec une accumulation de réserves (aoûtement). Enfin, la maturité est le stade où les fruits manifestent une diminution de l'acidité et un taux de sucres maximum. En général, ce stade se situe environ 100 jours après la floraison.

De nombreuses études ont démontré que les différents stades de développement de la vigne (Fig. 3) sont fortement dépendants de la température (Winkler *et al.*, 1974). La température cumulée par la plante constitue un « temps thermique », exprimé en fonction de la somme de degrés Jour (DJ) calculés à partir des températures journalières et diminuées de la température physiologique de base de 10°C, température au-dessous de laquelle la croissance de la vigne est inhibée.

III. 2. Développement et maturation des baies de raisin

Au cours de la mise à fruit et de son développement, les facteurs génétiques ainsi que les facteurs nutritionnels et environnementaux jouent un rôle important (Ojeda *et al.*, 1999, Fernandez *et al.*, 2006). Le nombre de baies se développant sur la grappe par rapport au nombre de fleurs (taux de nouaison) est fonction des génotypes, des conditions climatiques et de l'alimentation minérale de la vigne (Champagnol, 1984). Un très faible taux de nouaison (phénomène de coulure) pourrait être le résultat de compétitions de nature trophique ou hormonale (Carbonneau et Ollat, 1993) mais également d'une fertilisation excessive en azote, notamment sur *Vitis vinifera* L. cv. Merlot (Delas *et al.*, 1991). De la même façon, des défauts de fécondation peuvent conduire à de petites baies restant vertes (phénomène de millerandage). Le rapport feuille-fruit de la vigne influence également le développement et la composition des baies (Keller *et al.*, 2005 ; Baeza *et al.*, 2005). Le rapport de 1.4 m² par kg de fruit a été décrit comme étant optimal pour une maturation des baies (Howell, 2001).

La croissance des baies de raisin s'effectue selon deux sigmoïdes successives (Fig. 4) ayant chacune des caractéristiques distinctes (Coombe, 1992; Coombe et McCarthy, 2000).

La première phase du développement des baies commence à partir de la floraison jusqu'à 60 jours après. Au cours de cette phase, se succèdent des phénomènes de division cellulaire qui ont eu lieu pendant les premières semaines d'où la formation de la baie et des pépins (Coombe et McCarthy 2000) et le nombre des assises cellulaires constitutives de la baie sont déterminées (Harris *et al.*, 1968). Une augmentation de la taille des cellules avec accumulation des solutés a eu lieu au cours de cette phase. Plusieurs solutés s'accumulent et atteignent des niveaux maximums tels que les acides tartrique et malique (Possner et Kliewer, 1985). La fin de cette période se caractérise par un ralentissement de la croissance de la baie. Les baies sont alors dures, vertes, grossissent peu et présentent une certaine activité photosynthétique. Au cours de cette phase, les acides hydroxy-cinnamiques s'accumulent. Ces composés sont distribués au niveau de la pulpe et de la pellicule ; ils jouent un rôle important dans la réaction du brunissement et ils représentent des précurseurs à la synthèse des phénols volatils (Romeyer *et al.*, 1983).

Les tanins s'accumulent au cours de la première phase, ils sont localisés au niveau de la pellicule et des pépins (Kennedy *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2001). Ces composés sont d'une grande importance dans la stabilité de la couleur des vins rouges, et ils peuvent participer à l'astringence des vins.

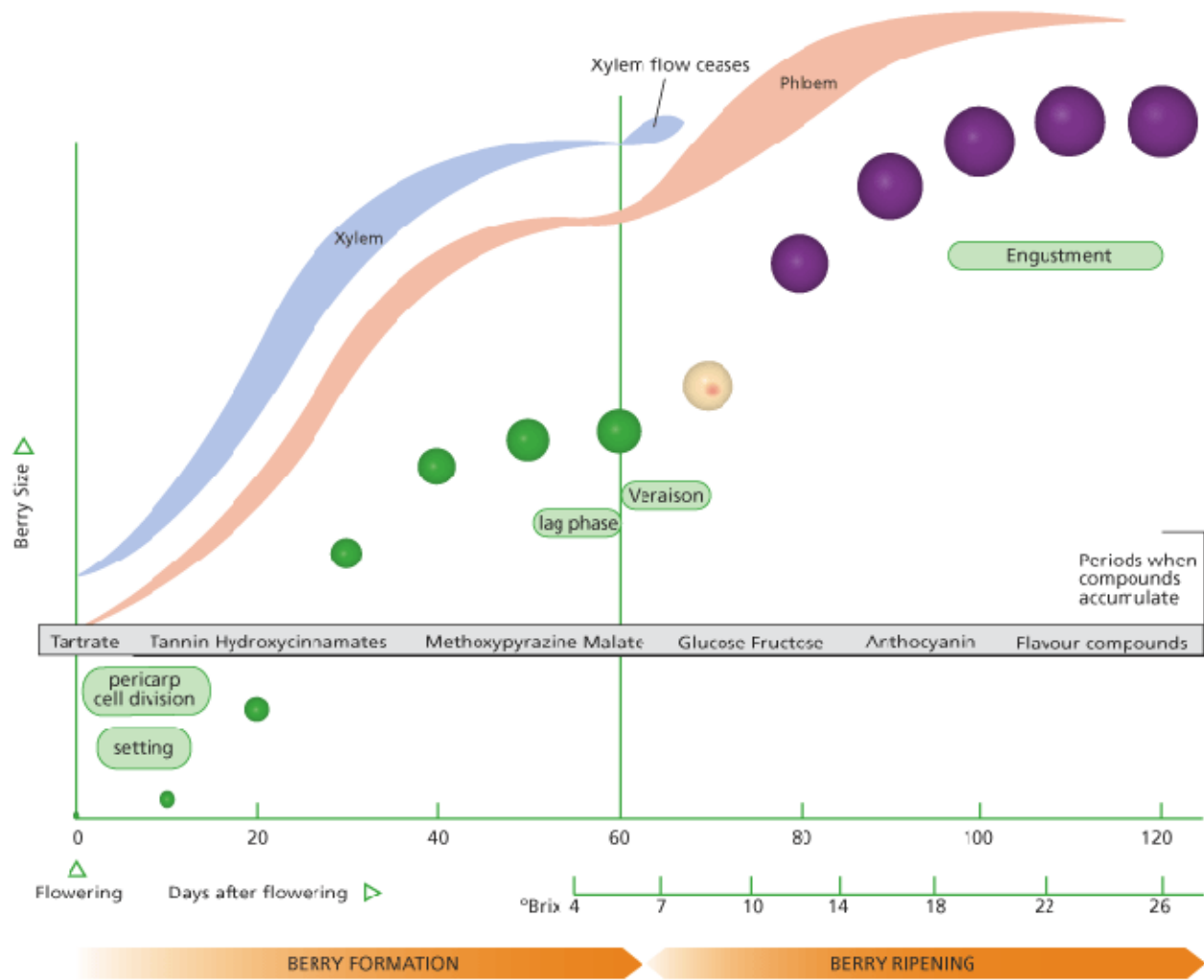


Figure 4 : Développement et maturation des baies de raisin (Coombe et Mc Carthy, 2000)

D'autres composés d'une importance capitale s'accumulent au cours de cette première phase : les micro et macroéléments minéraux (Rogiers *et al.*, 2000 ; 2006) , des acides aminés (Hilbert, 2002), ainsi que des composés aromatiques tels que les méthoxypyrazines (Allen et Lecy, 1999). Les connaissances sur le développement des baies, ainsi que la formation de composés ayant une grande importance au niveau des aspects sensoriel sont en perpétuelle progression. Les approches génétiques en vue de la détermination du pool des gènes impliqués dans la régulation de ses processus (Bogs *et al.*, 2005; Leslie *et al.*, 2005 ; Fernandez *et al.*, 2007) sont complétés par les approches ou techniques omiques (Grimplet *et al.*, 2007; Castellarin *et al.*, 2007; Castellarin et Di Gaspero, 2007)

La seconde phase débute par une période de transition appelée véraison. Les baies commencent à devenir translucides (cépages blancs) ou à se pigmenter (cépages rouges). Au début de la maturation, un ramollissement des baies et une reprise de l'accroissement de leur taille ont lieu, la baie double à peu près de taille entre le début et la fin de cette phase. La maturation est caractérisée par une accumulation de sucres et de composés phénoliques tandis que les concentrations en acides organiques diminuent ; en revanche, les arômes s'accumulent uniquement durant la fin de cette phase de maturation (Gholami *et al.*, 1995; Coombe et McCarthy, 1999).

Certains composés élaborés au cours de la première phase sont réduits en terme de teneur par baie, non seulement par phénomène de dilution mais aussi en terme de cinétique de biosynthèse. Essentiellement l'acide malique dont l'évolution dépend du cépage, du porte greffe et des conditions du milieu (Ibrahim, 2001; Attia *et al.*, 2004). La teneur en tanins diminue cependant au cours de cette phase. Cette diminution est liée au processus d'oxydation, les tanins sont liés aux parois des pépins (Kennedy *et al.*, 2000). Par conséquent, la composition de l'extrait de tanins des pépins change considérablement avec une réduction relative des tanins responsable de l'amertume (Adams, 2006 ; Kennedy *et al.*, 2006). Les quantités de tanins de la pellicule varient peu ou restent constants au cours de la deuxième phase de croissance ; mais leur nature change (Do Ó-Marques *et al.*, 2005). Ces modifications étant liées à la taille de la baie. La qualité et la nature de l'extraction des composés phénoliques sont étroitement liées à la composition en pectines et en anthocyanes de la pellicule (Kennedy *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2006).

Les teneurs des baies en plusieurs composés aromatiques, tels que les monoterpènes et les méthoxypyrazines, dont la biosynthèse débute au cours de la première phase de croissance, diminuent au cours de la deuxième phase (Luan *et al.*, 2006). Dans le cas des méthoxypyrazines leur diminution semble être fonction de l'intensité de l'éclaircissement au niveau de la grappe (Hashizume et Samuta, 1999).

III. 3. Composition des baies de raisin

La baie peut être considérée comme une unité biochimique indépendante et complexe ; en plus, des métabolites primaires (eau, sucres, acides aminés, macro et micro-éléments) qui sont indispensables à la survie de l'organe, les baies de raisin ont la capacité de synthétiser d'autres composés tels que les aromatiques et phénoliques (Gholami *et al.*, 1995). La baie comporte trois parties importantes : la pulpe, la pellicule et les pépins (Fig. 5A). La taille finale de la baie

dépend du nombre de cellules multiplié par la taille moyenne de chacune d'elle (Ho, 1992 ; Cowan *et al.*, 2001 ; Rapoport *et al.*, 2001). La phase de multiplication cellulaire représente un facteur important de l'organogenèse de la baie, bien que la phase d'expansion cellulaire soit la plus déterminante pour la taille finale des baies ainsi que sa morphologie (Fig 5 B et C ; Cong *et al.*, 2002). La variabilité de la taille de la baie chez les cépages *Vitis vinifera* L. est pour la plus grande partie ne dépend que de la phase d'expansion cellulaire, alors que chez les vignes sauvages (wild-type-like berries), cette variabilité dépend aussi bien de la phase d'expansion cellulaire que de la phase de multiplication cellulaire (Fernandez *et al.*, 2006). La taille de la baie joue un rôle important sur le rapport de la teneur des extraits à partir des différentes composantes, essentiellement, la pellicule et les pépins (Roby *et al.*, 2004 ; Roby et Matthews, 2004).

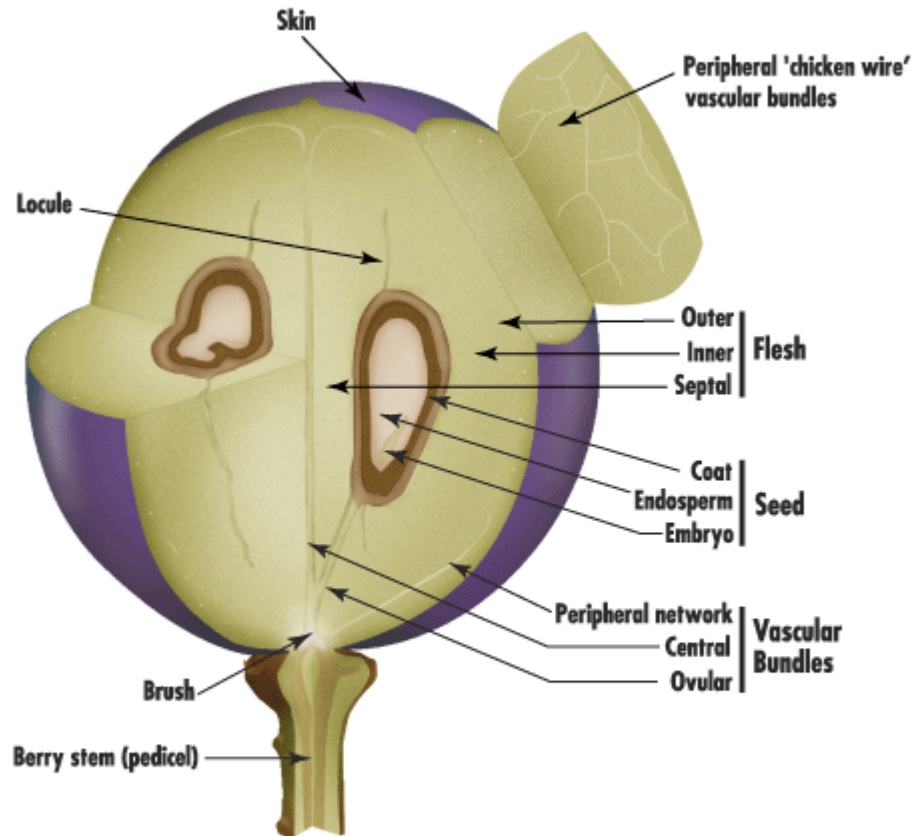
De façon générale, la qualité du raisin dépend de sa composition et plusieurs facteurs doivent être pris en compte dans sa détermination :

- Les sucres : la teneur en sucres au cours de la maturation est le facteur principal caractérise le degré de maturité des baies. Au cours du développement, la teneur en sucres des raisins verts ne dépasse pas 20 g par kg de matière fraîche (Peynaud, 1998). A partir de la véraison, les sucres s'accumulent dans la baie essentiellement sous forme de glucose et de fructose (99% des sucres du moût à maturité). Ces sucres, convertis en alcool durant la fermentation, sont très importants dans l'appréciation des raisins et de leurs produits.

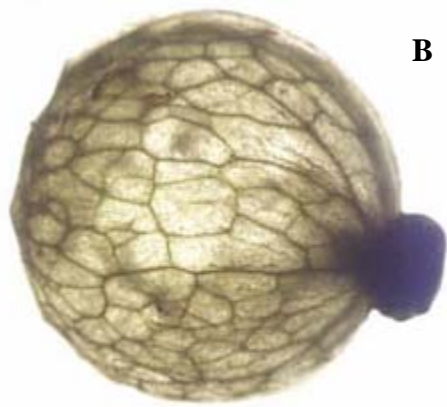
- L'acidité titrable (AT) : l'acidité titrable est également un facteur important de la qualité d'une vendange. Durant la maturation, l'acidité titrable des baies diminue, cette diminution étant principalement due à celle de l'acide malique (Huglin, 1986). Le rapport sucres / AT est prépondérant pour la détermination de l'optimum de maturité des baies et le déclenchement de la récolte. La maturité est considérée comme optimale lorsque le rapport sucres / AT de l'ordre de 50 à 60.

- Les acides organiques : l'acide malique et l'acide tartrique représentent plus de 90% de la teneur en acides organiques contenus dans la baie (Huglin, 1986). Leurs teneurs ainsi que leur rapport sont modifiés au cours de la maturation et peuvent également varier en fonction des conditions du milieu (Ruffner, 1982). Leur accumulation dans la baie se fait pendant la phase de croissance puis leur concentration diminue fortement de la véraison jusqu'à la maturité (dilution). La vitesse de la chute de la teneur en acide malique et le pH final à la récolte dépendent du cépage, du porte-greffe, de la nutrition potassique et de la température. Par contre, les effets des facteurs environnementaux sur la concentration en acide tartrique sont moins évidents (Terrier et Romieu, 2001). Ces deux acides contribuent également au goût des raisins et leur concentration a un effet notable sur l'intensité de la couleur des anthocyanes (Mazza et Miniati, 1993).

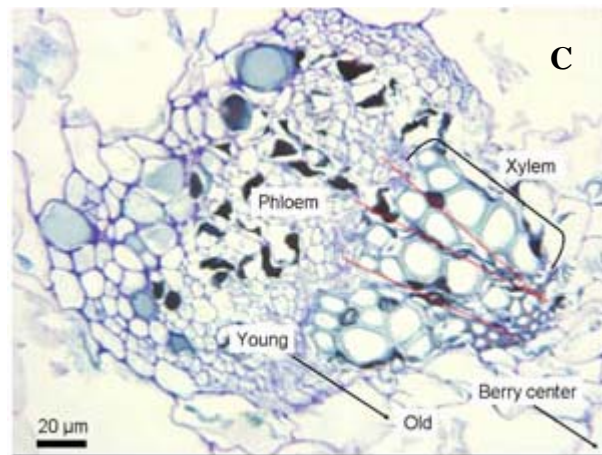
- La teneur en azote : l'azote joue un rôle important sur la qualité des raisins et des vins qui en résultent. 60% des composés azotés des baies sont représentés par les acides aminés. Les principaux sont la proline et l'arginine, bien que d'autres acides aminés soient présents (Treeby *et al.*, 1998 ; Stines *et al.*, 2000 ; Rodriguez-Lovelle et Gaudillère, 2002). L'arginine est la forme majeure de stockage de l'azote chez la plante (Lea, 1997). Ces composés n'ont pas un rôle organoleptique direct mais ils interviennent dans la fermentescibilité des moûts. Des teneurs en acides aminés trop faibles entraînent des difficultés de fermentation (Bisson, 1991). Des teneurs en azote élevées dans les baies peuvent entraîner la présence dans les vins de carbamate d'éthyle, d'histamine et autres composés nuisibles à la santé humaine (Delas, 2000).



Structure of a ripe grape berry partially sectioned on the long and central axis to show internal parts. Illustration by Jordan Koutroumanidis, Winetitles.



Peripheral vasculature of a preveraison berry.



Cross-section of a xylem strand

Figure 5. Morphologie de la baie de raisin (A ; [Coombe et Mc Carthy 2000](#)) et structure vasculaire de la baie au stade pré-veraison (B et C ; [Matthews, 2007](#))

- Les composés phénoliques : ce sont des composés importants du raisin qui comprennent des composés non flavonoïdes (acides phénols, stilbènes) et flavonoïdes (anthocyanes, flavonols, tannins) (Singleton et Esau, 1969). Les anthocyanes interviennent dans la couleur des raisins et des vins. Les tanins participent à la couleur des vins, en stabilisant les anthocyanes, mais sont plus impliqués dans la qualité gustative des vins (astringence). Des vertus pharmacologiques sont également attribuées aux composés phénoliques (Wang *et al.*, 1997 ; Bub *et al.*, 2001).

Le développement asynchrone des baies est un élément important pour déterminer la qualité d'une vendange. Il existe des différences de maturation entre les baies d'une même grappe. Celles les plus exposées aux rayonnements solaires contiennent plus de sucres et ont souvent une teneur en composés phénoliques plus élevée (Price *et al.*, 1995; Maigre, 2001). De ce fait, un potentiel qualitatif moyen est défini par cep dû à l'hétérogénéité entre les baies d'une même grappe et entre les grappes d'une même souche.

Outre la teneur en azote total, la détermination des teneurs en éléments minéraux majeurs (P, K, Ca et Mg) est importante car il permet d'apprécier l'état nutritionnel de la plante. Le phosphore est un élément important de la physiologie de la plante, notamment dans le métabolisme énergétique, car il participe aux réactions de respiration et de synthèse des glucides et des protéines. Il est également un constituant essentiel des acides nucléiques. Le potassium intervient dans la neutralisation des acides organiques produits au cours de la photosynthèse. Il participe au maintien du pH cellulaire à un niveau favorable pour ce processus et favorise l'accumulation de sucres. Le potassium peut également jouer un rôle lors d'une limitation de l'alimentation hydrique en favorisant l'absorption d'eau par les racines et en contrôlant les mécanismes d'ouverture et de fermeture des stomates (Delas, 2000). Le calcium et le magnésium entrent dans la composition des parois cellulaires dont ils assurent la stabilité. De plus, comme le potassium, ils contribuent à la neutralisation des acides organiques.

IV. Les composés phénoliques du raisin

Le raisin, fruit de la vigne, contient à maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, des terpènes (citrol, géraniol, ...), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline, ...), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins (Conde *et al.*, 2007).

Les composés phénoliques sont des constituants importants du raisin. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, pouvant être acylés ou glucosylés. Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

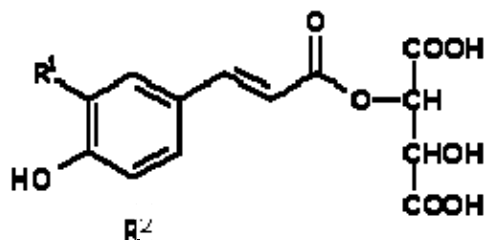
IV.1. Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

IV. 1. 1. Les acides phénoliques

On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine. D'autres composés phénoliques sont

également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (Fig. 6). Les composés majoritaires sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *t*-caféique l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique (Singleton, 1992 ; Goetz *et al.*, 1999).



Esters hydroxycinnamiques	R ₁	R ₂
Acide <i>t</i> -caféique	OH	H
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide <i>t</i> -fertarique	OCH ₃	H
Acide <i>t</i> -sinapique	OCH ₃	OCH ₃

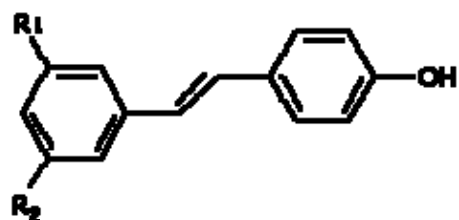
Figure 6: Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins.

IV. 1. 2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l' ϵ -viniférine (Fig. 7 et Fig. 8). (Waterhouse, 1994 ; Langcake, 1981). Ce type de molécules existe aussi sous la forme de dérivés trimériques jusqu'à pentamériques (Tanaka *et al.*, 1998). Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (Sun *et al.*, 2002). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Frankel *et al.*, 1993). On leur attribue aussi des activités chimio-préventives contre le cancer (Jang *et al.*, 1997 ; Daniel *et al.*, 1999).

IV. 2. Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Fig. 9). Ce groupe comprend, au sens large du terme, principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).



Stilbènes	R ₁	R ₂
Pterostilbène	OCH ₃	OCH ₃
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGlc	OH

Figure 7: Structures chimiques de quelques stilbènes.

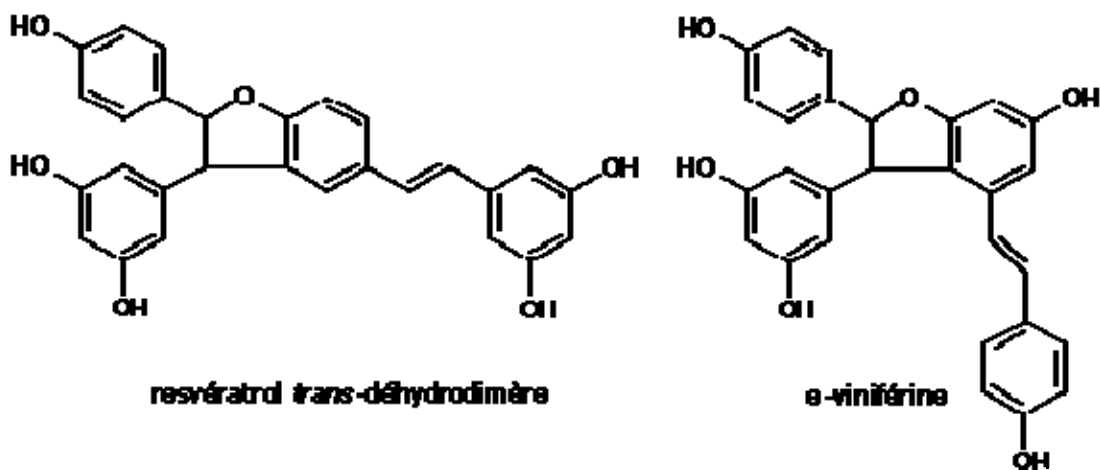


Figure 8: Dimères de stilbènes.

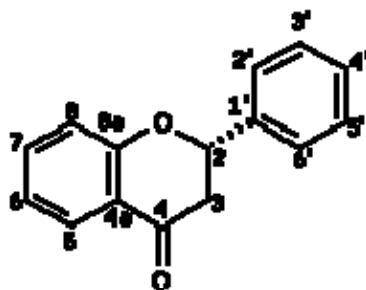
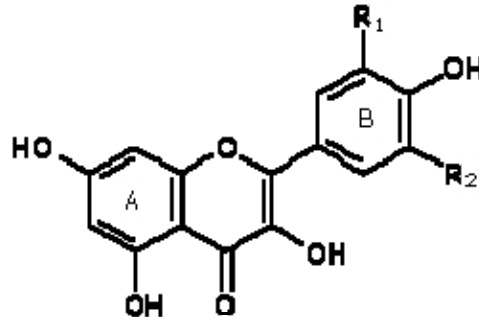


Figure 9: Structure chimique de la 2-phényl-benzopyrone.

IV.2. 1. Les flavonols

Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin : Le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnéthine (Fig. 10). Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges (Remy, 1999). On leur attribue des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du coeur et des cancers (Lacaille-Dubois *et al.*, 1996, Hollman, 2001) ou encore des activités antitumorales et chimiopréventives (Hollman, 2001).

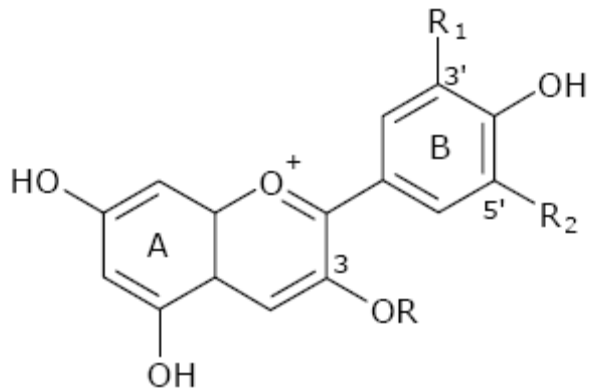


Flavonols	R ₁	R ₂
Kaempferol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamétine	OCH ₃	H

Figure 10: Structures chimiques de quelques flavonols présents dans le raisin.

IV.2. 2. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos* = fleur et *kyanos* = bleu) sont l'objet d'une attention particulière car ce sont les matières colorantes les plus importantes et les plus répandues dans les plantes (Mazza et Miniati, 1993). Ces pigments sont connus pour être responsables dans les pétales et les feuilles des plantes supérieures des couleurs allant du rose au bleu en passant par le rouge, le mauve et le violet. Les anthocyanes font partie d'une famille de composés appelés les flavonoïdes. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisées dans les parties externes des fruits. Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges (Mazza *et al.*, 1999). Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3 (Riberau-Gayon *et al.*, 1998). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. On distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis* : La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Fig. 11).



Anthocyanidines R*=H	R1	R2
Malvidine	OCH3	OCH3
Péonidine	OCH3	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH3	OH
Cyanidine	OH	H

* : Forme monoglucoside, R=glucose

Figure 11: Structures chimiques de quelques anthocyanidines.

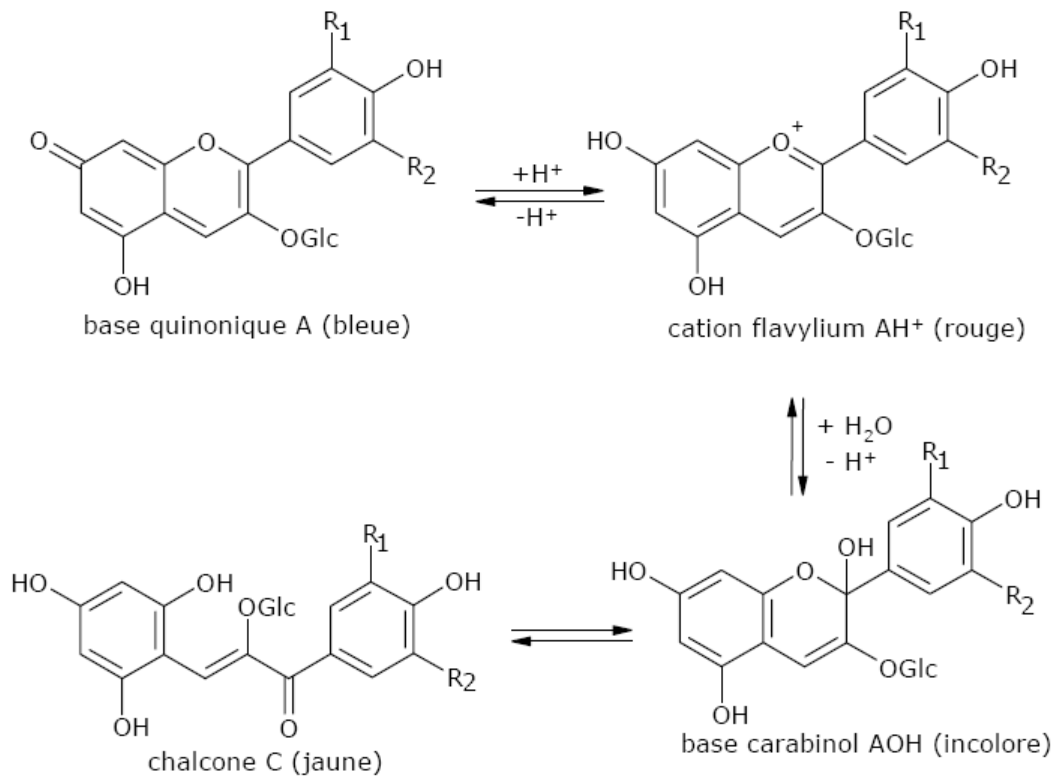


Figure 12: Transformation de la structure de la malvidine-3-O-glucoside en milieu aqueux (Strack, 1997).

Contrairement à d'autres espèces qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglucosylées en position C-3' et C-5', l'espèce *Vitis vinifera* n'en contient que des traces et se caractérise par la présence majoritaire de 3-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier de la malvidine 3-*O*-glucoside et de ses dérivés acylés (Baldi *et al.*, 1995 ; Mazza *et al.*, 1999).

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La forme flavylium, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue) (Fig. 12 ; Riberau-Gayon *et al.*, 1998). Pour la malvidine-3-*O*-glucoside, la forme hémiacétal (AOH) est largement majoritaire (Brouillard et Dubois, 1977). Toutefois, le cation flavylium est en quantité suffisante pour que sa couleur rouge prédomine.

IV.2. 2. 1 Synthèse des anthocyanes

Les différentes étapes de la voie de biosynthèse des anthocyanes ne sont pas encore toutes parfaitement connues. De nombreux travaux viennent régulièrement compléter la connaissance de cette voie métabolique en interaction avec les conditions du milieu (Castellarin *et al.*, 2007). La voie de biosynthèse des anthocyanes selon les hypothèses actuelles est résumée sur la Figure (13).

La phénylalanine est le précurseur de la majorité des composés phénoliques, notamment des anthocyanes, par l'intermédiaire du métabolisme des phénylpropanoïdes (Strack, 1997). La phénylalanine ammonia lyase (PAL) est la première enzyme impliquée dans cette biosynthèse. Elle catalyse la production d'acide cinnamique à partir de la phénylalanine. L'acide cinnamique est ensuite converti en acide *p*-coumarique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). L'enzyme 4-coumarate CoA ligase (4CL) conduit à la synthèse de l'ester *p*-coumaroyl CoA par liaison de CoA à l'acide *p*-coumarique. La chalcone est le premier flavonoïde synthétisé par condensation du *p*-coumaroyl CoA avec 3 molécules de malonyl CoA par la chalcone synthase (CHS). La chalcone isomerase (CHI) convertit ensuite la chalcone en flavonones, puis la flavonone 3-hydroxylase (F3H) conduit à la formation de dihydroflavonols par hydroxylation des flavonones. Les flavonones ou les dihydroflavonones pourraient subir des hydroxylations sur leur cycle B sous l'action de flavonoïde 3'-hydroxylases (F3'H) et de flavonoïde 3'5'-hydroxylases (F3'5'H). Ces enzymes détermineraient ainsi le type d'anthocyanes produites. L'activité de la F3'H conduirait à l'accumulation d'anthocyanes de type cyanidine dans les plantes alors que celle de la F3'5'H conduirait aux anthocyanes de type delphinidine (Boss et Davies, 2001).

La dihydroflavonol reductase (DFR) catalyse la première étape de la conversion des dihydroflavonols en anthocyanes. Cet enzyme est la cause d'une réduction en position 4 du cycle C des dihydroflavonols qui conduit à la formation de leucoanthocyanidines. Les étapes suivantes qui conduisent à la formation des anthocyanes sont encore mal connues. Trois étapes hypothétiques impliquant une hydroxylase et deux déhydratases ont été suggérées (Strack, 1997). La structure flavylium labile ainsi produite est ensuite stabilisée par une glycosylation en position 3 du cycle C catalysée par l'UDP-glucose : flavonoïde 3Oglucosyltransferase (UFGT). La delphinidine-3-glucoside et la cyanidine-3-glucoside sont les premières anthocyanes synthétisées et sont considérées comme des précurseurs des autres formes (Boss et Davies, 2001). L'ordre exact des modifications ultérieures des anthocyanes faisant intervenir des glycosylations, des acylations et des méthylations est encore inconnu. Des hydroxylations et des méthylations à des étapes antérieures peuvent également être envisagées (Bogs *et al.*, 2006).

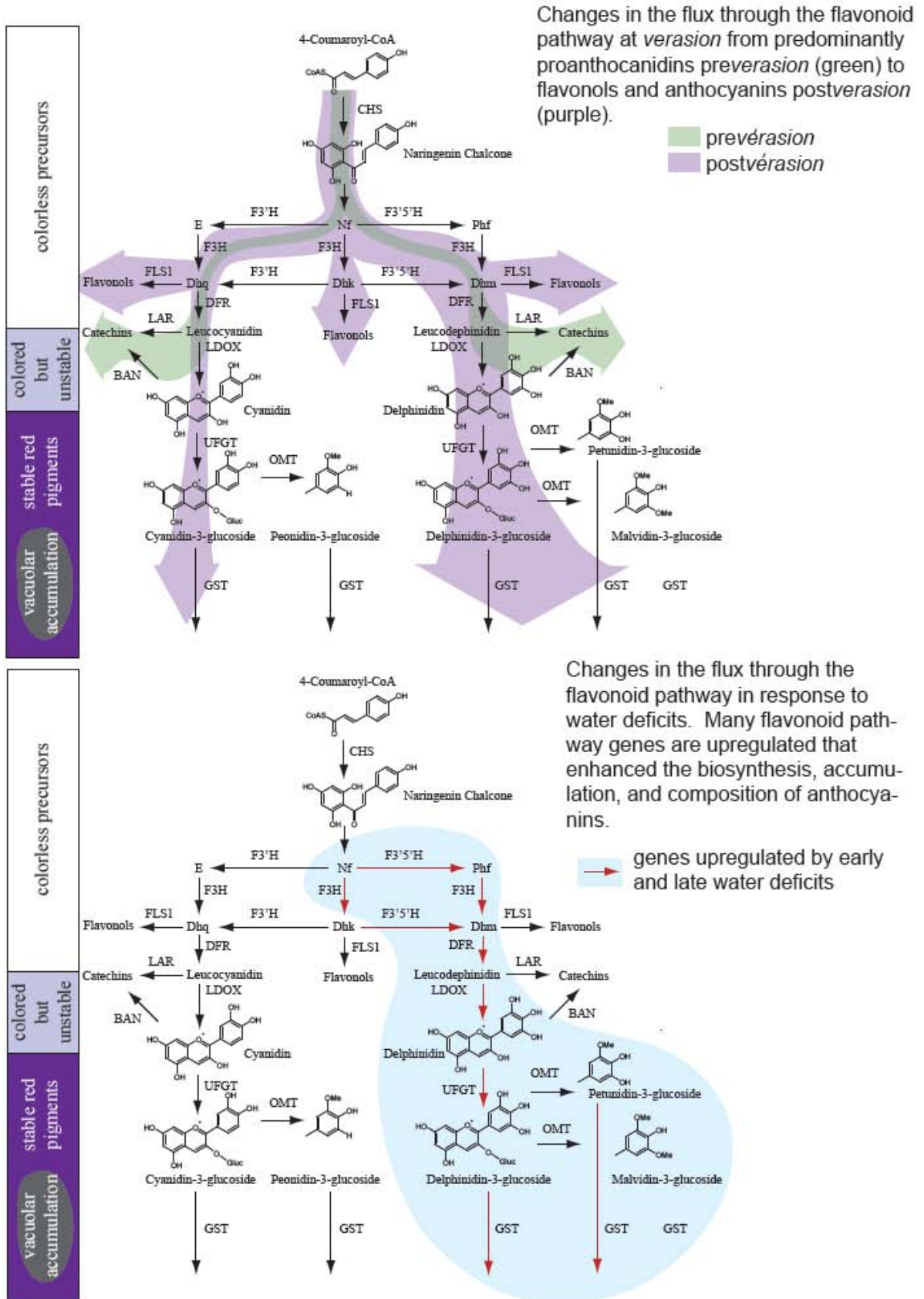


Figure 13: Voie de biosynthèse des anthocyanes à partir de la phénylalanine (Castellarin *et al.*, 2007)

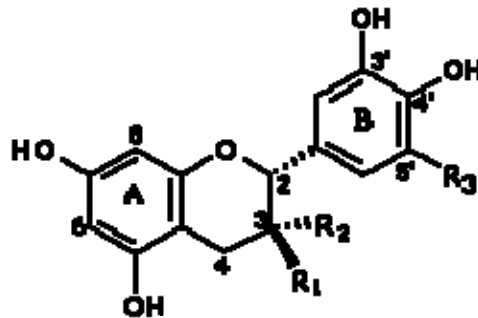
IV. 2. 3. Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, vin, thé...) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits et spécialement des vins (Haslam, 1980, 1998).

Dans la baie de raisin, la pellicule et les pépins sont les zones de concentration des tanins et des composés phénoliques (Kennedy *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2001). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylés (Hemingway, 1992 ; Souquet *et al.*, 1996).

- Les unités monomériques

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Fig. 14). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules de *Vitis vinifera*, implique leur existence



Flavanols	R ₃	R ₁	R ₂
(+)-catéchine	H	OH	H
(-)-épicatéchine	H	H	OH
(+)-gallocatéchine	OH	OH	H
(-)-épigallocatéchine	OH	H	OH

Figure 14: Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés.

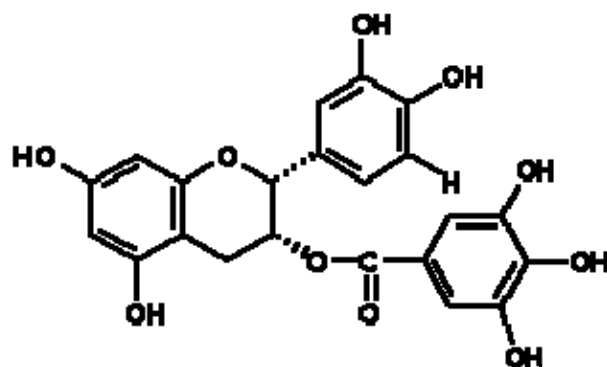
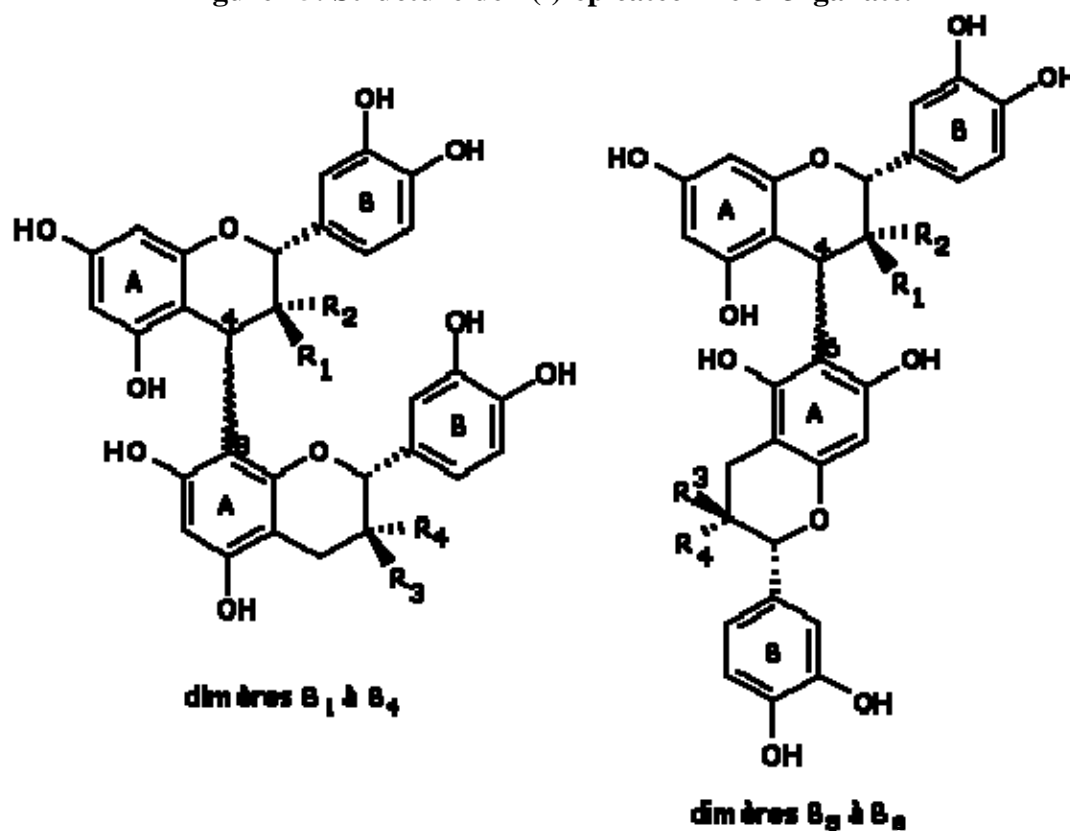


Figure 15: Structure de l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate.



Dimères	Noms	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B ₁	épicatéchine-(4β-8)-catéchine	H	OH	OH	H
B ₂	épicatéchine-(4β-8)-épicatéchine	H	OH	H	OH
B ₃	catéchine-(4α-8)-catéchine	OH	H	OH	H
B ₄	catéchine-(4α-8)-épicatéchine	OH	H	H	OH
B ₅	épicatéchine-(4β-6)-épicatéchine	H	OH	H	OH
B ₆	catéchine-(4α-6)-catéchine	OH	H	OH	H
B ₇	épicatéchine-(4β-6)-catéchine	H	OH	OH	H
B ₈	catéchine-(4α-6)-épicatéchine	OH	H	H	OH

Figure 16: Structures chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B.

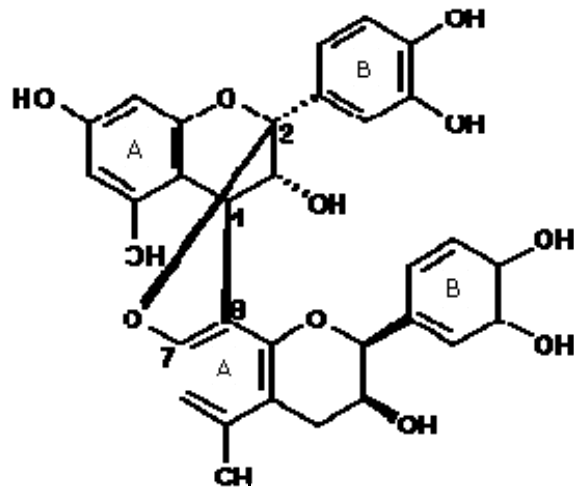
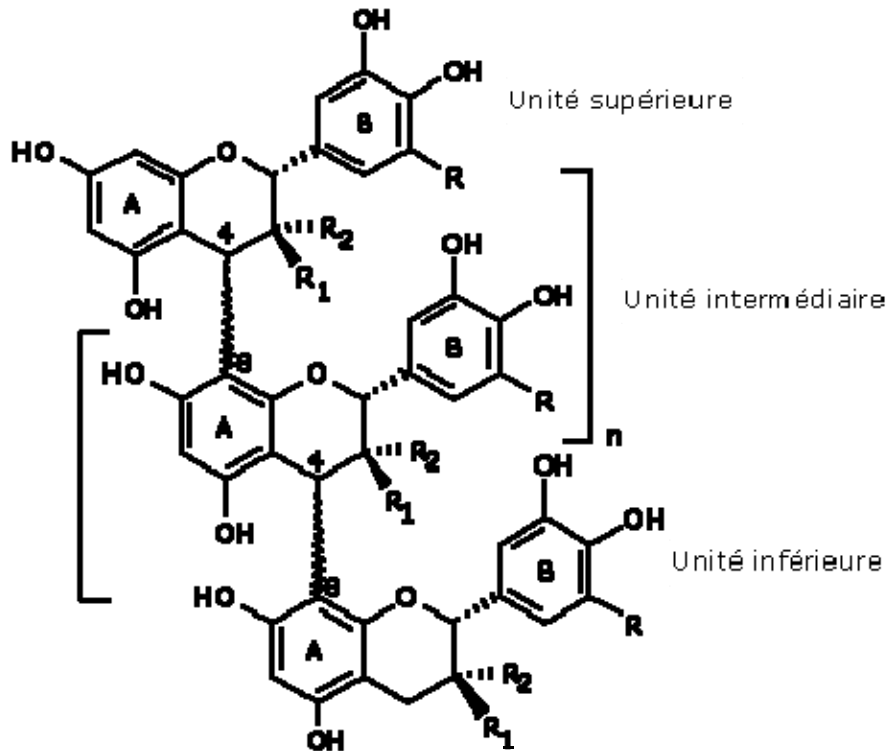


Figure 17: Proanthocyanidine A-2



$R_1 = \text{H, OH, O-gallate}$; $R_2 = \text{H, OH}$; $R = \text{H}$: procyanidines ;
 $R = \text{OH}$: prodelphinidines

Figure 18: Variations possibles de la structure polymérique d'un tanin condensé (proanthocyanidine ou prodelphinidine)

en tant que monomère (Souquet, 1996 ; Adams, 2006). Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier la (-)-épicatéchine, formant l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate (Fig. 15 ; Su et Singleton, 2001 ; Kennedy *et al.*, 2001).

- Les tanins condensés (type A et B)

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique (Chenyier *et al.*, 2006). Dans le raisin on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyane libérée. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), libèrent de la cyanidine ; d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallicatéchine), libèrent de la delphinidine (Adams, 2006).

Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre-elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées (Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991 ; Kennedy *et al.*, 2006). Le type B se caractérise par une liaison intermonomérique qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement (R), mais il existe quelques exceptions. Les structures des principaux dimères de type B du raisin sont représentées sur la Figure (16). Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A (Fig. 17 ; Haslam, 1998).

Les flavan-3-ols, présents dans le raisin, se rencontrent majoritairement sous la forme de polymères. Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylées (Adams, 2006 ;), alors que ceux des pellicules contiennent également des prodelphinidines (Kennedy *et al.*, 2001 ; Cheynier *et al.*, 2006).

La Figure (18) représente la structure d'une procyanidine polymérique. On y distingue l'unité supérieure, les unités intermédiaires et l'unité inférieure. Les unités monomériques se répartissent indifféremment dans le polymère, aussi bien dans les unités supérieures qu'en position terminale. Toutefois, on note la prédominance de l'épicatéchine (galloylée ou non) dans les unités supérieures (Souquet *et al.*, 1996).

Le nombre moyen d'unités monomériques, défini comme le degré moyen de polymérisation (DPM), peut aller jusqu'à 18 dans une fraction issue de pépins et avoisine les 30 unités dans un extrait de pellicule (Kennedy *et al.*, 2001).

V. Notion de stress hydrique chez la vigne

V.1. La demande hydrique de la vigne

En conditions classiques de culture, Ballif (1994) a évalué, par lysimétrie, l'évapotranspiration moyenne annuelle d'un monolithe sous vigne pour la période de 1974 à 1987 à 391 mm, pour une pluviométrie moyenne de 621 mm en région champenoise. En conditions irriguées, Droogers (2000) signale que chez la vigne une évapotranspiration atteint 749 mm, ce qui correspond à une limite supérieure. L'estimation la plus vraisemblable que nous puissions donner est celle de Huglin et Schneider (1998) : la transpiration de la vigne pendant la

période végétative d'avril à septembre vaut $0,6 \times \text{ETP}$, soit une valeur de l'ordre de 300 à 400 mm par an.

Pondéralement, l'eau est le principal constituant des organes en vie active de la vigne. Pour la vigne, l'approvisionnement en eau conditionne sa vigueur, quelle que soit la teneur en matière organique du sol (Champagnol, 1980). L'alimentation hydrique de la vigne doit être suffisante pour la croissance et le développement de la plante. Cependant, une faible alimentation hydrique est souhaitable durant la maturation, ce qui favorise l'accumulation des sucres dans les baies.

V.2. Un des principaux facteurs limitant la production : la sécheresse estivale

La vigne est une culture dont on attend des performances au travers d'une valorisation des milieux pauvres du point de vue agronomique, tout en affichant des objectifs de productivité et de qualité de la baie. Tout cela doit se faire dans un contexte de diversification des débouchés et des objectifs assignés au produit final. Toute amélioration de la productivité ne peut s'envisager sans le maintien de ces atouts. Dans ce contexte la vigne est plantée dans des milieux où la ressource en eau est très variable et souvent déficitaire dès la floraison.

En dépit de son bon comportement face à cette sécheresse en période estivale et il subsiste souvent une importante variation de la qualité du raisin typé par le millésime.

Il ressort des diverses prospectives sur les changements climatiques, une forte probabilité d'une augmentation de la température et une aggravation du déficit pluviométrique en particulier dans le Sud de l'Europe, où les vignobles sont les très répandus. Il pourrait en résulter des modifications de l'aire de production de cette culture à l'échelle nationale et européenne, étant donné la concurrence croissante pour l'utilisation de l'eau. La question que se pose est qu'il est probable que la vigne puisse bénéficier massivement à l'avenir de l'irrigation. Si cette irrigation devient obligatoire, cela serait difficilement compatible avec la notion de produit de terroir basée sur la bonne adéquation entre les besoins de la plante et son milieu.

Il convient donc d'étudier les comportements spécifiques (écophysiologique et nutritionnel) des cépages typiques de nos appellations, sous conditions limitantes en eau et réfléchir aux voies d'amélioration de la qualité du produit en adaptant les itinéraires techniques à ces nouvelles conditions climatiques de contraintes hydriques plus ou moins marquées.

V.3. Le changement climatique

En particulier les conditions atypiques du millésime 2003 (sécheresse et canicule) ont marqué les esprits de nombreux spécialistes du climat. Ces derniers s'accordent sur la prévision de millésimes aux caractéristiques similaires, avec une fréquence d'une année sur deux dans la deuxième moitié du siècle, voire davantage à la fin du XXI^{ème} siècle. Cela fait plusieurs années maintenant que des scientifiques du monde entier travaillent sur la problématique du changement climatique à différentes échelles de temps et de lieux (IPCC 2001). Il est essentiel de signaler que l'impact d'un tel réchauffement sur l'agriculture est intimement lié aux besoins physiologiques de la culture, à sa répartition spatiale et saisonnière ainsi qu'à l'amplitude du réchauffement (Butterfield *et al.*, 2000; McCarthy *et al.*, 2001). Ceci se traduit par un changement au niveau de l'intensité du froid pendant l'hiver, l'occurrence des événements froids, et la durée du cycle végétatif (Moonen *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005).

Le réchauffement climatique ne touchera pas toutes les régions du monde dans des proportions similaires (IPCC, 2001). Il sera particulièrement marqué sur les continents, et plus particulièrement dans l'hémisphère nord, au-dessus du tropique du cancer, avec une intensité maximale au sein du cercle polaire arctique. Au niveau saisonnier à l'échelle de la France, hiver et printemps sont les saisons qui subiront le moins d'échauffement, avant une rupture brutale pour la période estivale. Ceci serait particulièrement vrai pour la région méditerranéenne.

En plus de l'approche thermique, il est indispensable de s'intéresser à l'évolution et à la répartition des précipitations. A l'échelle planétaire, on constate un regain important de précipitations dans les cercles polaires arctique et antarctique ainsi que sur la bande de terre africaine et eurasiatique localisée entre le tropique du cancer et l'équateur (IPCC, 2001). D'un autre côté, l'autre élément spectaculaire est marqué par une réduction substantielle des précipitations annuelles dans l'arc méditerranéen, ainsi que sur la région mexicaine et l'ouest australien, mais dans de moindres proportions.

La question de la répartition annuelle des précipitations se pose en vue de mieux intégrer ces phénomènes en matière de conduite du vignoble.

A l'échelle de la France, des études montrent déjà que les écarts de pluviométrie entre le nord et le sud de la France d'une part, et entre les saisons d'autre part, vont s'accroître (Planton, 2003). Seule la période hivernale permettra de connaître un gain de précipitations, les trois autres saisons laissant apparaître des déficits pluviométriques importants et plus particulièrement dans les régions du sud et du sud-ouest.

V.4 Utilisation des indicateurs de stress en relation avec le statut hydrique chez la vigne

Des nombreux travaux scientifiques ont été réalisés pour déterminer l'incidence du stress hydrique sur les plantes : on utilise ainsi différentes mesures tels que le potentiel hydrique de base ; le potentiel tige à midi, la température du feuillage, la transpiration et la contraction du tronc. Ainsi l'utilisation du potentiel hydrique de base, du potentiel tige à midi et le cumul de la transpiration permettent de détecter plus fiablement l'état du stress hydrique que le potentiel hydrique foliaire à midi ou la température du feuillage (Remorini et Massai, 2003). L'état du stress hydrique a été détecté plus précocement moyennant le potentiel tige à midi que le potentiel hydrique de la feuille à midi (Selles et Berger, 1990), la contraction du tronc (Goldhamer *et al.*, 2000; Naor et Cohen, 2003), et la transpiration (Naor et Cohen, 2003). Par contre, dans d'autres études, le stress hydrique a été détecté plus précocement moyennant les mesures morphométriques de la contraction du tronc que les mesures du potentiel tige (Intrigliolo et Castel, 2004), les potentiels hydrique de base et à midi ou le potentiel tige à midi (Goldhamer *et al.* 1999). De nombreux auteurs s'accordent à dire que les mesures du potentiel hydrique de base semble être le meilleur indicateur pour l'évaluation de l'état du stress hydrique chez la vigne (Matthews *et al.*, 1987; Girona *et al.*, 1993b ; Goldhamer et Viveros, 2000; Ruiz-Sanchez *et al.*, 2000b; Williams et Arujo, 2002; Cifre *et al.*, 2005; Shellie, 2006 ; Girona *et al.*, 2006). On peut en conclure, à la vue de ces études, que la température du feuillage et le potentiel hydrique foliaire à midi sont deux indicateurs de l'état de stress hydrique qui sont moins fiables que les autres indicateurs. Néanmoins, les relations entre le potentiel de base, les potentiels tige et feuille à midi ainsi que les contractions de la tige en situation d'un stress hydrique précoce sont encore à approfondir.

V.5 Effets du stress hydrique sur le comportement physiologique

V.5.1. Effet du stress hydrique sur la production

Des relations positives, de type linéaire, sont observées entre le volume de la production et l'eau consommée (Freeman et Kliewer, 1983 ; Bravdo *et al.*, 1984 ; 1985 ; Jackson et Lombard, 1993). Cependant, l'effet d'un apport d'eau par l'irrigation sur la qualité sont parfois contradictoires entre ces études, et ce en fonction de l'objectif à atteindre concernant la taille de la baie et la richesse en sucre pendant un délai bien déterminé au cours de la phase de maturité du raisin. La période de sensibilité maximale à la sécheresse correspond à celle comprise entre la floraison et la véraison, et en particulier durant la phase de nouaison et de multiplication cellulaire lorsque les baies sont vertes ; de la véraison à la maturité représente aussi une période de grande importance, des points de vue physiologique et technologique de la maturité de raisin. Pendant la première phase, c'est le nombre de fleurs nouées et de cellules par baie qui est fortement affecté si le déficit hydrique est subi en cette période (Petrie *et al.*, 2004).

La plupart des études attribuent à la disponibilité en eau une action déterminante sur la production des raisins par diminution de la surface assimilatrice de la plante caractérisée par l'indice foliaire (LAI, ratio de la surface foliaire sur la surface au sol) (Lebon *et al.*, 2006), ainsi que sur la durée de fonctionnement de cette surface foliaire (Shultz et Matthews, 1993) et enfin sur le taux d'assimilation de carbone des feuilles qui est étroitement associé au fonctionnement photosynthétique (Alleweldt et Rühl, 1982 ; Patakas et Noitsakis, 2001).

V.5.2. Effet du stress hydrique sur la surface assimilatrice

Le développement végétatif de la vigne cultivée sous conditions limitantes d'alimentation hydrique est fortement perturbé (Chaves *et al.*, 2002. Ferrryra *et al.*, 2004, Lebon *et al.*, 2006). On note principalement une diminution importante de la taille et de la surface foliaire (Perry *et al.*, 2005 ; Lebon *et al.*, 2006). La réduction de la surface foliaire peut provenir d'une diminution de l'expansion foliaire et/ou d'une sénescence accélérée de la feuille. La croissance foliaire est stoppée très rapidement par un déficit hydrique, puisqu'elle intervient à des potentiels hydriques de turgescence de -0,4 MPa (Kramer et Boyer, 1995).

Au niveau cellulaire, deux facteurs sont déterminants sur la croissance : l'extensibilité de la paroi et sa turgescence.

L'extensibilité de la paroi ne dépend pas uniquement de ses propriétés élastiques, mais également de phénomènes biochimiques impliqués dans les processus de relaxation de celle-ci ; ces derniers sont souvent diminués lors d'un déficit hydrique (Matthews et Boyer, 1984; Cosgrove 1993).

Il existe une valeur seuil de turgescence cellulaire, conditionnée par l'extensibilité de la paroi, pour laquelle l'expansion est stoppée, et lorsque la contrainte est sévère, la perte de turgescence peut conduire à la sénescence foliaire. Ainsi des plantes soumises à un déficit hydrique voient généralement leur sénescence foliaire s'accélérer (Lebon *et al.*, 2006), et une perte trop importante d'eau peut conduire à la mort de la cellule et à la sénescence du tissu.

Cette réduction de la surface foliaire en conditions sèches diminue la surface évaporatrice de la plante et limite considérablement la production primaire. En réponse à la sécheresse, la sénescence foliaire conduit également à une allocation préférentielle des ressources vers les organes reproducteurs.

V.5. 3. Effet du stress hydrique sur l'activité photosynthétique

Lors d'un déficit hydrique, l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse et la conductance stomatique sont affectées (Lowlor, 2002 ; Lowlor et Cornic, 2002). La réduction de la photosynthèse, liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, est supposée dépendre à la fois de la fermeture des stomates, avec pour conséquence une diminution de la conductance à la diffusion du CO₂ et d'une limitation biochimique du chloroplaste à fixer le CO₂ (Tardieu et Simoneau, 1998 ; Escolana *et al.*, 1999 Flexas et Medrano, 2002.), probablement associée à la régénération limitante du RuBP, Ribulose Biphosphate, substrat du cycle de Calvin (Fig. 19 ; Gimenez *et al.* 1992). Ainsi le cépage Sangiovese montre une réduction de 35% de l'activité photosynthétique suite à une diminution du potentiel hydrique de -1,0 MPa à -1,5 MPa (Poni *et al.*, 2007).

La conductance stomatique diminue lors de l'abaissement du potentiel hydrique. Le contrôle de la régulation stomatique fait intervenir la turgescence cellulaire mais également des messagers racinaires, comme l'acide abscissique (ABA) (Davis *et al.* 1994 ; Sauter *et al.*, 2001). Généralement, au champ, une période sèche a des effets en premier lieu sur l'état hydrique de la plante, avant même celui du sol (Kramer et Boyer, 1995). Même pour des plantes bien alimentées en eau, une diminution du potentiel hydrique foliaire à la mi-journée est souvent observée au champ, lorsque la journée est chaude et ensoleillée. Dans une telle situation, l'altération de l'état hydrique de la feuille peut conduire à augmenter la sensibilité des stomates à l'ABA (Tardieu *et al.* 1993 ; Sauter *et al.*, 2001). La turgescence cellulaire intervient quant à elle de manière plus ou moins directe au niveau du chloroplaste : directement par le maintien du volume du chloroplaste (Gupta et Berkowitz, 1987), et indirectement, par son effet sur l'ouverture stomatique, qui en contrôlant la conductance au CO₂, conditionne l'utilisation de l'énergie photochimique (ATP, NADPH) dans le chloroplaste. La non-utilisation de cette énergie peut induire ou exacerber des phénomènes de photo-inhibition. Ceux-ci se traduisent par la diminution, plus ou moins rapidement réversible, du potentiel photochimique, liée à l'activation des mécanismes de dissipation de l'énergie, et/ou à la destruction proprement dite des photosystèmes II (PSIIs).

V. 6. Mécanismes d'adaptation à la contrainte hydrique

La sécheresse se manifeste par la combinaison d'une part, de la restriction de la disponibilité en eau du sol et, d'autre part, de l'augmentation de la demande évaporative. Dans les zones arides, les plantes ont développé des mécanismes de régulation assurant leur survie, en général aux dépens de la productivité. Ces mécanismes sont de nature différente chez les plantes cultivées des régions tempérées qui ont été sélectionnées pour leur productivité. D'un point de vue agronomique, la tolérance à la sécheresse est la capacité de la plante à croître et donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des déficits hydriques épisodiques (Chaves et Oliveira, 2002). Jones (1992) a défini et établi une classification des 'stratégies' d'adaptation des plantes à la sécheresse : la première consiste à « éviter » tout stress hydrique et la deuxième la capacité à le « tolérer ».

V. 6. 1. Eviter la contrainte hydrique

La première façon d'éviter la sécheresse est l'esquive. L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adaptation de son cycle de culture à

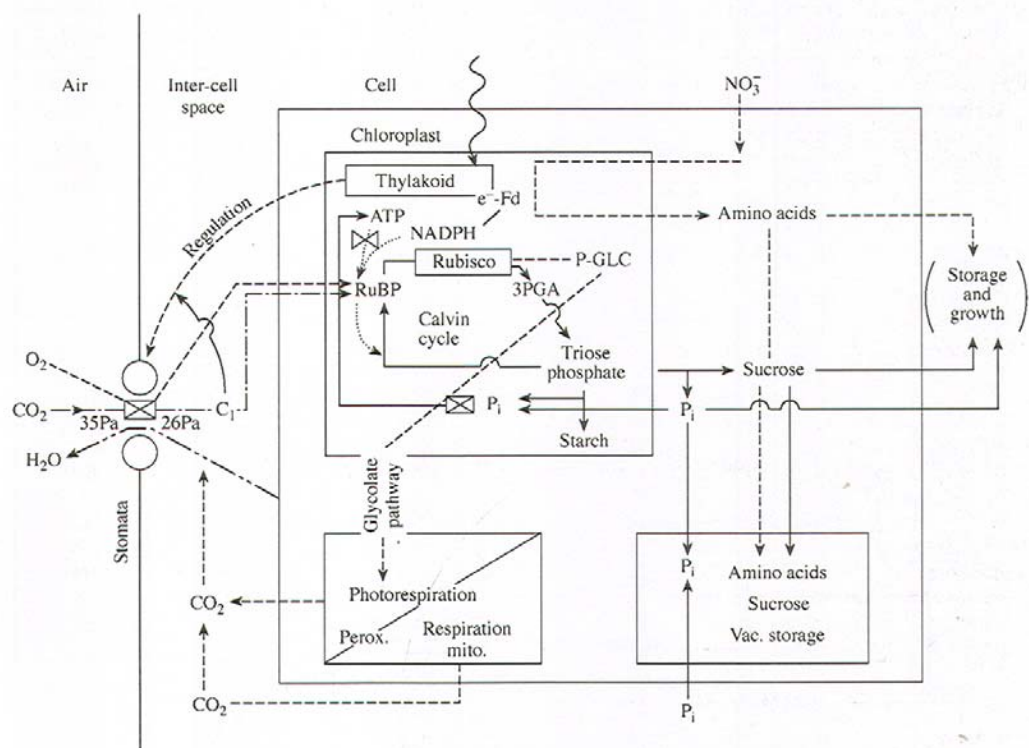


Figure 19 : Limitation de la photosynthèse par les stomates, en liaison avec la synthèse d'ATP, la régénération du Pi et autres processus biochimique liés à la photosynthèses sont signalés (Lowlor, 2002)

la longueur de la saison des pluies. Le développement phénologique rapide avec une floraison précoce, permet à la plante d'éviter les périodes sèches. Cette stratégie appliquée aux espèces cultivées a amené à décaler la date de semis et/ou à sélectionner des variétés plus précoces permettant d'éviter les déficits hydriques de fin de cycle. La deuxième façon d'éviter la sécheresse est la capacité de la plante à maintenir un état hydrique satisfaisant. La stratégie de l'évitement est principalement liée, d'une part, à la réduction de la transpiration et d'autre part, à une optimisation de l'absorption d'eau par les racines. La diminution de la transpiration est principalement liée à la fermeture des stomates. Il s'ensuit une chute de l'assimilation de CO₂ donc une baisse de production de biomasse. Elle peut être due également à une diminution des surfaces évaporantes. Parmi les mécanismes permettant de réduire la transpiration, la réduction de la surface foliaire et la diminution de la conductance stomatique (g_s) jouent un rôle déterminant.

Lors de sécheresses précoces, la réduction de la surface foliaire est associée à une diminution de l'expansion foliaire plus qu'à une sénescence accélérée des feuilles. Le rendement, corrélé à la durée de vie de la surface foliaire après floraison, est fortement affecté lorsque la sénescence est accélérée par des déficits hydriques tardifs. La régulation de la conductance stomatique reste le mécanisme majeur intervenant à court terme pour limiter les pertes en eau : le potentiel hydrique foliaire sera maintenu d'autant plus longtemps que la fermeture des stomates est précoce. Celle-ci peut intervenir à des potentiels hydriques foliaires différents en fonction du cépage (Bota *et al.*, 2001) et du stade de développement (Howell, 2001). La régulation de la conductance stomatique dépend du potentiel hydrique foliaire et de l'humidité de l'air au champ (Lowlor et Cornic, 2002). Les cépages à faible conductance sont plus sensibles au déficit de vapeur et à la baisse du potentiel hydrique foliaire que ceux à forte conductance. Une faible conductance est généralement proposée comme un trait favorable à l'adaptation à la sécheresse (Shultz, 2003). Si la fermeture des stomates n'est pas totale, en raison de la différence entre les coefficients de diffusion de l'eau et du CO₂ dans la feuille, la transpiration est plus réduite que l'assimilation nette : l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est alors augmentée en situation de stress (Cuevas *et al.*, 2006). En revanche, une telle sensibilité des stomates à la diminution de potentiel hydrique peut augmenter la fréquence des épisodes de photoinhibition. La chaîne de transport des électrons est alors rétro-réglée afin de dissiper l'énergie lumineuse en excès. Il est admis que le photosystème II (PSII) joue un rôle central dans les processus d'utilisation et de régulation de l'énergie lumineuse (Baker et Rosenqvist, 2004). Lorsque la fixation du CO₂ ne consomme plus assez d'énergie, d'autres voies métaboliques, telles que la photorespiration, peuvent contribuer au maintien du transfert non cyclique des électrons (Guan *et al.*, 2004). Lorsque cette « voie photochimique » est saturée, la dissipation thermique, par l'intermédiaire du cycle des xanthophylles, joue un rôle important au sein des mécanismes photoprotecteurs en limitant la destruction des PSII (Demmig-Adams et Adams 1992). Cependant, une augmentation supplémentaire de l'énergie lumineuse absorbée, conduit à une inactivation des PSII plus ou moins réversible, liée à des modifications structurales de la protéine D1 (Yokthongwattana et Melis, 2006). Ces modifications du fonctionnement photochimique peuvent être associées à une altération de la biochimie du chloroplaste. En effet, chez le tournesol, la réduction de la concentration intercellulaire en CO₂ peut s'accompagner d'une diminution durable de l'efficacité du chloroplaste à utiliser le CO₂, même si par la suite, la disponibilité de celui-ci n'est plus limitante. Cette altération du fonctionnement chloroplastique, plus ou moins rapidement réversible, peut contribuer à réduire le bilan journalier d'assimilation nette, suite à la dépression de conductance stomatique à la mi-journée ou en période de post-sécheresse. L'optimisation de l'absorption d'eau est liée à un ensemble complexe de caractères morphologiques des racines :

masse et volume, ramification, profondeur (Soar *et al.*, 2006, Soar et Loveys, 2007). De nombreuses plantes adaptées aux zones arides ne contrôlent que très peu leurs pertes en eau par transpiration, mais possèdent un enracinement très profond capable d'extraire l'eau du sol. La croissance racinaire en conditions sèches peut être maintenue par l'ajustement osmotique qui limite la baisse du potentiel de turgescence (Kramer et Boyer, 1995).

V. 6. 2. Tolérer la contrainte hydrique

La tolérance est la stratégie qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique. Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates (Passioura, 1996), de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire (Blum et Ebercon, 1981, Medrano *et al.*, 2003). Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique interne.

Cette tolérance au déficit hydrique interne permet un fonctionnement prolongé de la photosynthèse. Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que la croissance racinaire. Une autre conséquence du maintien du métabolisme carboné sera une diminution de la fréquence des épisodes de photoinhibition. Au niveau cellulaire, l'ajustement osmotique joue un rôle déterminant dans le maintien de la turgescence aux faibles potentiels hydriques foliaires.

Les capacités d'ajustement osmotique sont variables chez la vigne et dépendent du cépage, des modalités d'installation du déficit hydrique et de l'âge de la feuille (Rodrigues *et al.*, 1993). Les solutés impliqués sont essentiellement des ions inorganiques, des sucres solubles, des acides aminés et organiques (Patakas et Noitsakis, 1999). La tolérance à la sécheresse est le résultat de mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes (l'ajustement osmotique) couplées à un système antioxydant efficace sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique (Tardieu, 2005).

V.6. 3. Les mécanismes de la tolérance à la contrainte hydrique

V.6. 3.1. Les aquaporines

Les plantes équilibrent leur état hydrique en ajustant la conductivité de l'eau de leurs tissus. Les tissus vasculaires et les cellules de garde jouent un rôle important dans ce processus. Les aquaporines représente un composant significatif dans le transport cellulaire de l'eau (Eckert *et al.*, 1999 ; Kaldenoff et Eckert, 1999). Les aquaporines peuvent réguler la conductivité hydraulique et augmenter de 10 à 20 fois la perméabilité à l'eau des membranes (Maurel et Chrispeels, 2001 ; Javot et Maurel, 2002). L'expression et l'activité des aquaporines sont modulées par la déshydratation (Tyerman *et al.*, 2002). Smart *et al.*, (2001) ont montré que la répression de gènes d'aquaporines diminue la perméabilité à l'eau des membranes et peut conduire à la conservation cellulaire de l'eau pendant des périodes de contrainte hydrique. En revanche, il y a des exemples de gènes d'aquaporines, qui sont exprimés pendant le stress hydrique ayant pour résultat une plus grande perméabilité et une augmentation du flux de l'eau (Lovisolo et Shaubert, 2006).

V.6. 3.2. La protection des structures photosynthétiques

Les propriétés physiques de l'appareil photosynthétique sont cruciales pour la tolérance des plantes au stress hydrique. L'appareil photosynthétique, très sensible et exposé à des dommages, doit être maintenu ou rapidement réparé lors de la déshydratation (Godde, 1999). Les protéines chloroplastiques sont particulièrement déterminantes pour maintenir la fonctionnalité de ce dernier. Schneider *et al.*, (1993) ont montré que trois gènes chez le *C. plantagineum*, exprimés préférentiellement sous contrainte hydrique, codent pour des protéines chloroplastiques ('chloroplaste-localized stress proteins'- DSP). Les études immunologiques ont indiqué que les deux protéines, DSP22 et DSP34, sont situées dans les thylakoïdes, et que la protéine DSP21 était localisée dans le stroma. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'entretien des structures du chloroplaste en réponse à une contrainte hydrique. En outre, il a été démontré que la synthèse de DSP22 dépend de l'ampleur des dommages causés par photoinhibition (Alamillo et Bartels, 2001). Pruvot *et al.*, (1996) ont également rapporté l'accumulation d'une protéine chloroplastique (CDSP34), induit par la sécheresse, dans les thylakoides de *Solanum tuberosum*. Ces auteurs ont suggéré que cette protéine stabilise les membranes des thylakoides. Rey *et al.*, (1998) ont caractérisé un « stromal thioredoxin-like protéine (CDSP32) » induit par déshydratation, chez la pomme de terre, dont l'expression est indépendante de l'ABA.

V.6. 3.3. *Le stress oxydatif*

Une conséquence des stress environnementaux, comprenant le stress hydrique, est l'apparition d'un stress oxydatif, c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui endommagent les structures cellulaires (Appel et Hirt, 2004). Dans des conditions optimales, les feuilles sont dotées d'enzymes et de métabolites antioxydants suffisants pour faire face aux ROS. De nombreux travaux montrent que des enzymes telles que des superoxyde dismutases (SOD), des ascorbate peroxydases (APX), des catalases (CAT), des glutathion-S-transférases (GST) et des glutathion peroxydases (GPX) s'accumulent pendant le stress hydrique (Flexas *et al.*, 2006). La capacité du système antioxydant est déterminante pour maintenir l'intégrité du système photosynthétique lors d'une contrainte hydrique.

V.7. Incidence du régime hydrique sur le fonctionnement de la vigne

La majorité des plantes pérennes soumises à un déficit hydrique présente une diminution de la croissance des rameaux et des feuilles (Osorio *et al.*, 1998 ; Mpelasoka *et al.*, 2001), ainsi qu'une diminution de la production de fruit (Gonzalez-Altozano et Castel, 1999). Dans le cas de la vigne, la croissance des rameaux présente également une sensibilité au stress hydrique (Smart et Coombe, 1983) se traduisant généralement par un ralentissement de la croissance des sarments et une réduction de la surface foliaire (Reynolds et Naylor, 1994 ; Koundouras *et al.*, 1999). Ce phénomène s'observe même si le déficit en eau n'est que partiel au niveau du système racinaire (Dry et Loveys, 1999). En Australie, l'arrêt de croissance de rameaux non fructifères lors d'un déficit hydrique du sol est utilisé comme indicateur physiologique afin de déclencher l'irrigation des vignobles (Hardie et Martin, 2000). La production de la vigne et la taille des baies sont réduites par l'application d'un stress hydrique (Ginestar *et al.*, 1998; Ojeda *et al.*, 2001). Cependant, selon McCarthy (2000), la taille des baies est plus affectée si le déficit hydrique a lieu immédiatement après la floraison tandis qu'un stress hydrique après la véraison n'affecte pas ce paramètre. Les effets du déficit post floraison pourrait être le résultat d'une vitesse réduite de la division cellulaire, active dans les cellules du péricarpe à ce moment là (McCarthy, 1997).

D'autre part, Greenspan *et al.* (1996) ont montré que les variations de diamètre des baies soumises à un stress hydrique étaient plus importantes lorsque ce stress est appliqué pré-véraison plutôt que post-véraison. L'alimentation en eau de la vigne est un facteur important pour la composition et la qualité des raisins. Une forte contrainte hydrique est associée à une diminution de la conductance stomatique qui se traduit par une meilleure composition des raisins (Koundouras *et al.*, 1999). Inversement, une alimentation hydrique non limitante conduit à un bon fonctionnement physiologique de la vigne. De ce fait, la croissance végétative est prolongée et l'accumulation d'assimilats dans les raisins est plus faible. Sur sols argileux, caractérisés par une réserve utile en eau élevée, la maturation des raisins est retardée et ils présentent des teneurs supérieures en acides organiques. A l'inverse, sur les sols très perméables, la maturation des raisins est accélérée et leur acidité est plus faible (Peynaud, 1984).

V.7.1. Photosynthèse et transpiration en situation de stress hydrique

Les protections contre le stress hydrique ont toutes un coût en termes de productivité. Le contrôle stomatique et la réduction de surface foliaire sont nécessaires au maintien de l'état hydrique des plantes, mais elles se traduisent par une baisse de photosynthèse. L'appareil reproducteur est affecté d'où une réduction de façon irréversible du rendement. Des réductions de transpiration se paient en terme de risque de stress thermique. C'est donc en terme d'optimisation entre des processus contradictoires, et non en terme d'amélioration pure, que se raisonnent à la fois l'amélioration génétique et la gestion de l'irrigation. En termes génétiques, on ne peut pas favoriser à la fois la protection de la plante, qui amène à une stratégie "conservatrice" (réduction des surfaces d'échange et du rendement) et le maintien du potentiel de rendement qui amène à la stratégie inverse

a. Le gaz carbonique (CO₂) de la photosynthèse pénètre dans les feuilles par les stomates, qui contrôlent aussi la transpiration. La fermeture des stomates qui permet de maintenir l'état hydrique foliaire diminue donc la photosynthèse, et donc la production des plantes (Lowlor, 2002 ; Farineau et Morot-Gaudry, 2006). Une controverse existe depuis plusieurs années sur les parts stomatique et biochimique de la réduction de la photosynthèse en cas de déficit hydrique. Dans une grande gamme de déficits hydriques compatibles avec l'activité agricole, la part stomatique est probablement la plus importante (Cornic *et al.*, 2002). Une conséquence est que la photosynthèse est intrinsèquement liée à la transpiration, et il n'existe aucun moyen connu de contourner cet échange "eau contre carbone". Cet échange est la principale limitation de la "tolérance à la sécheresse" : on ne pourra jamais construire des plantes qui maintiennent leur productivité sans un niveau élevé de transpiration (Chaves *et al.*, 2002). La diminution de la photosynthèse a des conséquences sur le métabolisme du carbone, et certaines enzymes impliquées dans la circulation des assimilats sont régulées en réponse au déficit hydrique (Zinselmeyer *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2000).

b. Le rapport photosynthèse / transpiration : efficacité de l'eau, varie avec les conditions environnementales et a une variabilité génétique importante. L'efficacité de l'eau varie d'une part avec les conditions climatiques, d'autre part avec l'espèce. Farquhar *et al.* (1982) ont montré l'utilisation possible de la discrimination de l'isotope lourd du carbone (¹³C) par rapport à son isotope léger (¹²C) pour évaluer directement l'efficacité de l'eau qui peut alors être mesurée facilement avec un spectromètre de masse (Gaudillière *et al.*, 2002). Des mesures directes peuvent également être effectuées.

- On observe de grandes différences entre espèces pour un climat donné, avec une efficacité maximale chez certaines espèces disposant d'un métabolisme dit C4 (maïs, sorgho), et une variabilité génétique importante à l'intérieur de chaque espèce (Condon *et al.*, 2004).
- Pour un génotype donné, l'efficacité de l'eau est d'autant plus faible que la demande climatique est plus importante, puisque la plante transpire plus (Kiani *et al.*, 2007).

c. Une conséquence importante des réductions de photosynthèse en cas de sécheresse est la synthèse de composés toxiques oxydants dans les cellules. Si l'énergie solaire captée par les photosystèmes de la feuille n'est plus utilisée entièrement par la photosynthèse, des formes toxiques de l'oxygène peuvent apparaître, radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) (Apel et Hirt, 2004). Ces radicaux sont les mêmes que ceux qui causent le vieillissement des cellules végétales et animales, en provoquant la peroxydation des lipides et la dénaturation des protéines et de l'ADN. Différents mécanismes permettent de contrecarrer cette accumulation de radicaux toxiques. Un premier consiste à dissiper l'énergie lumineuse sous forme de chaleur. Les caroténoïdes sont impliqués dans ce mécanisme *via* le cycle des xanthophylles (Munné-Bosch et Alegre, 2000). Un deuxième mécanisme est la détoxification, qui consiste à empêcher l'accumulation d'hydroxyles en intervenant à différentes étapes de leur formation. Les superoxydes dismutases (SOD) produisent H_2O_2 à partir des superoxydes et H_2O_2 peut ensuite être éliminé par des catalases ou par le cycle ascorbate-glutathione. Les catalases sont induites par H_2O_2 , des ascorbates peroxydases sont induites par différents stress dont l'ABA, l'éthylène, la sécheresse (Apel et Hirt, 2004).), et des SOD sont induites par la sécheresse et l'ABA (Blokhina *et al.*, 2003).

V.7.2. Température d'organes et la transpiration

Le bilan d'énergie du couvert végétal montre qu'une partie importante de l'énergie radiative incidente est dispersée sous forme de transpiration (Farineau et Morot-Gaudry, 2006). Une réduction de la transpiration par fermeture stomatique se traduit donc par un échauffement de la feuille, souvent de plusieurs degrés C. Le déficit hydrique se trouve ainsi fréquemment associé au stress thermique, non seulement parce que les périodes sèches sont souvent chaudes, mais aussi à cause des réductions de transpiration (Leinonen et Jones 2004). L'échange "eau contre chaleur" est une limitation de la tolérance à la sécheresse, puisqu'une stratégie génétique consistant à réduire la transpiration par contrôle stomatique se trouve confrontée au risque de stress thermique (Tardieu, 2005).

V.7.3. La fluorescence chlorophyllienne en situation de stress hydrique

L'assimilation chlorophyllienne consiste en la formation de glucides à partir du CO_2 et de l'eau, grâce à l'énergie lumineuse captée par la chlorophylle et les pigments associés. Lorsqu'une molécule absorbe un photon, l'énergie qu'il transportait $h\nu$ peut avoir trois destinées différentes :

- elle peut intervenir dans la phase photochimique de la photosynthèse. Deux photosystèmes, nommés PSII et PSI, interviennent successivement dans la phase photochimique, leurs centres réactionnels portant respectivement les holochromes P680 et P700 de la chlorophylle a. Le nombre de molécules de pigment d'un photosystème est de l'ordre de 200 à 300 (Heller *et al.*, 1998). L'énergie lumineuse sera interceptée par une antenne collectrice qui assure la capture des photons et transmet l'énergie d'excitation aux centres réactionnels. Chez les végétaux supérieurs,

les antennes collectrices constituent les complexes collecteurs de lumière (light harvesting complex, LHC). Les complexes LHC I et LHC II sont ainsi respectivement associés au PSI et au PSII,

- elle sera dissipée sous forme thermique,

- elle peut enfin apparaître sous forme d'un photon $h\nu' < h\nu$, et donc $\lambda' > \lambda$; cette énergie est perdue sous forme de lumière de fluorescence.

Ces trois destinations coexistent et sont en compétition. Dans les conditions normales, 90 % de l'énergie totale absorbée est utilisée par la photosynthèse et une partie variable entre 1 et 10 % sera dissipée sous forme de chaleur ou sous forme de fluorescence à partir de la chlorophylle a au niveau du PSII.

Le P680, pigment actif du centre réactionnel du PSII, est un dimère de chlorophylle a ayant un potentiel d'oxydoréduction très élevé ($E^{\circ} = 1,12 \text{ V}$) lui permettant de recevoir sans difficulté les électrons issus de l'eau. Au niveau du PSII, l'accepteur primaire des électrons est une phéophytine (Phéo, $E^{\circ} = - 0,43 \text{ V}$). De là, l'électron est successivement transféré sur deux plastoquinones, nommées QA ($E^{\circ} = - 0,15 \text{ V}$) et QB ($E^{\circ} = - 0,05 \text{ V}$). Le transfert des électrons entre la Phéo et la QA est irréversible. Quand QA est réduite (QA⁻), les centres réactionnels du PSII seront fermés et tout photon intercepté sera émis sous forme de fluorescence.

D'une manière pratique, la majorité des études utilisant la fluorescence chlorophyllienne se basent sur « l'effet Kautsky » qui se produit lorsque des feuilles photosynthétiquement actives sont placées à l'obscurité puis illuminées, des changements dans l'intensité de la fluorescence intervenant dans le temps. Cette évolution est appelée « l'effet Kautsky ».

L'analyse de la fluorescence chlorophyllienne et de ses composantes photochimiques et non photochimiques (rendement quantique photochimique du PSII : Φ_{PSII} , efficacité photochimique maximale du PSII : Φ_{maxPSII} , taux du transport des électrons du PSII : JT, quenching photochimique : qP et quenching non photochimique : qNP), sous contrainte hydrique, montre une perturbation au niveau des réactions photochimiques de la photosynthèse avec un blocage du transfert d'électrons entre LHC II et PS II (O'Neil *et al.*, 2006). Flexas *et al.*, (1999) ont démontré que la fluorescence chlorophyllienne de la vigne augmente à midi et spécialement pour les plants stressés. La diminution du taux d'assimilation du CO₂ chez les feuilles est associée à une inhibition de la photosynthèse ce qui provoque une augmentation de la dissipation de l'énergie d'excitation du PSII entraînant des photo-endommagements des centres réactionnels du PSII (Sayed, 2003 ; Baker et Rosenqvist, 2004 ; O'Neil *et al.*, 2006).

Pour estimer l'efficacité photochimique maximale du PSII ($\Phi_{\text{maxPSII}} = F_v/F_m$), Jagtap *et al.*, (1998) ont montré que le déficit hydrique engendre une diminution importante du rapport F_v/F_m chez cinq variétés de *Sorghum bicolor* L. Moench. Par contre, Lu et Zhang (1999) n'ont observé aucun changement au niveau du Φ_{maxPSII} mesuré après une adaptation des feuilles de blé à l'obscurité sous des déficits hydriques modérés et sévères. Alors qu'après une adaptation à la lumière, le stress hydrique a engendré une diminution du rendement quantique du transport des électrons du PSII (JT) et de l'efficacité de capture des excitations photoniques au niveau des centres réactionnels ouverts du PSII, et une augmentation au niveau du Φ_{maxPSII} , qP et du qNP. Chez les plantes C3, quand les stomates sont fermés sous l'effet d'une contrainte hydrique et l'assimilation du CO₂ est réduite, la réduction photosynthétique de l'oxygène par la photorespiration augmente et sert comme consommateur de l'excès de l'excitation énergétique de l'appareil photosynthétique (Escolana *et al.*, 1999 ; Baker et Rosenqvist, 2004). Par contre, la réduction photosynthétique de l'O₂ s'est avérée insuffisante pour la dissipation de l'excès de l'excitation lumineuse interceptée par les antennes collectrices du PSII. Sous un stress hydrique

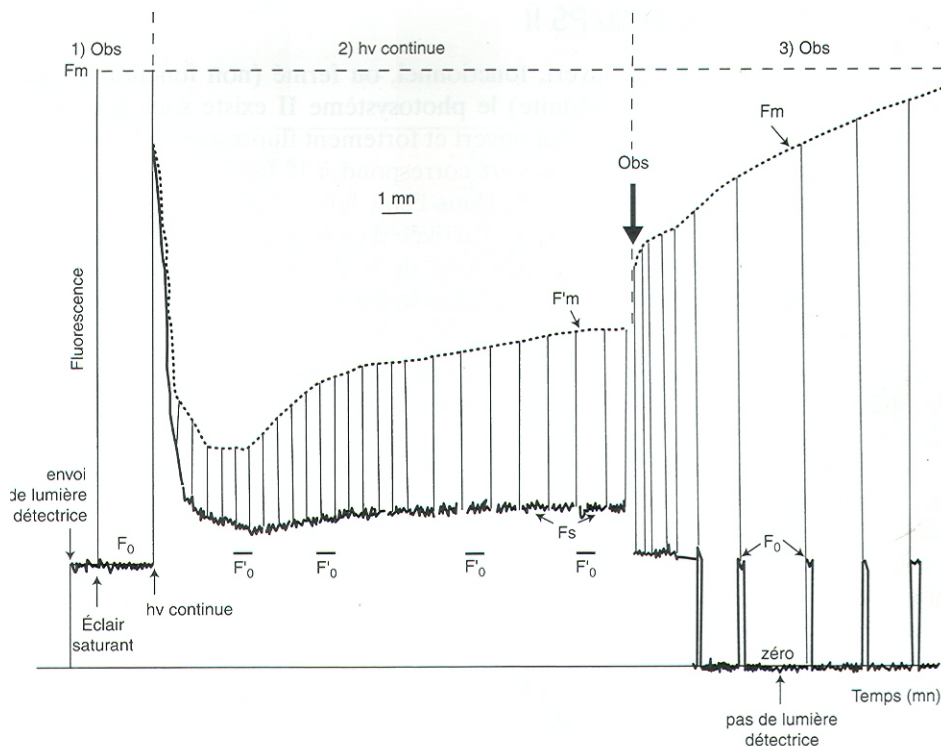


Figure 20 : Variation du rendement de fluorescence modulé chez une feuille de pois pendant l'induction de la photosynthèse, jusqu'à l'installation d'un état stationnaire. L'expérience, conduite en atmosphère d'air normal humidifié à 80 %, comprenant 3 phases :

- 1- à l'obscurité, détermination de F_0 et F_m est le rendement de F en présence de la lumière détectrice fournie seule ; F_m est obtenu par l'envoi d'un éclair de longue durée (700 ms) et de forte intensité (2-3 fois l'intensité solaire) fermant tous les centres PSII.
- 2- Eclairage modéré, $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ jusqu'à l'état stationnaire avec envoi d'éclairs sous éclairage, fermant tous les centres restés ouverts. F'_0 est déterminée en arrêtant l'éclairage actinique pendant 10 secondes. L'envoi pendant 5 secondes d'une lumière rouge lointain ($\lambda 720 \text{ nm}$, FR) permet d'abaisser F'_0 à la valeur F_0 .
- 3- Arrêt de l'illumination : augmentation de la fluorescence maximale F'_m en 2 phases. L'arrêt momentané de l'envoi de cette lumière détectrice entre deux éclairs saturants évite les faibles effets « actiniques » de celle-ci (Farineau et Morot-Gaudry, 2006).

sévère, le transport des électrons de l' O_2 et la diminution du quenching photochimique sont incapables de dissiper l'excès de l'énergie d'excitation causant ainsi des photo-détériorations au niveau du PSII (Nogués et Baker, 2000). Ces mêmes auteurs ont noté qu'au cours d'un stress hydrique les Φ_{maxPSII} , JT et qP des différentes espèces ont marqué d'importantes diminutions chez trois espèces différentes (*Olea europaea* L., *Rosmarinus officinalis* L. et *Lavandula stoechas* L.). De même, un stress hydrique appliqué sur des plantes CAM (*Clusia minor* L.) provoque une diminution de 34% du Φ_{PSII} et une augmentation de 42% du qNP (De Mattos et al., 1999).

V.7.4. Limitations de la croissance des organes de la plante

La limitation de la croissance foliaire est un mécanisme adaptatif qui permet de réduire la transpiration. Les réductions de croissance sont l'une des premières manifestations du déficit hydrique (Kramer et Boyer, 1995 ; Saab et Sharp, 2004). Elles se produisent soit directement au travers d'une réduction de vitesse de croissance, soit indirectement en réduisant le nombre d'organes portant des feuilles :

- *La réduction de vitesse de croissance foliaire met en jeu plusieurs mécanismes.* La vitesse de division cellulaire décroît (Granier *et al.*, 2000), les parois cellulaires, qui doivent se déformer pour permettre la croissance cellulaire, deviennent plus rigides (Cosgrove, 2005), la turgescence décroît (Bouchabke *et al.*, 2006). Chacun de ces phénomènes met en jeu plusieurs familles de gènes dont les régulations ne sont qu'imparfaitement connues (Kiani *et al.*, 2007). La signalétique des modifications de croissance est elle-même complexe, en particulier parce que plusieurs signalétiques se superposent et s'entrecroisent (en particulier celles de l'acide abscissique, de l'éthylène et des sucres (Sharp, 2002 ; Leon et Sheen, 2003). Il existe cependant un consensus sur le fait que la réduction de croissance n'est pas une conséquence passive du manque d'eau dans les cellules, elle est contrôlée et programmée par la plante, avec l'intervention de gènes d'inhibition qui s'expriment avant les sècheresses "catastrophiques". Il s'ensuit qu'une plante réduisant fortement sa taille lors d'un déficit hydrique n'a pas nécessairement été stressée au niveau cellulaire : il peut s'agir de régulations précoces.

- *L'architecture de la plante est profondément modifiée.* Un déficit hydrique, même très modéré et ne présentant pas de symptômes flagrants, se traduit chez beaucoup d'espèces par une modification importante de l'architecture de la plante. Chez la vigne le nombre de ramifications et le nombre d'organes élémentaires (phytomères) de la tige sont drastiquement réduits (Lecoeur *et al.*, 1995 ; Belaygue *et al.*, 1996 ; Lebon *et al.*, 2004). Chez les graminées, le nombre de talles est réduit en cas de déficit hydrique (Courtois *et al.*, 2000). Les processus en jeu et les signalétiques sont encore assez mal connus mais, il s'agit de contrôles actifs de la plante mettant en jeu des signalétiques hormonales et l'expression de gènes induits par le stress, et non la conséquence passive du stress ou d'un manque de nutriments (Kiani *et al.*, 2007).

- *Les croissances de plusieurs organes sont inégalement affectées.* Relativement peu d'études ont abordé les conséquences du déficit hydrique sur plusieurs organes de la plante. Un consensus existe cependant sur le fait que les racines sont les organes dont la croissance est la moins affectée, par rapport aux parties aériennes, végétatives et reproductrices (Soar et Loveys, 2007). La régulation des gènes affectant la croissance est assez nettement différente chez les racines et les parties aériennes (Wu et Cosgrove, 2000).

VI. Objectifs du travail

L'étude bibliographique montre que l'incidence du régime hydrique sur la physiologie de la vigne et sur la qualité des raisins a été étudiée par de nombreux auteurs sur les grands cépages internationaux (Cabernet Sauvignon, Syrah et Merlot). Cependant, quelques travaux aient été réalisés sur les principaux cépages régionaux du vignoble de Midi-Pyrénées, et des travaux déjà réalisés sur la physiologie de la maturité des cépages régionaux ont montré, que leur réactions étaient différentes, il nous a semblé important d'étudier l'incidence du stress hydrique sur les principaux cépages régionaux : Cot, Négrette, Tannat, Duras et Fer Servadou et sur l'évolution des composés phénoliques au cours de la maturation.

Afin de combler ce manque, nous avons conduit des expérimentations sous conditions contrôlées sous serre sur des vignes, âgées de quatre ans, dans lesquels nous avons fait varier les niveaux d'alimentation hydrique.

Au cours de ce travail trois thèmes ont été abordés :

- Dans le premier temps, nous avons caractérisé le comportement écophysologique de trois cépages Cot, Négrette et Fer Servadou. Les résultats sont présentés et discutés sous forme de deux publications.
- Dans le deuxième temps nous avons précisé le rôle de l'alimentation hydrique, du cépage et de la diminution de la taille des baies sur leur composition phénolique au cours de la période de maturation et à maturité. Cette thématique comporte deux publications présentant le comportement spécifique du Cot, de la Négrette, du Tannat et du Duras.
- Et en dernier lieu nous avons étudié l'effet d'une calcite micronisée sur le comportement écophysologique de la vigne en situation de stress hydrique. La signalisation cellulaire induite par cette calcite a été étudiée sur des plantes modèles Arabidopsis et tabac.

Enfin le mémoire se conclura en dégageant quelques perspectives de ce travail.

CHAPITRE II :

Matériels et méthodes

I. Introduction

Les cultures sur support sont couramment utilisées dans le cadre expérimentations, car elles permettent de contrôler avec précision les facteurs environnementaux tels que la température, l'hygrométrie, l'intensité lumineuse et le régime hydrique. Ce mode de culture permet d'une part une croissance rapide des plantes quelque soit la saison et d'autre part pouvoir contrôler parfaitement les éléments fertilisants apportés à la plante. Ce type de culture permet de simuler parfaitement une contrainte hydrique progressive au niveau du substrat reproduisant ainsi parfaitement celle d'un stress hydrique en plein champ, là où il est très souvent difficile de réaliser des situations vraies de sécheresse (Bravdo, 2005), à cause des aléas climatiques.

II. Matériel végétal

Le premier essai a été réalisé sur des plants âgés en moyenne de quatre ans sur cinq cépages autochtones de la région Midi-Pyrénées qui sont : Tannat clone 474, Cot clone 596, Négrette clone 663, Duras clone 627 et Fer Servadou clone 421.

Le porte-greffe utilisé est le 3309C clone 144 pour toutes les expérimentations, car il est largement représenté dans la région Midi-Pyrénées. Ce porte-greffe est issu du croisement entre *Riparia tomentueux* et *Rupestris martin*, et il est considéré comme qualitatif.

Le deuxième essai a été réalisé sur des jeunes plants greffés soudés de l'année du cépage Cot clone 596 greffé sur 3309C.

Le troisième essai portant sur la signalisation cellulaire et le mécanisme d'action de Megagreen a été réalisé sur des suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana plumbaginifolia*.

III. Culture en conditions contrôlées (en serre)

III. 1. Essai cépages

Cinq cépages ont été utilisés afin d'étudier leur comportement écophysiological en situation de stress hydrique en conditions contrôlées ainsi que la maturité phénolique des baies pendant la période post-véraison. Le dispositif expérimental est complètement randomisé avec $n = 12$ plants par traitement (vigne bien irriguée et vigne stressée), soit un total de 120 plants de vigne.

Cette expérimentation a été conduite en conditions contrôlées dans une serre de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (Sud-Ouest de la France, latitude $43^{\circ}32'14.50''N$; longitude $1^{\circ}29'44.25''O$; altitude 148 m). Cette serre est équipée pour des cultures hors-sol. Elle est orientée Nord-Sud. Les vignes sont plantées dans des pots de 40 litres (soit un plant par pot).

La croissance des plants s'est effectuée sous éclairage naturel, l'intensité lumineuse moyenne est estimée à $500 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$, l'intensité maximale de l'éclairage enregistrée à 14 heures était de $1600 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une photopériode naturel d'environ 14/10 h, à une température journalière $26/30^{\circ}\text{C}$ et $16/20^{\circ}\text{C}$ température nocturne. L'humidité relative de l'air était comprise entre 65 et 70%.

Le substrat utilisé est de la pouzzolane. Il est d'origine volcanique, avec les caractéristiques suivantes : pH \approx 6,5 ; capacité de rétention en eau = 19 % de son poids ; capacité d'échange cationique nulle ; densité = 0,7 à 1 ; granulométrie = 3 à 15 mm ; porosité = 73 % ; teneur en air après ressuyage = 62 %.

Afin d'obtenir une bonne croissance des vignes ainsi qu'une bonne maturation des raisins, nous avons choisi d'utiliser une solution de type Coïc-Le Saint, adaptée aux besoins nutritifs de la vigne mise au point par [Daverede \(1996\)](#) ([Tableau1, Ibrahim, 2001](#)).

Tableau 1 : Composition de la solution nutritive ([Ibrahim, 2001](#)).

Eléments majeurs	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
meq.L ⁻¹	8,8	1,0	2,0	1,0	2,1	6,7	2,0
Oligo-éléments	Fe	Mn	Mo	B	Zn	Cu	
mg.L ⁻¹	5,90	2,00	0,05	1,50	0,50	0,25	

III. 2. Système de conduite et travaux en vert

Les vignes ont été taillées en Guyot simple en laissant un courson comprenant 4 bourgeons. 24 plants ont été sélectionnés en fonction de leur uniformité (poids de bois de taille et sur le nombre de fleurs observées après le débourrement). Ces plants ont été disposés dans la serre, espacés de 1,3 m entre les rangs et de 0,5 m dans le rang. La croissance des rameaux a été stoppée à 15 feuilles pour obtenir un rapport feuille / fruit égal à 1,5 m² kg⁻¹ à la récolte ([Smart et al., 1990](#)). Tous les entre-coeurs ont été supprimés au fur et à mesure de leur apparition. Tous les plants sont irrigués normalement avec la même solution nutritive jusqu'au début de la véraison. Des traitements phytosanitaires classiques ont été appliqués en fonction des besoins. Un rognage a été effectué au mois de juillet pour une meilleure exposition des grappes au soleil, une bonne aération et un assainissement du climat dans la zone fructifère.

III.3. Contrainte hydrique en serre pour les vignes

Les plantes sont arrosées normalement jusqu'au stade début véraison avec la solution nutritive de référence. L'alimentation des pots est fractionnée en trois arrosages par jour (matin, midi et soir) à raison de 1L/m² de surface foliaire/24h (qui correspond dans nos conditions à la percolation des pots).

La première année un essai préliminaire a été effectuée, deux niveaux de restriction hydrique par rapport au témoin T0 (100 %) soient les traitements T1 (60 % du témoin) et T2 (30 % du témoin) ont été testés afin de déterminer le meilleur traitement qui nous permettra d'étudier l'état de la vigne en situation limitante assez marquée sans trop affecter les plants jusqu'au stade de maturité. Pour nos expérimentations nous avons choisi donc deux traitements :

- une alimentation hydrique non limitante normale témoin (100 %)
- une alimentation hydrique réduite avec des arrosages correspondant à (30 % du témoin)

Ces deux traitements retenus nous permettent de maintenir le potentiel hydrique de base du témoin à $\psi_{PD} > - 0,3$ MPa et celui du traitement stressé à $\psi_{PD} < - 0,5$ MPa ([Matthews et al., 1987](#), [Girona et al., 2006](#)). A ce stade le déficit hydrique est provoqué. La moitié des plantes (dite

stressées) avait subi une contrainte hydrique progressive, réalisée à ce stade. Cette contrainte hydrique consistait à diminuer progressivement l'arrosage de 100 % à 30 % pendant une semaine (soit une diminution d'approximativement 10 % par jour). Les mesures physiologiques sont effectuées chez les vignes « bien-irriguées » et les vignes stressées dès l'installation du déficit hydrique. Des irrigations modérées étaient ensuite effectuées afin de conserver l'état des feuilles jeunes en flétrissement jusqu'à la récolte.

III. 4. Stade de mesure et paramètres étudiés

Les mesures des relations hydriques, des échanges gazeux (photosynthèse) et de la fluorescence chlorophyllienne ont été réalisées sur la feuille la plus jeune et complètement développée, pendant la période début véraison - maturité. Une attention particulière a été accordée aux stades phénologiques repères : début véraison correspondant au stade 35 E-L System (Coombe, 1995), pleine véraison (Stade 36 E-L System), stade de maturation correspondant à niveau intermédiaire du Brix et au stade maturité ou la récolte du raisin (stade 38 E-L System).

III. 5. Les caractères physiologiques

La tolérance au déficit hydrique a été étudiée dans les expérimentations effectuées en serre contrôlée sur les plants stressés et témoins à partir du stade début véraison au stade maturité par rapport aux plantes témoins. Des mesures des paramètres hydriques sont effectuées sur les mêmes feuilles ainsi que les mesures des paramètres associés à la photosynthèse et des paramètres de fluorescence.

II.5.1. Relation hydrique

Au cours de ce travail, le contrôle de l'état hydrique des plants a été effectué par la mesure des potentiels hydrique de base (Ψ_{PD}) et de midi (Ψ_{MD}) à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA; Scholander *et al.*, 1965). Pour quantifier Ψ_{PD} , cette mesure a été réalisée peu avant le lever du soleil en l'absence de transpiration (stomates fermés à l'obscurité). Selon Katerji et Hallaire (1984), cette grandeur traduit les conditions d'alimentation hydrique d'un végétal liées à l'état de dessèchement du sol exploré par le système racinaire. Cette méthode consiste à mesurer la tension de la sève brute dans les vaisseaux d'une feuille fraîchement cueillie introduite dans une chambre à pression connectée à une bouteille de gaz (azote). Seul le pétiole, coupé à son extrémité, sort de la chambre par un petit orifice prévu à cet effet. La feuille est soumise à une pression gazeuse croissante dans la chambre jusqu'à l'apparition d'un ménisque de sève sur la section du pétiole. Cet instant correspond à l'équilibre de pression existant avant le détachement de la feuille du rameau. La pression minimale pour faire apparaître un ménisque de sève est enregistrée sur le manomètre.

Le potentiel hydrique foliaire à midi a été mesuré entre 12:00 h et 13:00 h de la même façon. L'évolution journalière du statut hydrique (Ψ_{leaf}) a été suivie toutes les deux heures à partir de 04:00 h. La conductivité hydraulique spécifique de la feuille a été déterminée K_l ($\text{mmol MPa}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) selon la relation $E/(\Psi_{Leaf} - \Psi_{PD})$ où E est la transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Sperry et Pockman, 1993).

II.5.2. Photosynthèse et paramètres associés

Les mesures d'assimilation photosynthétique maximale nette (A_{\max} en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), de la conductance stomatique (g_s en $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la transpiration (E en $\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) et la concentration interne en CO_2 (C_i en $\mu\text{mol mol}^{-1}$) ont été effectuées grâce à un analyseur à gaz infra-rouge de type LICOR 6400 (LICOR 6400-40; Lincoln, Nebr. USA) qui regroupe en une unité portable tous les éléments nécessaires pour la mesure des flux de vapeur d'eau et de CO_2 . Ce système comporte:

- une pince foliaire ventilée munie de capteurs de température à l'intérieur de la chambre et d'un capteur de PPF (Rayonnement Photosynthétiquement Actif). Cette pince est reliée à une lampe halogène permettant de travailler sous des rayonnements contrôlés.
- un capteur de fluorescence chlorophyllienne intégré (LI-6400-40 LCF).
- une entrée de cartouche à CO_2 permettant de travailler sous différentes concentrations de dioxyde de carbone.
- des microprocesseurs permettant la mesure de la concentration en CO_2 et en H_2O de l'air.
- une unité centrale permettant le contrôle des protocoles en plus d'un système d'acquisition et de transfert des résultats sur PC.

Les mesures ont été faites sur la feuille la plus jeune et complètement développée de chaque cépage entre 09:00 h et 12:00 h et sous éclairage saturant de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (PPFD : densité de flux de photons actifs) sous température et humidité relative ambiantes.

L'étude de l'évolution journalière a été effectuée pendant la journée toutes les deux heures de 06:00 jusqu'à 20:00 h.

L'étude de la relation entre l'efficacité quantique de CO_2 et l'efficacité quantique du photosystème PSII a été réalisée en mesurant les paramètres de la photosynthèse et de la fluorescence chlorophyllienne en modifiant l'intensité du PPF de 1500, 1200, 800, 400, 200, 100 et $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ à deux concentrations de CO_2 (400 et $800 \mu\text{L L}^{-1}$). L'efficacité quantique de CO_2 a été calculée comme étant le rapport de l'assimilation photosynthétique nette divisé par la densité de flux de photons actifs et le coefficient d'absorption ($\alpha = 0,85$) (Cheng *et al.*, 2001).

II.5.3. Paramètres de la fluorescence des chlorophylles

Lorsqu'une feuille est mise à l'obscurité, le système photosynthétique se met au repos après quelques minutes. Si cette feuille est exposée à un flash lumineux, le système photosynthétique répond par un signal de fluorescence comportant deux phases : une phase d'augmentation très rapide de l'intensité de fluorescence d'une valeur initiale F_0 à une valeur maximale F_m . Une deuxième phase lente et descendante de l'intensité vers un état stationnaire F_s .

Dans notre méthodologie de travail, et pour déterminer les valeurs F_0 et F_m , deux étapes sont nécessaires. La première étape consiste à stopper l'activité photosynthétique sur une petite surface de la feuille pour rendre les centres réactionnels disponibles. Pour cela, on place un clip sur la feuille qui permet de mettre la surface-test à l'obscurité. Le clip est laissé pendant 30 minutes pour permettre à la chaîne de transfert d'électrons le temps de se « vider ». La deuxième étape consiste à envoyer un flash lumineux sur la surface test. Le PSII est alors excité. L'énergie lumineuse qui ne peut pas être collectée par le PSII, déjà saturé, est alors réémise sous forme de fluorescence.

Dans les conditions ambiantes et en présence de la lumière, les centres réactionnels des photosystèmes sont fermés. Pour déterminer les niveaux d'excitation de ces photosystèmes, on mesure la fluorescence chlorophyllienne sous une lumière actinique. Cette étape nous permet d'obtenir les niveaux d'excitation minimale et maximale dont les valeurs correspondantes sont respectivement F_s (fluorescence stationnaire) et F_m' (fluorescence maximale en présence de la lumière).

Dans le but de déterminer les quenchings photochimique et non photochimique, la détermination du niveau d'excitation du système photosynthétique après une minute d'obscurité est nécessaire. Pour cela, on place le clip sur la surface de la feuille pour permettre à la feuille de s'adapter à l'obscurité. Après une minute, on excite la feuille par des photons et on mesure la fluorescence. La valeur de cette fluorescence est notée F_o' .

Après avoir mesuré tous les niveaux d'excitation (F_o , F_m , F_s , F_m' et F_o'), plusieurs paramètres peuvent être calculés. Dans notre étude, nous avons suivi :

- la capacité d'utilisation de l'énergie lumineuse pour le transport non cyclique des électrons le rendement photosynthétique des PSII : $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$
- l'efficacité photochimique potentielle des PSII pour le transfert des électrons : F_v / F_m
- l'efficacité photochimique réel des PSII pour le transfert des électrons : F_v' / F_m'
- le taux de transfert des électrons : $J_T = \Phi_{PSII} * PAR * 0,5 * 0,8$
- la part d'énergie lumineuse dissipée thermiquement au niveau des PSII : c'est le quenching photochimique : $q_P = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$

III. 6. Les caractères agronomiques de la maturité du raisin

III. 6. 1. Prélèvements des baies

Les prélèvements ont été réalisés à partir du stade début véraison jusqu'à la récolte pour toutes les expérimentations aux mêmes stades repères, que ceux retenus pour l'étude des paramètres écophysologiques. Les baies prélevées ont été pesées (poids frais) et leur diamètre a été mesuré. La pellicule et les pépins ont été ensuite séparés manuellement de la pulpe. La pellicule a été congelée à -20°C . Les poids frais de la pulpe, des pépins et de la pellicule ont été déterminés. Les mesures de l'indice de réfraction ($^\circ\text{Brix}$) et de l'acidité titrable des échantillons de pulpe ont également été réalisées au moment des prélèvements. Les différents échantillons ont été congelés (-20°C) pour la détermination par la suite des autres paramètres.

A maturité, pour chaque traitement, un échantillon de 1500 baies a été constitué. Le poids frais ainsi que le diamètre des baies ont été déterminés. Ensuite, les baies ont été classées selon leurs poids frais aux différentes catégories suivantes : a = 0,50–0,75 g, b = 0,76–1,00 g, c = 1,01–1,25 g, d = 1,26–1,5 g, e = 1,51–1,75 g et f = 1,76–2,00 g.

III. 6. 2. Composition des baies de raisin

La composition du jus extrait des baies est déterminée du début véraison jusqu'à la maturité. Les échantillons de baies récoltées lors des différents prélèvements ont été broyés par écrasement mécanique et le jus centrifugé. Les analyses ont été réalisées sur le surnageant. Les degrés Brix ont été déterminés par utilisation d'un réfractomètre à main avec compensation de

température (modèle RF233, Merck Eurolab ; Fontenay-Sous-Bois). L'acidité titrable déterminée est exprimée en g L⁻¹ H₂SO₄. La titration a été réalisée avec NaOH 0,1 N.

A maturité, les proportions des différentes parties des baies (pellicule, pulpe et pépins), par rapport au poids frais, ont été déterminées pour les différentes catégories de baies et classées ultérieurement.

III. 6. 2.3. Dosages des anthocyanes

Les baies ont été broyées par un broyeur (Dangoumeau, Prolabo, Paris) puis extraites selon Iland *et al.* (2000) dans de l'éthanol acidifié à pH = 2 pendant 1 heure puis une centrifugation à 3500 tpm pendant 5 minutes. Pour l'analyse des anthocyanes par HPLC, les extraits ont été filtrés sur des filtres seringues en polypropylène de 0,45 µm (GHP Acrodisc, Pall Gelman Corporation, Ann Arbor, USA). Une partie aliquote de 5 µl de chaque extrait a été injectée et les anthocyanes totales ont été mesurées par lecture de l'absorbance à 520 nm. La quantification des anthocyanes totales a été réalisée en utilisant une courbe d'étalonnage établie sur la malvidine-3-glucoside (Extrasynthèse, Lyon, France). Les résultats obtenus sont ainsi exprimés en équivalent malvidine-3-glucoside. L'analyse individuelle des anthocyanes a été réalisée sur une chaîne HPLC Hewlett Packard Série 200 (Spectra-Physics Thermo Separation Products, CA, USA) comprenant un module de séparation (Hewlett Packard Série 1100) connecté à un détecteur UV-Vis (Hewlett Packard 1040M Série II). La séparation a été réalisée à température ambiante par injection de 5 µL d'extrait sur une colonne Zorbax SB-C18 de 150 mm x 4.6 mm x 5 µm de taille de particule, équipée d'une précolonne de même nature C18 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). L'élution est faite à un débit de 1 ml min⁻¹ par un gradient tertiaire. L'éluant A est de l'eau, l'éluant B est l'acétonitrile et l'éluant C est de l'acide phosphorique à 1 %. Les éluants ont été filtrés sur une membrane organique de 0,45 µm type Millipore HVLP (Dublin, Ireland). Le gradient utilisé est indiqué dans le Tableau (2). La détection a été réalisée à 520 nm. L'identification des pics de malvidine-3-glucoside a été établie par injection d'étalon (Extrasynthèse, Lyon, France). Les autres composés ont été identifiés par analogie à la littérature et aux profils de détection obtenus au laboratoire du Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées. La malvidine-3-glucoside (Mv-3-gl) a été utilisée comme référence. Les anthocyanes sont quantifiées à l'aide du logiciel HP Chemstation, version 06.03 (Agilent Technologies, CA, USA) en référence à une courbe de calibration établie en utilisant la malvidine-3-glucoside. Les résultats obtenus sont donc exprimés en équivalent Mv-3-gl.

Tableau 2 : Gradient d'élution pour l'analyse des anthocyanes par HPLC

<i>Temps (min)</i>	<i>Débit (mL)</i>	<i>H₂O (%)</i>	<i>Acétonitrile (%)</i>	<i>H₃PO₄ 1% (%)</i>
0	1	20,0	0,0	80,0
50	1	0,0	30,0	70,0
55	1	0,0	50,0	50,0
60	1	0,0	100,0	0,0
65	1	0,0	100,0	0,0
70	1	50,0	50,0	0,0
75	1	100,0	0,0	0,0
80	1	20,0	0,0	80,0

III. 6. 2.4. Dosages des tanins

Pour les baies, le dosage des tanins a été réalisé selon la méthode décrite par [Harbertson et al., \(2002\)](#). La pellicule et les pépins sont séparés de la pulpe, rincés à l'eau distillée – di-ionisée puis conservés dans une solution à 100mg/L de SO₂ à 4°C jusqu'à l'étape d'extraction. Cette dernière consiste à placer les échantillons dans un erlenmeyer de 250 mL, puis pour chaque extraction, 1 mL d'une solution d'acétone/eau à 60 % v/v par gramme de poids frais a été ajouté. Puis l'erlenmeyer est fermé et inerté à l'azote. L'extraction est faite pendant 24 heures à la température ambiante au moyen d'un agitateur orbital réglé à 100 tpm. Après extraction, la solution est ensuite filtrée à travers du papier Watman #1 puis évaporée sous vide (35 à 40°C) pour éliminer l'acétone. La solution obtenue est ensuite ajustée à 1mL/baie soit 20 mL d'eau pure puis conservée à -20°C pour analyse.

La détermination de la teneur en tanins est basée sur le principe de précipitation des tanins par des protéines ([Haegerman et Butler, 1978](#)) modifié par [Harbertson et al., \(2002\)](#). Brièvement la solution de l'extrait est diluée dans une solution modèle de vin (12% d'éthanol (v/v), 5g/L bitartrate de potassium et pH ajusté à 3,3). Un échantillon de 500 µL est ajouté à 1 mL d'une solution tampon de protéine BSA (équivalent à 1 mg de protéine /mL d'une solution composée de 0,2 M acide acétique et 0,17 M NaCl ajustée à pH 4,9 avec de la soude) dans un tube à centrifugation de 1,5 mL. L'échantillon est passé au vortex puis mis à incubation pendant 15 min sous agitation (50 tpm). Après une centrifugation pendant 5 min à 13500g, le surnageant est ensuite prélevé et le tube est rincé avec 500 µL de la solution tampon sans BSA. Une deuxième centrifugation est effectuée pour éliminer le surnageant. Le culot est par la suite dissous dans 875 µL d'une solution tampon (5% v/v triéthanolamine et 10% SDS dodécyl sulfate de sodium ajusté au pH 9,4). Après 10 min, l'absorbance est mesurée à $\lambda = 510 \mu\text{m}$. Ensuite on ajoute 125 µL d'une solution de chlorure ferrique (0,01 M FeCl₃ dans 0,01 HCl) pour une deuxième lecture de l'absorbance à la longueur d'onde $\lambda = 520 \mu\text{m}$ après 10 min d'incubation. La concentration en tanins est exprimée en équivalent catéchine en référence à une courbe de calibration établie en utilisant la catéchine (Sigma, Steiheim, Germany).

IV. Essai d'application d'une calcite micronisée sur la vigne

IV. 1. Matériel Végétal

L'expérimentation a été également conduite en conditions contrôlées dans une serre à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse. Cette serre est équipée pour des cultures hors-sol. Les vignes sont cultivées dans des pots de 7 litres de volume sur un support inerte de pouzzolane (soit un plant par pot).

Le cépage retenu pour cette expérimentation est le Cot Clone 596 greffé sur 3309C clone 111.

IV. 2. Contrainte hydrique en serre pour les vignes

Les plants ont été mis en pré-culture pendant six semaines, afin d'avoir une végétation suffisante, pour pouvoir réaliser les pulvérisations foliaires. Les plants ont été arrosés avec la

même solution nutritive standard. L'irrigation des pots a lieu tous les deux jours à raison de 0,6 L/plant (qui correspond dans nos conditions à la percolation des pots).

Les traitements concernant le régime hydrique qui ont été préconisés sont les suivants :

- alimentation hydrique normale correspondant à 100% (témoin)
- alimentation hydrique réduite à 30% du témoin (stress hydrique)

IV. 3. Application d'une calcite micronisée sur des vignes en situation des stress hydrique

Megagreen est une calcite micronisée, élaborée par un procédé tribomécanique de broyage et d'activation breveté (European Patent office WO/2000/064586).

Ce produit innovant, utilisé en application foliaire est destiné à une large gamme de plantes : céréaliculture, cultures légumières et vigne dont il améliore le développement en condition de contrainte hydrique.

Megagreen est composé essentiellement de calcite, une roche sédimentaire issue d'algues calcaires. Le carbonate de calcium est majoritaire (Tableau 3), mais Megagreen contient aussi de la silice et un ensemble de composés comprenant magnésium et oligo-éléments.

Tableau 3 : Composition minérale du Megagreen

Composés	Quantité en g/Kg Megagreen
Carbonates totaux	823
CaO	417
SiO ₂	85,6
MgO	30,2
Fer	8,78

IV. 3.1. Particularité

L'activation tribomécanique permet de réduire la taille des particules du micromètre au nanomètre. Les particules acquièrent ainsi une grande surface d'échange qui rend le produit extrêmement réactif en milieu biologique (Fig. 21).

La solubilité carbonique de Megagreen est de 65 et son pouvoir neutralisant est de 47.

IV. 3.2. Traitements appliqués avec une calcite micronisée (Megagreen®)

Les doses du traitement Megagreen ont été effectuées par application foliaire. Les doses retenues sont :

- D0 : témoin non traité correspondant à la dose 0,00 % de produit (poids par volume w/v équivalent à un apport de 0 kg/ha sur la base de 150 L d'eau pour une densité moyenne de 4400 ceps/ha)
- D1 : traitement à la dose de 0,33 % m/v correspondant à 0,50 kg/ha
- D2 : traitement à la dose de 0,66 % m/v correspondant à 1,00 kg/ha

- D3 : traitement à la dose de 1,00 % m/v correspondant à 1,50 kg/ha
- D4 : traitement à la dose de 1,33 % m/v correspondant à 2,00 kg/ha

Le produit Megagreen a été appliqué en deux fois (début de l'essai jour 1 et après deux semaines 15^{ème} jour).

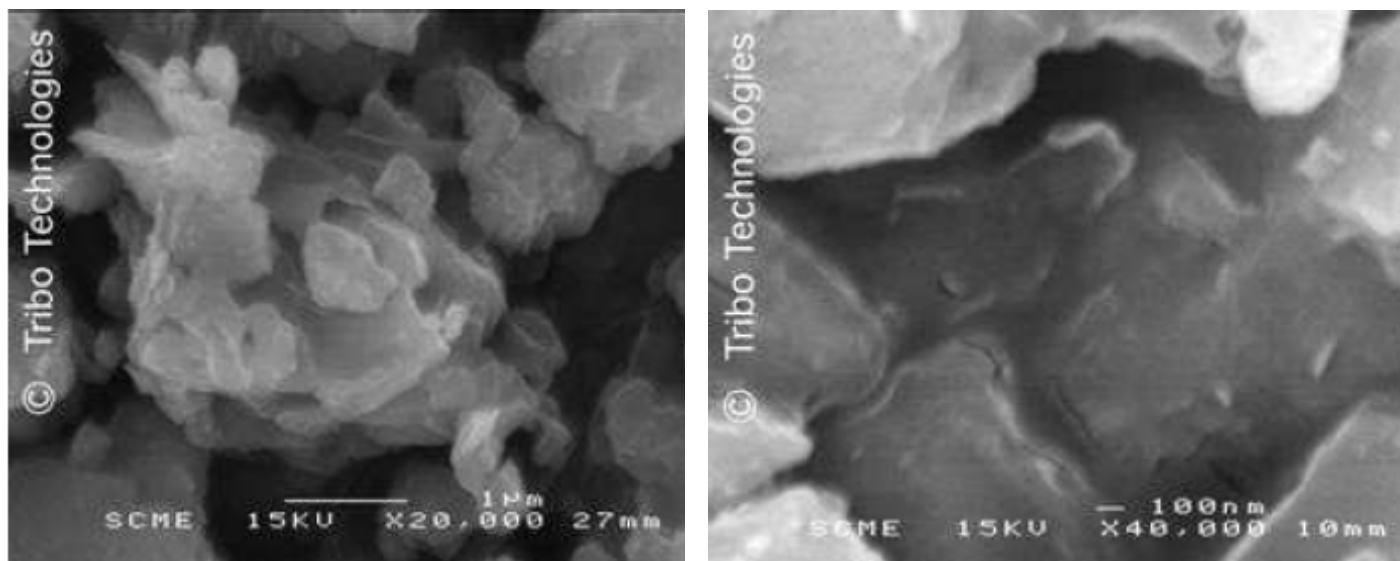


Figure 21: Structure de particules de Megagreen en microscopie électronique à transmission (*Faculté des Sciences Montpellier/CIRAD*)

IV. 4. Les caractères physiologiques

Les paramètres des relations hydriques, de la photosynthèse et de la fluorescence chlorophyllienne ont été mesurés pareillement à l'essai cépages (cf. paragraphe III.5).

V. Mise en évidence de la signalisation cellulaire de Megagreen sur les plantes et l'induction des processus de fermeture des stomates

V. 1. Conditions de culture du matériel végétal

Les suspensions des cellules de *Arabidopsis thaliana* L. (écotype Columbia) et de *Nicotiana plumbaginifolia* sont cultivés à $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sous lumière blanche continue ($40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et sous agitation rotative, dans un flacon rond de 1 litre et contenant 350 mL de milieu Gamborg (pH 5,8) (El Maarouf *et al.*, 2001; Reboutier *et al.*, 2002; Brault *et al.*, 2004). Les cellules sont repiquées chaque semaine sous la hôte à flux laminaire (dilution de 1/10 pour tous les tests). Les cellules sont utilisées après quatre jours de croissance.

V. 2. Electrophysiologie : mesures du potentiel de membrane et des courants ioniques

Le but est de mesurer les variations de la différence de potentiel transmembranaire (V_m) et des courants résultants de la régulation de canaux ioniques en réponse à un effecteur. Pour cela, il faut insérer une micro-électrode dans la cellule, et fermer le circuit électrique de mesure grâce à une électrode de référence dans le milieu externe.

V. 2.1. Les électrodes

Les mesures de potentiels et de courants transmembranaires sont effectuées à l'aide de microélectrodes en verre. Elles sont étirées à partir de tubes en borosilicate (Clark GC150F), à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige PA81) ; le diamètre de la pointe obtenue est inférieur à 1 μm . Ces micropipettes remplies avec KCl 600 mM sont connectées à la chaîne de mesure par un fil d'argent chloruré et l'ensemble constitue une interface Ag-AgCl. Le fil d'argent est intégré dans un porte-électrode (Clark Electromedical Inst., EH-3FS/1,5) maintenant la micropipette et permettant son remplacement rapide. La résistance des électrodes varie de 50 M Ω à 80 M Ω dans le milieu de Gamborg liquide.

L'électrode de référence (pellet E205, Phymep) est placée dans le milieu externe. Elle est reliée à la terre, prise comme potentiel de référence.

V. 2.2. Le système expérimental

Le déplacement de la microélectrode est effectué au moyen d'un micromanipulateur hydraulique à 3 axes, fixé au microscope et placé sur une table antivibration. Les manipulations sont effectuées à l'aide d'un microscope droit (grossissement X200) (Leitz, Dialux) équipé d'objectifs à longue distance frontale et d'une caméra (Sony, AVC-D5CE) reliée à un écran (Sony, PVM-122 CE).

La microélectrode est connectée à un électromètre (Axoclamp 2B). Un générateur d'impulsions (Wavetek) délivrant un signal carré (100 Hz) permet de caractériser la capacité et la résistance de l'électrode, la réponse à ce signal étant visualisée sur un oscilloscope (Tektronix TDS 210). La composante capacitive est réduite par un réglage interne de l'électromètre permettant d'introduire une « capacité négative » neutralisant partiellement celle de l'électrode. La résistance de l'électrode est compensée par un circuit équivalent à un pont de Wheastone avant son introduction dans la cellule. Dans ces conditions, il faut considérer que la résistance de l'électrode reste constante durant les expériences, c'est pourquoi la résistance est mesurée avant et après chaque empalement de cellule, afin de vérifier que sa valeur n'a pas varié pendant les mesures. Le potentiel de membrane est enregistré à l'aide d'un enregistreur graphique (Kipp et Zonen BD40).

Le système « microélectrode et cellule » constitue un circuit à haute impédance entre l'entrée de l'électromètre et la terre. Ce circuit, fonctionnant comme une antenne, est sensible aux interférences électriques extérieures. C'est pourquoi l'ensemble du système expérimental est entouré par une cage de Faraday reliée à la terre.

V. 2.3. Mise en place du matériel

Afin d'éviter d'induire un stress qui pourrait perturber la régulation des flux ioniques des cellules, les mesures de voltage imposé sont pratiquées sur des cellules maintenues dans leur milieu de culture. La suspension (500 μL) est prélevée après décantation partielle. Les 500 μl sont ensuite déposés dans une cuve en plexiglas. Les effecteurs sont rajoutés directement dans le

milieu au cours de l'expérience. Pendant l'empalement par la micro-électrode de mesure, les cellules en suspension doivent être maintenues à l'aide d'un micro-suçoir de verre dont les mouvements sont contrôlés par un micromanipulateur hydraulique à trois axes (Narishige MO102). Leur maintien dans le réceptacle du micro-suçoir est assuré par une aspiration constante à l'aide d'une seringue.

V. 2.4. Mesure des courants par la technique de voltage imposé à une électrode

Au potentiel de repos (V_m), la somme des courants membranaires est nulle. L'imposition du voltage permet de contrôler le potentiel de membrane. Les flux ioniques au travers de la membrane cellulaire sont alors enregistrés comme des courants électriques.

La technique de voltage imposé à une électrode (Finkel et Redman, 1984) consiste à imposer à la cellule une tension (V_{cmd}) différente de celle du potentiel de repos (V_m) et à enregistrer le courant qui en résulte. Cette méthode présente l'avantage de n'utiliser qu'une seule électrode ce qui est moins traumatisant pour la cellule et ce qui évite les problèmes de couplage électrique entre les deux électrodes. Ici, la même électrode assure les deux fonctions : imposition de V_{cmd} et mesure des courants I . Ces mesures se font en temps partagé : le signal de voltage imposé (V_{cmd}) est périodique et les mesures de I et de V_m ont lieu pendant le temps de relaxation, temps au cours duquel aucun voltage n'est imposé (retour à V_m). Le courant injecté (I_o) correspond au courant débité par la cellule en réponse au potentiel imposé (V_{cmd}) et reflète donc l'activité des canaux ioniques membranaires impliqués dans cette réponse. Le cycle de mesure doit être assez rapide (inférieure à 500 μs , fréquence de 2 à 3 KHz), de telle sorte que la membrane (constante de temps membranaire supérieure à 1 ms) reste polarisée de façon permanente à la valeur imposée.

L'amplificateur (AXOCLAMP 2B) est piloté par un ordinateur équipé du logiciel (Pclamp 8, Axon Inst.) qui permet de créer et d'utiliser des protocoles d'imposition de potentiels pour ouvrir ou fermer des canaux ioniques. Les données expérimentales mémorisées sont ensuite traitées à l'aide d'un logiciel (Clampfit 8, Axon Inst.) qui donne les relations courant-voltage (relations $I-V$). On s'assure de la validité des mesures en comparant les valeurs des potentiels du protocole à celles réellement imposées. En cas d'écart, les mesures sont systématiquement rejetées.

V. 3. Mesure des variations du pH extracellulaire

Le pH du milieu extracellulaire est mesuré directement dans la suspension cellulaire (Brault *et al.*, 2004). Les cellules sont cultivées à $24 \pm 2^\circ C$ sous lumière blanche continue (40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ PAR) et sous agitation rotative dans un flacon rond de 1 L contenant 350 mL de milieu Gamborg (pH 5,8). Le pH est suivi en permanence en utilisant un ionomètre ELIT 808 avec des électrodes pH combinées. Les effecteurs ont été ajoutés après stabilisation du pH puis les valeurs de pH sont enregistrées pendant 45 min.

V. 4. Mesure de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

L'oxygène moléculaire est à l'origine d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Ces molécules peuvent avoir un effet à la fois bénéfique ou délétère (conduisant à la mort cellulaire). Les plantes ont développé des mécanismes antioxydants permettant de neutraliser certaines ROS et donc de contrôler leur accumulation.

Le peroxyde d'hydrogène libéré dans le milieu de culture cellulaire est calculé en mesurant la chemiluminescence du réactif luminol qui réagit avec lui (Pique *et al.*, 1997). Dans un eppendorf de 2 mL, un échantillon de 1,5 mL de la suspension cellulaire est préalablement lavé puis traité avec Megagreen pendant 2 heures. 200 μ L de la suspension traitée sont mélangés à 600 μ L phosphate tampon (50 mM, pH 7,9) avant l'ajout de 100 μ L du luminol à 1,1 mM (et 100 μ L $K_3[Fe(CN)_6]$ 14 mM). La chemiluminescence est enregistrée à intervalle de 5 min avec un luminometer FB12-Berthold, avec un signal qui intègre du temps tout le 0.2 s.

V. 5. Mesure du calcium cytoplasmique

La concentration du calcium cytoplasmique des cellules a été mesurée par un luminomètre FB12-BERTHOLD. Des cellules de tabac *Nicotiana plumbaginifolia* exprimant l'apoequorine (Lecourieux *et al.*, 2002) préalablement prétraitées avec la coelenterazine ont été traitées avec différentes concentrations de Megagreen (25, 50, 100, 150 et 200 μ g/mL) à 22°C. Une prise d'essai de 250 μ L est placée dans un tube à luminomètre, et les lectures sont enregistrées par intervalle de 0,2 s (unité arbitraire relative) à l'aide du logiciel Win Term (Software ; Berthold).

VI. Analyses de données et analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme d'une moyenne de 3 à 30 répétitions \pm l'erreur standard ou l'écartype de cette moyenne. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'analyse de la variance des moyennes avec les tests ANOVA one-way et ANOVA two-ways, pour évaluer la signification de l'effet au seuil $P < 0,05$ par rapport à la plus petite différence significative avec les tests Fisher's LSD et Student Newman Keuls.

Nous avons utilisé les logiciels Sigmastat® 2.03 Statistical Software et KaleidaGraph® pour l'évaluation des corrélations entre les paramètres étudiés et des tendances de leurs évolutions.

CHAPITRE III :

Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique de la vigne *Vitis vinifera* L. cvs Cot, Négrette et Fer Servadou

Présentation

La qualité du raisin dépend des facteurs climatiques, mais aucun climat ne remplit les conditions pour convenir parfaitement à l'écophysologie de la vigne. Le type de climat le plus propice à l'élaboration des plus grands vins du monde correspond à un climat tempéré où la pluviométrie est uniforme ou concentrée en été. Ce phénomène est dû aux contraintes imposées par les gelées et au manque de chaleur qui ont repoussé la viticulture vers des climats stables présentant des températures optimales pour la qualité des vins. Les zones méditerranéennes ne connaissant pas de telles modérations, le stress hydrique y est souvent présent.

Les vignobles se sont développés principalement dans les zones à climat océanique tempéré, mais aussi à climat méditerranéen, parfois même à climat continental (en fonction de conditions micro - climatiques particulières : Bourgogne, Côtes de Nuits ou Côtes de Beaune, Champagne, Tokay, ...). On assiste actuellement à un réchauffement de la planète, c'est une des composantes du changement global. Ce réchauffement est dû en partie à l'effet de serre (émission de CO₂ et d'autres gaz, trous dans la couche d'ozone), modifie le climat et provoque souvent des stress hydriques importants sur certains vignobles. L'évolution de la température (fréquemment associée à des modifications des précipitations) à l'échelle de la planète mais aussi à l'échelle d'une région viticole a donc une influence profonde sur la viticulture.

En France, l'année 2003, a été le symbole d'un changement climatique important en raison d'une sécheresse estivale prolongée (associée à la canicule), mais déjà depuis le début des années 1980 on a assisté à une augmentation régulière de la température et à un changement du régime des précipitations avec une tendance à la baisse. De septembre 2004 à septembre 2005, une grande partie du territoire français a connu une pluviométrie inférieure d'un tiers à la moyenne des 50 dernières années, et une sécheresse d'une intensité comparable à celles de 1976 et de 1989. Sur les 8 dernières années, une vingtaine de départements connaissent des limitations de consommation d'eau en année « normale » ; ce chiffre est doublé les années relativement sèches (1998, 2004), et plus de 60 départements ont été concernés les années les plus sèches (2003, 2005). Même en année humide (2001), environ 6 départements ont connu des restrictions d'usage d'eau.

Certaines simulations climatiques proposées par Météo France jusqu'en 2100 montrent que la température moyenne va augmenter de manière importante, et que, parallèlement, le nombre de jours consécutifs sans précipitations, paramètre important à prendre en compte pour la culture de la vigne, va lui aussi aller en augmentant.

En cas de stress hydrique prolongé, les plantes sont capables de modifier de nombreux aspects de leur physiologie cellulaire ainsi que de développement (diminution de la surface foliaire et de la biomasse aérienne, augmentation de la croissance racinaire) de manière à mieux s'adapter aux conditions défavorables (Lawlor et Cornic, 2002). En situation de forte contrainte hydrique, l'assimilation photosynthétique sous éclaircissement intense des plantes C3 et C4 peut être limitée par leur contenu relatif en eau et la diminution de leur potentiel hydrique (Chaves, 1991 ; Lawlor, 2001). La limitation de l'assimilation du carbone est associée d'une part à la limitation de la

diffusion du CO₂ intercellulaire, qui est contrôlée par l'ouverture des stomates (effet dit stomatique), et d'autre part une limitation biochimique (effet non stomatique). En outre, le stress hydrique limite l'activité enzymatique nitrate réductase (NR ; Kaiser, 1987 ; Kaiser et Foster, 1989) ainsi que l'activité sucrose phosphate syntase (SPS, Vasséy *et al.*, 1991), ce qui infini peut limiter l'assimilation du carbone. Une augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique pourrait permettre d'augmenter les concentrations en CO₂ intercellulaire (C_i) et celle au niveau des chloroplastes (C_c), d'où une restauration de l'activité photosynthétique et une meilleure utilisation photosynthétique de l'eau.

C'est dans le but de mieux comprendre le fonctionnement physiologique de la vigne en condition de stress hydrique pendant la période allant de la véraison à la maturité, et plus particulièrement sur l'assimilation du carbone, que s'inscrit ce chapitre.

Pour ce faire, cette étude a été menée sur trois cépages autochtones du Sud-Ouest de la France, le Cot, la Négrette, et le Fer Servadou greffés sur 3309C cultivés en pots en conditions contrôlées. Les mesures des potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{base} exprimé en - MPa) avant le levée du soleil et à midi (Ψ_{midi} exprimé en - MPa) ont été réalisées avec une chambre à pression tous les deux jours. L'alimentation en eau a été déterminée afin de maintenir le potentiel de base du témoin à -0,3 MPa et des vignes stressées entre -0,5 et -0,6 MPa. Les mesures de l'assimilation photosynthétique nette (P_N en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), de la conductance stomatique (g_s en $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) et de la transpiration (E en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ont été réalisées sur des jeunes feuilles matures grâce à un appareil portable LICOR 6400 (LI-6400, LiCor, Lincoln, USA) pour des rayonnements saturants ($1500 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ PAR}$) et à deux concentrations en CO₂ (400 et 800 $\mu\text{L L}^{-1}$). De même, les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne ont été déterminés grâce à une chambre à fluorescence intégrée (LI-6400-40 LCF) : la capacité d'utilisation de l'énergie lumineuse pour le transport non cyclique des électrons, le rendement photosynthétique des PSII (Φ_{PSII}), l'efficacité photochimique potentielle des PSII pour le transfert des électrons (F_v/F_m), le taux de transfert des électrons (ETR), la part d'énergie lumineuse dissipée thermiquement au niveau des PSII : quenching photochimique (q_P) et enfin l'état stationnaire de la fluorescence (F_s).

L'étude de la relation entre l'efficacité quantique de l'assimilation du CO₂ et l'efficacité quantique du photosystème PSII a été réalisée en mesurant les paramètres de la photosynthèse et de la fluorescence chlorophyllienne en modifiant l'intensité du PPFD 1500, 1200, 800, 400, 200, 100 et 50 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ à deux concentrations de CO₂ (400 et 800 $\mu\text{L L}^{-1}$). L'efficacité quantique de CO₂ a été calculée par le rapport de l'assimilation photosynthétique nette divisée par la densité de flux de photons actifs et par le coefficient d'absorption (Cheng *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus montrent :

- ***une limitation de l'activité photosynthétique des cépages en situation de stress hydrique***

Le stress hydrique présente un effet significatif sur les paramètres de l'assimilation photosynthétique et de la fluorescence chlorophyllienne. Le comportement de la vigne vis-à-vis de la contrainte est différent en fonction des cépages. Au stade de la véraison, après installation progressive de la contrainte hydrique, le cépage Fer Servadou accuse une diminution importante de l'assimilation photosynthétique P_N (28,0 % par rapport au témoin non stressé) suivi par la Négrette et le Cot qui montrent une diminution respective de la photosynthèse de 19,4 et 13,5 %. En situation de stress hydrique prolongé (stade maturité), la réduction de P_N est de l'ordre de 50

% pour les trois cépages. L'assimilation photosynthétique nette (P_N) du cépage Cot présente des valeurs relatives de 86 %, 70 % et 52,8 % par rapport au témoin non stressé aux stades véraison, mi-maturité et à maturité. Ce phénomène pourrait être lié à la concentration foliaire en chlorophylles ; car, ce cépage présente des concentrations foliaires en chlorophylle a (0,55 et 0,53 mg.g⁻¹ de matière fraîche respectivement aux stades véraison et maturité) et en chlorophylle b (2,02 et 1,83 mg.g⁻¹ de matière fraîche aux stades véraison et maturité). Le Fer Servadou a montré des valeurs les plus faibles de P_N et C_i , bien qu'il présente les concentrations les plus élevées en chlorophylles. Des résultats similaires ont été signalés par [Moutinho-Pereira et al. \(2007\)](#) pour les cépages Tinto Cão et Toriga Nacional.

Sous concentration élevée en CO₂ (800 µL.L⁻¹), après une contrainte hydrique prolongée, le Fer Servadou présente une plus grande capacité à restaurer son assimilation photosynthétique, en comparaison avec les cépages Cot et Négrette. En effet, par rapport au témoin non stressé, le Fer Servadou présente une valeur relative de P_N de l'ordre de 169% alors que le Cot et la Négrette ont atteint des valeurs respectives de 53,5 % et 64,8 %. Ce fait nous permet de supposer que le cépage Fer Servadou a une capacité plus importante à protéger son système photosynthétique dans un état fonctionnel et ce, sous le contrôle de la conductance stomatique. Les paramètres P_N et g_s sont étroitement liés et leur relation dépend du cépage. En effet, le point d'inflexion pour le Fer Servadou se situe entre 60 et 80 mmoles m⁻² s⁻¹, pour le Cot entre 30 et 40 mmoles m⁻² s⁻¹ et pour la Négrette entre 10 et 20 mmoles m⁻² s⁻¹. En effet, les cépages Cot et Négrette montrent une variation moins importante du paramètre g_s en fonction de la demande évaporative (VPD) en comparaison avec le cépage Fer Servadou. Cette sensibilité des stomates au stress pourrait permettre de limiter la transpiration mais aussi de compenser la différence des cépages et la vulnérabilité du xylem au phénomène de cavitation ([Schultz et Matthews, 1993](#)).

- ***Les relations hydriques permettent d'expliquer les différences variétales de l'activité photosynthétique***

[Schultz \(2003\)](#) a signalé une décroissance exponentielle de la conductance en fonction du potentiel hydrique foliaire. Dans nos conditions expérimentales, nous observons le même phénomène où les différences entre les cépages sont assez marquées. Le cépage Fer Servadou montre une relation étroite et significative ($g_s = 0.16202 \exp(0.89157 \Psi_{\text{leaf}})$; $R^2 = 0.803$). Cette relation est plus marquée que pour la Négrette ($g_s = 0.07576 \exp(0.25145 \Psi_{\text{leaf}})$; $R^2 = 0.758$) et le Cot ($g_s = 0.02211 \exp(0.38086 \Psi_{\text{leaf}})$; $R^2 = 0.577$). Ces résultats soulignent encore un peu plus et renforcent les différences entre les cépages signalées précédemment. Plusieurs études ont suggéré que la régulation de la conductance stomatique permet d'assurer un flux de transpiration synchronisé avec la conductivité hydraulique ([Tyree et Sperry, 1988](#) ; [Schultz et Matthews 1993](#)). Les cépages qui ont fait l'objet de notre étude montrent des différences assez nettes. En effet, l'évolution journalière de la conductivité hydraulique conforte les différences déjà observées concernant la conductance stomatique, et nous permet de suggérer un rôle prépondérant de ce paramètre dans le contrôle des mouvements stomatiques. [Ripullone et al., \(2007\)](#) aient déjà montré qu'une relation étroite existait entre ces deux paramètres chez des plants de pin maritime (*Pinus pinaster*).

Une conductivité hydraulique assez élevée peut diminuer le potentiel hydrique foliaire en dessous du seuil de cavitation et par conséquent provoquer un phénomène d'embolisme. Ceci pourrait agir en tant que signal de régulation de la fermeture des stomates ([Nardini et al., 2001](#)) et par

conséquent, permettrait de prévenir la cavitation (Tyree et Zimmermann, 2002 ; Chatelet *et al.*, 2006).

- ***Relation entre l'efficacité quantique d'assimilation du carbone et l'efficacité quantique des PSII***

La réponse de l'assimilation photosynthétique nette des trois cépages Cot, Négrette et Fer Servadou en condition de stress hydrique, à la densité de flux de photons actifs (PPFD) a été couplée aux mesures de la fluorescence chlorophyllienne pour deux concentrations en CO₂, 400 µL L⁻¹ considérée comme normale et 800 considérée comme élevée. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la photosynthèse en réponse à l'augmentation de PPFD, jusqu'au point de saturation au dessus duquel on observe une faible augmentation de la photosynthèse en réponse à l'augmentation du rayonnement quelque soit la concentration en CO₂. Sous un stress hydrique, l'assimilation photosynthétique est plus élevée pour la concentration la plus forte en CO₂ que pour la concentration normale (400 µL L⁻¹). La courbe de réponse à la lumière suit une augmentation polynomiale de la forme $A_n = a \text{ PPFD}^b$ avec des coefficients de corrélation très significatifs, soient $R^2 = 0,98, 0,98$ et $0,97$ respectivement pour le Fer Servadou, le Cot et la Négrette à 800 µL L⁻¹ de CO₂. Le cépage Fer Servadou montre la réponse la plus importante par rapport au Cot et à la Négrette.

L'efficacité photochimique réel des PSII pour le transfert des électrons (F_v'/F_m') et la part d'énergie lumineuse dissipée thermiquement au niveau des PSII (qP) diminuent en réponse à l'augmentation de la PPFD, d'où la diminution de la capacité d'utilisation de l'énergie lumineuse pour le transport non cyclique des électrons (Φ_{PSII}). Par conséquent, le taux de transfert des électrons (ETR) augmente en réponse à la lumière. Ces paramètres mis en relation avec l'efficacité quantique d'assimilation de carbone montrent une relation curvilinéaire.

Sous condition de contrainte hydrique et pour les trois cépages, le paramètre Φ_{PSII} montre une relation linéaire avec l'efficacité quantique d'assimilation de carbone jusqu'aux environs de 0.025 mol CO₂ mol⁻¹ quanta, puis devient ensuite curvilinéaire avec l'augmentation de l'efficacité quantique d'assimilation de carbone par l'augmentation de la PPFD. Un modèle de forme générale correspondant à la relation entre ces deux paramètres soit : $\Phi_{PSII} = A + B x + C x^2$ (x = efficacité quantique d'assimilation de CO₂) a été établi avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,99$. Cette tendance a été signalée par Öquist et Chow (1992) et Cheng *et al.* (2001). Plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette évolution comme l'hétérogénéité des PSII (Lavergne et Briantais, 1996, Yokthongwattana et Melis, 2006), le taux de transfert des électrons et l'affectation des flux des électrons vers d'autres processus que l'assimilation de carbone comme la photorespiration (Guan *et al.*, 2004).

Publication I:

Stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis under water deficit and elevated CO₂ in three grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.).

Publication II:

Ecophysiological responses of three grapevines varieties (*Vitis vinifera* L.) to water stress under ambient and elevated carbon dioxide levels.

N.B.: Le texte des publications est présenté selon les recommandations de chaque revue.

Stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis under water deficit and elevated CO₂ in three grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.).

Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Marc Garcia¹ and Thierry Lamaze⁴

¹ *Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées, Institut National Polytechnique de Toulouse ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole BP32607, 31326 Castanet Toulouse, FRANCE*

² *Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1 - 15 Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, FRANCE.*

³ *Laboratoires des Systèmes des Production Arboricoles, Institut de l'Olivier, Rue Ibn Khaldoun; BP14; 4061 Sousse TUNISIE.*

⁴ *Centre d'Etudes Spatiales de la Biosphère, Université Paul Sabatier, 18 Avenue Ed. Belin - bpi 2801 ; 31401 Toulouse, FRANCE.*

¹ To whom reprint requests should be addressed. E-mail address: faouzi.attia@ensat.fr

PHOTOSYNTHETICA,
Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic

To be submitted in December 2007.

Stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis under water deficit and elevated CO₂ in three grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.).

Abstract:

Three grapevine varieties (*Vitis Vinifera* L.) Fer Servadou, Cot and Négrette subjected to water stress deficit were studied for changes in predawn (Ψ_{PD}) and midday (Ψ_{MD}) water potentials, net photosynthetic rate (P_N), stomatal conductance (g_s), internal CO₂ concentration (C_i), intrinsic water use efficiency (P_N/g_s), steady-state fluorescence (Fs), photochemical quenching (qP), photochemical efficiency of Photosystem II of dark adapted leaves (F_v/F_m) and electron transport rate (ETR). In drought stressed plants P_N , g_s and C_i decreased significantly, showing the different sensitivity to drought of the cultivars. Elevated CO₂ concentration (800 μ L L⁻¹) fully restored distinctly P_N and C_i depending on the cultivar and related to different stomatal response to both air vapour pressure deficit (VPD) and water deficit. This effect is related to difference in stomatal and non stomatal limitation. Chlorophyll fluorescence parameters showed a high stability.

Additional key words: Fer Servadou, Cot, Négrette, net photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence, atmospheric vapour pressure deficit.

Introduction:

Drought is considered to be the predominant factor both for determining the geographic distribution of vegetation and for restricting crop yields in agriculture (Schulze 1986). Furthermore, water stress is a limiting factor for a wide range of plant physiological process and can have a profound effect on plant metabolism and development (Cornic 1994). Acclimation occurs when plant metabolism or development is altered in response to environmental conditions in a manner that allows near normal plant functions to be maintained under suboptimal conditions. Drought stress can decrease the sensitivity of photosynthesis to subsequent water deficits and similarly reduce the sensitivity of stomata to low atmospheric vapour pressure deficit (Matthews and Boyer 1984). Carbon uptake and water use efficiency is under stomatal control and stomata closure is one of the earliest responses to drought (Davies *et al.* 2002; Flexas *et al.* 2004; Cechin *et al.* 2006). The Combination of chlorophyll fluorescence and gas-exchange rate proved to be a useful approach to distinguish stomatal to non-stomatal limitation, as well as estimating the importance of various types of energy use such as thermal dissipation and photorespiration (Krall and Edwards 1992, Valentine *et al.* 1995, Baker and Rosenqvist 2004). The use of a high ambient CO₂ concentration to overcome small stomatal conductance and provide Rubisco with sufficient substrate to restore net photosynthetic rate to its potential level has been a key point in water relations studies (Lwlor and Cornic 2002). Thus under increased CO₂ concentration and water stress, net photosynthetic rate can be fully restored only when stomatal conductance controls internal CO₂, but, not restored when metabolic effects limit photosynthesis (Bazzaz 1990, Noormets *et al.* 2001). Grapevine cultivars' response to drought stress differ largely (Moutinho-Pereira *et al.* 2007) and depends on their different anatomical, physiological and biochemical characters (Flexas *et al.* 2002).

With increasing drought conditions in the south west of France, and, at the best of our knowledge, no information in the literature on the behaviour of Fer Servadou, Cot and Négrette under water stress, it was deemed necessary to conduct this experiment to study gas exchange, water relations and chlorophyll fluorescence of these autochthonous widely spread grape cultivars (utilized to produce high quality wines) under water stress, ambient air and elevated CO₂ concentrations.

Materials and methods

Plant material. A hydroponic culture experiment was carried out during two successive seasons on five-year old grapevines Fer Servadou, Cot and Négrette grafted onto 3309 Couderc (3309 C) rootstock. Vines were grown in 40 L pots filled with pozzolana (3-15 mm diameter volcanic rock fragments, 19% water holding capacity). All the vines were irrigated with a standard nutrient solution (Ibrahim 2001, Attia *et al.* 2004). The experiment was carried out in controlled conditions in a glasshouse in Toulouse (southern France, 43° latitude). The environmental conditions were approximatively 30/25°C (day/night) with a natural photoperiod (between 04:00 to 15:00 h), and 60-70 % relative humidity. Three phenological growth stages of the grapevine were studied, which are berries began to colour and enlarge the first, berries with intermediate Brix values the second and berries harvest ripe the third, corresponding respectively to 35, 36 and 38 stages of the modified E-L System according to Coombe (1995).

Drought treatment. Water stress was imposed at the start of veraison by decreasing the irrigation volume from 100% (control) to 30% of the control (drought stressed). Plant water status was monitored every two days from veraison to the end of the experiment (harvest) by measuring predawn and midday leaf water potentials with a pressure chamber according to Scholander *et al.* (1965). Predawn leaf water potential (ψ_{PD}) in the controls was maintained higher than -0.3 MPa, while in the stressed vines was maintained lower than -0.5 MPa (Matthews *et al.* 1987, Girona *et al.* 2006).

Plant water relations. Every two days, at predawn (03:00 to 04:00 h), ψ_{PD} was determined on three fully expanded leaves by using a pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA). At midday (12:00 to 13:00 h) on the same day, water potential was measured on the leaves used for photosynthesis and chlorophyll fluorescence measurements.

Chlorophyll Fluorescence. Leaf chlorophyll fluorescence measurements were performed on attached leaves using an open infra-red gas-exchange system with an integrated fluorescence chamber head model (LICOR 6400-40; Lincoln, Nebr. USA). For stressed and control plants, five leaves of different plants were used at the time of measurement, leaf temperature was set at glasshouse air temperature and HR, and chamber air CO₂ was set at 400 $\mu\text{L L}^{-1}$. The analyses of fluorescence were performed using the light-doubling technique; the quantum efficiency of PSII photochemistry was estimated as follows: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ where F_m' is the pulse-saturated fluorescence yield in the light (when all the PSII traps are closed), and F_s is the steady-state fluorescence yield in the light. Photochemical quenching (qP) of Chl a fluorescence was estimated as follows: $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$ where F_0' is the lowest fluorescence yield with open PSII centres (after dark imposition).

Net photosynthesis. Single leaf gas exchange measurements were coupled with measurements of leaf chlorophyll fluorescence. Maximal net photosynthetic rate (P_N) was

measured on a block-by block basis from 09:00 to 12:00 h using a portable Li-6400 photosynthetic analyzer (LICOR, Lincoln, Nebr. USA) which was equipped with a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF) placed at the top of the leaf chamber. The sample leaf was placed in the cuvette that was maintained at ambient temperature and humidity, and exposed to saturating photosynthetic photon flux density PPF (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ambient CO_2 concentration of 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ and elevated CO_2 concentration of 800 $\mu\text{L L}^{-1}$. A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and stomatal conductance to water vapour, g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured once stomatal conductance and CO_2 assimilation stabilized.

Pigment determination: Chlorophyll (Chl) *a* and *b* of fully expanded leaves were extracted in N-N'-dimethylformamide DMF and spectrophotometrically determined as described by Porra *et al.* (1989) and expressed in mg g^{-1} fresh weight (FW). The pigment extracts were prepared from fully expanded leaves used for gas exchange measurements.

Experimental design and data analysis. The experiment design was a completely randomized plan ($n = 12$). Treatments were 12 vines well-watered and 12 vines water stressed per cultivar. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and checked for significant probability ($p \leq 0.05$) level using Sigmatat® 2.03 Statistical Software. The difference between the means was determined using Fisher's Least Significant Difference at a probability ($p \leq 0.05$).

Results and Discussion

Trends of predawn and midday leaf water potential seasonal evolution under drought stress treatment of three red wine grape cultivars are illustrated in Fig. 1. For these cultivars, predawn water potential (Ψ_{PD}) decreased progressively from veraison (between -0.35 and -0.46 MPa) to harvest time (between -0.51 and -0.55). Indeed, at veraison stage, Fer Servadou showed a significant lower Ψ_{PD} respect to Négrette and Cot. However, at harvest time Ψ_{PD} of vines from the three cultivars were similar ($p < 0.05$). At veraison the Négrette presented the highest decrease of Ψ (203%), from predawn to midday, followed by the two other cultivars (Fer Servadou 156% and Cot 131%). However, at harvest time the highest decrease from predawn to midday was for Cot (247%), whereas Négrette and Fer Servadou daytime decrease was 206% and 200%, respectively. These measurements have long been used as an index of water stress as it reflects a combination of many factors, such as atmospheric vapour pressure deficit, leaf intercepted radiation and water availability, internal hydraulic conductivity and stomatal regulation (Patakas *et al.* 1997, Escolana *et al.* 2002). This different behaviour versus stressful availability of water may be a strategy for better restricting leaf water losses in grapevines growing under water stress and improving the water use efficiency (Tardieu and Simmoneau 1998, Guan *et al.* 2004). Fig. 2 shows seasonal evolution of P_N , g_s , C_i and P_N/g_s for Fer Servadou, Cot and Négrette. There was a significant decrease was observed for P_N and g_s compared to the controls (well-watered plants) and it was distinctly for the three grape cultivars. Fer Servadou showed the highest P_N decrease at veraison (28.0%) followed by Négrette and Cot (19.4% and 13.5% respectively). However, at harvest time P_N decreased of about 50% and there is no significant difference between cultivars at $p < 0.05$.

At ambient CO_2 Cot presented the highest P_N (86.0 %, 70.0% and 52.8% respectively at veraison, ripeness and harvest time than Fer Servadou and Négrette. Cot is not statistically different from Négrette at veraison and ripeness, and the three varieties have similar value at harvest. This can

be attributed to the capacity of adaptation of the Cot with chlorophyll (Chl) contents. Indeed, the Cot grape cultivar showed lowest Chl *a* contents (0.55 and 0.53 mg g⁻¹ FW respectively at veraison and harvest time) and Chl *b* contents (2.02 and 1.83 mg g⁻¹ FW respectively at veraison and harvest time) followed by Négrette and Fer Servadou. Although having the highest chlorophyll contents, Fer Servadou leaves exhibited the lowest P_N and C_i during drought stress treatment, similar behaviour has been reported for Portuguese grape cultivars such as Tinto Cão and Toriga Nacional (Moutinho-Pereira *et al.* 2007). These differences in stomatal sensitivity during drought among cultivars may serve to limit transpiration to compensate for differences in the vulnerability of xylem to cavitation (Schultz and Matthews 1993). Schultz (2003) suggested that differences in water potential and stomatal behaviour of different cultivars under drought could be linked to differences in hydraulic architecture.

The stomatal conductance g_s of the three grape cultivars showed similar decreasing trend as P_N for stressed vines compared to the controls. At harvest time, g_s reached 29.92%, 42.55 and 43.7 % respectively for Négrette Fer Servadou and Cot, which was their lowest level during the seasonal period. During drought stress treatment, Négrette showed the highest and increasing intrinsic water use efficiency P_N/g_s (117.8 %, 157.5 % and 158.2 %, respectively at veraison, ripeness and harvest time) and the Fer Servadou showed intermediate levels. From veraison to harvest time, P_N/g_s values increased by 34 %, 30 % and 27 % respectively for Négrette, Fer Servadou and Cot cultivars. According to de Souza *et al.* (2005) and Poni *et al.* (2007) P_N and g_s response to drought was not directly associated with osmotic adjustment and occurred independently of bulk leaf tissue turgor. While there are other factors than leaf water relations related with the chemical signals coming from roots and/or the photosynthetic apparatus functionality, they probably play a key role in carbon assimilation.

Figure 3 showed changes in Chl *a* fluorescence of fully expanded leaves of Fer Servadou, Cot and Négrette cultivars under drought stress treatment. At harvest time, water stress decreased significantly F_s values depending on the grape cultivar with also a significant decrease in the F_v/F_m . Cot and Négrette cultivars showed higher thermal dissipation of photons than Fer Servadou. The ETR varied significantly depending on the grape cultivar; its evolution shows a relative stability of leaves photochemistry of the photosynthesis apparatus under drought stress treatment. Fer Servadou showed the highest decrease for Chl *a* and Chl *b* respectively by 14 % and 16 % from veraison to harvest than Cot and Négrette. This pattern may be an important mechanism for avoiding high irradiance damage to the photosynthetic apparatus and suggests a better acclimation of the photosynthetic system to sun exposed habitats. Considering Négrette had higher Chl (*a+b*) contents (3.39 and 3.9 mg g⁻¹ FW respectively at veraison and harvest time) but lower Chl *a/b* than Fer Servadou and Cot leaves, these results suggest a high efficiency of photon capturing system by antenna light-harvesting complexes.

The instantaneous photosynthetic rate, intercellular CO₂ and intrinsic WUE are presented showing a relative increase under elevated CO₂ (Fig. 4.). At veraison, Cot showed the highest capacity (331 %) to restore P_N than Négrette and Fer Servadou (137 % and 216 % respectively). The later showed the lowest capacity to restore its net photosynthetic rate under because it marked the lowest g_s and C_i . However at harvest time, Fer Servadou presented the highest level of P_N (169 %) versus Cot and Négrette (53.5 % and 64.8 % respectively), which was accompanied with significantly higher g_s and C_i . Cot and Négrette at harvest time showed significantly higher P_N/g_s than Fer Servadou because their g_s were lower than Fer Servadou once. Under water stress treatment, for the three cultivars, increasing ambient CO₂ increased P_N/g_s . This behaviour suggests that Fer Servadou present a greater capacity to protect its photosynthetic apparatus

against water stress, with a higher stomatal limitation than Cot and Négrette. The relationship between g_s and P_N for Fer Servadou, Cot and Négrette assessing the inflexion point between stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under drought and elevated CO_2 ($800 \mu\text{L L}^{-1}$) is shown in Fig. 5. The data fitted a polynomial function with different value of correlation coefficient (0.89, 0.88 and 0.57 respectively for Fer Servadou, Négrette and Cot). Hence, at ambient CO_2 the slopes of the regressions of the tree cultivars showed similar trends (data not shown). The Fer Servadou showed a greater inflexion zone (at g_s between 60 and 80 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) than Cot (at g_s between 30 and 40 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and Négrette (at g_s between 10 and 20 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which means that, Fer Servadou showed a greater ability to restore its photosynthesis because its limitation is more stomatal than non-stomatal. The slopes of the regressions confirm that limitation of net photosynthetic rate is more non-stomatal for Cot and Négrette than Fer Servadou. Indeed, Cot and Négrette cultivars exhibited a lower variation of g_s to atmospheric vapour pressure deficit. But, Fer Servadou presented a greater variation of g_s with higher correlation coefficient ($r = 0.92$) for VPD. As explained by [Medrano *et al.* \(2002\)](#), using g_s as a reference parameter which explain the gradual response to water stress which first acts as a partial closure leading to a metabolic adjustment through limited generation of RuBP and there after as the drought stress progress closure of stomata leads to reduced photochemistry and than carboxylation efficiency. In our results, we have to take into account the specific behaviour of the grape cultivar for g_s under drought stress treatment.

Yet, no information about the effect of water stress on water relations, gas exchange, and chlorophyll fluorescence of these grape cultivars are available. In the south western of France, where these cultivars are widespread, and autochthonous are subjected to increasing drought cycle start from pre-flowering stage to harvest time.

In conclusion, our results indicate a significant effect of the drought stress treatment on gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters. There is a significant difference between Fer Servadou, Cot and Négrette behaviours under water stress and CO_2 concentration. The stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis depends significantly on the grape cultivar. The stomatal effect was more important in the drought response of the Fer Servadou, which reduced significantly its photosynthesis start from veraison, whereas the non-stomatal effects were substantial and more expressive for Cot and Négrette. Their ability to restore photosynthesis at elevated CO_2 was lower thus photosynthetic metabolism must be impaired. Interestingly, Chl *a* and *b* contents suggest a different efficiency of photon capturing among cultivars tested under drought stress. Future work should evaluate the photosynthetic enzymes, carbohydrate metabolism and hormone signalling such as ABA for assessing the impact of drought stress on each grapevine performance.

Acknowledgement The technical assistance of Dr. Mohamed BRAHAM is gratefully acknowledged and Dr. Nouredine BOURAS for reading the first version of the manuscript. We thank Prof Vitale NUZZO for helpful comments and valuable criticism of the manuscript.

References

- Attia, F., Ibrahim, H., Cadet, A., Garcia, M.: Evaluation of leave, must and wine cation contents and of must and wine acidity of five red wine grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) grafted onto 3309 Couderc and grown hydroponically. - *Acta Horticulturae* **652**: 255-263, 2004.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E.: Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. exp. Bot.* **55**: 1607-1621, 2004.
- Bazzaz, F. A.: The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. – *Annu. Rev. Ecol. Systematics* **21**: 167-196, 1990.
- Cechin, I., Rossi, S.C., Oliveira, V.C., Fumis, T.F.: Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. - *Photosynthetica* **44**: 143-146, 2006.
- Coombe, B.G.: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. - *Australian J. of Grape and Wine Res.* **1**: 100-110, 1995.
- Cornic, G.: Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In *Photoinhibition of Photosynthesis* (eds N. R. Baker & J. R. Bowyer), 297–313, 1994.
- Davies, W.J., Willkinson, S., Loveys, B.: Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. - *New Phytol.* **153**: 449-460, 2002.
- de Souza, C.R., Maroco, J.P., dos Santos, T.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C., Pereira, J.S. and Chaves, M. M.: Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars. - *Agri. Ecosystems Environ.* **106**: 261-274, 2005.
- Escalona, J.M., Flexas, J., Medrano, H.: Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. - *Australian J. Plant Physiol.* **26**: 421-433, 1999.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H.: Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. - *Funct. Plant Biol.* **29**: 461-471, 2002.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey T. D.: Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. - *Plant Biol.* **6**: 269-279, 2004.
- Girona, J., Mata, M., del Campo, J., Arbonés, A., Bartra, E., Marsal, J.: The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. - *Irrigation Science* **24**: 115-127, 2006.
- Guan X.Q., Zhao, S.J., Li, D.Q., Shu, H.R.: Photoprotective function of photorespiration in several grapevine cultivars under drought stress. - *Photosynthetica* **42**: 31-36, 2004.
- Ibrahim, H.: Genèse et évolution des acides organiques dans les feuilles, les baies, les moûts et les vins des cépages Cot et Négrette (*Vitis vinifera* L.). Institut National Polytechnique de Toulouse France. PhD Diss. pp 299, 2001.
- Krall, J.P., Edwards, G.E.: Relationship between photosystem II and activity and CO₂ fixation in leaves. - *Physiologia Plant.* **86**: 180-187, 1992.
- Lawlor, D.W., Cornic, G.: Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. - *Plant Cell Environ.* **25**: 275–294, 2002.
- Matthews, M.A., Boyer, J.S.: Acclimation of photosynthesis to low leaf water potentials. - *Plant physiol.* **74**: 161-166, 1984.
- Matthews, M.A., Anderson, M.M., Schultz, H.R.: Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet Franc. - *Vitis* **26**: 147-160, 1987.

- Medrano, H., Escolana, J.M., Bota, J., Gulias, J., Flexas, J.: Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. - *Ann. Bot.* **89**: 895-905, 2002.
- Moutinho-Pereira, J., Magalhães N., Gonçalves, B., Bacelar, E., Brito, M. Correia, C.: Gas exchange and water relations of three *Vitis vinifera* L. cultivars growing under Mediterranean climate. - *Photosynthetic* **45**: 202-207, 2007.
- Noormets, A., Sôber, A., Pell, E. J., Dickson, R. E., Podila, G. K., Sôber, J., Isebrands, J. G., Karnosky, D. F.: Stomatal and non-stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones exposed to elevated CO₂ and/or O₃. - *Plant Cell Environ.* **24**: 327–336, 2001.
- Patakas, A., Noitsakis, B. Stavrakas, D. Adaptation to seasonal drought in *Vitis vinifera* L. as affected by leaf age. - *Vitis* **36**: 11-14, 1997.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Civardi, S. Response of “Sangiovese” grapevines to partial root-zone drying: Gas-exchange, growth and grape composition. - *Scientia Horticulturae* 2007. in press.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann P.E.: Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. - *Biochimica Biophysica Acta* **975**: 384-394, 1989.
- Scholander, P.F., Hemmingsen, E., Gary, W.: Sap pressure in vascular plants. - *Science*. **148**: 339-346, 1965.
- Schultz, H.R., Matthews M.A. (1993) Xylem development and hydraulic conductance in sun and shade shoots of grapevine (*Vitis vinifera* L.): evidence that low light uncouples water transport capacity from leaf area. - *Planta* **190**: 393–406, 1993.
- Schulze, E.D.: Carbon dioxide and water vapor exchange in response to dry air and dry soil. – *Annu. Rev. Plant physiol.* **37**: 247-274, 1986.
- Shultz, H.R.: Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant Cell Environ.* **26**:1393-1405, 2003.
- Tradieu, F., and Simoneau, T.: variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *J. exp. Bot.* **49**: 419-432, 1998.
- Valentini, R., Epron, D., De Angelis, P., Matteucci, G., Dreyer, E.: In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. - *Plant Cell Environ.* **18**: 631–640, 1995.

Figures

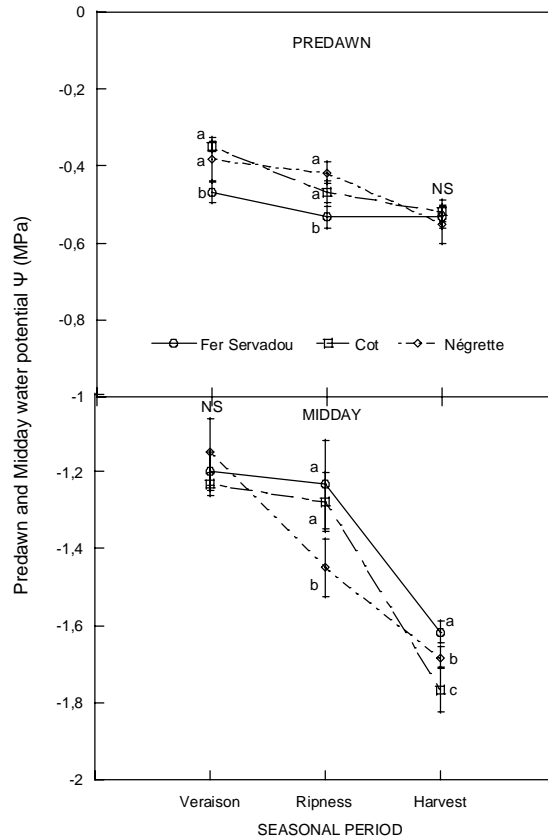


Fig. 1. Seasonal pattern of predawn (Ψ_{PD}) and midday (Ψ_{MD}) water potential of fully expanded leaves of Fer Servadou, Cot and Négrette grape cultivars during drought stress treatment. Each point represents a mean \pm SD (n= 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically and NS indicate Nonsignificantly different means at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

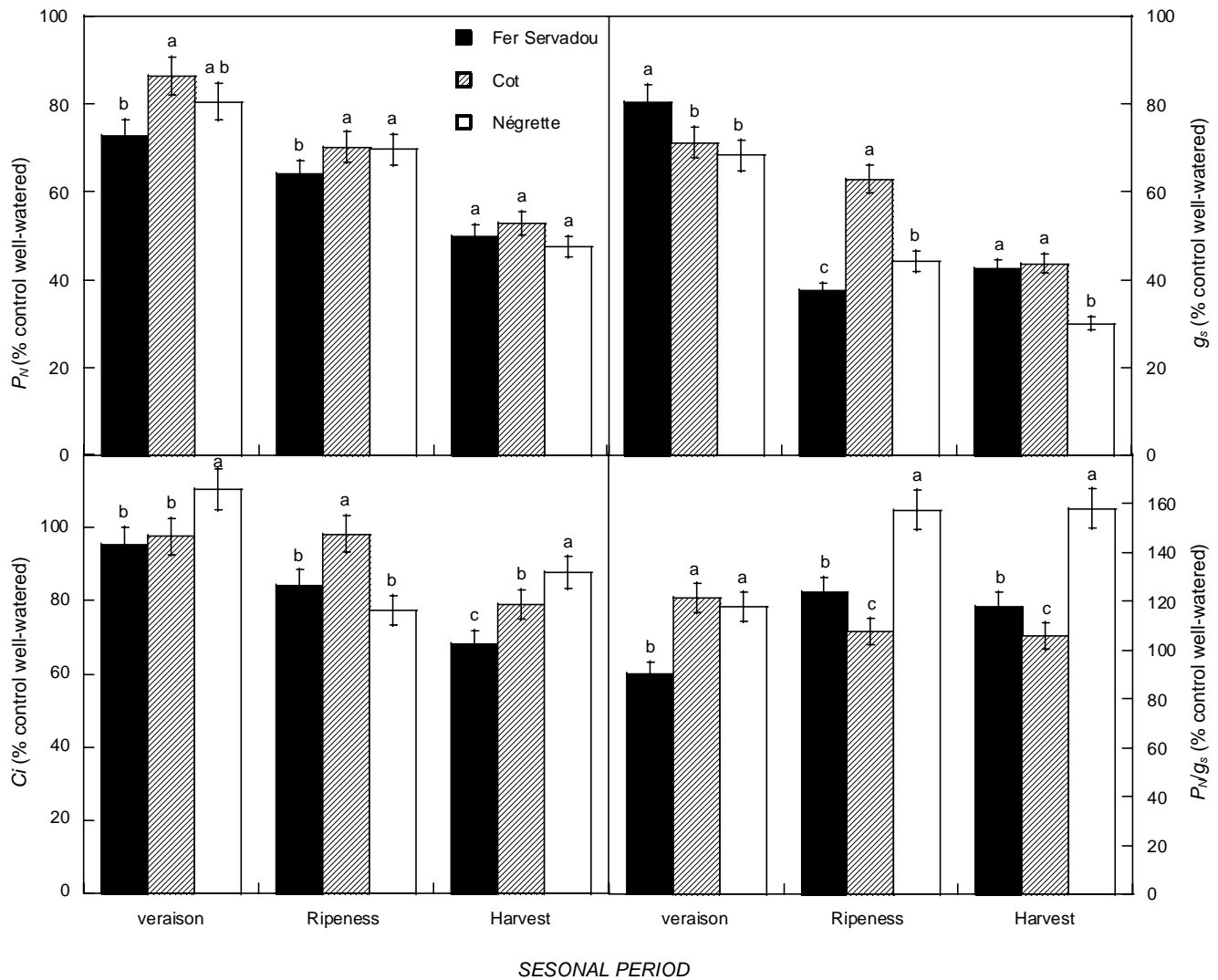


Fig. 2. Seasonal changes of maximal net CO₂ assimilation rate (P_N), stomatal conductance (g_s), internal CO₂ concentration (C_i) and intrinsic water use efficiency (P_N/g_s) at ambient CO₂ concentration (400 $\mu\text{L L}^{-1}$) of fully expanded leaves of Fer Servadou, Cot and Négrette cultivars under drought stress treatment. Columns are means and vertical bars represent S.D. measurements of 12 different leaves. At each graph, columns followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$) according to Fisher's LSD test.

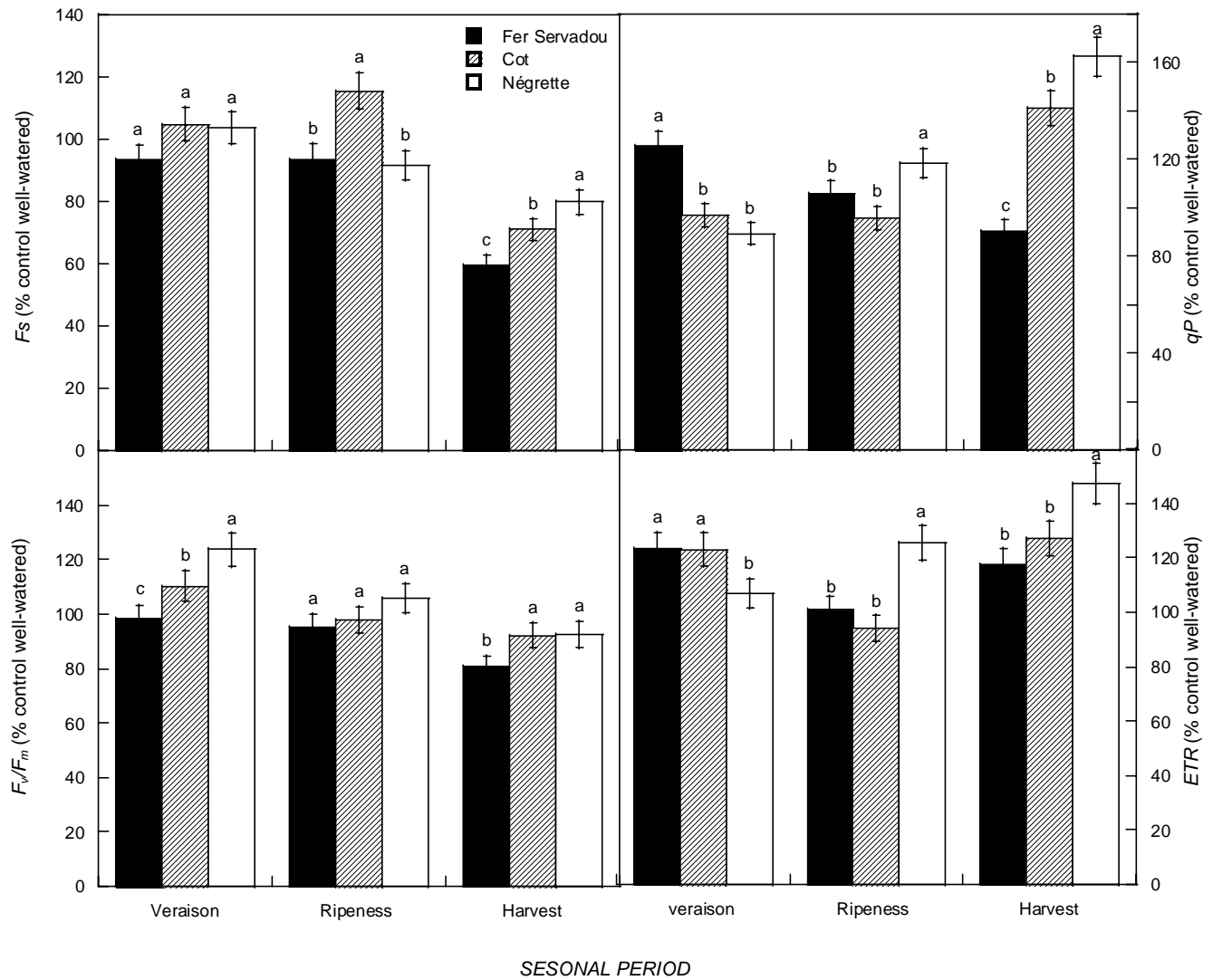


Fig. 3. Seasonal changes of Steady-state fluorescence (F_s), photochemical quenching (qP), photochemical efficiency of Photosystem 2 of dark adapted leaves (F_v/F_m) and electron transport rate (ETR) of fully expanded leaves of Fer Servadou, Cot and Négrette cultivars under drought stress treatment. *Columns* are means and *vertical bars* represent S.D. measurements of 12 different leaves. At each graph, columns followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$) according to Fisher's LSD test.

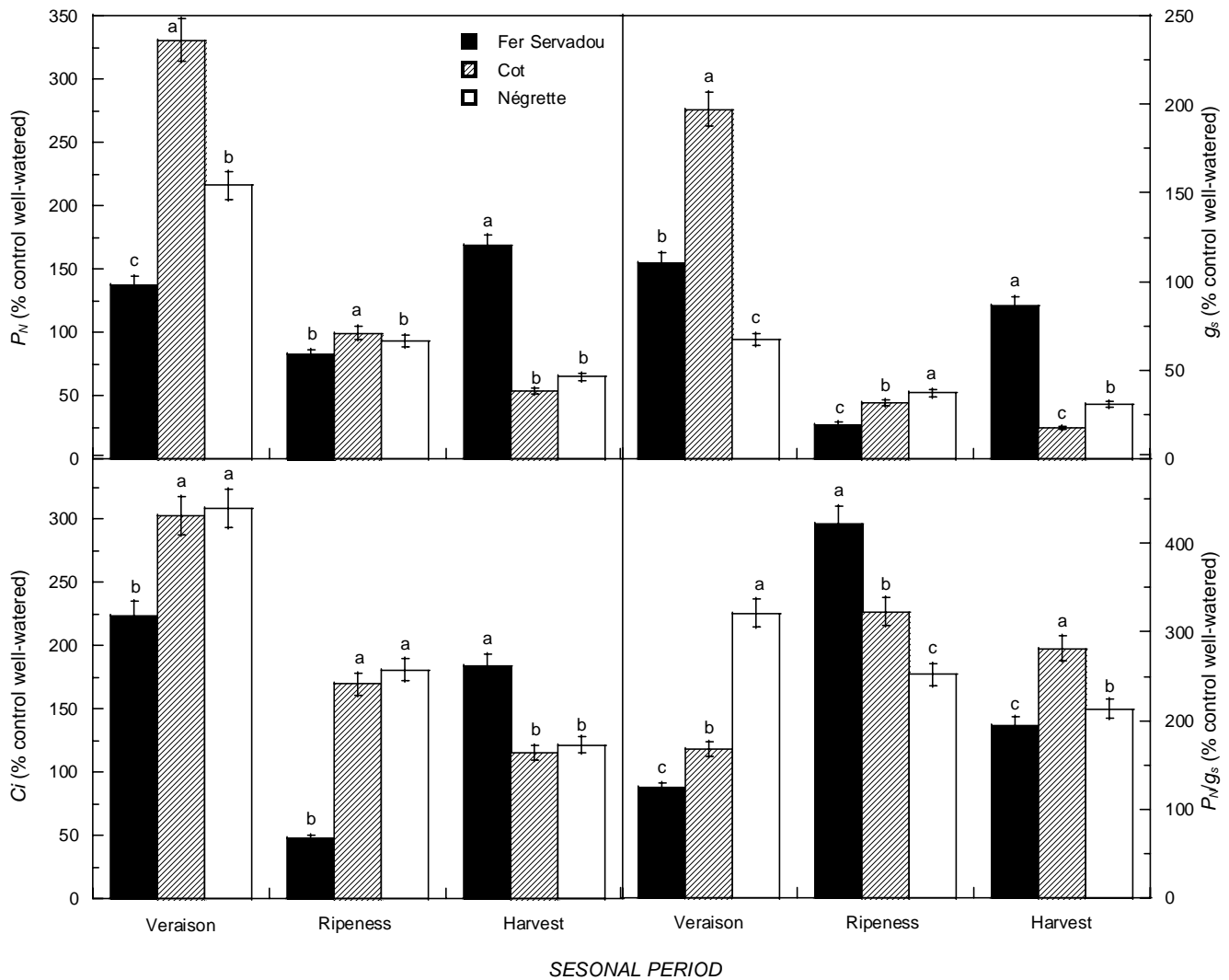


Fig. 4. Seasonal changes of Maximal net CO₂ assimilation rate (P_N), stomatal conductance (g_s), internal CO₂ concentration (C_i) and intrinsic water use efficiency (P_N/g_s) for elevated CO₂ concentration (800 $\mu\text{L L}^{-1}$) of fully expanded leaves of Fer Servadou, Cot and Négrette cultivars under drought stress treatment. *Columns* are means and *vertical bars* represent S.D. measurements of 12 different leaves. At each graph, columns followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$) according to Fisher's LSD test.

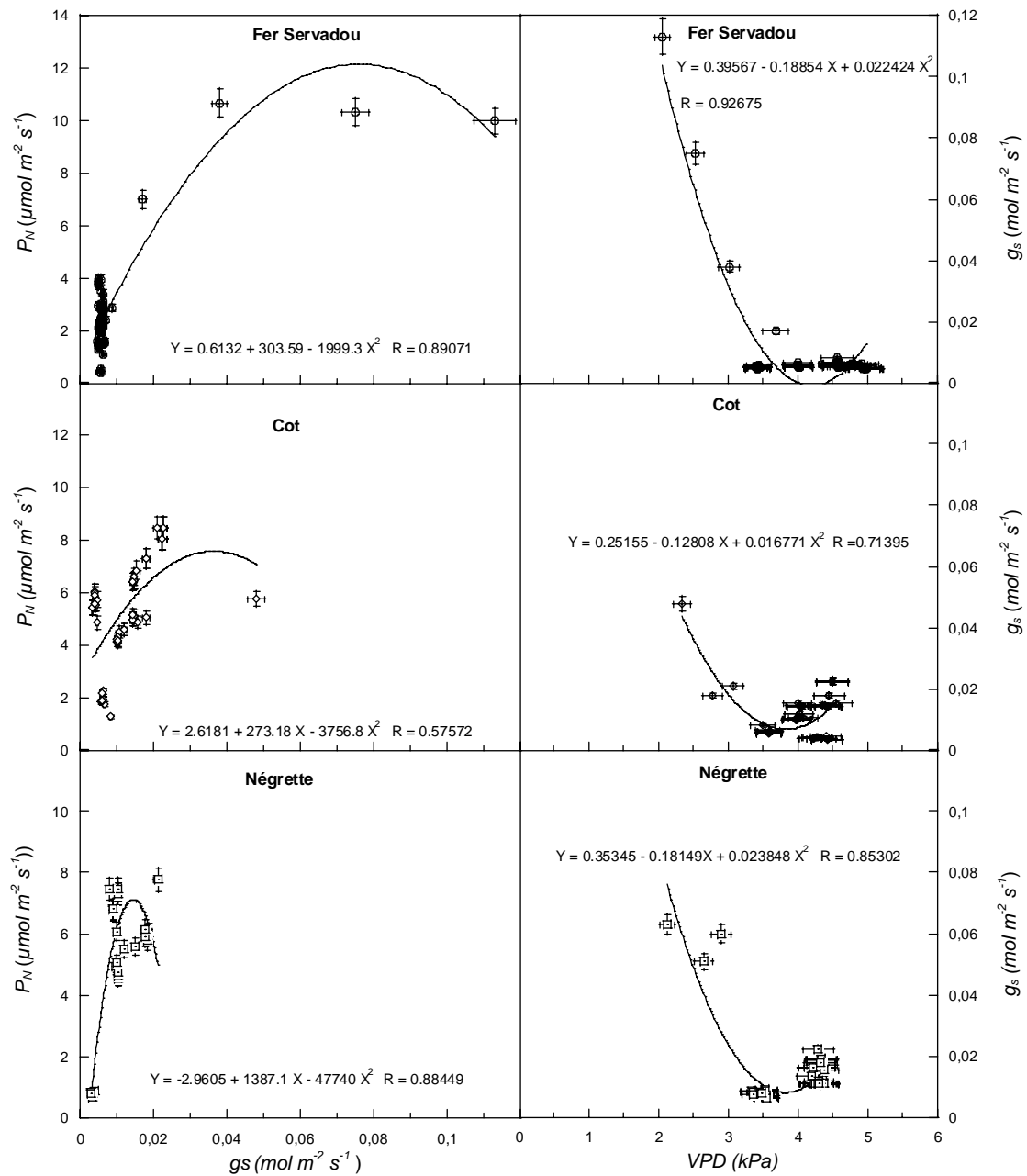


Fig. 5. Relationship between maximal net CO₂ assimilation rate (P_N) and stomatal conductance (g_s), and stomatal response to atmospheric vapour pressure deficit (VPD) for elevated CO₂ concentration (800 $\mu\text{L L}^{-1}$) of Fer Servadou, Cot and Négrette cultivars under drought stress treatment (afternoon measurements). Each data point shows mean and standard error for three replicate leaves.

Ecophysiological responses of three grapevines varieties (*Vitis vinifera* L.) to water stress under ambient and elevated carbon dioxide levels.

Faouzi Attia¹ and Marc Garcia

Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées, Institut National Polytechnique de Toulouse ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole BP32607, 31326 Castanet Toulouse, FRANCE

François Garcia

Centre de Formation et de Recherches en Œnologie, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1 - 15 Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, FRANCE.

Fethi Ben Mariem

Laboratoires des Systèmes des Production Arboricoles, Institut de l'Olivier, Rue Ibn Khaldoun; BP14; 4061 Sousse TUNISIE.

Vitale Nuzzo

Universita' degli Studi della Basilicata Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell'Ambiente Viale dell'Ateneo Lucano, 10 85100 Potenza ITALIE.

Thierry Lamaze

Centre d'Etudes Spatiales de la Biosphère, Université Paul Sabatier, 18 Avenue Ed. Belin - bpi 2801 ; 31401 Toulouse, FRANCE.

¹ To whom reprint requests should be addressed. E-mail address: faouzi.attia@ensat.fr

SOUTH AFRICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE (SAJEV)
South African Society for Enology & Viticulture, South Africa.

To be submitted in December 2007

Ecophysiological responses of three grapevines varieties (*Vitis vinifera* L.) to water stress under ambient and elevated carbon dioxide levels.

Keywords: Fer Servadou, Cot, Négrette, net CO₂ assimilation rate, chlorophyll fluorescence, stomatal conductance, leaf specific hydraulic conductivity, electron flow rate.

ABSTRACT

The effects of water stress on ecophysiological behaviour, photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in three red wine grape varieties, namely Fer Servadou, Cot and Négrette were studied under controlled conditions. Water status of grapevines in these varieties subjected to well-watered (control) and water stressed (stressed) treatments was determined from véraison until harvest. Diurnal time courses of chlorophyll and gas exchange rates were measured. Under drought stress, these varieties behaved distinctly with regards to their diurnal patterns of measurements, showing a correspondence between net CO₂ assimilation rate, stomatal conductance, transpiration and electron transport rate. Stomatal control showed different, yet specific behaviour amongst the three varieties, as was the case with leaf specific hydraulic conductance (K_l). When leaf water potential (Ψ_{leaf}) was plotted against K_l , the relationship proved highly significant, also confirming that differences were through stomatal control. Our results showed that Fer Servadou has anisohydric stomatal behaviour and Négrette and Cot had near-anisohydric and isohydric behaviours respectively. Stomatal behaviour in these cultivars could possibly be regulated by hydraulic conductance. Moreover, measurements of net CO₂ assimilation rate and photosystem II quantum efficiency in response to incident photosynthetic photon flux density (PPFD) under water stress at ambient and elevated CO₂ concentrations, showed a single curvilinear relationship between true quantum yield of CO₂ assimilation and PSII quantum efficiency. The relationship was linear at up to 0.025 mol CO₂ mol⁻¹ quanta. It then became curvilinear with a further rise in quantum yield in response to increasing PPFD.

Introduction

Actual climate change involves dry conditions with marked drought periods in summer, causing significant water stress in the grapevine during the ripening period (Stock *et al.*, 2005). Ecophysiological behaviour and grape maturity are closely related to the evolution of these climatic modifications (Chuine *et al.*, 2004; Stock *et al.*, 2005). Response to water stress involves interactions between physical and metabolic processes in cells, tissues and organs with adaptative changes and/or deleterious effects (Kramer and Boyer, 1995, Chaves *et al.*, 2002). Lowlor and Cornic (2002) explained that the parts of photosynthetic metabolism that may potentially be affected by water stress are light interception (PSII activity), synthesis of RuBP, carboxylation of RuBP catalysed by Rubisco, CO₂ supply to the PCR cycle, consumption of assimilated carbon and finally consumption of electrons. Stomatal closure is the dominant factor limiting gas exchange during water deficits (Davies and Gowing 1999, Medrano *et al.*, 2002). Stomata however also regulate transpiration so that sufficient carbon is gained while leaf water potential is

prevented from becoming too negative, and the breakdown of the plant's hydraulic system is avoided (Schultz & Matthews 1997). Under drought conditions, Tardieu and Simoneau (2002) described isohydric and anisohydric stomatal behaviour between species under fluctuating soil water status and evaporative demand. Schultz (2003) showed that even within the same species there exists variability of stomatal control, with Grenache exhibiting near-isohydric and Syrah anisohydric behaviour.

The mechanism of photosynthesis involves many processes of which all are sensitive to ambient environmental changes. The comparison of photosynthetic capacity is typically made on a net assimilation basis, often neglecting the fact that carbon assimilation also depends on the availability of CO₂ at the carboxylation sites, which is restricted by the resistance to diffusion along the pathway from the atmosphere to the chloroplasts (Fila *et al.*, 2006). The relationship between PSII quantum efficiency and quantum yield for CO₂ assimilation or O₂ evolution has been well documented, with linear regression relationships being reported in many species (Cornic and Briantais, 1991, Cheng *et al.*, 2001, Fila *et al.*, 2006). The effect of water stress on the relationship between PSII quantum efficiency and quantum yield for CO₂ assimilation has not been examined.

The objective of this study was 3-fold: (i) to assess for three grapevine varieties (Fer Servadou, Cot and Négrette) photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters under water stress conditions; (ii) to establish the effect of water stress on the relationship between PSII quantum efficiency and quantum yield for CO₂ assimilation at ambient CO₂ and non-respiratory conditions (elevated CO₂); and (iii) to check whether differences in stomatal behaviour and changes in CO₂ diffusion are part of the varieties' adaptation to water stress.

With increasing drought conditions in southern France and, to the best of our knowledge, no information in the literature on the behaviour of Fer Servadou, Cot and Négrette under water stress, the results are expected to fill a knowledge gap in the photosynthetic physiology of these grape varieties under water stress, and to support a more consistent interpretation of photosynthesis measurements in relation to hydraulic architecture under water stress conditions.

Materials and methods

Plant material

A hydroponic culture experiment was carried out during two consecutive seasons on five-year old grapevines Fer Servadou, Cot and Négrette, autochthonous widely spread grape varieties utilized to produce high quality wines in southern France, and grafted onto 3309 Couderc (3309 C) rootstock. Grapevines were grown in 40 L pots filled with pozzolana (3-15 mm diameter volcanic rock fragments with a 19% water holding capacity). All the grapevines were irrigated with a standard nutrient solution (Ibrahim 2001, Attia *et al.*, 2004). The experiment was carried out under controlled conditions in a glasshouse in Toulouse (southern France, 43° latitude). The environmental conditions were 26/30-16/20 day/night temperature, a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 1200-1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; natural photoperiod (14/10 h) light/dark cycle, and relative humidity between 65 and 70%. Two phenological growth stages of the grapevine were assessed, of which the first was where berries began to colour and enlarge, and the second was berries with intermediate Brix values second. These stages corresponded respectively to stage 36 and 38 of the modified E-L System according to Coombe (1995).

Drought treatment

Water stress was imposed at the start of véraison (phenological stage 35 in the E-L system) by decreasing the irrigation volume from 100% well-watered (control) to 30% of the control (drought stressed). Plant water status was monitored every two days from veraison to the end of the experiment (harvest time) by measuring predawn and midday leaf water potentials with a pressure chamber according to [Scholander *et al.*, \(1965\)](#). Predawn leaf water potential (ψ_{PD}) in the control vines was maintained higher than -0.3 MPa, while in the stressed vines it was maintained lower than -0.5 MPa ([Matthews *et al.*, 1987](#), [Girona *et al.*, 2006](#)).

Chlorophyll Fluorescence

Leaf chlorophyll fluorescence measurements were performed on attached fully expanded leaves using an open infrared gas-exchange system with an integrated fluorescence chamber (LICOR 6400-40; Lincoln, Nebr. USA). For stressed and well-watered (control) plants, three leaves of three different plants were used at the time of measurement, leaf temperature was set at glasshouse air temperature and relative humidity, and chamber air CO₂ was set at 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ for ambient CO₂ level and at 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ for elevated CO₂ concentration. The analyses of fluorescence were performed using the light-doubling technique; the quantum efficiency of PSII photochemistry was estimated as follows: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ where F_m' is the pulse-saturated fluorescence yield in the light (when all the PSII traps are closed), and F_s is the steady-state fluorescence yield in the light. Photochemical quenching (qP) of Chl a fluorescence was estimated as follows: $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$ where F_0' is the lowest fluorescence yield with open PSII centres (after dark imposition).

Net photosynthesis

Single leaf gas exchange measurements were coupled with measurements of leaf chlorophyll fluorescence. Net CO₂ assimilation rate (A_n) was measured from 09:00 to 12:00 using a portable Li-6400 photosynthetic analyzer (LICOR, Lincoln, Nebr. USA) which was equipped with a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF) placed at the top of the leaf chamber.

The relationship between quantum yield of CO₂ assimilation and PSII quantum efficiency was studied by altering incident photosynthetic photon flux density (PPFD). Measurements of net CO₂ assimilation rate (A_n) and chlorophyll fluorescence parameters in response to PPFD were made in descending order 1500, 1200, 800, 400, 200, 100 and 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the leaf level after measuring dark respiration R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The sample leaf was placed in the cuvette that was maintained at ambient temperature and humidity. At each PPFD, the sample leaf was exposed to ambient and elevated CO₂ concentrations, therefore, net CO₂ assimilation rate A_n ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiration E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), stomatal conductance g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and internal CO₂ concentration C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) were measured once stomatal conductance and CO₂ assimilation stabilized. Quantum yield of CO₂ assimilation was calculated as net CO₂ assimilation rate divided by incident PPFD and leaf absorptance ([Cheng *et al.*, 2001](#)).

Plant water relations

Every two days, at predawn (03:00 to 04:00), Ψ_{PD} was determined on three fully expanded leaves by using a pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA). At midday (12:00 to 13:00) on the same day, Ψ_{MD} water potential was measured on the leaves used for photosynthesis and chlorophyll fluorescence measurements. The diurnal course of leaf water potential Ψ_{Leaf} was measured every two hours from 06:00 until 20:00. Leaf-specific hydraulic conductance K_l ($\text{mmol MPa}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was calculated as $E/(\Psi_{Leaf} - \Psi_{PD})$ according to [Sperry and Pockman \(1993\)](#).

Experimental design and data analysis

The experimental design was a completely randomized layout ($n = 12$). Treatments were 12 vines well-watered (Control) and 12 vines water stressed (stressed) per cultivar. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and checked for significant probability at the $P \leq 0.05$ level using Sigmastat® 2.03 Statistical Software. The difference between the means was determined using Fisher's least significant difference (LSD) at a probability of $P \leq 0.05$. KaleidaGraph® was used to determine relationships between parameters by means of regressions.

Results and discussion

Effect of water stress on diurnal time courses of gas exchange and chlorophyll fluorescence

Gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters under water stress at ambient CO_2 levels in Fer Servadou, Cot and Négrette showed a diurnal evolution (Fig. 1). During the day from 6:00 until 20:00 Négrette showed higher A_n compared to those of Fer Servadou and Cot (Fig. 1A). After midday, A_n began to decline in Cot and Négrette varieties. The slope of this decline was similar in Cot and Négrette, although this decline started from higher values. Indeed, in Fer Servadou grapevines subjected to drought stress, the depression started earlier and was more pronounced (Fig. 1A). In contrast with Négrette, at mid-afternoon Fer Servadou and Cot showed a A_n recovery trend with a peak at 16:00. Similar responses to decreased water availability was reported in Tempranillo cv. ([Flexas et al., 1999](#)), Touriga Nacional cv. ([Moutinho-Pereira et al., 2004, 2007](#)) and in Riesling cv. ([Bertamini et al., 2006](#)). Stomatal conductance (g_s) showed a pattern similar to that of A_n (Fig. 1B), but for Fer Servadou grapevines it decreased drastically starting from 10:00, with a recovery at mid-afternoon (increased until 16:00 and decrease afterwards until 20:00). Cot grapevines also showed g_s recovery behaviour at mid-afternoon similar to that of Fer Servadou. These differences imply very different strategies in water use. The values of A_n/E at elevated CO_2 concentrations were higher than those at ambient CO_2 . Under water stress, A_n/E values were higher than those of the well-watered control.

[Schultz \(2003\)](#) reported an exponential decay function as a relationship between g_s and Ψ_{PD} . This function was fitted separately to the data for each variety from the stress treatments for g_s and Ψ_{Leaf} in the morning. Genotypic differences in the fitting curves were found, which were significantly different with an exponential decay [Fer Servadou: $g_s = 0.16202 \exp(0.89157 \Psi_{Leaf})$; $R^2 = 0.803$; Négrette: $g_s = 0.07576 \exp(0.25145 \Psi_{Leaf})$; $R^2 = 0.758$ and Cot: $g_s = 0.02211 \exp(0.38086 \Psi_{Leaf})$; $R^2 = 0.577$]. The indicated differences again imply very different strategies in water use. As indicated in Fig. 2, Ψ_{PD} and Ψ_{Leaf} were always lower for stressed compared to well-watered vines for the three cultivars. Leaf water potential is generally accepted as a reliable indicator of plant water status, with values of -0.5 MPa during the predawn period and minimum values of -0.9 MPa to -1.2 MPa during the day regarded as the onset of negative water stress

effects on grapevine physiology (Williams *et al.*, 1994 and references therein). In fact, Cot cv. showed the highest difference between Ψ_{PD} and Ψ_{leaf} at 12:00 and 18:00 (0.78 and 0.48 MPa respectively) despite its strong stomatal closure response, which closely resembles classic isohydric behaviour.

The relationship between the PSII operating efficiency and CO₂ assimilation in leaves allows fluorescence to be used to detect differences in the response of plants to environmental challenges, consequently to screen for tolerance to environmental stresses (Baker and Rosenqvist, 2004). O'Neil and co-authors (2006) suggested that chlorophyll fluorescence might serve as a practical means for indirectly assessing leaf photosynthesis rates and to distinguish stress tolerance of susceptible plants. In our experiment, the diurnal time course of chlorophyll fluorescence quenching parameters under water stress at ambient CO₂ concentration are shown in Fig. 1. The efficiency of excitation capture by open PSII centers (F_v'/F_m') in Fer Servadou decreased progressively from 6:00 until 20:00 (Fig. 1C). However, for Cot and Négrette F_v'/F_m' showed stability during daytime with decreasing trends from mid-morning to afternoon. Similar responses were reported in other grapevines, including Tinto Cão, Touriga Nacional and Tinta Roriz cultivars, related to a relative decrease in F_o' , F_m' and F_v' (Moutinho-Pereira *et al.*, 2007). In Négrette grapevines submitted to drought stress F_v'/F_m' varied between 0.30 and 0.46; in Cot it varied between 0.32 and 0.37 and for Fer Servadou values were between 0.24 and 0.599. Photochemical quenching (qP) increased from 6:00 until 14:00 and then decreased afterwards (Fig. 1D). Fer Servadou showed slightly higher qP than those of Négrette and Cot grapevines. Φ_{PSII} decreased in the water stress treatment and showed lower variability depending on the grape cultivar (Fig. 1E). Under water stress, the diurnal time courses of J_T showed marked differences between varieties and followed a pattern that coincided well with that shown for A_n (Fig. 1F). In accordance with Guan *et al.*, (2004) J_T decreased under water stress conditions. J_T reached a peak at midday in Négrette grapevines, but earlier at 10:00 in those of Fer Servadou cv. Our results show an afternoon recovery of J_T in Fer Servadou cv. in accordance with Flexas and co-authors (1999) in Tempranillo cv. Moreover, In Cot and Négrette, under water stress and at elevated CO₂, grapevines showed marked recovery behaviour of J_T at mid-afternoon but not at ambient CO₂.

Effect of water stress on gas exchange and the relationship between quantum yield for CO₂ assimilation and PSII efficiency

A light response curve under water stress was established with coupled gas exchange and chlorophyll fluorescence emission measurements. Under water stress, as PPFD increased, A_n increased linearly before reaching a saturation point (Fig. 3A) beyond which A_n showed little response to increasing PPFD. Both true quantum yield of CO₂ assimilation (Fig. 3B) and PSII quantum efficiency (Fig. 3C) decreased with increasing PPFD. At each given PPFD, A_n and quantum yield for CO₂ increased at elevated CO₂ concentration compared to ambient CO₂ values for Fer Servadou, Cot and Négrette grapevines.

The relationship between A_n in stressed grapevines and PPFD at ambient and elevated CO₂ showed a polynomial trends fitting a model of general form $A_n = a \text{PPFD}^b$ with highly significant coefficients of correlation ($R^2 = 0.98, 0.98$ and 0.97 respectively for Fer Servadou, Cot and Négrette at elevated CO₂).

Chlorophyll fluorescence quenching parameters in response to incident PPFD, under water stress at ambient and elevated CO₂ concentrations, are shown in Fig. 4. The efficiency of excitation

capture by open PSII centres (F_v'/F_m') decreased with increasing PPFD (Fig. 4A). Photochemical quenching (qP) also decreased with increasing PPFD (Fig. 4B). The decline in both F_v'/F_m' and qP in response to increasing PPFD induced a decrease in PSII quantum efficiency (Φ_{PSII} , Fig. 4C). Correspondingly, the electron transport rate (J_T) increased with increasing PPFD (Fig. 3C).

When each fluorescence parameter (F_v'/F_m' , qP and Φ_{PSII}) was plotted against true quantum yield of CO_2 assimilation (Fig. 5) curvilinear relationships to true quantum yield of CO_2 assimilation were found for F_v'/F_m' and qP (Fig. 5A and B respectively). A close relationship was found between quantum yield of CO_2 assimilation and Φ_{PSII} (Fig. 5C). At any given Φ_{PSII} , elevated CO_2 concentration had no effect compared to ambient CO_2 levels, with all the data points from leaves in the three grape varieties falling into the same range. Under water stress and for the three grape cultivars, the relationships were linear at up to $0.025 \text{ mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$ quanta, then becoming curvilinear with a further rise in quantum yield in response to increasing PPFD. A model of the general form $\Phi_{PSII} = A + B X + C X^2$ (X = true quantum yield for CO_2) has been fitted to each treatment with a highly significant correlation coefficient ($R^2 = 0.99$). This curvilinear relationship was also noted earlier by Öquist and Chow (1992) as well as Cheng *et al.* (2001). Many factors may contribute to this such as PSII heterogeneity (Lavergne and Briantais, 1996, Yokthongwattana and Melis, 2006), changes in electron cycling around PSII and partitioning of electron flow to processes other than CO_2 assimilation. Guan and co-authors (2004) showed that for three grapevine varieties under drought stress, photorespiration was an important photoprotection mechanism.

Leaf specific hydraulic conductance and stomatal behaviour

Previous studies suggested that stomatal regulation might function to keep transpirational flow synchronised with the plants hydraulic capacity (Tyree and Sperry, 1988; Schultz and Matthews, 1993). Therefore the leaf specific hydraulic conductance, K_l , was estimated from the relationship of single leaf transpiration rate to the soil–xylem water potential difference (in our present experiment soil water potential was assumed to be equivalent to predawn water potential). On a diurnal time scale, large differences were observed in K_l between the three varieties with respect to the control and water stressed treatments (Fig. 6). These specific behaviours in Fer Servadou, Cot and Négrette grapevine varieties support the implication of a causal relationship between K_l and stomatal conductance. These data suggested that differences in stomatal behaviour resembling isohydric and anisohydric strategies were related to plant hydraulics. The controlling mechanism for g_s was related to K_l for stressed and well-watered plants alike and functional on a diurnal time scale when environmental variables and water relations underwent large fluctuations.

The relationship between K_l ($\text{mmol MPa}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and Ψ_{leaf} at morning for well-watered and stressed grapevines in the three grape varieties showed an exponential trend fitting a model of the general form $K_l = a \exp(b \Psi_{\text{leaf}})$ (Fig.7). The slope of this relationship is an estimate of K_l decrease with increasing water deficit. Fer Servadou well-watered and stressed grapevines showed the same trends with an exponential decrease of K_l ($R^2 = 0.93$ and 0.96 respectively for the control and water-stressed treatments). Négrette and Cot grapevines had similar trends when they are well-watered, but under water stress Cot grapevines showed more isohydric behaviour. These results of leaf gas exchange support the differences in stomatal behaviour for these varieties and revealed that Fer Servadou exhibits anisohydric stomatal behaviour; Négrette

exhibits near-anisohydric and Cot isohydric stomatal behaviour (Fig. 7). It was demonstrated that a common and close coupling between g_s and leaf specific hydraulic conductance exists, which can fully account for the observed differences in stomatal behaviour (Ripullone *et al.*, 2007). Intra-specific differences in stomatal sensitivity have been related to more rapid soil water depletion. This markedly different behaviour may form the basis of the control mechanism for stomatal conductance in the near-isohydric and anisohydric strategies of respectively Cot, Négrette and Fer Servadou grapevine cultivars. A higher hydraulic capacity may lower the Ψ_{leaf} below cavitation threshold and then lead to the formation of embolisms. The cavitation events may then act as signal for stomatal closure (Nardini *et al.*, 2001), which would occur to prevent cavitation (Tyree and Zimmermann, 2002; Chatelet *et al.*, 2006). Ripullone and collaborators (2007) suggested an adaptive feedback loop between g_s and Ψ_{leaf} as a response to K_t manipulation for maritime pine seedlings, with Ψ_{leaf} being prevented from declining below the cavitation threshold through stomatal closure. Myburgh and Howell (2006) reported that stomatal control not only prevented Ψ_{leaf} decrease, but also acted as protective mechanism that avoided extremely high water stress in grapevines. It must also be considered that other factors in grapevine plants than leaf specific hydraulic conductance can also contribute as controlling factors on stomatal behaviour, such as relative abundance of ABA in xylem sap, in leaves and in berries (Soar *et al.*, 2006; Antolin *et al.*, 2006).

Conclusions

Water status proved to be an important aspect in the ecophysiological behaviour of gas exchange and chlorophyll fluorescence in the studied grapevine varieties. Under water stress, net CO_2 assimilation, stomatal conductance and PSII quantum efficiency decreased significantly and distinctly depending on the grape variety. The present results indicate that true quantum yield for CO_2 assimilation is not affected by elevated CO_2 concentration under water stress condition, and it showed a significant relationship with PSII quantum efficiency. Results also showed that anisohydric, near anisohydric and isohydric behaviour in grapevine cultivars from the south of France under water stress can be explained by the differences in leaf specific hydraulic conductance on a diurnal basis. Further studies on hydraulic architecture in the green shoots in relation with differential sensitivity of stomata to increasing vapour pressure deficit and linked with ABA physiology need to be addressed to elucidate the exact controlling mechanisms for stomata.

Literature cited

- Antolín, M.M., Ayari, M. & Sánchez-Díaz M., 2006. Effects of partial rootzone drying on yield, ripening and berry ABA in potted Tempranillo grapevines with split roots. *Aust. J. Grape Wine R.* 12, 13-20.
- Attia, F., Ibrahim, H., Cadet, A. & Garcia, M., 2004. Evaluation of leave, must and wine cation contents and of must and wine acidity of five red wine grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) grafted onto 3309 Couderc and grown hydroponically. *Acta Horticulturae* 652, 255-263.
- Baker, N.R. and Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. exp. Bot.* 55, 1607-1621.

- Bertamini, M., L. Zulini, K. Muthuchelian, & Nedunchezian, N., 2006. Effect of water deficit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. *Photosynthetica* 44, 151-154.
- Chatelet D.S., Matthews, M.A. & Rost, T.L., 2006. Xylem structure and connectivity in grapevine (*Vitis vinifera*) shoots provides a passive mechanism for the spread of bacteria in grape plants. *Annals of Botany* 98, 483–494.
- Chaves, M.M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C.P.P, Osório M.L., Carvalho, I., Faria T. & Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field? photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 907-916.
- Cheng, L, Fuchigami L.H., & Breen, P.J., 2001. The relationship between photosystem II efficiency and quantum yield for CO₂ assimilation is not affected by nitrogen content in apple leaves. *J. Exp. Bot.* 52, 1865-1872.
- Chuine, I., Yiou, P., Viovy, N., Seguin, B., Daux, V., Le Roy Ladurie, E., 2004. Grape ripening as a past climate indicator. *Nature* 432, 289–290.
- Coombe, B.G., 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine R.* 1, 100-110.
- Cornic, G. & Briantais, J.M., 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta* 183, 178–184.
- Cornic, G. & Fresneau, C., 2002. Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany* 89, 887–894.
- Davies, W.J. & Gowing, D.J.G., 1999. Plant responses to small perturbations in soil water status. In: Press MC, Scholes JD, Barker MG, eds. *Physiological plant ecology*. Oxford: Blackwell Science, 67-89.
- Fila, G., Badeck, F.W., Meyer, S., Cerovic, Z. & Ghashghaie, J., 2006. Relationships between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagated grapevine plants, before and after ex vitro acclimatization. *J. Exp. Bot.* 57, 2687-2695.
- Flexas, J., Escalona, J.M. & Medrano, H., 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell & Environment* 22, 39-48.
- Girona, J., Mata, M., del Campo, J., Arbonés, A., Bartra, E. and Marsal, J., 2006. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irrigation Science.* 24, 115-127.
- Guan, X.Q., Zhao, S.J., Li, D.Q. & Shu, H.R., 2004. Photoprotective function of photorespiration in several grapevine cultivars under drought stress. *Photosynthetica* 42, 31-36.
- Ibrahim, H.: Genèse et évolution des acides organiques dans les feuilles, les baies, les moûts et les vins des cépages Cot et Négrette (*Vitis vinifera* L.) (in French). Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Kramer, P.J. & Boyer, J.S., 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press, California.
- Lavergne, J. and Briantais, J.M., 1996. Photosystem-II heterogeneity. In: Ort DR and Yocum CF (eds). *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 265-287.
- Lawlor, D.W. & Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell Environment* 25, 275–294.
- Matthews, M.A., Anderson, M.M. & Schultz, H.R., 1987. Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis* 26, 147-160.

- Medrano, H., Escalona, J.M., Cifre, J., Bota, J. and 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.
- Moutinho-Pereira, J., Magalhães, N., Gonçalves, B., Bacelar, E., Brito, M. & Correia, C., Gas exchange and water relations of three *Vitis vinifera* L. cultivars growing under Mediterranean climate. *Photosynthetic* 45, 202-207.
- Moutinho-Pereira, J.M., Correia, C.M., Gonçalves, B.M., Bacelar, E.A. & Torres-Pereira, J.M., 2004. Leaf gas exchange and water relations of grapevines grown in three different conditions. *Photosynthetica* 42, 81-86.
- Nardini, A., Tyree, M.T. & Salleo S., 2001. Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerasus* L. and its impact on leaf hydraulics. *Plant Physiol.* 125, 1700–1709.
- O’Neil, P.M., Shanahan, J.F. & Schepers, J.S., 2006. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science* 46, 681-687.
- Öquist, G. & Chow, W.S., 1992. On the relationship between the quantum yield of Photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and the quantum yield of CO₂-dependent O₂ evolution. *Photosynthesis Research* 33, 51-62.
- Ripullone, F., Guerrieri, M.R., Nole, A., Magnani F. & M. Borghetti, 2007 Stomatal conductance and leaf water potential responses to hydraulic conductance variation in *Pinus pinaster* seedlings. *Trees* 21, 371-378.
- Scholander, P.F., Hemmingsen, E. & Gary W., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339-346.
- Schultz, H.R. & Matthews, M.A., 1997. High vapour pressure deficit exacerbates xylem cavitation and photoinhibition in shade-grown *Piper auritum* H.B. & K. during prolonged sun flecks I. Dynamics of plant water relations. *Oecologia* 110, 312-319.
- Shultz, H.R. & Matthwes, M.A., 1993. Xylem development and hydraulic conductance in sun and shade shoots of grapevine (*Vitis vinifera* L.): evidence that low light uncouples water transport capacity from leaf area. *Planta* 190, 393-406.
- Shultz, H.R., 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell and Environment* 26, 1393-1405.
- Soar, C.J., Speirs, J., Maffei, S.M, Penrose, A.B., McCarthy, M.G. & Loveys, B.R., 2006. Grape vine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Aust. J. Grape Wine R.* 12, 2-11.
- Sperry, J.S. & Pockman, W.T., 1993. Limitation of transpiration by hydraulic conductance and xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant, cell and environment* 16, 279-287.
- Stock, M., Gerstengarbe, F.W., Kartschall, T. & Werner, P.C., 2005. Reliability of climate change impact assessments for viticulture. *Acta Horticulturae* 689, 29-40.
- Tradieu, F. & Simoneau, T., 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J. exp. Bot.* 49, 419-432.
- Tyree M.T. & Zimmermann, M.H., 2002. Xylem structure and the ascent of sap. Springer Series in Wood Science.
- Tyree, M.T. & Sperry, J.S., 1988; Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? Answers from a model. *Plant Physiol.* 88, 574-580.

Williams, L.E., Dokoozlian, N.K. & Wample, R., 1994. Grape. In: Schaffer, B. & Anderson, P.C. (eds). Handbook of environmental physiology of fruit crops, vol I, Temperate crops. CRC Press, Boca Raton. Pp. 85-133.

Yokthongwattana, K. and Melis, A., 2006. Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: Mechanism of a photosystem II damage and repair cycle. In Demmig-Adams, B., Adams III, W.W. & Mattoo, A.K. (eds). Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment. Springer Netherlands, pp. 175–191.

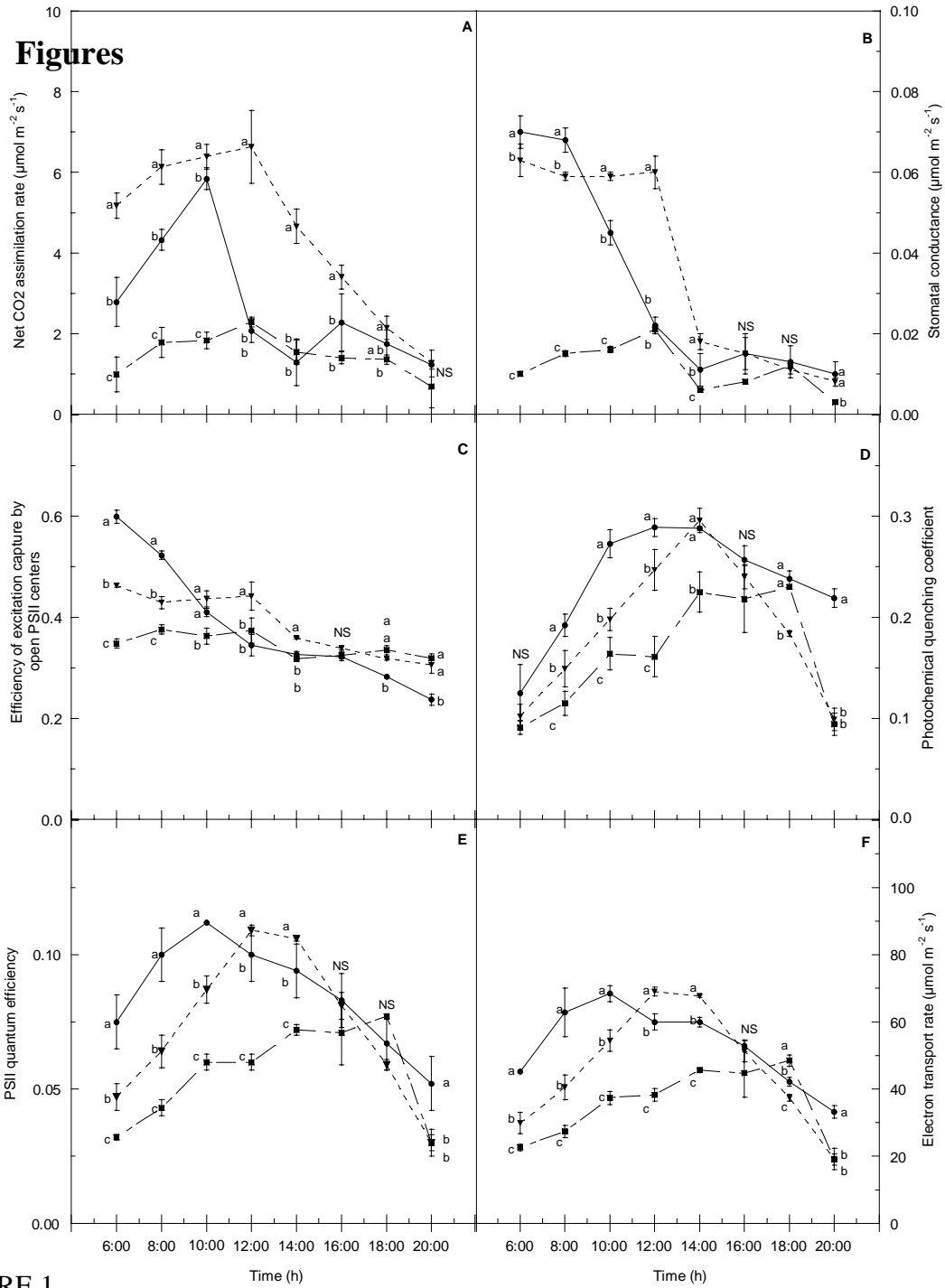


FIGURE 1
 Diurnal time courses of Net CO₂ assimilation rate A_n (A), stomatal conductance g_s (B), Efficiency of excitation capture by open PSII centres F_v'/F_m' (C), photochemical quenching qP (D), and PSII quantum efficiency Φ_{PSII} (E), and electron transport rate J_T (F) under water stress at ambient CO₂ for three red wine grape varieties Fer Servadou (●), Cot (■) and Négrette (▼). Each data point represents the average of three measurements on three plant replications with standard error. Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Mean separation by Fisher's LSD.

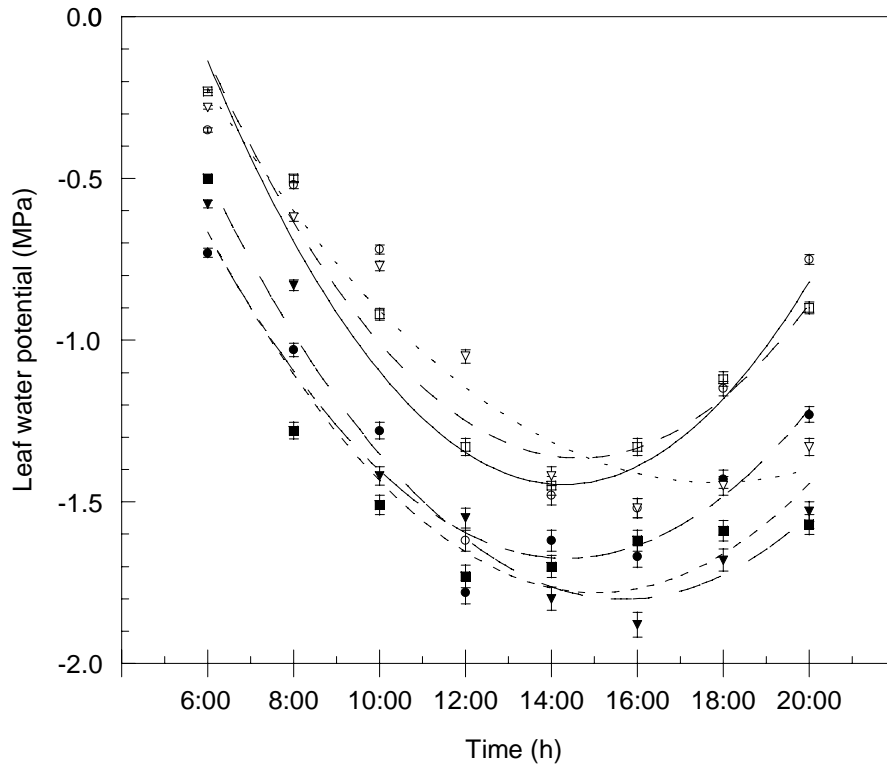


FIGURE 2

Diurnal time courses of leaf water potential Ψ_{Leaf} in well-watered grapevines (Fer Servadou ○, Cot □ and Négrette ▽), and stressed vines (Fer Servadou ●, Cot ■ and Négrette ▼). Each data point represents the average of three measurements with standard error.

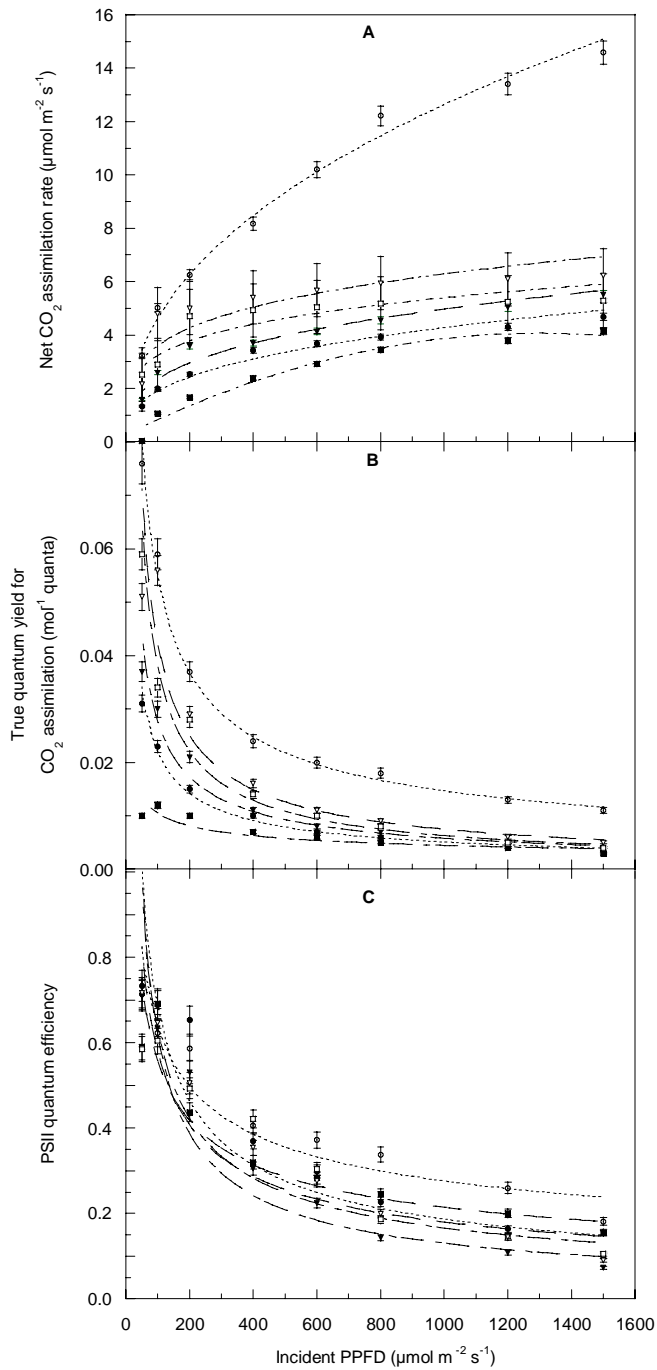


FIGURE 3

Net CO_2 assimilation rate A_n (A), true quantum yield for CO_2 assimilation (B), and PSII quantum efficiency Φ_{PSII} (C) under water stress at ambient CO_2 of three red wine grape varieties Fer Servadou (●), Cot (■) and Négrette (▼) and at elevated CO_2 (800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) Fer Servadou (○), Cot (□) and Négrette (▽). Each data point represents the average of three measurements on three plant replications with standard error.

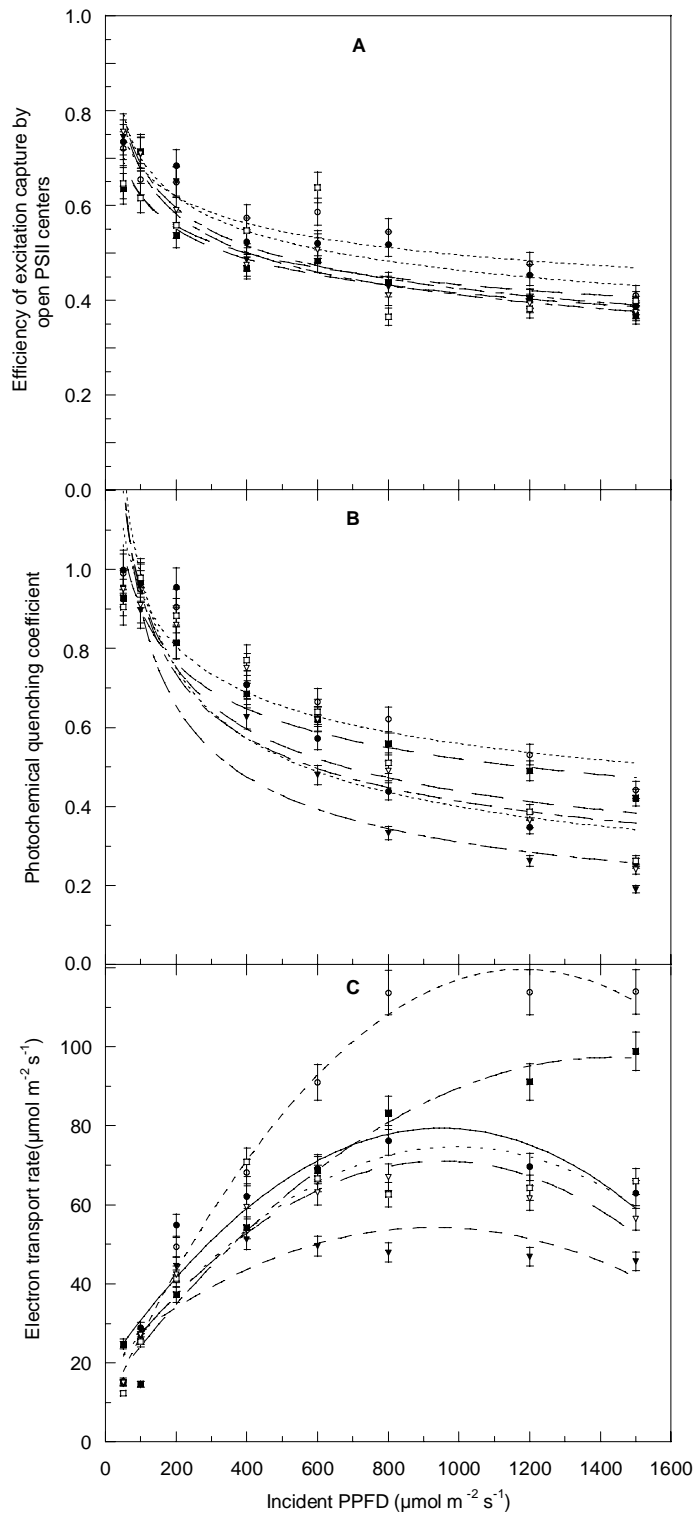


FIGURE 4

Efficiency of excitation capture by open PSII centres F_v'/F_m' (A), photochemical quenching qP (B), and electron transport rate J_T (C) under water stress at ambient CO_2 of three red wine grape varieties Fer Servadou (●), Cot (■) and Négrette (▼) and at elevated CO_2 ($800\mu mol\ mol^{-1}$) Fer Servadou (○), Cot (□) and Négrette (▽). Each data point represents the average of three measurements on three plant replications with standard error.

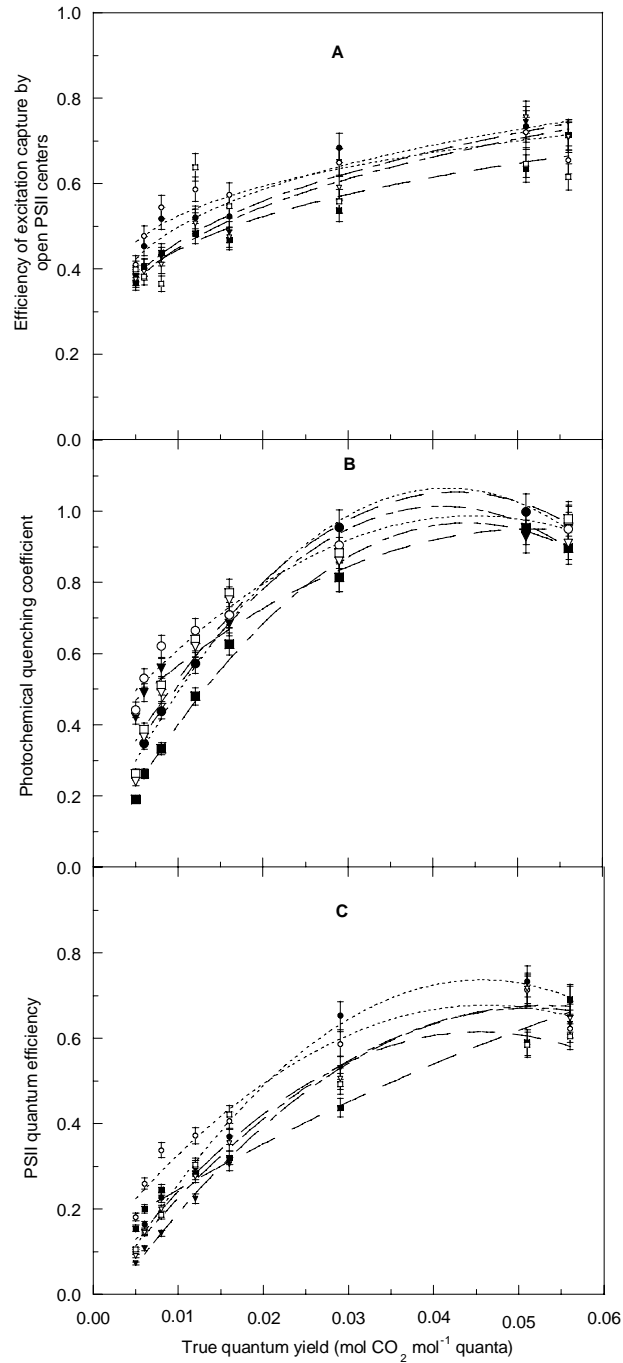


FIGURE 5

True quantum yield for CO₂ assimilation in relation to chlorophyll fluorescence parameters under water stress at ambient CO₂ of three red wine grape cultivars Fer Servadou (●), Cot (■) and Négrette (▼) and at elevated CO₂ (800 μmol mol⁻¹) Fer Servadou (○), Cot (□) and Négrette (▽). Efficiency of excitation capture by open PSII centres F_v'/F_m' (A), photochemical quenching qP (B), and PSII quantum efficiency Φ_{PSII} (C). Each data point represents the average of three measurements on three plant replications with standard error.

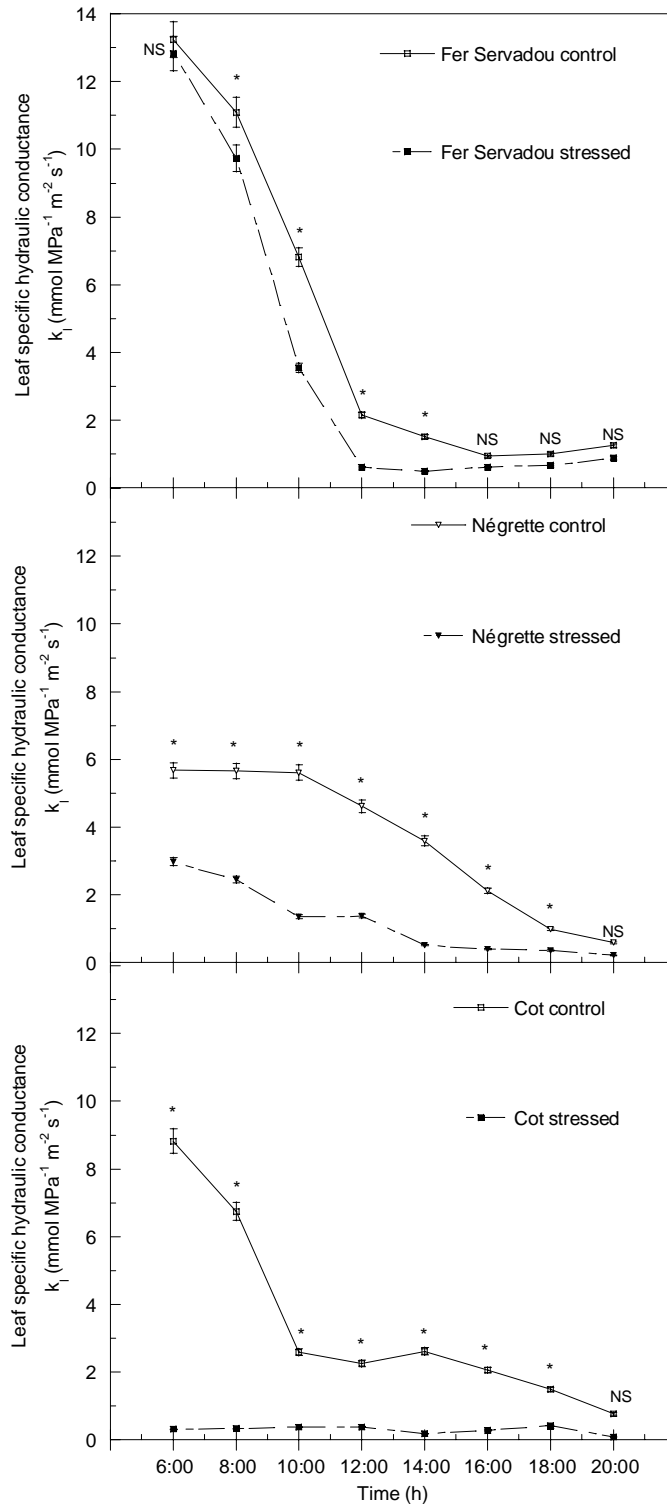


FIGURE 6

Diurnal time courses of leaf specific hydraulic conductance (K_l) in well-watered (Control) Fer Servadou (○), Cot (□) and Négrette (▽) grape varieties, and stressed Fer Servadou (●), Cot (■) and Négrette (▼). Each data point represents the average of three measurements on three plant replications with standard error. NS,* indicate Nonsignificantly or significantly different means from control at $P \leq 0.05$. Mean separation by Mean separation by Fisher's LSD.

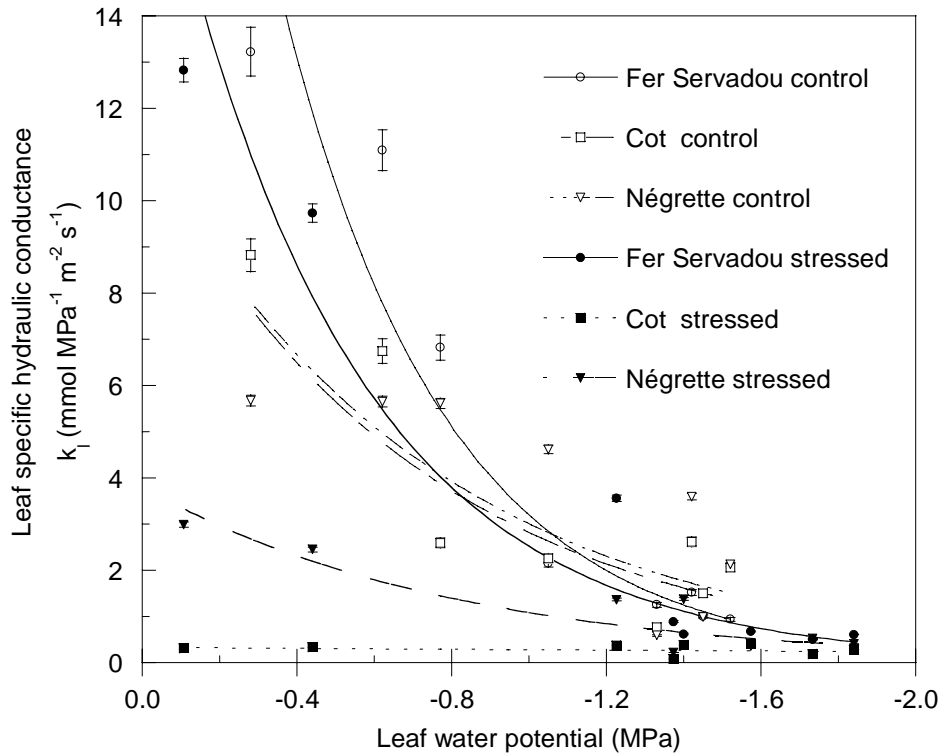


FIGURE 7

Morning leaf specific hydraulic conductance (K_l) as a function of leaf water potential (Ψ_{Leaf}) for control (well-watered) and stressed (water-stressed) Fer Servadou, Cot and Négrette grapevines. Each data point represents the average of three measurements on three plant replications with standard error. A model of general form $K_l = a \exp^{(b * \Psi_{\text{Leaf}})}$ has been fitted to each data set. Under water stress: Fer Servadou: $K_l = 76.287 \exp(2.7279 \Psi_{\text{leaf}})$; $R^2 = 0.964$; Cot: $K_l = 0.3707 \exp(0.2208 \Psi_{\text{leaf}})$; $R^2 = 0.169$; Négrette: $K_l = 8.818 \exp(1.6757 \Psi_{\text{leaf}})$; $R^2 = 0.923$.

CHAPITRE IV :

Effet du stress hydrique sur la maturité phénolique du raisin : études des cépages *Vitis vinifera* L. cvs Cot, Négrette, Tannat et Duras

Présentation

Depuis plusieurs années, les météorologistes constatent des modifications des conditions climatiques à l'échelle mondiale et surtout régionale avec une accélération dans l'hémisphère nord, allant vers un réchauffement de la planète (Arnell *et al.*, 2003 ; Christensen *et al.*, 2007). Ce changement climatique est souvent associé à des conditions de sécheresse estivale prononcée, provoquant un stress hydrique important sur la vigne (Stock *et al.*, 2005). Le comportement écophysologique de la vigne et la maturité du raisin sont étroitement liés à l'évolution des conditions climatiques et du système de conduite culturale (Chuine *et al.*, 2003 ; Nuzzo *et al.*, 2006). De plus, la qualité des composés phénoliques des baies sont soumis à l'influence des conditions du milieu : alimentation hydrique (Roby *et al.*, 2004), alimentation minérale (Hilbert *et al.*, 2003), température et éclaircissement (Spayd *et al.*, 2002).

L'objectif des pratiques culturales et des itinéraires techniques, dont l'alimentation hydrique constitue une composante principale, est d'optimiser l'équilibre entre la production et la qualité des raisins (Poni *et al.*, 2007). De trop rares études ont été menées sur le comportement physiologique des cépages autochtones de la région Midi-Pyrénées en condition de contrainte hydrique et ses conséquences sur la maturité phénolique du raisin pendant la période de maturité. Aussi, une question qui reste posée est : est-ce que la variation de la composition phénolique est due à l'effet stimulateur du stress hydrique ou à la modification de la morphologie de la baie ?

Dans cette expérimentation, l'objectif est d'étudier l'effet d'une contrainte hydrique du début de la véraison jusqu'à la maturité sur les échanges des flux gazeux d'une part et d'autre part sur la composition phénolique des baies des cépages Cot, Négrette, Tannat et Duras ; greffés sur 3309C en pots en conditions contrôlées. Les mesures des potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{base} en - MPa) avant le levée du soleil et à midi (Ψ_{midi} en - MPa) ont été réalisées avec une chambre à pression, tous les deux jours, en vue de maintenir le potentiel de base du témoin à -0,3 MPa et des vignes stressées entre -0,5 et -0,6 MPa.

Les mesures de l'assimilation photosynthétique nette (A_n en $\mu\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) et de la conductance stomatique (g_s en $\text{moles H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ont été réalisées au niveau des jeunes feuilles matures moyennant un appareil portable LICOR 6400 (LI-6400, LiCor, Lincoln, USA).

Les baies ont été prélevées aux stades du début véraison, véraison, trois semaines après véraison et maturité. La maturité phénolique a, quant à elle, été suivie par le dosage des teneurs en anthocyanes ainsi qu'en tanins au niveau de la pellicule, des pépins et de la baie entière.

Un échantillonnage des baies a été réalisé à la maturité en vue de les séparer en fonction de leur poids frais (6 classes : a = 0,50–0,75 g, b = 0,76–1,00 g, c = 1,01–1,25 g, d = 1,26–1,5 g, e = 1,51–1,75 g et f = 1,76–2,00 g) afin d'étudier d'une part l'effet de la contrainte hydrique sur les paramètres morphologiques de la baie et d'autre part, l'effet de la variation du poids frais de la baie de raisin sur les teneurs en composés phénoliques.

Les résultats obtenus pendant deux années successives d'études (2005 et 2006) montrent :

- ***Une influence prépondérante du stress hydrique sur la photosynthèse et la conductance stomatique***

Dans nos conditions expérimentales, la capacité photosynthétique des feuilles jeunes matures est fortement diminuée par la contrainte hydrique comparée aux témoins normalement alimentés en eau. Cette diminution de la photosynthèse est associée à une forte diminution de la conductance stomatique. L'évolution journalière de la photosynthèse et de la conductance stomatique montrent que la conductance est affectée assez rapidement par la demande évaporative journalière. Quand la demande est très forte, l'après midi, aussi bien le témoin que l'essai stressé ont des valeurs d'activité photosynthétique très faibles.

- ***Modification importante de la constitution morphologique de la baie sous stress hydrique***

L'effet le plus important de la contrainte hydrique pendant la phase de maturation (du stade 35 au stade 38 EL-System ; [Coombe 1990](#)) se manifeste sur la taille des baies et sur la distribution des petites baies par rapport aux grosses baies. Aussi le traitement stressé induit une taille moyenne des baies plus faibles que celles des témoins normalement irrigués, soit une diminution de l'ordre de 11%, 5,4%, 4,3%, et 7,5% respectivement pour le Cot, la Négrette, le Tannat et le Duras.

Cet effet sur la taille de la baie se retrouve nettement au niveau de la répartition des différentes classes de poids frais (de 0,5 g à 2,0 g). Le nombre des petites baies (classes a, b et c) représente pour l'essai stressé 51,2%, 49,8%, 54,3% et 44% d'un échantillon composé de 1500 baies, respectivement pour le Cot, la Négrette, le Tannat et le Duras, alors que pour le témoin, ces baies ne représentent que 28,5%, 36,5%, 20,8% et 41,0% de la population. Les deux catégories médianes (c et d soit de 1,00 à 1,50 g PF) chez les essais stressés des cépages Cot, Négrette, Tannat et Duras sont respectivement de 33,5%, 36,8%, 39,0% et 33,2%.

L'observation pour les différentes classes, des rapports entre les poids respectifs de la pellicule, des pépins et de la pulpe par rapport au poids des baies montre que, d'une part, la masse de la pellicule est corrélée positivement à la masse de la baie, d'où une croissance coordonnée entre pellicule et baie ; d'autre part l'effet le plus remarquable du stress hydrique est la limitation du poids de la pulpe. Sous conditions de contrainte hydrique, la répartition du poids frais de la baie entre ses différentes composantes est de : 84% pulpe, 13% pellicule et 3% pépins ; pour la Négrette: 81% pulpe, 15% pellicule et 4% pépins, le Tannat, 82%, 12% et 6% et enfin, le Duras 85%, 12% et 3%. Les proportions varient cependant en fonction des différentes classes de poids frais des baies. Le Cot présente un rapport pépins sur pellicule plus élevé en conditions de stress hydrique que le témoin, ce rapport diminue avec l'augmentation du poids de la baie.

L'ensemble de ses observations montre qu'en situation de stress hydrique post-véraison on a une faible sensibilité du développement de la pellicule en comparaison avec la pulpe.

- ***Effet du stress hydrique sur la cinétique d'accumulation des anthocyanes et des tanins au cours de la maturation***

Les résultats illustrant l'effet de l'alimentation hydrique sur la concentration en anthocyanes totales exprimée en équivalents de malvidine monoglucoside (éq. Mv-3-gl/ g de PF de baie) montre un comportement spécifique du cépage pendant la période de maturation. Le stress hydrique stimule la biosynthèse des anthocyanes dès le début de la véraison, puis celles-ci s'accumulent jusqu'à maturité. A maturité, il existe des différences significatives entre les cépages au niveau des concentrations en anthocyanes, alors qu'entre les deux régimes d'alimentation hydrique, pour un même cépage, elles sont en moyennes similaires.

Les différents cépages ont un comportement spécifique quant à leur réponse au stress hydrique concernant leur teneur en tanins (exprimés en équivalents de catéchine (EC/ baie). Pour chaque cépage, l'effet du stress hydrique est plus important sur les variations de la teneur en tanins que celles des anthocyanes pendant la période de maturité.

- ***Effet du stress hydrique sur les anthocyanes et les tanins en fonction de la taille des baies***

L'incidence de l'alimentation hydrique sur la teneur en anthocyanes et en tanins de la pellicule et des pépins, (exprimés en équivalent catéchine EC) des différentes classes de poids de baies a été étudiée.

La réponse des cépages est différente vis-à-vis du stress hydrique et elle est plus marquée pour les différentes catégories de baies (classes de poids frais de baies). En effet, une corrélation positive a été mise en évidence entre la teneur en anthocyanes et l'accroissement du poids frais de la baie. Cette augmentation correspond à 2,20, 0,61, 1,02 et 0,82 mg/g PF de baie respectivement pour le Cot, la Négrette, le Tannat et le Duras sous stress hydrique.

La teneur en tanins de la pellicule et des pépins présente une diminution linéaire liée à l'augmentation du poids frais de la baie quels que soient le cépage et le traitement. Les variations en fonction de la taille de la baie sont supérieures à celles dues au stress hydrique.

Pour les deux cépages Cot et Duras, un effet significatif du stress hydrique pour chaque catégorie de baie (de la classe a à la classe f) est à noter sur la teneur en tanins des pépins qui augmente pour les classes a, b, c et d. Les variations des cépages sont cependant différentes, pour le Tannat nous n'avons pas d'augmentation significative de ce paramètre pour les mêmes classes.

En alimentation hydrique normale, la variation de la teneur en tanins de la pellicule exprimée en EC/g PF de baie, varie selon le cépage, mais aussi en fonction de la taille de la baie. L'effet du stress hydrique sur la teneur en tanins de la pellicule est différent selon la taille de la baie.

Publication I:

Effects of water availability on leaf gas exchange and berry mass repartition in Cot and Négrette grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.).

Publication II:

Effects of water availability from leaf photosynthesis to grape phenolic maturity of Tannat and Duras grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.).

N.B.: Le texte des publications est présenté selon les recommandations de chaque revue.

Effects of water availability on leaf gas exchange and berry mass repartition in Cot and Négrette grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.).

Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Elisabeth Besnard⁴ Thierry Lamaze⁵ and Marc Garcia¹

¹ *Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées, Institut National Polytechnique de Toulouse ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole BP32607, 31326 Castanet Toulouse, FRANCE.*

² *Centre de Formation et de Recherches en Œnologie, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1 - 15 Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, FRANCE.*

³ *Laboratoires des Systèmes des Production Arboricoles, Institut de l'Olivier, Rue Ibn Khaldoun; BP14; 4061 Sousse TUNISIE.*

⁴ *Association d'Expérimentation de la Ferme Départementale d'Anglars-Juillac – 46140 Anglars-Juillac, FRANCE.*

⁵ *Centre d'Etudes Spatiales de la Biosphère, Université Paul Sabatier, 18 Avenue Ed. Belin - bpi 2801; 31401 Toulouse, FRANCE.*

¹ To whom reprint requests should be addressed. E-mail address: faouzi.attia@ensat.fr

SOUTH AFRICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE (SAJEV)
South African Society for Enology & Viticulture, South Africa.

To be submitted in December 2007

EFFECTS OF WATER AVAILABILITY ON LEAF GAS EXCHANGE AND BERRY MASS REPARTITION IN COT AND NÉGRETTÉ GRAPEVINE CULTIVARS (*Vitis vinifera* L.).

Abstract: The effects of water deficit was evaluated in terms of leaf physiological, and phenolic composition and accumulation in different berry size categories on Cot and Négrette, two red grapevine cultivars, which are autochthonous from the southern France. Water deficit started in pre-veraison and ended at harvest by limiting water availability to 30% of the well-watered vines. Predawn and midday leaf water potentials served as an indicator to maintain water stress level compared to the control. Over six weeks of water deficit, water stressed vines showed a reduction in leaf maximum assimilation rate (A_{max}) of 49 and 44% respectively for Cot and Négrette respects well-watered vines. While a reduction of 75% was measured for leaf stomatal conductance (g_s) for both Cot and Négrette cultivars. For both Cot and Négrette cultivars, relationships between the fresh mass, skin, and flesh in six different berry size categories, ranged from about 0.5 to 2.0g, were assessed on ripe fruit from grapevines subjected to well-watered and water stressed treatments. Fresh mass components for both treatments varied depending on the grape cultivar and water availability. Cot showed that seed represented around 3%, skin around 13%, and flesh about 84%. The Négrette cultivar showed that seed represented around 4%, skin around 15% and flesh around 81%. Exact proportion of seed, skin and flesh varied according to berry size category. There was an increase in total seed mass per berry to water stress treatment. Anthocyanin content, seed and skin tannin concentrations varied depending on the grape variety and berry size and less with vine water stress treatment.

Key words: *Vitis vinifera*, maximum assimilation rate, stomatal conductance, water stress, fruit growth, berry size, anthocyanins, tannins

Introduction

Wine production in the south-western France is an important economic activity. Indeed, 46,000 ha are planted to grapevines (Douanes, 2004). Annual wine production is 3,349 million hL and 25% are Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) wines (Douanes, 2004). *Vitis vinifera* L. Cot (syn. Malbec) and Négrette are main red wine grape cultivars of the 'Cahors' and of the 'Fronton' appellations respectively. These cultivars are utilized to produce high quality wines. In these areas, vineyards are dry-farmed because of legal restrictions and the use of irrigation is prohibited for premium wine, a decision based on the AOC rules that supplemental water delivered in premium wines areas might spoil wine quality and be detrimental to the image of a given "terroir". Legislation has probably adapted to such a postulate where in many appellations irrigation is still forbid.

However, the un-seasonally dry summer of 2003 (the driest over the last century in south-western France), as well as the dramatically increasing frequency of summers during which drought periods occur, has shifted attention to the actual need for a knowledge on these cultivars about their ecophysiological behaviors, water status, and grape and wine quality under drought conditions. Studies in the literature have investigated the effects on the ecophysiological parameters, grape composition of different varieties but quite small literature which has dealt with Cot and Négrette grape cultivars. Less well studied is vine and berry response to alleviation of pre-veraison water stress and during post-veraison ripening. The contradictory results in

response to differential water stress for phenology (Hardie and Considine, 1976; Matthews and Anderson, 1989; Myburgh, 2003; Dos Santos *et al.*, 2003), reproductive capacity (Matthews and Anderson, 1989), ecophysiological behavior (Escolana *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2003; Cifre *et al.*, 2005; Medrano *et al.*, 2003) and berry composition and quality (Esteban *et al.*, 2001; Salón *et al.*, 2005; Myburgh and Howell, 2006; Perez-Magarin and Gonzalez-San Jose, 2006) cause difficulties to explain the occurring phenomena, because many studies lack a common biological indicator of vine water status. Leaf water potential determined by means of a pressure chamber (Scholander *et al.*, 1965), corresponds with soil moisture and leaf gas exchange (Williams and Arujo, 2002) and may be a useful, biological measure of vine water status that would enable comparison of vine and berry response to water stress.

It was then deemed necessary to conduct an experimental study on Cot and Négrette grapevine cultivars under water stress in controlled conditions. We monitored the gas exchange, fruit growth and phenolic composition changes to gradual application of water-deficit starting in pre-véraison and ending at harvest time to mimic the gradual onset of such stresses likely to occur under field conditions. Moreover, this study was conducted also on these two cultivars to define first the interrelations between berry size at harvest, and fresh mass distribution between seed, skin, and flesh tissues; and second to evaluate the roles of fruit size and water availability on these aspects of fruit composition that are of immediate interest in winemaking.

Materials and Methods

Plant material. A hydroponic culture experiment was carried out during two consecutive growing seasons (2005 and 2006) on five-year old grapevines Cot and Négrette, autochthonous widely spread grape cultivars utilized to produce high quality wines in southern France, grafted onto 3309 Couderc (3309 C) rootstock. Grapevines were grown in 40 L pots filled with pozzolana (3-15 mm diameter volcanic rock fragments with a 19% water holding capacity). All the grapevines were irrigated with standard nutrient solution (Ibrahim, 2001; Attia *et al.* 2004). The experiment was carried out under controlled conditions in a glasshouse in Toulouse (southern France, latitude: 43°32'14.50N; longitude 1°29'44.25W; altitude: 148 m). The environmental conditions were 26/30-16/20°C day/night temperature, photosynthetic photon flux density (PPFD) about 1200-1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; natural photoperiod (14/10 h) light/dark cycle, and relative humidity between 65 and 70%. Each potted vine was trained to four vertical shoots. All axillaries later shoots were excised during shoot development.

Four phenological growth stages of the grapevine were assessed, of which the first was where berries began to colour and enlarge, the second was berries at véraison which corresponded to stage 36 of the modified E-L System according to Coombe (1995), the third was ripeness stage in which berries have intermediate Brix values, and the last at harvest time which corresponded to the stage 38 E-L System.

Drought treatment. Water stress was imposed at the start of véraison (phenological stage 35 in the E-L system) by decreasing the irrigation volume from 100% well-watered (control) to 30% of the control (drought stressed). This restriction was chosen between three restriction levels previously tested during 2004 growing season. Plant water status was monitored every two days from véraison to the end of the experiment (harvest) by measuring predawn (ψ_{PD}) and midday leaf water (ψ_{MD}) potentials with a pressure chamber according to Scholander *et al.* (1965). Predawn leaf water potential in the controls vines was maintained higher than -0.3 MPa, while in

the stressed vines it was maintained lower than -0.5 MPa (Matthews *et al.*, 1987; Girona *et al.*, 2006).

Gas exchange measurements. Single leaf gas exchange measurements were coupled with measurements of leaf chlorophyll fluorescence. Maximum net assimilation rate (A_{\max}) was measured using an open infrared gas-exchange system (LICOR, Lincoln, Nebr. USA) equipped with a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF) placed at the top of the leaf chamber. Measurements were taken on the sunny side of the rows at mid-morning and mid-afternoon. At each time ambient temperature and relative humidity were first measured and conditions within the sample chamber were then set to reproduce the ambient conditions as closely as possible. The sample leaf was placed in the cuvette that was maintained at ambient temperature and humidity, and exposed to saturating photosynthetic photon flux density PPFD ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and a fixed CO_2 concentration of $400 \mu\text{L L}^{-1}$, at all time using the mixer supplying industrial grade CO_2 (Vaisala, Helsinki, Finland). The cuvette was clamped onto six sun-exposed fully expanded leaves per treatments on three separate vines of each cultivar, and A_{\max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and stomatal conductance to water vapor, ($g_s \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured once stomatal conductance and CO_2 assimilation had been stable.

Vine water status. Every two days, at predawn (0300 to 0400 hrs), ψ_{PD} was determined on three fully expanded leaves by using a pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA) using industrial grade nitrogen to pressurize the chamber. At midday (1200 to 1300 hrs) on the same day, ψ_{MD} water potential was measured on the leaves used for photosynthesis and chlorophyll fluorescence measurements.

Berry sampling, morphology, anthocyanin and tannins assays. Beginning at start of veraison, veraison, ripeness (veraison + 3 weeks) and at harvest time 100-berry samples were sampled for well-watered and stressed treatments from Cot and Négrette grape cultivars. At harvest time, one sample composed about 1500 berries, were separated from the pedicel, weighed and divided into six mass categories: a = 0.50–0.75 g, b = 0.76–1.00 g, c = 1.01–1.25 g, d = 1.26–1.5 g, e = 1.51–1.75 g and f = 1.76–2.00 g.

From each size category, treatment and replication, 20 berries were randomly sampled and diameter was determined. The relationship between berry fresh mass and berry volume is shown in figure 2 (derived from diameter measurements assuming spherical fruit). Berries were sliced in halves with a razor blade, and seed and flesh were carefully removed from each berry-half using a small metal spatula, and without rupturing any pigmented hypodermal cells. Seeds were then carefully separated by hand from berry flesh. Both skin and seed were rinsed with deionised water, blotted dry and weighed.

The mean berry sizes for each treatment within a size category were similar. Therefore, any treatment differences that arose within a size category were not due to treatment differences in berry size within that category. From each size category, treatment and replication, a 20 berries sample was processed and subjected to anthocyanins and tannins analysis. Anthocyanin extraction was performed as described by Iland *et al.* (2000) and anthocyanins were analyzed using the reversed-phase HPLC method as described by Adams and Harbertson (1999). Compounds identification was based on retention times and UV spectra, anthocyanins were quantified using malvidin 3,5-diglucoside as a standard (BioChemika, Beilstein, Germany).

Tannin concentrations were determined in the berry, skin and seed extracts as described by Harbertson *et al.* (2002). Tannins concentrations were calculated from a standard curve that was generated with (+)-catechin hydrate (Sigma, Steinheim, Germany) and values were reported as

content (mg per berry) or concentration (mg per unit of berry, skin, and seed fresh weight) in catechin equivalents.

Data analysis and experimental design. The experimental design was a completely randomized layout ($n = 12$). Treatments were 12 vines well-watered and 12 vines water stressed per each grapevine cultivar. Data were analyzed using factorial analysis of variance (ANOVA 2-way) with treatment factors grape variety and water availability. Where significant treatment effects were identified using Student Newman Keuls Method and checked for significance at the probability $P \leq 0.05$ level using Sigmastat® 2.03 Statistical Software. KaleidaGraph® was used to determine relationships between parameters by means of regressions.

Results

Seasonal evolution of leaf water status and single-leaf gas exchange. Predawn leaf water potential (Ψ_{PD}) at start of the experiment indicates that grapevines were well-watered before stress started (Fig. 1A). Water was rapidly depleted in water stressed treatment. The trend was a decrease in water availability in pots until the end of the experiment. One week after the start of the stress treatment, Ψ_{PD} dropped to -0.40 and -0.43 MPa respectively for Cot and Négrette cultivars. Water stress seemed to be milder at véraison stage, but during ripeness until harvest time it was not too much severe, it dropped to -0.57 and -0.59 MPa respectively for Cot and Négrette. Midday leaf water potential (Ψ_{MD}) decreased significantly in stressed grapevines for the same cultivars at véraison stage until harvest (Fig. 1B). When all measurements for predawn Ψ_{PD} and midday leaf water potentials Ψ_{MD} were plotted together, they showed a high correlation ($R^2 = 0.75$).

Under water stress, maximum net CO_2 assimilation rate (A_{max}) readings taken at ripeness were 69 and 68% of the controls respectively for Cot and Négrette grape cultivars (Fig 1C); whereas at harvest, they were lower: 51 and 56 % respectively for Cot and Négrette. Négrette showed significantly lower A_{max} than Cot for well-watered treatment. Over 6 weeks of water limitation, A_{max} decreased by 58% of its initial maximum photosynthetic activity A_{max} in Cot cultivar, similar to the value for Négrette cultivar (54%). The final values for Cot and Négrette were not statistically different decreased only about

For both Cot and Négrette cultivars, maximum stomatal conductance (g_s) in stressed grapevines corresponded to 25% of the control at harvest time (Fig. 1D). Within each date during stress, g_s was always reduced under water stress treatment. Over water stress period, g_s was reduced by 82 and 80% for Cot and Négrette versus their initial levels. When we pooled all the data of g_s and Ψ_{PD} we found a high correlation $R^2 = 0.72$, this correlation is higher under water stress than for well-watered. Moreover, Négrette showed higher correlation than Cot cultivar: $R^2 = 0.99$ and $R^2 = 0.94$ respectively.

Water deficit and fruit growth at maturity.

Berry fresh mass. Water deficit in grape vines from Cot and Négrette cultivars inhibited berry growth, expressed in terms of mean fresh mass of berries. Assuming that berry has spherical form, we determined berry volume (i.e. $3/radius$ or $3/r$ where surface area = $4 \pi r^2$ and volume = $4/3 \pi r^3$). The relationship between berry fresh mass and berry volume is shown in figure (2), with a best fitted polynomial function ($R^2 = 0.94$ and $R^2 = 0.96$ respectively for the controls and water stressed grapevines of Cot and Négrette).

The frequency distribution of berry fresh mass among size categories was similar for stressed grapevines in Cot and Négrette cultivars. On average 33.5 and 36.8% of the berries respectively for Cot and Négrette were in the two median categories, 1.00-1.50 g (Fig. 3).

Berries smaller than 1.00 g represented 16 and 17% in well-watered Cot and Négrette cultivars respectively; while in stressed grapevines berries smaller than 1.00 g, were in higher proportions, 35.1 and 30.4% respectively for Cot and Négrette.

Seed growth. Cot cultivar showed generally lower seed number in average than Négrette for both controls and water stressed grapevines. Under water stress, seed number per berry was generally higher. For both Cot and Négrette cultivars, seed number was 1 for small berries and increased up to about 2.9 seed per berry for f category under water stress (1.76–2.00 g; Fig. 4A). Cot fresh mass per seed was significantly the lowest in different berry size categories, except f category (Fig. 4B). Total seed mass per berry varied significantly depending on berry fresh weight and drought treatment for Cot cultivar. Water stressed Négrette grapevines, showed significantly higher total seed mass than well-watered grapevines, except the largest category (Fig 4A). The lowest berries showed a higher variability between treatments for relative seed mass per berry. Relative seed mass per berry showed a significant correlation with berry fresh weight ($R^2 = 0.96$ and $R^2 = 0.82$ under water stress respectively for Cot and Négrette). Relative seed mass per berry represented in average 3.33 and 3.64% for Cot and Négrette respectively (Fig. 4B). In the largest berries, there was no difference neither between cultivars nor drought treatment.

Skin growth. Skin mass per berry was not constant but was linearly correlated to berry fresh weight in both seasons. Négrette showed higher correlations ($R^2 = 0.98$ well-watered and $R^2 = 0.99$ stressed) than Cot ($R^2 = 0.99$ well-watered and $R^2 = 0.93$ stressed) (Fig 6A). Skin tissues represented in average 13 and 15% of total berry fresh mass respectively for Cot and Négrette cultivars in the investigated categories (Fig 6B). There were no consistent differences between irrigation treatments with respect to skin mass per berry and grape variety within the same mass category. While, from the smallest to the largest berries skin mass increased about 75% in Cot and 182% in Négrette under water stress treatment, for a berry size increase of 3 folds.

Water deficit and phenolic composition during ripening period. The concentration of anthocyanin (mg/berry fresh wt.) and tannin content are shown in Figure 7. Anthocyanins concentration increased from the onset of vèraison to harvest in all treatments. As expected, accumulation of anthocyanins in berries started at vèraison and increased over the course of the ripening period in both cultivars (Fig. 8A). There was a significant difference in anthocyanin concentration between grape cultivars during ripening period, where Cot showed a higher kinetic of biosynthesis of anthocyanins than Négrette. Négrette showed higher anthocyanin concentration at start of vèraison but lower afterwards until harvest. Both Cot and Négrette showed statistically similar anthocyanin concentration at harvest time for well-watred and stressed treatments. During ripening period, water stress seemed to increase slightly anthocyanin concentration for Négrette cultivar.

Berry tannin content increased during ripening period for both cultivars start from vèraison to harvest time (Fig. 7B). Cot showed higher tannin content than Négrette during ripening. Water stress treatment increased tannin content for Cot and Négrette cultivars.

Water deficit and phenolic composition in relation to berry size.

Seed tannins and berry size. Seed tannin concentration expressed in mg catechin equivalent in terms of seed fresh weight decreased linearly with increasing berry size for both cultivars Cot and Négrette (Fig. 8A). There was a high correlation between seed tannin concentration and berry

fresh weight ($R^2 = 0.99$ and $R^2 = 0.96$ respectively for stressed Cot and Négrette grapevines). There was significant positive effect of water stress compared to the control on seed tannin concentration for Cot, whereas for Négrette there was a significant positive effect only in small berries (a and b categories). Seed tannin concentration varied more depending on berry size than water stress treatment for both Cot and Négrette cultivars.

Skin tannins and berry size. Skin tannins generally decreased linearly with increasing berry size for both cultivars Cot and Négrette (Fig. 8B). There was a high correlation between skin tannin concentration and berry fresh weight ($R^2 = 0.99$ and $R^2 = 0.93$ respectively for stressed Cot and Négrette grapevines). Obtained results showed that under water stress larger berries (d, e and f categories) had higher skin tannin concentration compared to the controls, in opposition to the lower berry sizes (a, b and c). However Négrette cultivar showed that water stress increased significantly skin tannin concentration only in small berries which belong to a, b and c categories.

Anthocyanins and berry size. Anthocyanin content per berry was positively correlated with berry size (Fig. 9C). Anthocyanin content per berry varied more with berry size than water stress treatment for both Cot and Négrette cultivars. Indeed, water stress presented a significantly higher content in larger berries for Négrette (d, e and f categories), and in intermediate categories for Cot (c and d categories). The linear correlation based on berry fresh weight (X) was for the controls (Anthocyanins: $y = 0.628 + 0.456 * X$ $R^2 = 0.966$ for Cot and $y = 0.44 + 0.105 * X$ $R^2 = 0.948$ for Négrette) and for water stress treatments (Anthocyanins: $y = 0.463 + 0.522 * X$ $R^2 = 0.985$ for Cot and $y = 0.387 + 0.185 * X$ $R^2 = 0.931$ for Négrette). The increase in anthocyanin content was less than the corresponding increase in berry fresh weight, the anthocyanins content increased with berry size at an average rate of 1.96 and 0.44 mg/g fresh weight for Cot and Négrette controls respectively and about 2.20 and 0.61 mg/g fresh weight for Cot and Négrette water stressed treatments respectively.

Discussion

Seasonal ecophysiological behavior of Cot and Négrette under water stress. The response of Cot and Négrette cultivars to water deficit observed to this study indicates that roots, rather than sensing the water status in pot, were responsive to the level of available water maintained in the pots of stressed grapevines, which corresponds to a gradual onset of such water stress likely to occur under field conditions. Predawn and midday leaf water potential can serve as indicators of water stress intensity and water status of grapevines (Williams and Araujo, 2002). In the present experiment, the lowest value of leaf water potential reached during the treatment in stress plant was -0.6 MPa before dawn and -1.7 MPa at midday. When roots reached equilibrium with dry substrate in pots, gas exchange parameters were more severely impaired. This is also explained in Fig (1).

Water stress is a limiting factor for a wide range of physiological processes in plants (Escolana *et al.*, 2002). Leaf water status and carbon uptake are under stomatal control. Stomata closure is one of the earliest responses to drought, resulting in protection of the plants against harmful dehydration but also inevitably results in reduction of CO₂ uptake by photosynthesis Flexas *et al* (2002). In this experiment, seasonal single-leaf gas-exchange data provided a consistent pattern of increased stomatal sensitivity in gradual water stressed vines.

Stomatal conductance responded reasonably well to water stress treatment, thus it may be used as a reliable vine water status indication (Intrigliolo and Castel, 2006). The relationships found between A_{max} and g_s for single-leaf data pooled on seasonal basis essentially supports the

assumption of [Escolana *et al.* \(1999\)](#) and [Flexas and Medrano \(2002\)](#) that under moderate stress leaf assimilation in grapevine is mostly controlled by partial and reversible stomatal closure.

Phenolic maturity during ripening under water stress. In our conditions, prior to the reduction of watering, the crop level was adjusted to the same number of bunches per plant in all treatments. Yield differences between well-watered and water stressed were significant (data not shown). This means that berry growth was affected by the water stress imposed during ripening. This may be explained by acknowledging that although water deficit may have stimulated post-veraison skin growth, it is more likely that expansive growth of the inner mesocarp was inhibited to a greater degree by water deficit than skin tissue itself ([Roby and Matthews, 2004](#), [Matthews and Schakel, 2005](#)). Consequently, water stress treatment increased anthocyanin concentration and tannin content during ripening period (Fig. 8). These results are in agreement with those obtained by other authors ([Esteban *et al.*, 2001](#); [Roby *et al.*, 2004](#); [Salón *et al.*, 2005](#)). A continuous increase of anthocyanin concentration and tannin content was observed from start of veraison to harvest, reflecting a continuous biosynthesis of these phenolic compounds in the skins at a rate higher enough to offset the dilution effect of increasing berry weight. Anthocyanins, which account for half or more of the total polyphenols, are indirectly responsible for the overall increase in polyphenols in the skins of red grape cultivars ([Adams 2006](#)). It has been reported that phenolic biosynthesis for ‘Shiraz’ cultivar during water deficit could also be limited ([Ojeda *et al.*, 2002](#)). These authors concluded that there were two types of responses to water deficit: an indirect and positive response due to the effect of berry mass reduction (a concentration effect), and a direct response on phenolic biosynthesis that can be either positive or negative, depending on the type of phenolic compounds, the degree of water deficit, and the period during which is applied. [Castellarin *et al.*, \(2007\)](#) showed that early and late season water deficits, applied before or after the onset of ripening Cabernet sauvignon berries, increased anthocyanin accumulation after veraison. Expression profiling revealed that the increased anthocyanin accumulation resulted from earlier and greater expression of the genes controlling flux through the anthocyanin biosynthetic pathway, including F3H, DFR, UFGT and GST ([Castellarin *et al.*, 2007a](#)).

Morphology of Cot and Négrette berry growth under water stress.

This study is an attempt to define on Cot and Négrette cultivars first the interrelations between berry size at harvest and fresh mass distribution between seed, skin, and flesh tissues; and second to evaluate the role of fruit size and water availability on these aspects of fruit composition. Thus first, we adopted the variation in berry fresh mass and the mass-size categories to much the variation in berry volumes. This one, based on Cot and Négrette linear relationships between berry volume (based on diameters) as a function of fresh mass (direct measurements) for controls ($R^2 = 0.94$) and under water stress treatment ($R^2 = 0.96$), is in accordance with results presented by [Roby and Matthews \(2004\)](#) on Cabernet Sauvignon grape cultivar. Water stress affected significantly relative distribution of berry size categories. Under water stress, berries smaller than 1.00 g represented 219 and 178% of the controls for respectively Cot and Négrette cultivars. Cot berry growth seemed to be more sensitive than Négrette to water stress after veraison. Distribution of fresh mass in mature berries varied depending on the grape cultivar. For Cot, seed represented around 3%, skin around 13%, and flesh about 84%. For Négrette, seed showed that seed represented around 4%, skin around 15% and flesh around 81%. Exact proportion varied according to berry size category.

Our results show that skin mass is positively correlated with berry mass in all treatments, increasing 2 folds for Négrette and 1 folds for Cot as whole berry mass increased approximately 3 folds from 0.625 to 1.875 g/berry. Under water stress this increase is lower than the well-watered controls for both cultivars. For most berry sizes, relative skin mass (% berry fresh mass) ranged between 8.87 and 16.08 for Cot and between 11.23 and 16.42 for Négrette. However, for most berry sizes, well-watered Négrette had slightly higher relative skin mass than Négrette water stressed and than both well-watered and stressed Cot treatments. Accordingly, [Roby *et al.*, \(2004\)](#) suggested that upon exposure to late season water deficits exocarp is less sensitive growth than mesocarp.

As the increase in total seed weight per berry, depending on the berry size, was more important than the decrease in seed tannin concentration (mg catechin eq./ seed fresh wt.) tannin content (mg/berry) increased with berry size. Under water stress, for both Cot and Négrette cultivars, seed tannin concentration (per seed fresh wt.) decreased by 69 and 60% respectively from the smallest berries to the largest berries, however for the controls it decreased respectively by 65 and 58% for Cot and Négrette. Similar results have been reported by [Roby and Matthews \(2004\)](#) on Shiraz cultivar. Among size categories, seed tannin concentration varied more with berry size category rather than with water stress treatment. Our results indicate that water deficit accelerated the rate of decline during fruit ripening. Similar results have been reported the effect of environmental factors on the decrease in the concentration of seed tannin ([Harbertson *et al.*, 2002](#); [Kennedy *et al.*, 2001, 2002](#)).

As seed tannin concentration, skin tannin concentration decreased also with berry size. As skin mass was less sensible to water stress treatment among berry size categories, skin tannin content per berry variation was more affected by the cultivar than the drought treatment. Skin anthocyanin content showed a positive linear correlation with berry size ($R^2 = 0.96$ for Cot and $R^2 = 0.94$ for Négrette). Under water stress treatment, the relative increase in skin anthocyanin content was 1.24 mg/g berry fresh wt. for Cot and only 0.70mg/g berry fresh wt. for Négrette. Our results report subtle difference first between skin tannins and skin anthocyanin, and second between cultivars for these two phenolic parameters. [Roby and Matthews \(2004\)](#) reported that primary mechanism by which water deficit increased skin tannin and anthocyanin concentrations is probably a direct stimulation of biosynthesis and related to the differential growth responses of skin and inner mesocarp tissue ([Roby *et al.*, 2004](#)). Different lines of evidence suggest that water stress increased total anthocyanin content by the up-regulation of most flavonoid biosynthetic genes and, in particular, of UFGT, CHS2, CHS3 and F3H, which explain well the metabolite changes in water, stressed fruits ([Castellarin *et al.*, 2007b](#)). Mainly the Myb5a transcription factor which has been shown to generally affect the expression of several structural genes of the flavonoid pathway ([Deluc *et al.*, 2006](#)) and the transcription factor MybC ([Kobayashi *et al.*, 2002](#)) are up-regulated in water stressed berry skins at véraison and soon after véraison until harvest, respectively.

Conclusions

This work is the first attempt to study relations between water stress, photosynthesis, berry size and phenolic composition for Cot and Négrette grape cultivars. Our results suggest that there is a close link between water availability and grape quality at harvest, through water stress effects on photosynthesis and phenolic biosynthesis. Our results showed that water stress affected berry size, seed, skin and flesh relative proportions. Based on berry size variation, Cot and

Négrette cultivars showed different sensitivity to water stress. Thus the most important changes in fruit composition that develop in response to drought arise simply from resultant changes in berry size. The different responses observed in Cot and Négrette suggest that ecophysiological and berry quality regulation is depending on the grape cultivar.

Acknowledgements: The work was supported by “Commission Viti-Vinicole de Midi-Pyrénées, France”. The authors gratefully acknowledge Dr. Mohamed BRAHAM, I.O. Institute for his collaboration in this experiment. We thank also Walid FEKIRI for technical assistance. We are indept tp professor Vitale NUZZO for valuable comments and suggestions in the manuscript

Literature cited

- Adams, D.O. & Harbertson, J.F., 1999. Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 247-252.
- Adams, D.O., 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 249-256.
- Attia, F., Ibrahim, H., Cadet, A. & Garcia, M., 2004. Evaluation of leave, must and wine cation contents and of must and wine acidity of five red wine grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) grafted onto 3309 Couderc and grown hydroponically. *Acta Horticulturae* 652, 255-263.
- Castellarin, S.D., Matthews, M.A., Di Gaspero, G. & Gambetta G.A., 2007a. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating favonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 10.1007/s00425-007-0598-8.
- Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E., & Di Gaspero, G., 2007b. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell and Environment* 30, 1381-1399.
- Cifre, J., Bota, J., Escalona, J.M., Medrano, H. & Flexas, J., 2005. Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L.) an open gate to improve water-use efficiency?. *Agric. Ecosystems & Environment* 106, 159-170.
- Coombe, B.G., 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine R.* 1, 100-110.
- De Souza, C.R., Maroco, J.P., Santos, T.P., Rodriguez, M.L., Lopes, C.M., Pereira J.S. & Chaves, M.M., 2003. Partial rootzone drying: regulation of stomatal and carbon assimilation in field grown grapevines (*Vitis vinifera* L. Moscatel). *Funct. Plant Biol.* 30, 653-662.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Merillon, J.M. & Hamdi, S., 2006. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.* 140, 499–511.
- Dos Santos, T.P., Lopes, C.M., Rodrigues, M.L., de Souza, C.R., Maroco, J.P., Pereira, J.S., Silva, J.R. & Chaves, M.M., 2003. Partial rootzone drying: effects on growth and fruit quality of field-grown grapevines (*Vitis vinifera*). *Funct. Plant Biol.* 30, 663-671.
- Douanes, 2004. Potentiel viticole du basin Sud-Ouest: récolte 2004.
- Escalona, J., Flexas, J. & Medrano, H., 2002. Drought effects on water flow, photosynthesis and growth of potted grapevine. *Vitis.* 41, 57-62.
- Escalona, J.M., Flexas, J. & Medrano, H., 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 421-433.

- Esteban, M.A., Villanueva, M.J. & Lissarrague, J.R., 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agric.* 81, 409-420.
- Flexas, J. & Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. *Annals of Botany.* 89, 183-189.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B. & Medrano, H., 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.* 29, 461-471.
- Girona, J., Mata, M., del Campo, J., Arbonés, A., Bartra, E. & Marsal, J., 2006. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irrigation Science.* 24, 115-127.
- Harbertson, J.F., Kennedy, J.A. & Adams, D.O., 2002. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:54-59.
- Hardie, W. J. & Considine, J.A., 196. Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development. *Am. J. Enol. Vitic.* 27, 55-61.
- Ibrahim, H.: Genèse et évolution des acides organiques dans les feuilles, les baies, les moûts et les vins des cépages Cot et Négrette (*Vitis vinifera* L.) (in French). Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Iland, P., Ewart, A., Sitters, J., Markides, A. & Bruer, N., 2000. Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown, Adelaide, Australia.
- Intrigliolo, D.S. & Castel, J.R., 2006. Vine and soil-based measures of water status in a tempranillo vineyard. *Vitis* 45:157-163.
- Kennedy, J.A, Matthews, M.A. & Waterhouse, A.L., 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavanoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 268-274.
- Kennedy, J.A., Troup, G.L., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G. & Jones, G.P., 2001. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine R.* 6, 244-254.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. & Honda, C., 2002. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 215, 924-933.
- M.A. Esteban, M.J. Villanueva & Lissarrague, J.R., 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agric.* 81, 409-420.
- Matthews, M.A. & Anderson, M.M., 1989. Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 52-60.
- Matthews, M.A. & Shackel K.A., 2005. Growth and water transport in fleshy fruit. In, *Vascular Transport in Plants*, N.M. Holbrook and M.A. Zwieniecki (Eds.), pp 181-197.
- Matthews, M.A., Anderson, M.M. & Schultz, H.R., 1987. Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis* 26, 147-160.
- Medrano, H., Escalona, J.M., 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, *Funct. Plant Biol.* 30, 607-619
- Myburgh, P.A. & Howell, C.L., 2006. Water relations of *Vitis vinifera* L. cv. Sunred seedless in response to soil water depletion before harvest. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 196-200.
- Myburgh, P.A., 2003. Responses of *Vitis vinifera* Sultanina to level of soil water depletion under semi-arid conditions. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24, 16-24.

- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A. & Deloire, A., 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 261-267.
- Perez-Magarin, S.S. & Gonzalez-San Jose, M.L., 2006. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 96, 197-208.
- Roby, G. & Matthews, M.A., 2004. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 74-82.
- Roby, G., Harbertson, J.F., Adams, D.O. & Matthews, M.A., 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 100-107.
- Salón, J.L., Chirivella, C. & Castel, J.R., 2005. Response of cv. Bobal to timing of deficit irrigation in Requena, Spain: water relations, yield, and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 56:1-8.
- Scholander, P.F., Hemmingsen, E. & Gary, W., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339-346.
- Williams, L.E. & Araujo, F.J., 2002. Correlations among predawn leaf, midday leaf, and midday stem water potential and their correlations with other measures of soil and plant water status in *Vitis vinifera*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127, 448-454.

Figures

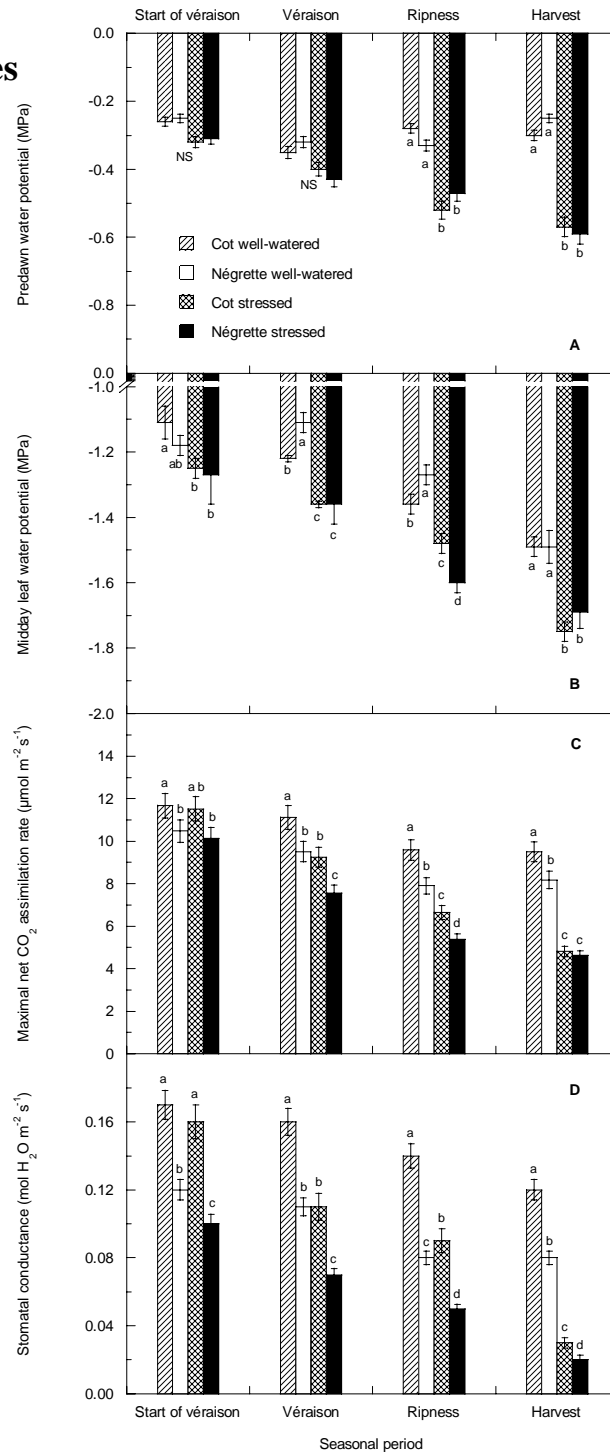


Figure 1 Seasonal variation in predawn water potential Ψ_{PD} (A), midday leaf water potential Ψ_{MD} (B), maximal net CO_2 assimilation rate A_{max} (C), and stomatal conductance g_s (D) for Cot and Négrette grape cultivars subjected to well-watered and stressed treatments. Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 ($n = 6$). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

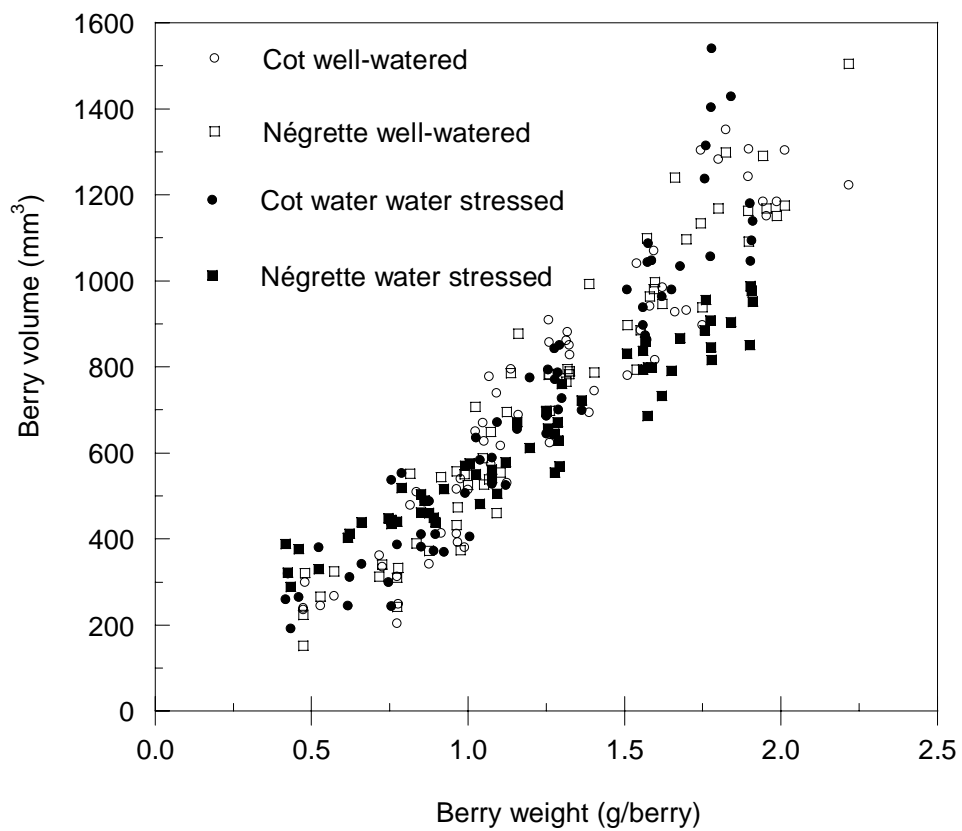


Figure 2 Berry volume (calculated from diameters) at harvest as a function of measured fresh mass for Cot and Négrette grape cultivars subjected to well-watered (Control) and water stress treatments. Means of two successive growing seasons 2005 and 2006.

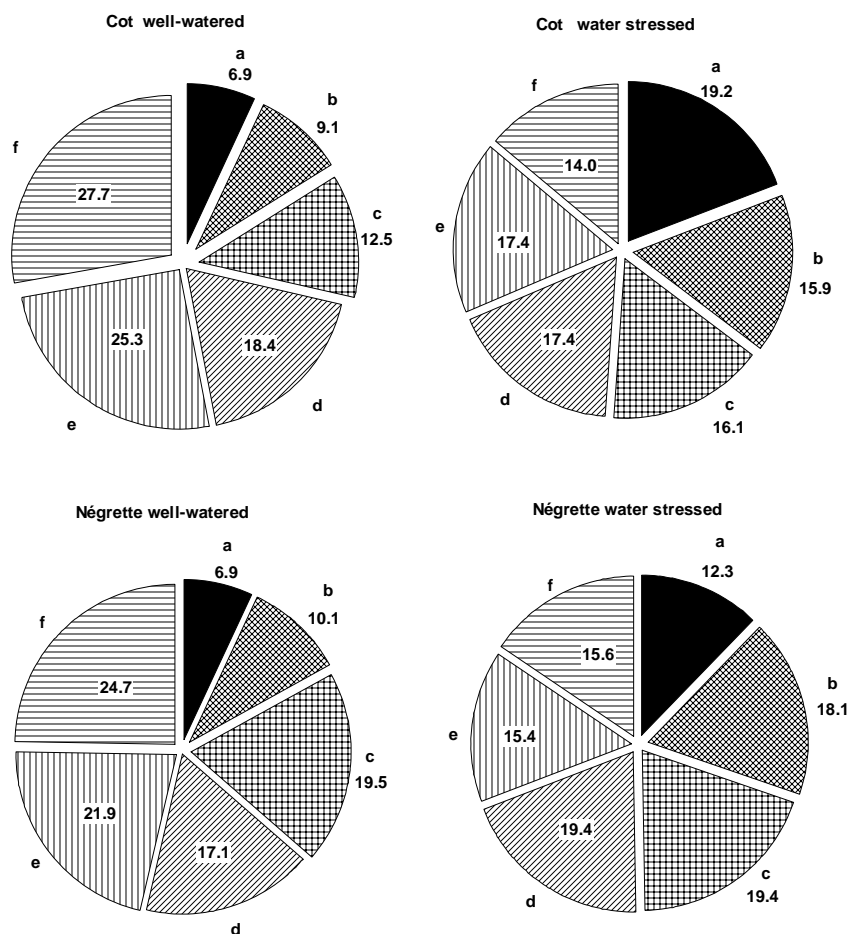


Figure 3 Frequency distribution (% of sample population) for berry size in fruit from Cot and Négrette grapevines subjected to two irrigation treatments (well-watered and water stressed). Berry size categories are indicated where: a = 0.50-0.75; b = 0.76-1.00; c = 1.01-1.25; d = 1.26-1.50; e = 1.51-1.75 and f = 1.76-2.00 g. Populations for each treatment were sampled from three replicate of three grapevines. Means of two successive growing seasons.

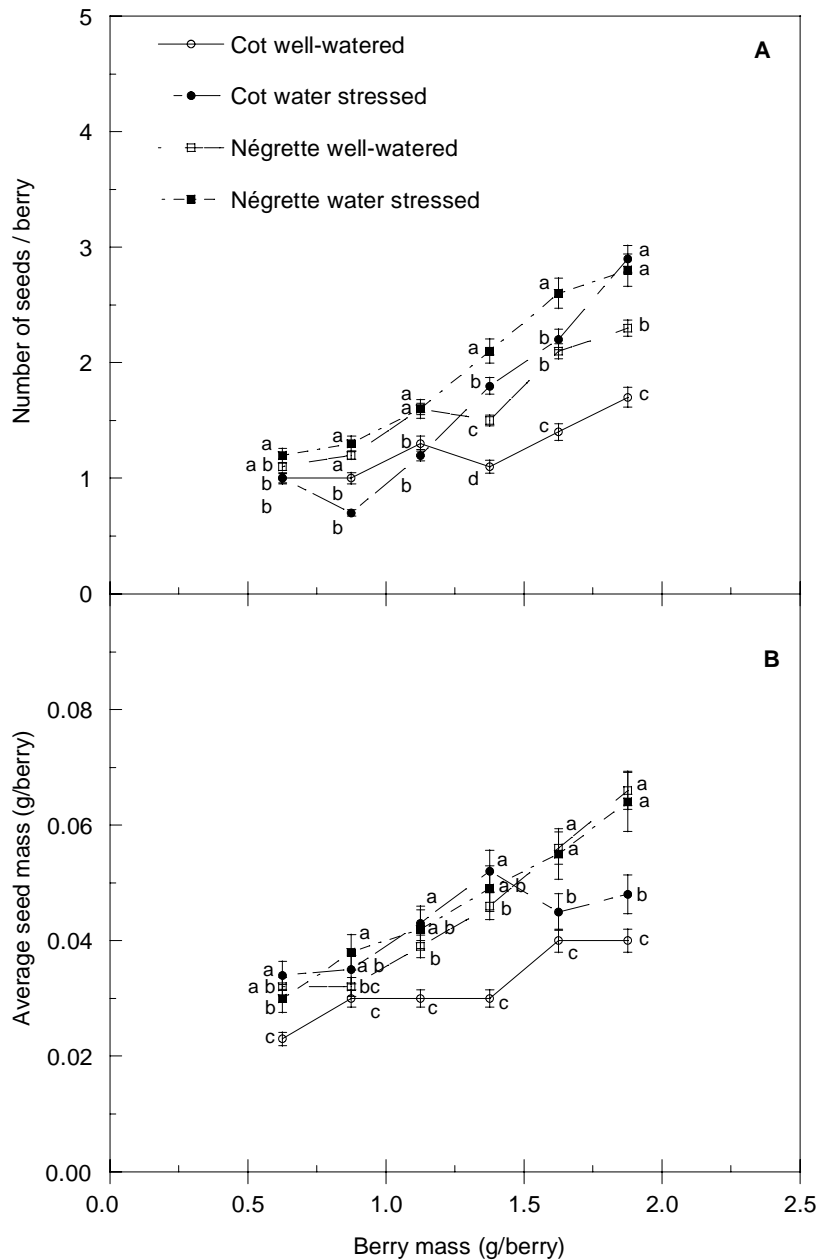


Figure 4 Variation in seeds number per berry (A) and seed size (average seed mass per berry (g) B) in six different berry size categories (indicated as berry mass (g)) from Cot and Négrette grapevines subjected to two treatments (well-watered and water stressed). Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 ($n = 6$). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

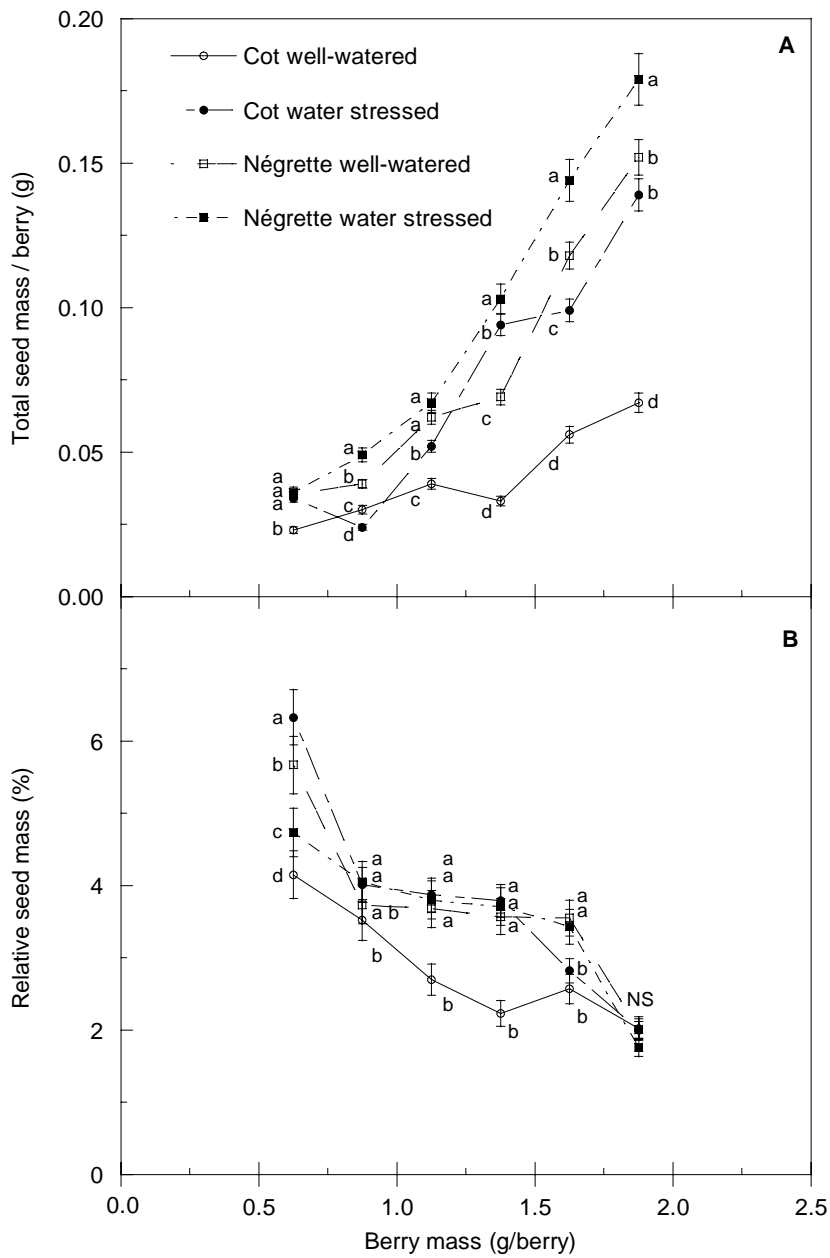


Figure 5 Variation in total seed mass (A) and relative seed mass (B), of berries from Cot and Négrette grapevines well-watered and subjected to water stress treatments. Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 ($n = 6$). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

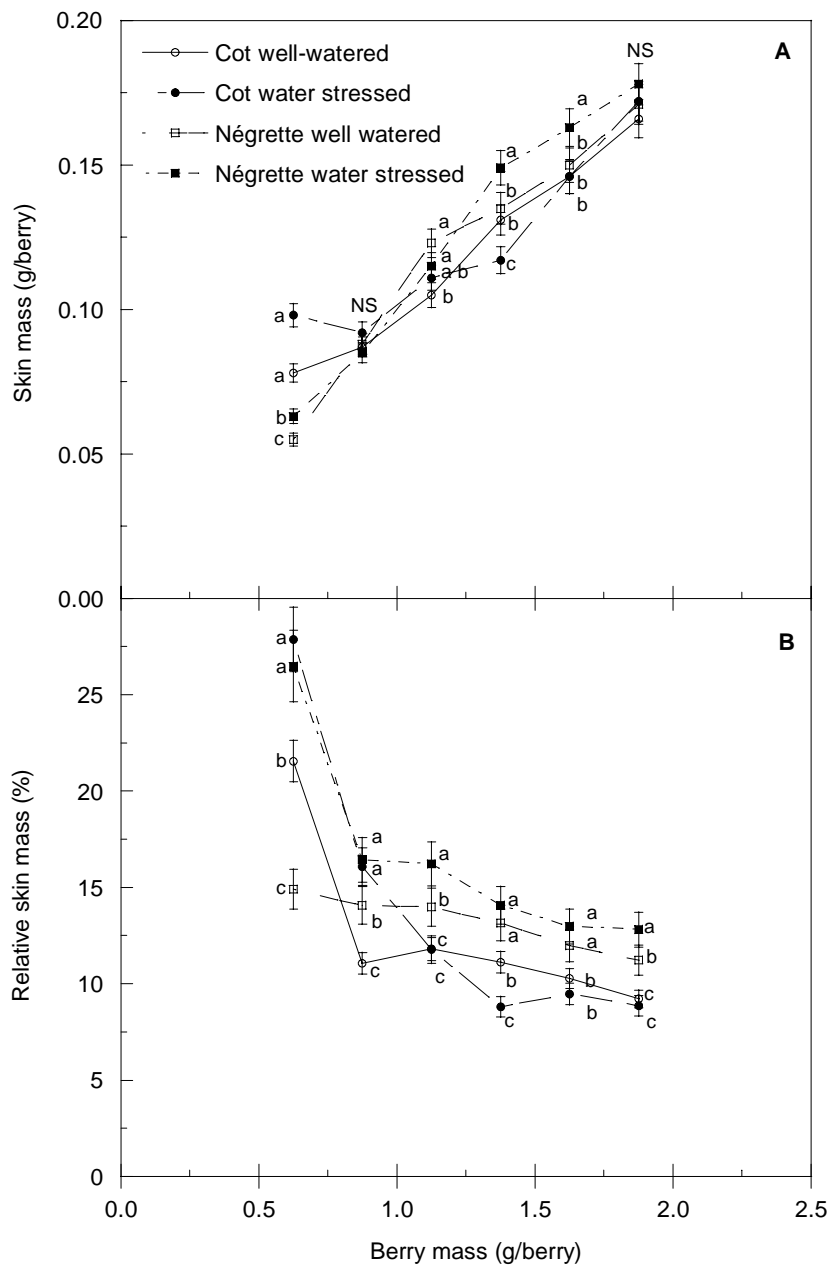


Figure 6 Variation in skin mass (A) and relative skin mass (B) of berries from Cot and Négrette grapevines well-watered and subjected to water stress treatments. Each data point is mean \pm S.E of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006. (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

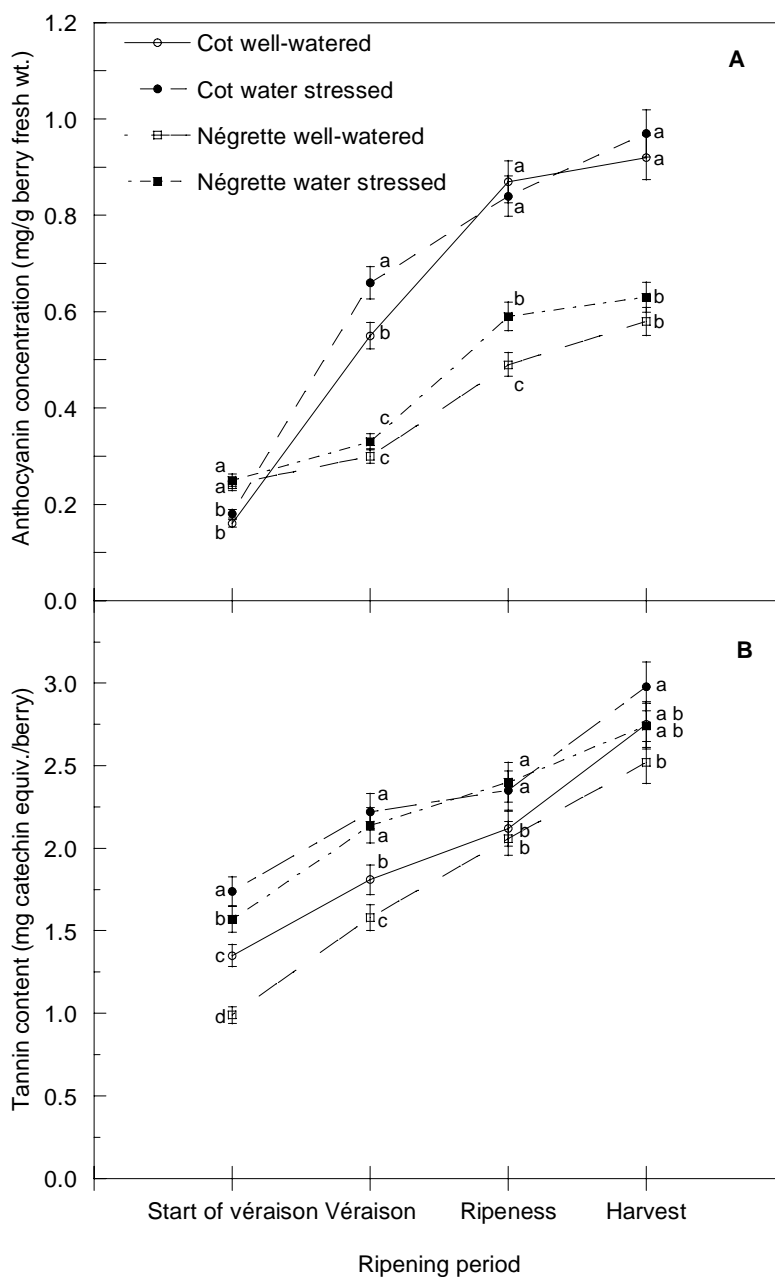


Figure 7 Evolution of anthocyanin concentration (A) and tannin content (B) in different berry size categories from Cot and Négrette grapevines well-watered and subjected to water stress treatments during ripening period. Each data point is mean \pm S.E of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006. (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

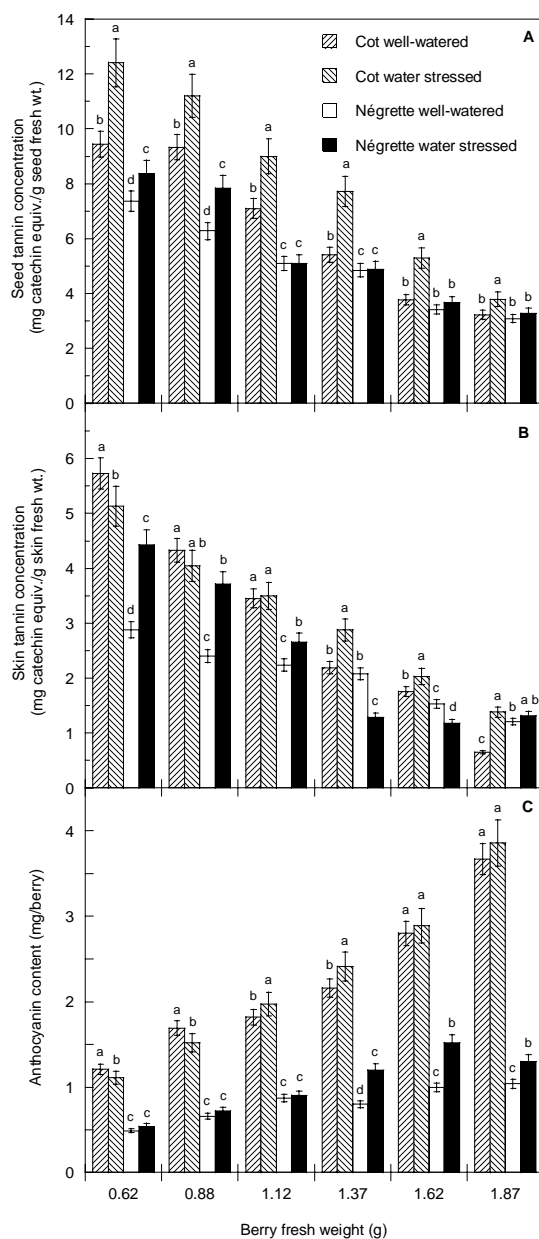


Figure 8 Concentration of seed tannin (A), skin tannin (B), and anthocyanin content in different berry size categories from Cot and Négrette grapevines at harvest for both water treatments (well-watered and water stress). Each data point is mean \pm S.E of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 ($n = 6$). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

Effects of water availability from leaf photosynthesis to grape phenolic maturity of Tannat and Duras grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.).

Faouzi Attia¹, François Garcia², Fethi Ben Mariem³, Vitale Nuzzo⁴, François Dedieu⁵, Thierry Lamaze⁶ and Marc Garcia¹

¹ *Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées, Institut National Polytechnique de Toulouse ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole BP32607, 31326 Castanet Toulouse, FRANCE*

² *Centre de Formation et de Recherches en Œnologie, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1 - 15 Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, FRANCE.*

³ *Laboratoires des Systèmes des Production Arboricoles, Institut de l'Olivier, Rue Ibn Khaldoun; BP14; 4061 Sousse TUNISIE.*

⁴ *Universita' degli Studi della Basilicata Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell'Ambiente Viale dell'Ateneo Lucano, 10 85100 Potenza ITALIE.*

⁵ *Université Paul sabatier Toulouse III – 118 Route de Narbonne 31062 Toulouse, France*

⁶ *Université Paul Sabatier, Centre d'Etudes Spatiales de la Biosphère, 18 Avenue Ed. Belin - bpi 2801 ; 31401 Toulouse, FRANCE.*

¹ To whom reprint requests should be addressed. E-mail address: faouzi.attia@ensat.fr

AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE (AJEV)
American Society for Enology and Viticulture (U.S.A.)

To be submitted in December 2007

EFFECTS OF WATER AVAILABILITY FROM LEAF PHOTOSYNTHESIS TO GRAPE PHENOLIC MATURITY OF TANNAT AND DURAS GRAPEVINE CULTIVARS (*Vitis vinifera* L.).

Abstract: Our study focuses on the physiological responses and berries phenolic maturity of Tannat and Duras red wine grape cultivars, which are autochthonous from the southern France, under water stress condition from pre-véraison to harvest by limiting water availability to 30% of the control well-watered. Predawn and midday leaf water potentials served as an indicator to maintain water stress level compared to the control. The seasonal reduction of leaf maximum assimilation rate (A_{max}) under water stress over 6 weeks stress period versus well-watered was 60% for Tannat and Duras as compared to 64 and 46% for leaf stomatal conductance (g_s) for Tannat and Duras cultivars respectively. Diurnal courses of gas exchange parameters suggest a near-isohydric behavior for both Tannat and Duras. These responses qualify Tannat as a good candidate for adapting to limited water availability. For both Tannat and Duras cultivars, relationships between the fresh mass, skin, and flesh in six different berry size categories, ranged from about 0.5 to 2.0 g, were assessed on ripe fruit from grapevines subjected to well-watered and water stressed treatments. Fresh mass components for both treatments varied significantly depending on the grape cultivar and water availability. Tannat showed that seed represented around 6%, skin around 12%, and flesh about 82% of the berry total fresh weight. The Duras cultivar showed that seed represented around 3%, skin around 12% and flesh around 85%. Exact proportion of seed, skin and flesh varied according to berry size category. There was an increase in total seed mass per berry to water stress treatment. Anthocyanin content and the seed tannin concentration varied depending on the grape variety and water stress treatment. In comparison with skin tannin or anthocyanin content, seed tannin varied more with berry size and less with vine water status. Tannat variety showed a positive effect of water stress on anthocyanin content but not Duras. Alast, seed and skin tannin concentrations decreased with berry fresh weight.

Key words: *Vitis vinifera*, maximum assimilation rate, stomatal conductance, water stress, fruit growth, berry size, anthocyanins, tannins.

Introduction

Vitis vinifera L. is relatively tolerant to water deficit. Limited water availability has been used advantageously to inhibit vine growth without fruit yield reductions and to make measurable improvements in grape quality (Esteban et al. 2001; Salón et al. 2005, Sivilotti et al. 2005, Reynolds et al. 2007). A connection from vine water status to fruit composition to differences in wine composition and sensory attributes was established by Matthews et al. (1990). Indeed, vine water deficits generally lead to smaller berries and changes in fruit and wine compositions (Bravdo et al. 1985, Kennedy et al. 2002). Berry size is widely acknowledged as a factor determining wine grape quality, anthocyanins and other phenolic compounds that contribute to red wines their unique characteristics accumulate in the skin (Coombe et al. 1987). More specifically, under water stress, there is an increase in total phenolic and anthocyanin contents in fruit, the major components of the “sensory” characteristics of wine, resulting in improved aroma, color and flavor (Matthews et al. 1990, Chapman et al. 2005), as well as enhanced health benefits conferred by polyphenolic compounds with antioxidant activity (German and Walzem 2000; Dixon et al. 2005). Late season water deficit can result in ripe fruit with more skin and seed

tissues (relative to whole-berry fresh mass) compared with well-watered control fruit (Roby et al. 2004).

The best management practices permit to optimize a complex task as the equilibrium between vine productivity and wine quality; where water availability management is an important component (Poni et al. 2007). At the best of our knowledge, no information was published in the literature on the physiological responses of Tannat and Duras cultivars (utilized to produce high quality wines) to water stress and about berries growth and composition under limiting water availability. Hence, the question arises for these autochthonous cultivars whether the most important changes in fruit composition that develop in response to drought arise simply from resultant changes in berry size.

Accordingly, we carried out an experimental study on Tannat and Duras grapevine cultivars under water stress in controlled conditions. We monitored gas exchange, fruit growth and phenolic composition changes to gradual application of water-deficit starting in pre-véraison and ending at arvest time to reproduce the gradual onset of such stresses likely to occur under field conditions. Moreover, this study was conducted also on these two cultivars to define first the interrelations between berry size at harvest, and fresh mass distribution between seed, skin, and flesh tissues; and second to evaluate the roles of fruit size and water availability on these aspects of fruit composition that are of immediate interest in winemaking.

Materials and Methods

Plant material. A hydroponic culture experiment was carried out during two successive growing seasons (2005 and 2006) on five-year old grapevines Tannat and Duras, autochthonous widely spread grape cultivars utilized to produce high quality wines in southern France, and grafted onto 3309 Couderc (3309 C) rootstock. Grapevines were grown in 40 L pots filled with pozzolana (3-15 mm diameter volcanic rock fragments, 19% water holding capacity). All the grapevines were irrigated with standard nutrient solution (Ibrahim 2001, Attia et al. 2004). The experiment was carried out in controlled conditions in a glasshouse in Toulouse (southern France, latitude 43°32'14.50N; longitude 1°29'44.25W; altitude 148 m). The environmental conditions were 26/30-16/20 day/night temperature, photosynthetic photon flux density (PPFD) of 1200-1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; natural photoperiod (14/10 h) light/dark cycle, and relative humidity between 65 and 70%. Each potted vine was trained to four vertical shoots. All axillary later shoots were excised during shoot development.

Four phenological growth stages of the grapevine were assessed, which are berries began to colour and enlarge the first, berries at véraison which corresponds to stage 36 of the modified E-L System according to Coombe (1995) the second, the third is ripeness stage in which berries have intermediate Brix values, and the last at harvest time which corresponds to the stage 38 E-L System.

Drought treatment. Water stress was imposed at start of véraison (phenological stage 35 E-L system) by decreasing the irrigation volume from 100% well-watered (control) to 30% of the control (drought stressed). This restriction was chosen between three restriction levels previously tested during 2004 growing season. Plant water status was monitored every two days from véraison to the end of the experiment (harvest) by measuring predawn (ψ_{PD}) and midday leaf water (ψ_{MD}) potentials with a pressure chamber according to Scholander et al. (1965). Predawn leaf water potential in the controls was maintained higher than -0.3 MPa, while in the stressed vines was maintained lower than -0.5 MPa (Matthews et al. 1987, Girona et al. 2006).

Gas exchange measurements. Single leaf gas exchange measurements were coupled with measurements of leaf chlorophyll fluorescence. Maximum net assimilation rate (A_{\max}) was measured using a portable gas exchange analyzer (LI-6400, LICOR, Lincoln, Nebr. USA) which was equipped with a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF) placed at the top of the leaf chamber. Measurements were taken on the sunny side of the rows at mid-morning and mid-afternoon. At each time ambient temperature and relative humidity were first measured and conditions within the sample chamber were then set to mimic the ambient conditions as closely as possible. The sample leaf was placed in the cuvette that was maintained at ambient temperature and humidity, and exposed to saturating photosynthetic photon flux density PPF (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and a fixed CO_2 concentration of 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, at all time using the mixer supplying industrial grade CO_2 (Vaisala, Helsinki, Finland). The LI-6400 cuvette was clamped onto six sun-exposed fully expanded leaves per treatments on three separate vines of each cultivar, and A_{\max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and stomatal conductance to water vapour, (g_s mol $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were measured once stomatal conductance and CO_2 assimilation had been stable.

Vine water status. Every two days, at predawn (0300 to 0400 hrs), ψ_{PD} was determined on three fully expanded leaves by using a pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA) using industrial grade nitrogen to pressurize the chamber. At midday (1200 to 1300 hrs) on the same day, ψ_{MD} water potential was measured on the leaves used for photosynthesis and chlorophyll fluorescence measurements. Diurnal course of leaf water potential (ψ_{Leaf}) was measured every two hours from 0600 until 2000 hr.

Berry sampling, morphology, anthocyanin and tannins assays. Beginning at start of véraison, véraison, ripeness (véraison + 3 weeks) and at harvest time 100-berry samples were sampled for well-watered and stressed treatments from Tannat and Duras grape cultivars. At harvest time, one sample composed about 1500 berries, were separated from the pedicel, weighed and divided into one of the six mass categories: a = 0.50–0.75 g, b = 0.76–1.00 g, c = 1.01–1.25 g, d = 1.26–1.5 g, e = 1.51–1.75 g and f = 1.76–2.00 g.

From each size category, treatment and replication, 20 berries were randomly sampled and diameter was determined. The relationship between berry fresh mass and berry volume is shown in figure 3 (derived from diameter measurements assuming spherical fruit). Berries were sliced in halves with a razor blade, and seed and flesh were carefully removed from each berry-half using a small metal spatula, and without rupturing any pigmented hypodermal cells. Seeds were then carefully separated by hand from berry flesh. Both skin and seed were rinsed in deionised water, blotted dry and weighed.

The mean berry sizes for each treatment within a size category were similar. Therefore, any treatment differences that arose within a size category were not due to treatment differences in berry size within that category. From each size category, treatment and replication, a 20 berries sample was processed and subjected to anthocyanin and tannins analysis. Anthocyanin extraction was performed as described by Iland et al. (2000) and anthocyanins were analyzed using the reversed-phase HPLC method as described by Adams and Harbertson (1999). Compound identification was based on retention times and UV spectra. Anthocyanins were quantified using malvidin 3,5-diglucoside as a standard (BioChemika, Beilstein, Germany).

Tannin concentrations were determined in the berry, skin and seed extract as described by Harbertson et al. (2002). Tannins concentrations were calculated from a standard curve that was generated with (+)-catechin hydrate (Sigma, Steinheim, Germany) and values were reported as content (mg per berry) or concentration (mg per unit of berry, skin, and seed fresh weight wt.) in catechin equivalents.

Data analysis and experimental design. The experiment design was a completely randomized plan ($n = 12$). Treatments were 12 vines well-watered and 12 vines water stressed per each grapevine cultivar. Data were analyzed using factorial analysis of variance (ANOVA 2-way) with treatment factors grape variety and water availability. Where significant treatment effects were identified using Student Newman Keuls Method and checked at probability ($p \leq 0.05$) level using Sigmasat® 2.03 Statistical Software. KaleidaGraph® was used to determine relationships between parameters by means of regressions.

Results

Seasonal evolution of leaf water status and single-leaf gas exchange. Predawn water potential (Ψ_{PD}) at start of the experiment indicates that grapevines were well-watered before stress started (Fig. 1A). Water was rapidly depleted in water stressed treatment. The trend was a decrease in water availability in pots until the end of the experiment. One week after the stress treatment, Ψ_{PD} for stressed plants was significantly different from well-watered grapevines; it dropped to -0.23 and -0.33 MPa respectively for Tannat and Duras cultivars. Water stress seemed to be milder at véraison stage, but during ripeness until harvest time it was not too severe, it dropped to -0.58 and -0.57 MPa for Tannat and Duras respectively. When all measurements for predawn and midday leaf water potentials (Ψ_{MD}) plotted together, they showed a high correlation ($R^2 = 0.68$). Thus at harvest time, for stressed treatments Tannat showed higher correlation than Duras between Ψ_{PD} and Ψ_{MD} ($R^2 = 0.89$ and $R^2 = 0.76$ respectively) (Fig. 1B).

Under water stress, maximum net CO₂ assimilation rate (A_{max}) readings taken at ripeness and harvest were 60% of the controls for Tannat grape cultivar (Fig 1C). Duras showed significantly lower A_{max} than Tannat for well-watered and stressed treatments. The measurements taken for Duras grapevines subject to water stress treatment at ripeness and harvest were respectively 76 and 54% of the controls. Duras seemed to be more sensitive to water stress, over 6 weeks of water limitation, A_{max} decreased by 53% of its initial maximal photosynthetic activity however A_{max} for Tannat cultivar decreased only about 42%.

Maximum stomatal conductance (g_s) in stressed grapevines was respectively for Tannat and Duras cultivars 64 and 46% of the controls at harvest time (Fig. 1D). Within each date during stress, g_s was always reduced under water stress treatment but not significantly only at start of véraison. Over water stress period, g_s was reduced by 35 and 61% respectively for Tannat and Duras versus their initial levels. This confirmed that Duras gas-exchange parameters were more affected by water stress than Tannat ones.

Diurnal evolution of water status and single-leaf gas exchange. Diurnal single leaf gas-exchange trends evaluated at 2 h intervals on (day 4 of stress week 4) showed a strong daytime effect. At diurnal daytime, stressed grapevines for Tannat and Duras showed significantly different leaf water potentials compared to their controls (Fig. 2A). The diurnal time course of A_{max} for Tannat well-watered grapevines showed a significant difference compared to stress treatment except at midday. For Duras cultivar, A_{max} varied significantly, except at 8:00 hrs (Fig. 2B). Stomatal conductance (g_s) showed a pattern similar to that of A_{max} (Fig. 2C), but for Duras grapevines it decreased drastically starting from 10:00 hr, with a recovery at mid-afternoon (increased until 16:00 hr and decrease afterwards until 20:00 hr). Well-watered Tannat grapevines showed g_s recovery behavior at mid-afternoon similar to that of stressed Duras grapevines. Stomatal conductance for both Tannat and Duras cultivars were significantly reduced during the day; except Duras at 20:00 hr. As the atmospheric vapor pressure deficit was high in

the afternoon, a higher fraction of g_s values fell below $0.05 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ threshold. Assimilation rate and stomatal conductance showed a close correlation on a diurnal basis ($y = 31.24 + x^{0.426} R^2 = 0.75$ for Tannat and $y = 17.33 + x^{0.26} R^2 = 0.86$ for Duras).

Water deficit and fruit growth at maturity.

Berry fresh mass. Water deficit in grape vines from Tannat and Duras cultivars inhibited berry growth, expressed in terms of mean fresh mass of berries. Assuming that berry has spherical form, we determined berry volume (i.e. $3/\text{radius}$ or $3/r$ where surface area = $4 \pi r^2$ and volume = $4/3 \pi r^3$). The relationship between berry fresh mass and berry volume is shown in figure (3), with a best fitted polynomial function ($R^2 = 0.91$ and $R^2 = 0.97$ respectively for Tannat and Duras Fig. 3).

The frequency distribution of berry fresh mass among size categories was similar for stressed vines in Tannat and Duras cultivars. In average 54.5 and 57.6% of the berries respectively for Tannat and Duras were in the two median categories, 0.76–1.25 g (Fig. 4).

Berries smaller than 1.00 g represented 8.3 and 17% in well-watered respectively for Tannat and Duras cultivars; whereas, in stressed grapevines, berries smaller than 1.00 g, were in higher proportions, 33.50 and 31.5% respectively for Tannat and Duras.

Seed growth. Seed number was 1 for small berries and increased up to about 3.5 seed per berry at f category for Tannat (1.76–2.00 g; Fig. 5A); however, Duras cultivar presented fewer seeds per berry (between 1 and 2.8). Total seed mass per berry varied significantly depending on berry fresh weight and drought treatment. Water stressed Tannat grapevines, showed significantly higher total seed mass than well-watered grapevines, except the larger category. However, in Duras variety total seed mass was significantly higher in larger categories (> 1.50 g) than smaller berries (Fig 6A). Thus, fresh mass per seed varied depending in the berry size category (Fig. 5B). Relative seed mass per berry varied significantly depending on the grape variety. Relative seed mass depending on berry fresh weight varied between 0.96 and 6.40% for Duras and between 5.21 and 7.46% for Tannat variety (Fig. 6B).

Skin growth. Skin mass per berry was not constant but was a linearly related to berry fresh weight in both seasons, Tannat showed a high correlations ($R^2 = 0.99$ well-watered and $R^2 = 0.93$ stressed); and Duras also ($R^2 = 0.99$ well-watered and $R^2 = 0.93$ stressed) (Fig 7A). Skin tissues represented 8.3 to 16.71% of total berry fresh mass in well-watered Tannat in the investigated categories (Fig 7B). However in stressed treatment skin tissues represented from 8.96 to 15.03% of total berry fresh mass, exact proportion varied with berry fresh weight.

There were no consistent differences between irrigation treatments with respect to skin mass per berry and grape variety within the same mass category. While, from the smallest to the largest berries skin mass increased about 75% in Tannat and about 66% in Duras under water stress treatment, for a berry size increase of 3 folds.

Water deficit and phenolic composition during ripening period. The concentration of anthocyanin (mg/berry fresh wt.) and tannin content (catechin equivalents /berry) are shown in Figure 8. Anthocyanins concentration increased from the onset of véraison to harvest in all treatments. As expected, accumulation of anthocyanins in berries started at véraison and increased over the course of the ripening period in both cultivars (Fig. 8A). There were significant differences between the treatments for Tannat and Duras, except for Tannat at véraison and Duras during ripening. Anthocyanin concentration was higher in Duras than in

Tannat at start of véraison. Indeed, at harvest anthocyanin concentration was enhanced in water stressed grapevines for both cultivars in comparison to controls.

Berry tannin content increased during ripening period for both cultivars start from véraison to harvest time (Fig. 8B). Tannat showed higher tannin content than Duras during ripening. Water stress treatment increased tannin content for Tannat. Duras showed similar behavior, except at véraison where the difference was not significant between well-watered and stressed treatments.

Water deficit and phenolic composition in relation to berry size.

Seed tannins and berry size. Seed tannin concentration expressed in mg catechin equivalent in terms of seed fresh weight decreased with increasing berry size for both cultivars Tannat and Duras (Fig. 9A). There was no significant effect of water stress compared to the control on seed tannin concentration for Tannat, except for the largest berries where difference was significant. However for Duras, water stress increased significantly seeds tannin concentration in the six categories of berries.

Skin tannins and berry size. In general, skin tannin decreased with increasing berry size for both cultivars Tannat and Duras (Fig. 9B). Duras water stressed treatment showed significantly higher skin tannin concentration in the studied categories except the smallest (a), the intermediate (c) and the largest category (f).

The smallest berries showed higher skin tannin concentration than the largest in the controls (145 and 173% respectively in Tannat and Duras) and also for water stress treatment (100 and 416% respectively in Tannat and Duras).

Anthocyanins and berry size. Anthocyanin content per berry was positively correlated with berry size (Fig. 9C). Water stress berries presented a significantly higher content in all berry categories for Tannat but not for Duras cultivar. The polynomial correlation based on berry fresh weight (x) was for the controls (anthocyanins: $y = 0.906 * x^{0.437}$ $R^2 = 0.985$ for Tannat and $y = 0.466 * x^{0.314}$ $R^2 = 0.927$ for Duras) and for water stress treatments ($y = 1.197 * x^{0.500}$ $R^2 = 0.981$ for Tannat and $y = 0.407 * x^{0.422}$ $R^2 = 0.948$ for Duras). The increase in anthocyanin content was less than the corresponding increase in berry fresh weight, the anthocyanins content increased with berry size at an average rate of 1.02 and 0.56 mg/g fresh weight for Tannat and Duras controls respectively and 1.20 and 0.82 mg/g fresh weight for Tannat and Duras water stressed treatments respectively.

Discussion

Ecophysiological behavior of Tannat and Duras under water stress. The response of Tannat and Duras cultivars to water deficit observed to this study indicates that roots, rather than sensing the water status in pot, were responsive to the level of available water maintained in the pots of stressed grapevines, which corresponds to a gradual onset of such water stress likely to occur under field conditions. When roots reached equilibrium with dry substrate in pots, gas exchange parameters were more severely impaired. This is also explained in figures 1A and 2A, and accounts for predawn leaf-water potential as being an indicator of water availability in wet pots.

Seasonal and diurnal single-leaf gas-exchange data provided a consistent pattern of increased stomatal sensitivity in gradual water stressed vines. This response makes Tannat showing more isohydric behavior than Duras, similar to Grenache, which according to [Schultz \(2003\)](#) is

categorized as an isohydric genotype. In our study and on a diurnal basis in both treatments the diurnal trend is showing a sharp decline from morning to afternoon (Fig. 5B) and a tendency to recover during the measurement taken at 16:00 hr. This implies that leaf-water loss in Tannat is more responsive to increasing evaporative demand even for a certain degree of stomatal closure during the central part of the day.

The relationships found between A_{\max} and g_s for single-leaf data pooled on diurnal basis essentially supports the assumption of Escalona et al. (1999) and Flexas and Medrano (2002) that, under moderate stress, leaf assimilation in grapevine is mostly controlled by partial and reversible stomatal closure. These authors have suggested that photosynthesis is primarily limited by reductions in g_s to a threshold g_s value of about $0.75\text{--}0.100\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

Reduction in g_s in the deciduous species may have been related to an increasing likelihood of xylem cavitation as soil water availability declined (Jones and Sutherland 1991, Sparks and Black 1999). Several studies have reported a concomitant decline in g_s with increasing xylem cavitation (Salleo et al. 2000, Sperry et al. 2002). Some studies have provided evidence of a link between a decline in g_s and stem and leaf cavitation, indicating that stomata may sense xylem cavitation and regulate water loss in a manner that prevents further decline in leaf and xylem water potential (Nardini and Salleo 2000, Cochard et al. 2002, Ripullone et al. 2007).

Although in our study no determination of abscisic acid (ABA) or xylem pH were made, a root-to-shoot signal mediated by ABA can give further explanation to the different strategies in the control of stomatal closure between these two cultivars .

Phenolic maturity during ripening under water stress. The ripening phase of berry is characterized by a further increase in berry volume, which is initially very rapid but slows down progressively towards fruit maturity (Hrazdina et al. 1984). Embryo growth stops, the seeds mature, turn from green to brown and become hard and desiccated (Kennedy et al. 2000, Harbertson et al. 2002). Red pigments and sugars accumulate, while chlorophyll and organic acids are degraded (Kanellis and Roubelakis-Angelakis 1993, Famini et al. 2000). Seeded grapes initially grow mostly by cell division. However, full-size cells are not added to the berry like “bricks to a wall”; hence cell division is accompanied and followed by cell expansion. In fact, the vast majority of the volume gain is due to cell expansion. As berries grow and ripen they undergo both physical and chemical changes (Kennedy et al. 2002). In our conditions, prior to the reduction of watering, the crop load was adjusted to the same number of bunch per plant in all treatments. Yield differences between well-watered and water stressed were significant (data not shown). This means that berry growth was affected by the water stress imposed during ripening. This may be explained by acknowledging that although water deficit may have stimulated post-veraison skin growth, it is more likely that expansive growth of the inner mesocarp was inhibited to a greater degree by water deficit than skin tissue itself (Roby and Matthews 2004). As a consequence, water stress treatment increased anthocyanin concentration and tannin content during ripening period (Fig. 8), results which are in agreement with those obtained by other authors (Esteban et al. 2001, Roby et al. 2004, Sal3n et al. 2005). A continuous increase anthocyanin concentration and tannin content was observed from start of véraison to harvest, reflecting a continuous synthesis of these phenolic compounds in the skins at a rate higher enough to offset the dilution effect of increasing berry weight. Anthocyanins, which account for half or more of the berry total polyphenols, are indirectly responsible for the overall increase in polyphenols in the skins of red grape cultivars (Adams 2006). It has been reported that phenolic biosynthesis in Shiraz during water deficit could also be limited (Ojeda et al. 2002). These authors concluded that there are two types of responses to water deficit: an indirect and positive response due to the effect of berry mass reduction (a concentration effect), and a direct response

on phenolic biosynthesis that can be either positive or negative, depending on the type of phenolic compound, the degree of water deficit and the period during which is applied.

Morphology of Tannat and Duras berry growth under water stress. This study is an attempt to define on Tannat and Duras cultivars first the interrelations between berry size at harvest and fresh mass distribution between seed, skin, and flesh tissues; and second to evaluate the roles of fruit size and water availability concerning fruit composition. Thus first, we adopted the variation in berry fresh mass and the mass-size categories to much the variation in berry volumes. This based on Tannat and Duras linear relationships between berry volume (based on diameters) as a function of fresh mass (direct measurements) for controls ($R^2 = 0.959$ and 0.973 respectively Tannat and Duras) and under water stress treatment ($R^2 = 0.914$ and 0.973 respectively Tannat and Duras), is in accordance with results presented by [Roby and Matthews \(2004\)](#) on Cabernet Sauvignon grape cultivar. Water stress affects significantly relative distribution of berry size categories. Under water stress, berries smaller than 1.00 g represented 3 folds of the control for Tannat and 2 folds than the control for Duras cultivar. Tannat berry growth seemed to be more sensitive than Duras to water stress after véraison. Distribution of fresh mass in mature berries varied depending on the grape cultivar. For Tannat, seeds represented around 6%, skin around 12%, and flesh about 82%. For Duras cultivar, seeds represented around 3%, skin around 12% and flesh around 85%. Exact proportion varied according to berry size category. Our results showed that skin mass was positively correlated with berry mass in all treatments, increasing 3 folds for Duras and 2 folds for Tannat as whole berry mass increased approximately 3 folds from 0.625 to 1.875 g/berry. Under water stress this increase is lower than the well-watered controls for both cultivars. For most berry sizes, relative skin mass (% berry fresh mass) ranged between 8.36 and 9.95 for Tannat and between 8.54 and 11.40 for Duras. However, for most berry sizes, Duras well-watered had slightly higher relative skin mass than Duras water stressed and Tannat with both well-watered and stressed treatments. Accordingly, [Roby et al. \(2004\)](#) suggested that upon exposure to late season water deficits exocarp is less sensitive growth than mesocarp.

As the increase in total seed weight per berry depending on the berry size was more important than the decrease in seed tannin concentration (mg catechin eq./ seed fresh wt.) Tannin content (mg/berry) increased with berry size. Under water stress, for both Tannat and Duras cultivars seed tannin concentration (per seed fresh wt.) decreased by 48% from the smallest berries to the largest berries, however for the controls it decreased respectively by 60 and 54% for Tannat and Duras similar results were reported by [Roby and Matthews \(2004\)](#) on Cabernet Sauvignon cultivar. Seed tannin content was a linear function of seed number ($R^2 = 0.95$ and 0.96 respectively Tannat and Duras). Among size categories, seed tannin concentration varied more with berry size category than water stress treatment. Our results indicate that water deficit accelerated the rate of decline during fruit ripening. Similar results reported the effect of environmental factors on the decrease in the concentration of seed tannin among seasons ([Harbertson et al. 2002](#), [Kennedy et al. 2002](#)).

As with seed tannin concentration, skin tannin concentration decreased also with berry size. As skin mass was less sensible to water stress treatment among berry size categories, skin tannin content per berry variation was more affected by the cultivar than the drought treatment. The effect of water deficit on anthocyanin concentration was two folds for Tannat but for Duras anthocyanin concentration was not significantly affected. Our results report subtle difference first between skin tannins and skin anthocyanins, and second between cultivars for these two phenolic parameters. [Roby and Matthews \(2004\)](#) reported that primary mechanism by which water deficit increased skin tannin and anthocyanin concentrations is probably a direct stimulation of

biosynthesis and related to the differential growth responses of skin and inner mesocarp tissue (Roby et al. 2004).

Conclusions

Since the primary basis for classifying different plant species and genotypes as being isohydric or anisohydric, is how they respond in term of leaf-water status (midday leaf-water potential) to a soil-water deficit treatment, our results, based on gas-exchange of Tannat and Duras cultivars subjected to water stress treatment start of véraison until harvest as compared to well-watered grapevines, support in favor of more near-isohydric behavior for Tannat at mid-morning Than for Duras.

Water deficit in grape vines from Tannat and Duras cultivars inhibited berry growth, expressed in terms of mean fresh mass of berries. Tannat showed that seed represented around 6%, skin around 12%, and flesh about 82%. The Duras cultivar showed that seed represented around 3%, skin around 12% and flesh around 85%. Exact proportion of seed, skin and flesh varied according to berry size category. Present results indicate that berry size variation is important in determining phenolic composition depending on the grape cultivar. The effect of water stress treatment on the concentrations of skin tannin was different than the effect on anthocyanin concentration, this varied depending on the berry size and the grape cultivar.

Work is obviously needed to assess in these two cultivars how the speed of drought development, allotted root volume (pots versus open field) and strategy of different methods of water supply can affect and/or modify the type of response observed in our study; thus, determination of abscisic acid (ABA) or xylem pH, a root-to-shoot signal mediated by ABA can give further explanation to the different strategies in the control of stomatal closure between these two cultivars. Nevertheless, the relations between berry size at harvest, and fresh mass distribution between seed, skin, and flesh tissues established here permit to evaluate the effect of water availability on berry phenolic composition.

Acknowledgements: The work was supported by “Commission Viti-Vinicole Midi-Pyrénées, France”. The authors gratefully acknowledge Dr. Mohamed BRAHAM, I.O. Institute for his collaboration in this experiment. We thank also W. Fekiri for technical assistance.

Literature cited

- Adams, D.O., and J.F. Harbertson. 1999. Use of alkaline phosphatases for the analysis of tannins in grapes and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:247-252.
- Antolín, M.M., M., Ayari, and M. Sánchez-Díaz. 2006. Effects of partial rootzone drying on yield, ripening and berry ABA in potted Tempranillo grapevines with split roots. *Aust. J. Grape Wine R.* 12:13-20.
- Attia, F., H., Ibrahim, A., Cadet, and M. Garcia. 2004. Evaluation of leave, must and wine cation contents and of must and wine acidity of five red wine grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) grafted onto 3309 Couderc and grown hydroponically. *Acta Hort.* 652:255-263.
- Bravdo, B., Y., Hepner, C., Loinger, S., Cohen, and H. Tabacman. 1985. Effect of irrigation and crop level on growth, yield and wine quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:132-139.

- Chapman, D.M., R., Gaspar, S.E., Ebeler, J.X., Guinard, and M.A. Matthews. 2005. Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status. *Aust. J. Grape Wine R.* 11:339-347.
- Cochard, H., L., Coll, X., Le Roux, and T. Améglio. 2002. Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiol.* 128:282-290.
- Coombe, B.G. 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine R.* 1: 100-110.
- Cramer, G.R., A., Ergül, J., Grimpe, R.L., Tillett, E.A.R., Tattersall, M.C., Bohlman, D., Vincent, J., Sonderegger, J., Evans, C., Osborne, D, Quilici, K.A., Schlauch, D.A., Schooley, and J.C. Cushman. 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* 7:111-134.
- Dixon, R.A., D.Y., Xie, and S.B. Sharma. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165:9-28.
- Douglas O. Adams. 2006. Phenolics and Ripening in Grape Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:249-256.
- Escalona, J.M., J., Flexas, and H. Medrano. 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:421-433.
- Esteban, M.A., M.J., Villanueva, and J.R Lissarrague. 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *J. Sci. Food and Agric.* 81:409-420.
- Famiani, F., R.P., Walker, L., Técsi, Z.H., Chen, P., Proietti, and R.C. Leegood. 2000. An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *J. Exp. Bot.* 51:675-683.
- Flexas, J., J., Bota, J.M., Escalona, B., Sampol, and H. Medrano. 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.* 29:461-471.
- German, J.B., and R.L. Walzem. 2000. The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.* 20:561-593.
- Girona, J., M., Mata, J., del Campo, A., Arbonés, E., Bartra, and J. Marsal. 2006. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irrigation Sci.* 24:115-127.
- Harbertson, J.F., J.A., Kennedy, and D.O. Adams. 2002. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:54-59.
- Hrazdina G., G.F., Parsons, and L.R. Mattick. 1984. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 220-227.
- Ibrahim, H. 2001. Genèse et évolution des acides organiques dans les feuilles, les baies, les moûts et les vins des cépages Cot et Négrette (*Vitis vinifera* L.). PhD Dissertation Institut National Polytechnique de Toulouse France.
- Iland, P., A., Ewart, J., Sitters, A., Markides, and N. Bruer. 2000. Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown, Adelaide, Australia.
- Jones, H.G. and R.A. Sutherland. 1991. Stomatal control of xylem embolism. *Plant Cell Environ.* 14:607-612.
- Kanellis, A.K., and K.A. Roubelakis-Angelakis. 1993. Grape. In: Seymour G, Taylor J, Tucker G, eds. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall, 189-234.

- Kennedy, J.A., M.A., Matthews, and A.L. Waterhouse. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavanoids. *Am. J. of Enol. Vitic.* 53:268-274.
- Kennedy, J.A., G.L., Troup, J.R., Pilbrow, D.R., Hutton, D., Hewitt, C.R., Hunter, R., Ristic, P.G. Iland, and G.P. Jones. 2001. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine R.* 6:244-254.
- Matthews, M.A., M.M., Anderson, and H.R. Schultz. 1987. Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis* 26, 147-160.
- Matthews, M.A., R., Ishii, M.M., Anderson, and M. O'Mahony. 1990. Dependence of wine sensory attributes on vine water status. *J. Sci. Food Agric.* 51:321-335.
- Nardini, A., M.T., Tyree, and S. Salleo. 2001. Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerasus* L. and its impact on leaf hydraulics. *Plant Physiol.* 125:1700-1709.
- Ojeda, H., C., Andary, E., Kraeva, A., Carbonneau, and A. Deloire. 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:261-267.
- Poni, S., F., Bernizzoni, and S. Civardi, 2007. Response of "Sangiovese" grapevines to partial root-zone drying: Gas-exchange, growth and grape composition. *Scientia Horticulturae*, 114:96-103.
- Reynolds, A.G., W.D., Lowrey, L., Tomek, J., Hakimi, and C. de Savigny. 2007. Influence of Irrigation on Vine Performance, Fruit Composition, and Wine Quality of Chardonnay in a Cool, Humid Climate. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:217-228.
- Ripullone, F., M.R., Guerrieri, A., Nole, F., Magnani, and M. Borghetti. 2007. Stomatal conductance and leaf water potential responses to hydraulic conductance variation in *Pinus pinaster* seedlings. *Trees* 21:371-378.
- Roby, G. and M.A. Matthews, 2004. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10:74-82.
- Roby, G., J.F., Harbertson, D.O., Adams, and M.A. Matthews. 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10:100-107.
- Salleo, S., A., Nardini, F., Pitt, and M.A. Lo Gullo. 2000. Xylem cavitation and hydraulic control of stomatal conductance in Laurel (*Laurus nobilis* L.). *Plant Cell Environ.* 23:71-79.
- Salón, J.L., C., Chirivella and J.R. Castel. 2005. Response of cv. Bobal to timing of deficit irrigation in Requena, Spain: water relations, yield, and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 56:1-8.
- Scholander, P.F., E., Hemmingsen, and W. Gary. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346.
- Shultz, H.R., 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant Cell Environ.* 26:1393-1405.
- Sivilotti, P., C., Bonetto, M., Paladin, and E. Peterlunger. 2005. Effect of soil moisture availability on Merlot: from leaf water potential to grape composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 56:9-18.
- Sparks, J.P. and R.A. Black. 1999. Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol.* 19:453-459.
- Sperry, J.S., U.G., Hacke, R., Oren and J.P. Comstock. 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant Cell Environ.* 25:251-263.

Figures

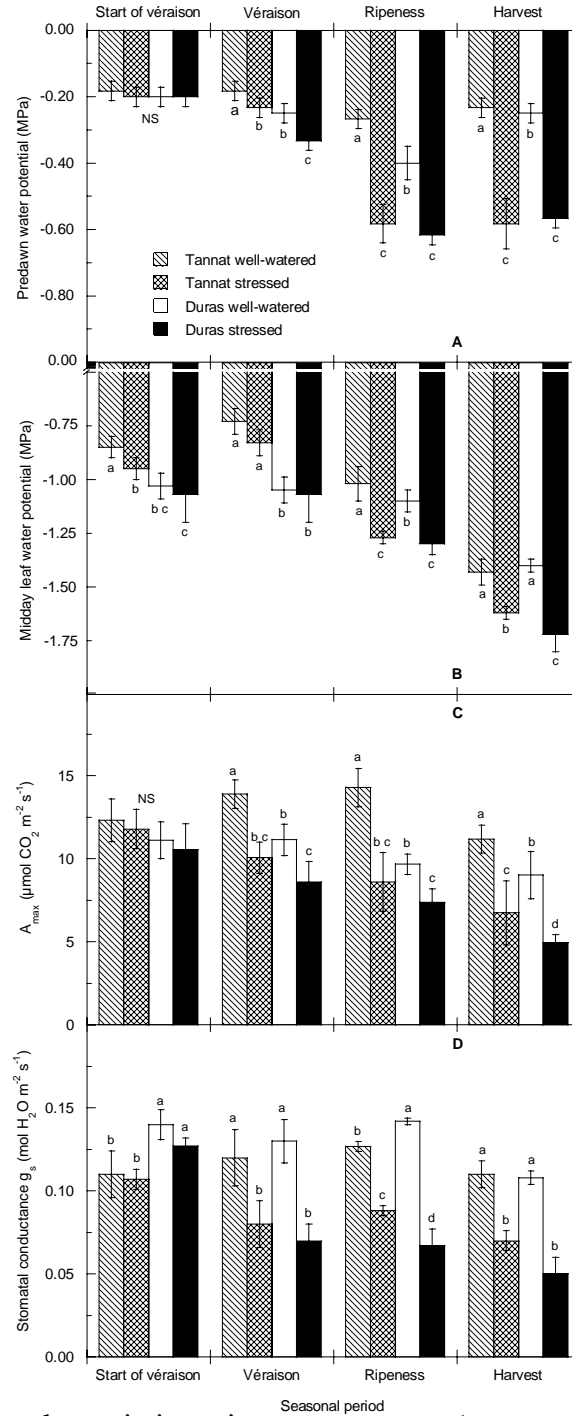


Figure 1 Seasonal variation in predawn water potential Ψ_{PD} (A), midday leaf water potential Ψ_{MD} (B), maximum net CO₂ assimilation rate A_{max} (C), and stomatal conductance g_s (D) for Tannat and Duras grape cultivars subjected to well-watered and stressed treatments. Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

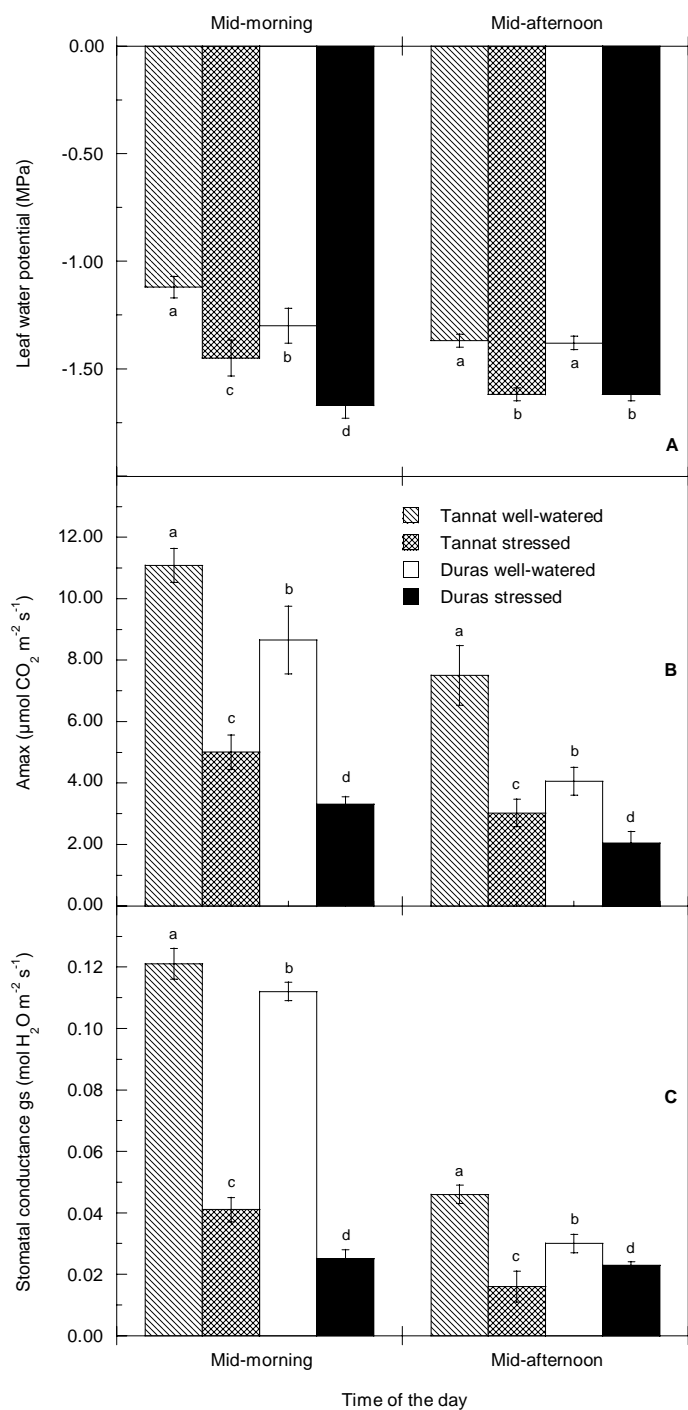


Figure 2 Diurnal changes at harvest time in leaf water potential Ψ_{Leaf} (A), maximal net CO₂ assimilation rate A_{max} (B), and stomatal conductance g_s (C) for Tannat and Duras grape cultivars subjected to well-watered and stressed treatments. Each data point is mean \pm S.E of three measurements on three plant replications. Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

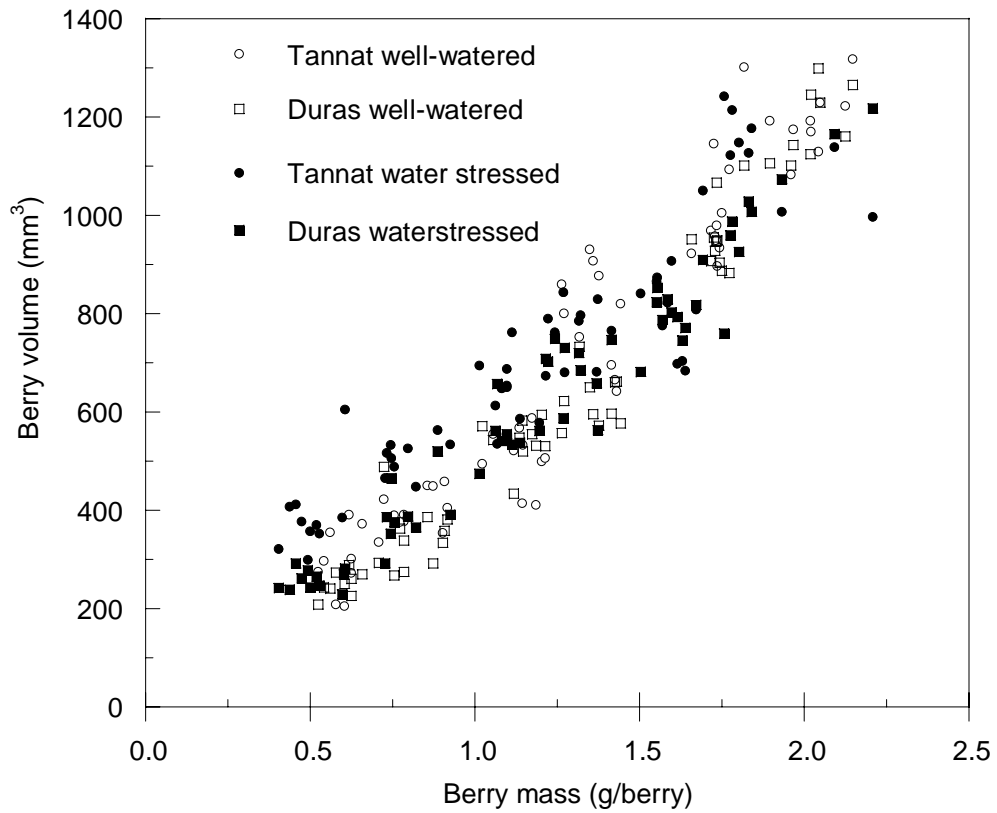


Figure 3 Berry volume at harvest (calculated from diameters) as a function of measured fresh mass for Tannat and Duras grape cultivars subjected to well-watered (Control) and water stress treatments. Means of two successive growing seasons 2005 and 2006.

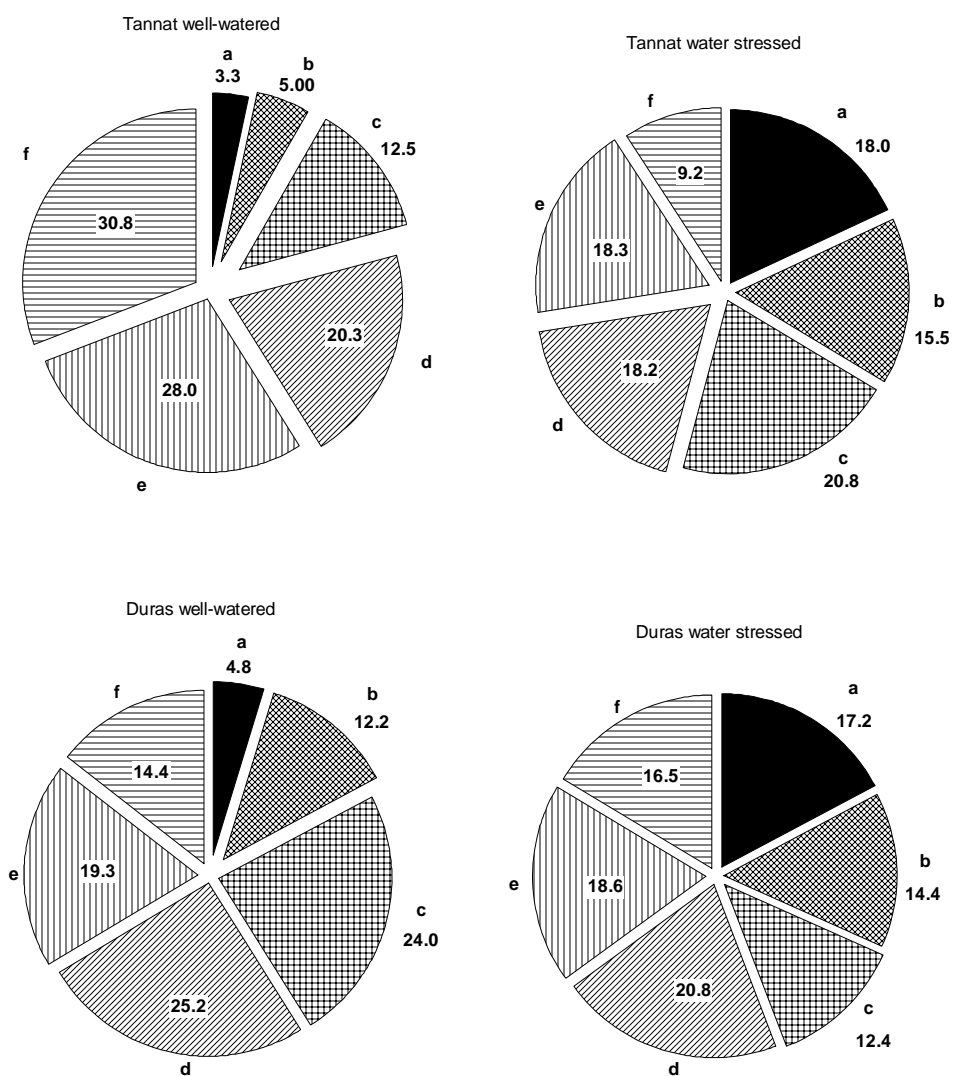


Figure 4 Frequency distribution (% of sample population) for berry size in fruit Tannat and Duras vines subjected to two irrigation treatments (well-watered and water stressed). Berry size categories are indicated where: a = 0.50-0.75; b = 0.76-1.00; c = 1.01-1.25; d = 1.26-1.50; e = 1.51-1.75 and f = 1.76-2.00 g. Populations for each treatment were sampled from three replicate of three grapevines. Means of two successive growing seasons.

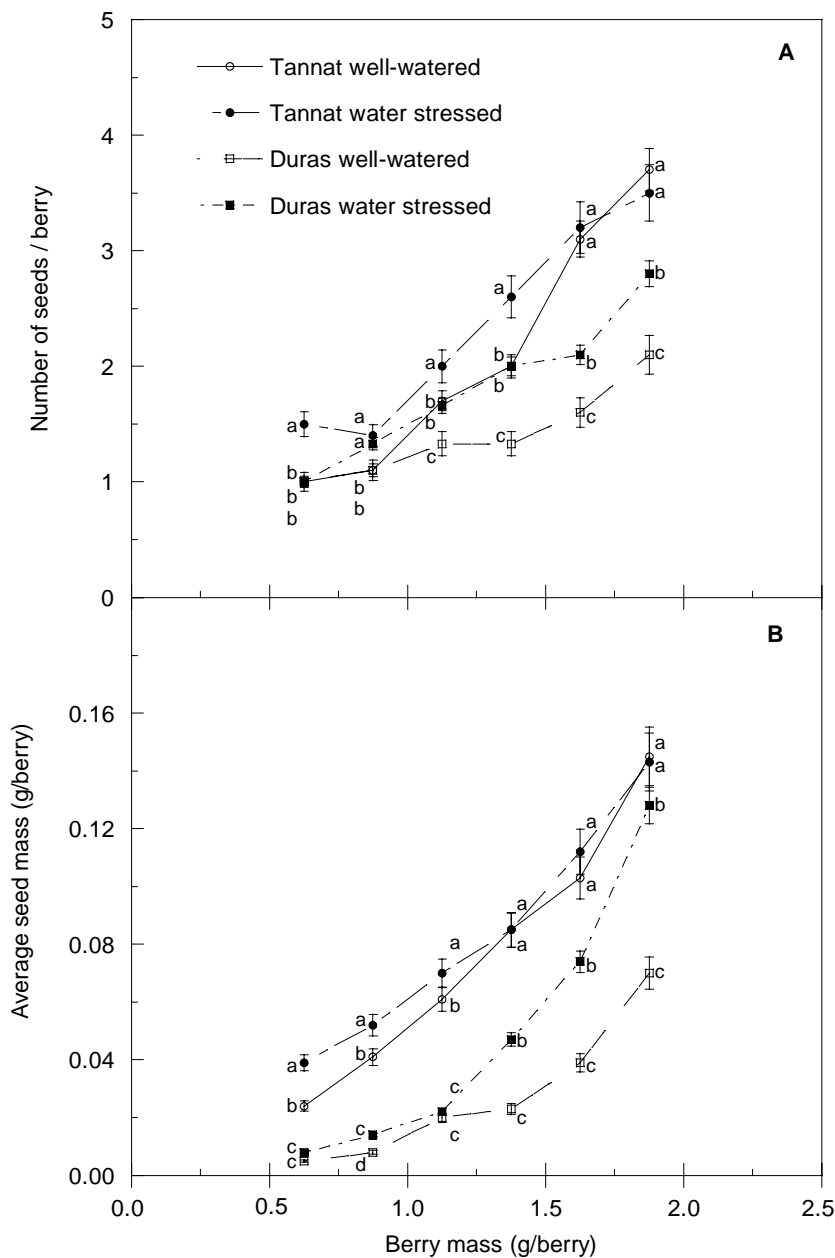


Figure 5 Variation in seeds number per berry (A) and seed size (average seed mass per berry (g) B) in six different berry size categories (indicated as berry mass (g)) from Tannat and Duras grape cultivars subjected to two treatments (well-watered and water stressed). Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

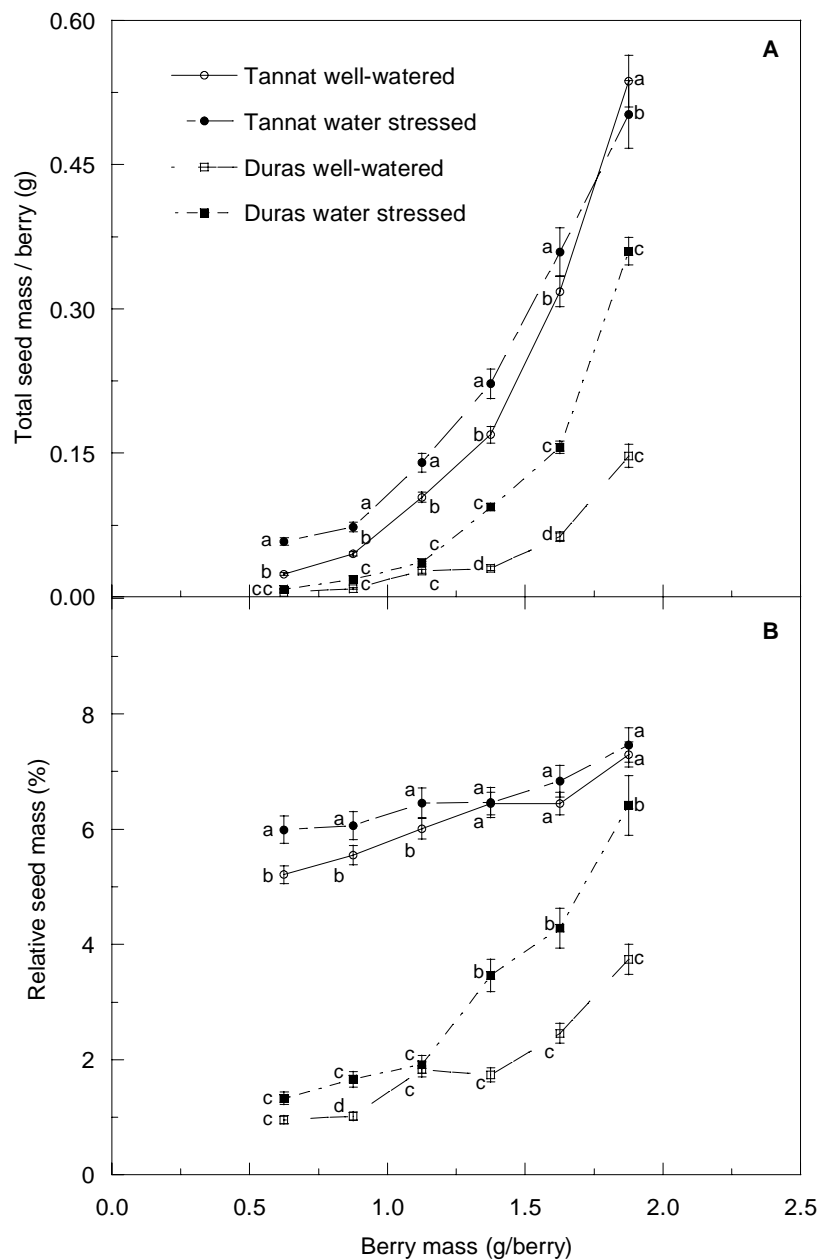


Figure 6 Variation in total seed mass (A) and relative seed mass (B), of berries from Tannat and Duras cultivars well-watered and subjected to water stress treatments. Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 ($n = 6$). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

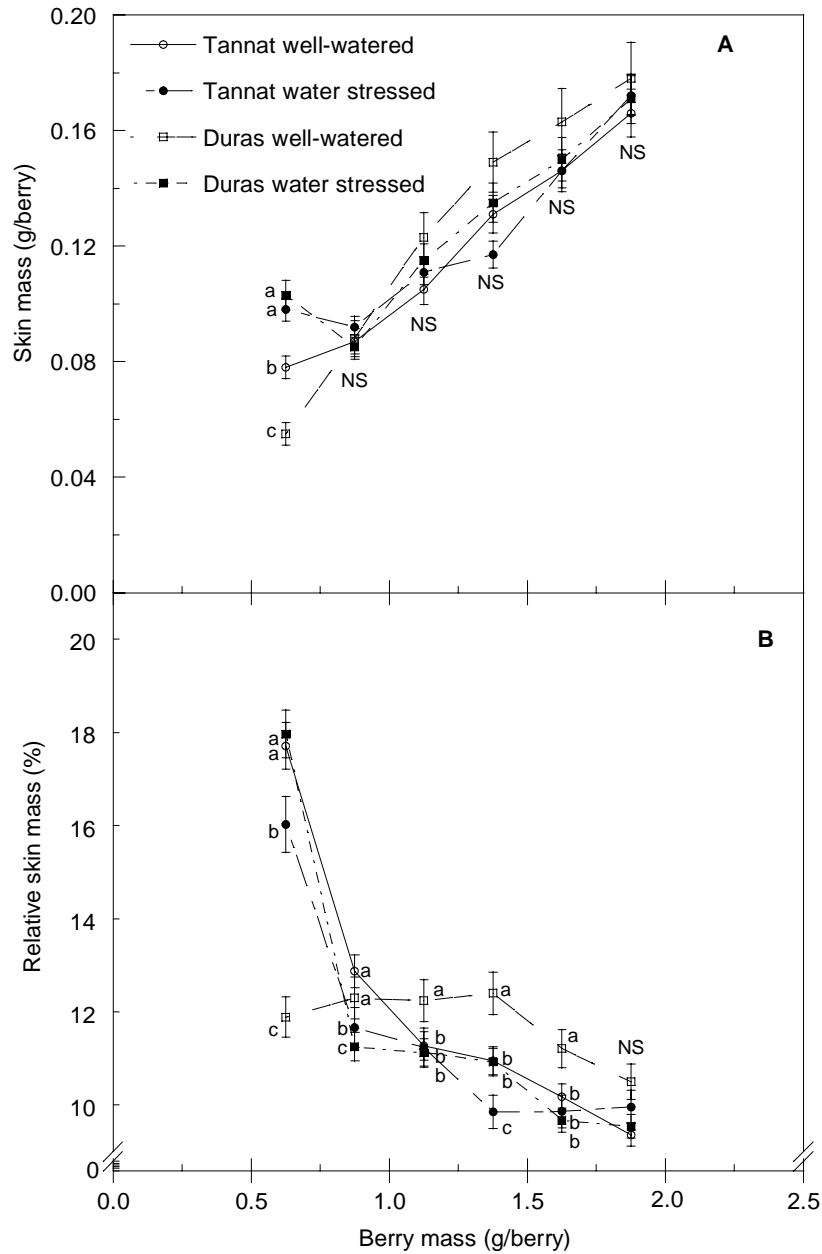


Figure 7 Variation in skin mass (A) and relative skin mass (B) of berries from Tannat and Duras cultivars well-watered and subjected to water stress treatments. Each data point is mean \pm S.E of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006. (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

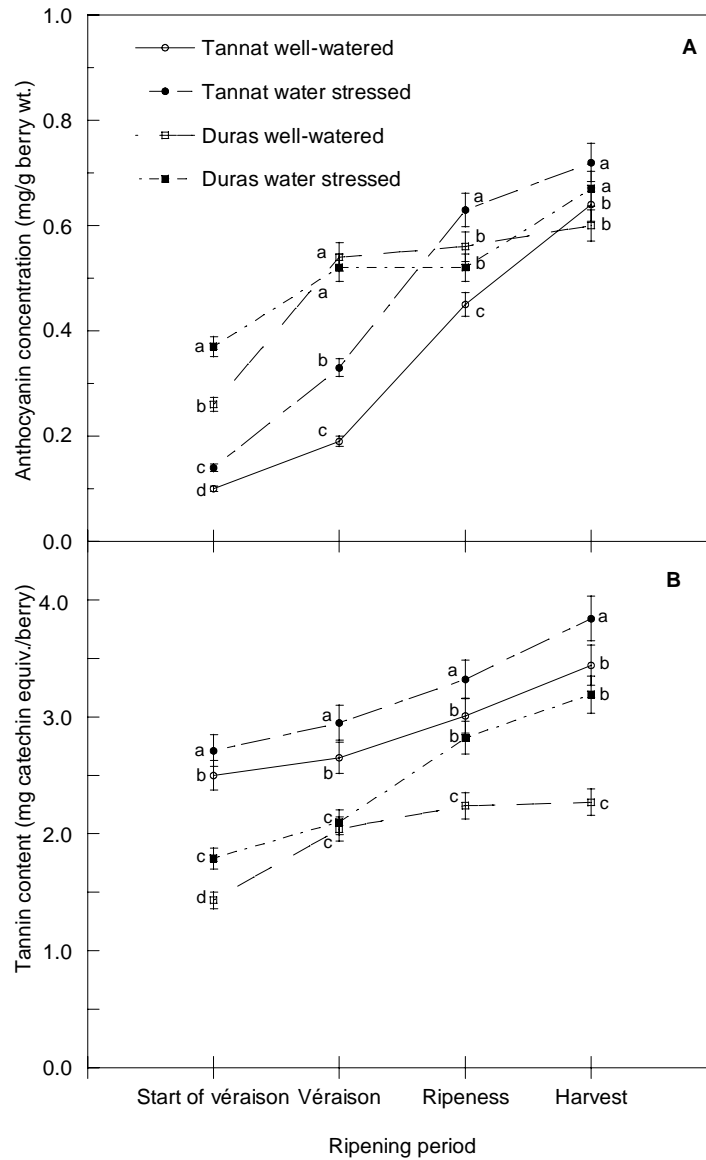


Figure 8 Evolution of anthocyanin concentration (A) and tannin content (B) in berries from Tannat and Duras cultivars well-watered and subjected to water stress treatments during ripening period. Each data point is mean \pm S.E of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006. (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

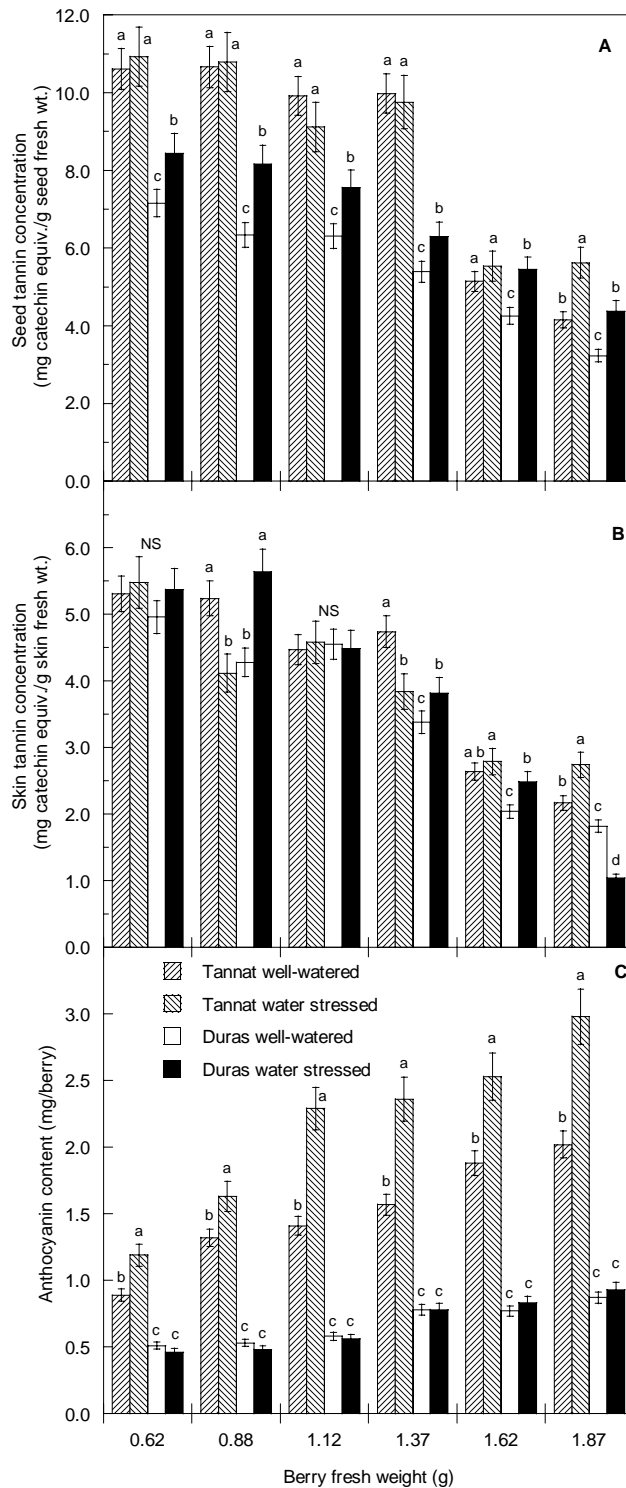


Figure 9 Concentration of seed tannin (A), and skin tannin (B), and anthocyanin content in berries from Tannat and Duras grape cultivars during fruit ripening for treatments with well-watered and water stress. Each data point is mean \pm S.E. of six replicate from two successive growing seasons 2005 and 2006 (n = 6). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by ANOVA two ways Student Newman Keuls Method.

CHAPITRE V :

Effet d'une calcite micronisée sur le comportement écophysologique et la signalisation cellulaire chez la vigne *Vitis vinifera* L. en conditions de stress hydrique

Présentations

Plusieurs études sur l'effet agronomique d'une calcite micronisée Megagreen®, commercialisée par la société Agronutrition (Carbone, France), ont déjà été réalisées sur des grandes cultures (céréales et betterave) et sur des cultures maraîchères (salade, tomate, melon, fraise, pomme de terre ...). Ces études ont montré une amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse. Cependant, le mode d'action de cette calcite en particulier les voies de signalisation cellulaire par laquelle elle permet aux plantes de mieux gérer le stress hydrique restent inconnu à ce jour.

Afin d'y remédier et de déterminer également la dose adéquate à appliquer, nous avons réalisé deux expérimentations :

- une à l'échelle de la plante entière en conditions contrôlées sur le cépage Cot. Pour cela, des traitements correspondant à différentes doses D0 (0,00 % m/v ; D1 (0,33 m/v), D2 (0,66 m/v), D3 (1,00 % m/v) et D4 (1,33 % m/v) de Megagreen pour deux applications foliaires ont été appliquées sur des vignes, qui ont été mises en en pré-culture pendant six semaines afin d'avoir une végétation suffisante pour pouvoir réaliser les pulvérisations foliaires.
- une à l'échelle cellulaire, les expérimentations ont été réalisées sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana plumbaginifolia*. En effet, au cours de ces dernières années, il a été démontré que les cellules d'*Arabidopsis thaliana* constituaient un bon modèle pour l'étude des mécanismes d'action à l'échelle cellulaire. Par exemple, des suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana* répondent à différents éliciteurs tels que les harpines et l'acide fusarique (Reboutier *et al.*, 2005, Bouizgarne *et al.*, 2006). De plus, le système cellulaire permet d'enregistrer l'activité des canaux ioniques, activité qu'il est beaucoup plus difficile de caractériser à une échelle supérieure (El-Maarouf *et al.*, 2001; Reboutier *et al.*, 2002; 2005).

Les résultats obtenus montrent :

1. à l'échelle de la plante entière :

- **Photosynthèse et conductance stomatique** : L'application de Megagreen n'a pas d'effet positif de 5 à 11 jours de traitement ; la contrainte hydrique diminue la photosynthèse des feuilles jeunes et matures, ceci étant associé à une forte réduction de la conductance stomatique qui n'est plus que de 20 à 25 % de celle des témoins, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs (Medrano *et al.*, 2003; Moutinho-Pereira *et al.*, 2004; Bertami *et al.*, 2006). Après 16 jours, un effet positif marqué sur la photosynthèse est observé ; perdure ensuite et permet aux plantes en conditions de contrainte hydrique de retrouver le niveau de photosynthèse des témoins. L'effet du Megagreen sur la photosynthèse est associé à un effet parallèle positif sur la conductance stomatique. En terme relatif, l'impact de Megagreen sur la fixation du carbone est supérieur à l'impact sur la conductance stomatique (et donc sur la transpiration foliaire), il en résulte un effet positif de Megagreen sur l'efficacité photosynthétique de l'utilisation de l'eau par les plantes.

L'effet positif du Megagreen décrit sur les feuilles jeunes et matures se retrouve aussi sur la totalité du feuillage de la vigne aussi.

L'action de Megagreen a été caractérisée pour des concentrations variées en CO₂ autour de la feuille. Sous 400 µL L⁻¹ de CO₂, les effets déjà décrits de la contrainte et de Megagreen sur la photosynthèse se retrouvent. Les résultats sont similaires sous 200 µL L⁻¹ de CO₂. Par contre sous forte concentration en CO₂ (800 µL L⁻¹), la photosynthèse est pratiquement identique chez les témoins et celles stressées (en l'absence de Megagreen). Ceci montre clairement que la contrainte hydrique altère l'assimilation du carbone en condition normale (400 µL L⁻¹) en réduisant la concentration intercellulaire du CO₂ dans la feuille par augmentation de la résistance à la diffusion (effet stomatique). Sous forte concentration en CO₂, l'application de Megagreen ne modifie pas la photosynthèse (déjà élevée) des plantes stressées. Ceci prouve qu'en conditions normales, le principal mécanisme permettant au Megagreen de stimuler la photosynthèse des plantes stressées est une augmentation de la conductance stomatique.

- *Dose d'application du Megagreen* : Différentes doses du Megagreen (de 0,33 % à 1,33% m/v) ont été testées, l'effet positif du traitement Megagreen sur la capacité photosynthétique et la conductance stomatique est maximal pour la dose de 1,00 m/v, considérée comme standard, avec deux applications successives dans un intervalle de deux semaines.

2. A l'échelle cellulaire

- *Accumulation de calcium cytosolique* : La concentration en calcium cytoplasmique des cellules a été mesurée par un luminomètre FB12-BERTHOLD. Des cellules de tabac exprimant l'apoeaquinone (Lecourieux *et al.*, 2002) préalablement prétraitées avec la coelentarazine ont été traitées avec différentes concentrations de Megagreen. Le traitement Megagreen induit une augmentation rapide du calcium dans le cytosol et cette accumulation est fonction de la concentration utilisée. Ces résultats prouvent que le Megagreen modifie la compartimentation intracellulaire du calcium. De très nombreuses études récentes ont signalé l'importance du calcium comme messenger secondaire, en effet, ce cation bivalent intervient dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, voies dites « Ca²⁺-dépendantes » (White et Broadley, 2003, Brault *et al.*, 2004).

- *Dépolarisation de la membrane plasmique et activation des canaux anioniques* : L'étude a été réalisée en voltage imposé à électrode (Reboutier *et al.*, 2002). Elle permet de mesurer le potentiel membranaire ainsi que les courants anioniques (Cl⁻, NO₃⁻) en utilisant des électrodes de verre capillaire borosilicatés. L'ajout de Megagreen provoque après 2 minutes une dépolarisation de la membrane plasmique et cette amplitude varie avec la dose de Megagreen. La mesure des courants anioniques montre que Megagreen stimule le flux anionique sortant. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui ont montré que l'augmentation du calcium cytosolique induit une augmentation des courants anioniques (Brault *et al.*, 2004 ; de Angeli *et al.*, 2007).

- *Production d'espèces réactives d'oxygène (ROS)* : L'oxygène moléculaire est à l'origine d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Ces molécules peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques ou délétères (conduisant à la mort cellulaire). Les plantes ont développé des mécanismes antioxydants permettant de neutraliser certaines ROS et donc de contrôler leur accumulation. Dans notre étude nous avons mesuré le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) libéré dans le milieu de culture cellulaire grâce au luminomètre FB12-BERTHOLD en présence du Luminol et de Ferrocyanure. L'effet du Megagreen a été suivi pendant 24 heures par mesure de chimioluminescence. La cinétique journalière de la production des ROS est assez particulière sur les cultures cellulaires et est maximale après 8h de traitement. Des mesures réalisées 24h après le traitement montrent que la quantité de ROS est fonction de la dose de Megagreen appliquée. Le

prétraitement des suspensions cellulaires de tabac et d'*Arabidopsis thaliana* avec le diphenylene iodonium (DPI, 12 μM) qui est un inhibiteur de la NADPH oxydase (enzyme produisant des ROS), réduit la libération des ROS dans le milieu cellulaire. Ceci suggère que le Megagreen stimule l'activité enzymatique de la NADPH oxydase, ce qui est en accord avec [Murata et al., \(2001\)](#).

- *Alcalinisation du milieu extracellulaire* : Le pH du milieu extracellulaire est mesuré directement dans la suspension cellulaire ([Brault et al., 2004](#)). Les cellules sont cultivées à $24 \pm 2^\circ\text{C}$ sous lumière blanche continue ($40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR) et sous agitation rotative dans un flacon rond de 1 L contenant 350 mL de milieu Gamborg (pH 5,8). Le pH est suivi en permanence en utilisant un ionomètre ELIT 808 avec des électrodes de pH combinées. Les effecteurs ont été ajoutés, après stabilisation du pH, puis les valeurs de ce paramètre sont enregistrées pendant 45 min.

Les résultats obtenus montrent que le Megagreen induit une alcalinisation rapide et exponentielle du milieu (durant environ 10 min) suivie de deux phases : une première de stabilisation de la vitesse d'alcalinisation (10-15 min) puis une seconde d'arrêt de l'alcalinisation. Le pré-traitement des cellules (Tabac et *Arabidopsis*) par du vanadate (200 μM , inhibiteur de l'ATPase pompe à proton du plasmalemme) supprime l'alcalinisation induite par Megagreen. Ceci suggère que la pompe à proton est impliquée dans les processus de l'alcalinisation induite par le Megagreen. Enfin, un pré-traitement par le DPI réduit l'amplitude de l'alcalinisation provoquée par le Megagreen laissant supposer que la stimulation de la production de H_2O_2 par le Megagreen est associée à l'inhibition de la pompe à protons.

Publication I :

Processed Calcite Particles Improved Leaf Photosynthesis of Potted Cot Grapevines During Water Stress Conditions.

Publication II :

Early MEG -induced cellular responses, implication for stomatal closure

N.B.: Le texte des publications est présenté selon les recommandations de chaque revue.

Processed Calcite Particles Improved Leaf Photosynthesis of Potted Cot Grapevines During Water Stress Conditions.

Faouzi Attia¹ and Marc Garcia

Centre de Viticulture et d'Œnologie de Midi-Pyrénées, Institut National Polytechnique de Toulouse ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole BP32607, 31326 Castanet Toulouse, France

François Garcia

Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1 - 15 Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France.

Fethi Ben Mariem

Laboratoires des Systèmes des Production Arboricoles, Institut de l'Olivier, Rue Ibn Khaldoun; BP14; 4061 Sousse TUNISIE.

Laurent Martinez

Agronutrition Equipe Recherche et Développement, Parc Activestre 3 avenue de l'Orchidée - 31390 Carbonne - France.

Thierry Lamaze

Centre d'Etudes Spatiales de la Biosphère, Université Paul Sabatier, 18 Avenue Ed. Belin - bpi 2801 ; 31401 Toulouse, France.

Acknowledgement We acknowledge Dr. Mohamed BRAHAM for cheerful help and advice on the setup of the experiments. We thank Dr. Nouredine BOURAS for reading an earlier version of this manuscript. We also thank Michael HOLTZ and Benoit SEVERAC for helpful comments and valuable criticism of the manuscript.

¹ To whom reprint requests should be addressed. E-mail address: faouzi.attia@ensat.fr

*Submitted to JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE
American Society for Horticultural Science (U.S.A.)
10/10/2007*

Subject Category: Environmental Stress Physiology

Processed Calcite Particles Improved Leaf Photosynthesis of Potted Cot Grapevines During Water Stress Conditions.

Additional index words. *Vitis vinifera* L., photosynthesis, stomatal conductance, chlorophyll fluorescence, water use efficiency, VPD atmospheric vapor pressure deficit.

Abstract. Application of processed particles such as Kaolin is widely developed to reduce abiotic stress damage and improve water use efficiency in perennial fruit crops. Our study determined the effect of processed calcite particles (Megagreen®) on water relations and photosynthesis in potted vine of ‘Cot’ grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) grown in a glasshouse in summer under natural light. Well-watered and drought stressed vines were either unsprayed or sprayed with Megagreen at different doses (0.00, 0.33, 0.66, 1.00 and 1.33 % w/v). Water stress affected predawn and midday leaf water potential, maximal CO₂ assimilation (A_{\max}), stomatal conductance (g_s) and photosystem II efficiency (Φ_{PSII}) of the younger fully expanded leaves. Megagreen was able to restore A_{\max} and Φ_{PSII} in water stressed plants. This effect was associated with a positive but less pronounced effect on g_s and leaf transpiration. The beneficial effects of Megagreen were also observed on young and old leaves, at low and high atmospheric vapor pressure deficit and, in the morning as well as the afternoon. Megagreen application did not lead to appreciable changes in leaf water potentials. In water stress plants, A_{\max} was strongly improved by increasing air CO₂ concentration. Under these conditions, Megagreen did not increase CO₂ fixation. Thus, it is suggested that Megagreen prevailing mechanism of action is an increase in stomatal conductance of grapevines subjected to drought conditions.

Introduction. Water stress is one of the most important environmental factors inhibiting plant growth and production (Chaves et al., 2002). It has a multifaceted effect on metabolism and a low rate of gas exchange in the plant suffering from water stress is often reported (Hsiao, 1973). Both stomatal and non-stomatal factors contribute to the effects of drought on photosynthesis and transpiration (Kaiser et al., 1981). Stomatal closure is the main factor since the photosynthetic apparatus is often largely unaffected by water limitation in the whole plant (Cornic et al., 1992). Grapevine is generally grown in regions with dry summer and must endure several months of drought during its seasonal cycle. Visible syndromes in plants exposed to drought during the vegetative phase are leaf wilting, decrease in plant height, in the number of leaves and in canopy area (Boyer, 1982, Passioura et al., 1992; Cramer et al., 2007). Invisible effects are injuries of plasma membrane, disturbances in water status of different organs, and a decrease in chlorophyll content (Blum and Ebercon, 1981, Medrano et al., 2003). The plant resists drought by reducing its leaf canopy and closing its stomata (Chaumont et al., 1997, Flexas et al., 2002). At cellular level, water stress affects transcripts which are involved in metabolism, transport, and the biogenesis of cellular components (Cramer et al., 2007). Thus, water deficit-treated plants appear to have a high demand to adjust osmotically, detoxify free radicals (reactive oxygen species), and cope with photoinhibition.

In recent years, the use of processed mineral particles in plant protection in low input sustainable agriculture has been developed in order to repel insects (Glenn et al., 1999; Showler, 2002), to suppress disease incidence (Glen and Puterka, 2005), to reduce heat stress and solar injury (Jifon and Syvertson, 2003, Glenn et al., 2003) and to enhance net carbon assimilation

(Glenn et al., 2003). The presence of mineral particles on the leaf surface can reduce the amount of photosynthetically active radiation (PAR) reaching the leaf surface by reflecting PAR. However, under water stress condition, Glenn and co-authors (2001) reported that the application of a reflective coating on plants provided more benefit in reducing the heat load than reduction in potential assimilation rate. Megagreen® is a micronized calcite, elaborated from sedimentary limestones rock, which is finned and activated by tribomechanic process (European Patent N° WO/2000/064586). These processed particles give a very reactive product which has a beneficial effect on several horticultural products such as olive tree, maize, strawberry and lettuce under drought conditions. However, no result on the physiological effects of Megagreen has been published.

In the present paper, the effects of Megagreen processed calcite particles on gas exchange, stomata conductance and primary photochemistry were examined during water deficit conditions in potted wine grapes grown in a glasshouse. Although the use of potted vines might induce criticism because this approach does not represent field conditions (Bravdo, 2005), the lack of basic knowledge about adaptation to water stress of this grape cultivar and the difficulty of establishing in-the-field genuine “wet” and “dry” treatments (Cot is mostly grown in areas where occasional summer rainfall occurs) underlied our decision on about the usefulness of a pot approach.

Materials and methods

Plant material. The experiment was carried out in controlled conditions on twelve replications (plants $n = 12$) in a completely randomized design. Two-month-old plants were used for the experiment. The ‘Cot’ red wine grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) was grafted on to 3309C rootstock. Rooted cuttings were grown in individual 10 L plastic pots, containing mixed peat and sand (substrate Pozzolana). The experiment was carried out in Toulouse (southern France, lat.43°32’14.50’’N; long. 1°29’44.25’’W; altitude 148 m), in a glasshouse of the viticulture and enology department/Institut Notional Polytechnique de Toulouse. The environmental conditions were approximatively 30/25°C (day/night) with natural photoperiod (between 0400 to 1500_{HR}), and 60 - 70% relative humidity. The plants were watered three times a week with 0.6 L/vine of a reference complete nutrient solution (Ibrahim, 2001).

Drought and Megagreen treatments. Water stress was imposed by decreasing the irrigation volume from 0.6 L (control) to 0.2 L (stress). Plant water status was monitored every two days from veraison to the end of the experiment by measuring predawn and midday leaf water potentials with a pressure chamber according to Scholander et al. (1965). Predawn water potential (ψ_{PD}) in the controls was higher than - 0.3 MPa and lower than - 0.5 MPa in water stressed plants (Matthews et al., 1987; Girona et al., 2006).

Grapevine plants received two applications of Megagreen: at the onset of the drought treatment and two weeks later. The Megagreen doses (0.00 (D₀) as a control 0.33 (D₁), 0.66 (D₂), 1.00 (D₃) and 1.33% (w/v) (D₄)) were prepared by adding the particles for application.

Plant water relations. Every two days, at predawn (0300 to 0400_{HR}), ψ_{PD} was determined on three fully expanded leaves by using a pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, Ore. USA). At midday (1200 to 1300_{HR}) on the same day, water potential was measured on the leaves used for photosynthesis and chlorophyll fluorescence measurements.

Chlorophyll Fluorescence. Leaf chlorophyll fluorescence measurements were performed on attached leaves using an open infra-red gas-exchange system with an integrated fluorescence

chamber head model (LI-6400-40 LCF, Lincoln, Nebr. USA). For stressed and control plants, six leaves of different plants were used at the time of measurement, leaf temperature was set at glasshouse air temperature and relative humidity, and chamber air CO₂ was set at 400 μL L⁻¹. The analyses of fluorescence were performed using the light-doubling technique; the quantum efficiency of PSII photochemistry was estimated as follows: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ where F_m' is the pulse-saturated fluorescence yield in the light (when all the PSII traps are closed), and F_s is the steady-state fluorescence yield in the light. Photochemical quenching (qP) of Chl a fluorescence was estimated as follows: $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ where F_o' is the lowest fluorescence yield with open PSII centres (after dark imposition).

Net photosynthesis. Single leaf gas exchange measurements were coupled with measurements of leaf chlorophyll fluorescence. Maximal net photosynthesis (A_{max}) was measured on a block by block basis from 0900 to 1200_{HR} using LI-6400-40 LCF gas exchange analyzer placed at the top of the leaf chamber. The sample leaf was placed in the cuvette that was maintained at ambient temperature and humidity, and exposed to saturating photosynthetic photon flux density PPF (1500 μmol m⁻² s⁻¹) and a fixed CO₂ concentration of 400 μL L⁻¹. A_{max} (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) and stomatal conductance to water vapor, g_s (mol H₂O m⁻² s⁻¹) were measured once stomatal conductance and CO₂ assimilation had been stable.

Data analysis and experimental design. The experiment design was a completely randomized plan ($n = 12$). Treatments were 12 vines well-watered and 12 vines water stressed per each dose of Megagreen treatment D_0 (0.00 as a control), D_1 (0.33), D_2 (0.66), D_3 (1.00) and D_4 (1.33% w/v) for a total 120 vines. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and checked for significant probability ($P \leq 0.05$) level using Sigmastat® 2.03 Statistical Software. The difference between the means was determined using Fisher's Least Significant Difference at a probability ($P \leq 0.05$).

Results

The exposure of plants to water stress (with or without Megagreen application) resulted in a significant decrease in water potential measured in the younger fully expanded leaves before dawn and at midday (with an exception at the end of the experiment for midday potential following Megagreen treatment, Fig. 1). Under drought conditions, Megagreen application significantly but only slightly increased predawn leaf water potential and generally did not affect mid-day leaf water potential. However, a significant positive effect was observed on both potentials at the end of the experiment (4-week treatment).

A_{max} was already markedly depressed by 5 d of water deficiency (30% of the capacity of the controls) and remained on average at similar low values thereafter (Fig. 2). The negative effect on A_{max} was associated with a parallel effect on the leaf stomata conductance (g_s). In water stress plants, Megagreen treatment did not affect A_{max} after 5 and 11 d but enhanced A_{max} at 16 d and thereafter, until after 3 weeks A_{max} reached a similar value in stressed as in control plants. Thus, Megagreen was able to fully restore A_{max} in drought-stressed plants. This positive effect of Megagreen on A_{max} was associated with a positive but less pronounced effect on g_s (and leaf transpiration, not shown). Thus, the photosynthetic water use efficiency was increased in stressed plants treated with Megagreen as compared to the controls. As indicated in Fig. 3, the repercussions of drought and Megagreen treatments (4-week duration) were similar in young and old leaves as compared to those observed on the younger fully expanded leaves. Thus, only the latter were used to further study Megagreen action.

The positive effect of Megagreen on photosynthetic CO₂ fixation and stomatal conductance occurred in the morning as well as in the afternoon (Fig. 4). The steady state values reached by Φ PSII were low in all types of plants due to the high irradiances on the leaves during measurements (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). Chla fluorescence analysis revealed substantial differences between leaves of water stressed and control plants (4-week exposure to drought, Fig. 5) since the values reached by Φ PSII in stressed plants were lower than in the controls. Megagreen treatment partly restored the PSII photochemistry in the former. Neither water stress nor Megagreen response on qP and Fv/Fm ratio was evident.

Various Megagreen doses were applied on water stressed and control plants. All the data (A_{max} , g_s and Φ PSII) available for duration of treatment longer than 15 d were compiled in figures 6. On average, Megagreen treatments did not significantly affect the photosynthetic parameters in control plants whereas the beneficial effect of Megagreen on stressed plant photosynthesis was again clearly observed. The conventional treatment (equivalent to a rate of 150 L of 1.00% (w/v) mixture per ha) gave satisfying results. In situation of very high leaf to air vapor pressure deficit (VPD) as it was the case in the afternoon of the of August 7th (day 24), A_{max} and g_s were increased in Megagreen treated control plants indicating that Megagreen can occasionally enhance photosynthesis of well watered plant (Fig. 7).

Under water deficiency, CO₂ uptake was no longer noticeably affected by water shortage if the CO₂ concentration around the leaves was increased from 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ (“natural” concentration) to 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ (high concentration, Fig. 8). Interestingly, under high CO₂ concentration, Megagreen no longer stimulate A_{max} in stressed plants.

Discussion

Predawn and midday leaf water potential can serve as indicators of water stress intensity and water status of grapevines (Williams and Araujo, 2002). In the present experiment, water limitation was imposed on young vine plants cultivated in a glasshouse under natural sun light for four weeks in the summer by reducing watering. The lowest value of leaf water potential reached during the treatment in stress plant was -0.7 MPa before dawn and -1.7 MPa at midday. Although marked, the stress was not severe for ‘Cot’ grapevine cultivar since water limited plants showed visible signs of drought (such as loss of turgor) but no defoliation or leaf necrosis (data not shown). In well-watered plants, midday leaf water potential was lower at the end as compared to the beginning of the experiment indicating some water constraint even in control plants due to high vapor pressure deficit during the 4th week of the drought period at noon. In general, Megagreen application did not change leaf water potentials of water limited plants suggesting that Megagreen effects do not result from any marked improvement of water status of the plants.

Water stress is a limiting factor for a wide range of physiological processes in plants (Escolana et al., 2002). Leaf water status and carbon uptake are under stomatal control. Stomata closure is one of the earliest responses to drought, resulting in the protection of the plants against harmful dehydration but also inevitably results in reduction of CO₂ uptake by photosynthesis. Flexas et al, (2002) suggest that stomatal conductance may be a useful indicator of grapevine water stress. In drought conditions, stomatal closure can even occur before detectable changes in leaf water potential (Correia et al., 1990; Flexas et al., 1998, 2002). Soar and co-authors (2006) indicated that ‘Shiraz’ grape cultivar responded to increasing stressful conditions by constraining stomatal opening in a strong exponential decay. In our experiment, drought stress strongly

decreased maximal net CO₂ assimilation rate and stomatal conductance of fully expanded leaves of 'Cot' grape cultivar (Fig. 2). Mattii and Storchi (2002) showed a linear negative correlation between leaf assimilation and midday leaf-water potential for 'Sangiovese' grape cultivar, with a 35% reduction in A_{max} for leaf-water potentials ranging from -1.0 to -1.5 MPa. Shultz (2003) reported that water stress distinctly influences gas exchange and water relations in grapevine cultivars in relation to difference in their hydraulic architecture. In the present case, in water stressed plants, low values of A_{max} probably directly resulted from stomatal factors rather than damage of the photosynthetic apparatus since A_{max} was restored under elevated CO₂ concentration (800 μL L⁻¹) around the leaf which allows the substrate of Rubisco to diffuse to the site of carboxylation. Megagreen application led to a clear restoration of A_{max} in drought stressed plants. This positive effect of Megagreen was associated with a positive but less pronounced effect on g_s, thus increasing photosynthetic water use efficiency in stressed plants treated with Megagreen as compared to the controls. Thus, we suggest that Megagreen stimulates photosynthesis in drought stress plants via a positive effect on g_s. This hypothesis is strengthened by the fact that Megagreen had only minor (if any) effect on leaf water potentials and did not increase further CO₂ uptake in water limited plant for which photosynthesis was restored by enhancing CO₂ concentration. This agrees well with the hypothesis that Megagreen prevailing mechanism of action is through stomata opening, at least under the present moderate water limitation.

Photoinhibition or a decrease in quantum efficiency of PSII might be one of the main factors for A_{max} reduction. A_{max} decrease in Fv/Fm is considered as an indicator of photoinhibition and structural damage to the PSII reaction center complex. The lack of significant effects of drought on Fv/Fm in the present study implies that there was little effect of stress on PSII and the primary reactions of photosynthesis. Severe drought stress conditions may be required to induce quantifiable reduction in PSII efficiency. This strongly supports our hypothesis that 1- present water stress was moderate, 2- photosynthesis was affected by drought through stomatal activity and that Megagreen stimulation of CO₂ uptake in drought conditions occurred through an increase in g_s.

The present investigation is the first study the authors are aware of on the repercussions of processed calcite particles on photosynthesis of grapevines grown under controlled water stress conditions. The positive effect of Megagreen application on photosynthetic CO₂ fixation and stomatal conductance occurred in the morning as well as in the afternoon suggesting it took place throughout the day (Fig. 4). This effect was observed under high and low atmospheric vapor pressure deficit (VPD). Most of our results concern young fully expanded leaves. However, we verified that the major effects observed on these leaves were also observed on both young and old leaves. It thus appears that the modifications of leaf photosynthesis induced by Megagreen occur in permanence and concern the whole plant canopy.

We can compare the electron transport rates estimated from fluorescence measurement (Jf) with the theoretical minimum rates for CO₂ assimilation (Jc) calculated from gas-exchange measurements (Cornic and Briantais, 1991) Jf was estimated by multiplying the quantum yield of PSII electron transport by irradiance. The result was multiplied by 0.4 because leaves typically have an absorptance of 0.8 and because it was assumed that incident radiation is equally distributed to the photosystem. Jc is based on A_{max} (neglecting dark respiration) multiplied by 4 since there is a minimum requirement of 4 electrons per CO₂ fixed in photosynthesis. In leaves of control and Megagreen treated water stress plants, Jf was ca 42 μmol m⁻² s⁻¹ (ΦPSII = 0.08) and Jc was ca 40 μmol m⁻² s⁻¹ (A_{max} = 10 μmol m⁻² s⁻¹). Thus, the rates of electron flow for carbon assimilation were very similar to those calculated from PSII activity. This is consistent with low

activity of reactions other than those of the Calvin cycle which consume photosynthetically-generated electrons (Calatayud et al., 2000). By contrast, in water stressed plants not treated with Megagreen, J_f (ca $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with $\Phi_{\text{PSII}} = 0.06$) exceeded J_c ($8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with $A_{\text{max}} = 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) showing that processes such as photorespiration can be major sinks for photosynthetic electrons. Indeed, water stressed and Megagreen treatments did not significantly alter the steady-state values of the photochemical quenching (qP, i.e the PSII red-ox state).

The molecular mechanisms allowing Megagreen to open stomata have not yet been elucidated. No information is known about its permeability through the cuticle. It can stimulate the production of endogenous products eliciting the synthesis of non-identified growth activators or inhibitors or shifting the endogenous hormone balance. Our own preliminary results on *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana plumbaginifolia* suspension cells indicated that Megagreen caused an increase in cytosolic calcium, depolarization of the plasma membrane and the activation of anion channels (data not shown). These cellular signaling processes are consistent with Megagreen acting as an “elicitor”. However, further research is needed to understand the accurate mechanisms responsible for the beneficial effect of Megagreen on plants subjected to drought conditions.

Concluding Remarks

Megagreen (a commercial calcium carbonate particle film material) application alleviates the adverse effect of water stress on grape photosynthesis. The beneficial effect of Megagreen is mainly achieved by increasing stomatal conductance. This is observed over the day and in the whole plant canopy. Megagreen induced an increased in photosynthetic CO_2 fixation which is higher than that in leaf transpiration so that Photosynthetic water use efficiency was improved. Megagreen application may also improve well watered plant photosynthesis under high leaf to air VPD. Repercussions of Megagreen on photosynthesis are dose-dependent and the recommended dose gave good results. Preliminary results suggest that Megagreen action may involve components of signaling pathways such as changes in cellular calcium compartmentation.

Literature Cited

- Baz, M. and R.T. Fernandez, 2002. Evaluating woody ornamentals for use in herbicide phytoremediation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127:991-997.
- Bertamini, M., L. Zulini, K. Muthuchelian, and N. Nedunchezian. 2006. Effect of water deficit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. *Photosynthetica* 44:151-154.
- Blum, A. and A. Ebercon. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21:43-47.
- Boyer, J. S. 1982. Plant productivity and environment. *Sci.* 218:443-448.
- Bravdo, B.A. 2005. Physiological mechanisms involved in the production of non-hydraulic root signals by partial rootzone drying. *Acta Hort.* 689:267–275.
- Calatayud, P.A., E. Llovera, J.F. Bois and T. Lamaze. 2000. Photosynthesis in drought-adapted cassava. *Photosynthetica* 38:97-104.
- Chaumont, F., W.F. Loomis and M.J. Chrispeels. 1997. Expression of an Arabidopsis plasma membrane aquaporin in Dictyostelium results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94:6202-6209

- Chaves, M.M., J. S. Pereira, J. Maroco, M. L. Rodrigues, C. P. P. Ricardo., M. L. Osório, I. Carvalho, T. Faria and C. Pinheiro. 2002. How plants cope with water Stress in the field? photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* 89:907-916.
- Cornic, G. and J.M. Briantais. 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentration and during drought stress. *Planta* 183:178-184.
- Cornic, G., J. Ghashghaie, B. Genty and J.M. Briantais. 1992. Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica* 27:295-309.
- Cramer, G. R. Ergül, A. Grimple, J. Tillett, R. L. Tattersall, E. A. R. Bohlman, M. C. Vincent, D. Sonderegger, J. Evans, J. Osborne, C. Quilici, D. Schlauch, K. A. Schooley, D. A and J. C. Cushman. 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* 7:111-134.
- Cuevas, E., P. Baeza, and J.R. Lissarrague. 2006. Variation in stomatal behaviour and gas exchange between mid-morning and mid-afternoon of north-south oriented grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo) at different levels of soil water availability. *Scientia Hort.* 108:173-180.
- Dry, P. and B. R. Loveys. 1998. Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 4:140-148.
- Düring, H. 1987. Stomatal responses to alterations of soil and air humidity in grapevines. *Vitis* 26:9-18.
- Düring, H. 1988. CO₂ assimilation and photorespiration of grapevine leaves: responses to light and drought. *Vitis* 27:199-208.
- Düring, H. 1991. Determination of photosynthetic capacity of grapevine leaves. *Vitis* 30:49-56.
- Düring, H., B.R. Loveys, and P.R. Dry. 1996. Root signals affect water use efficiency and shoot growth. *Acta Hort.* 427:1-13.
- Escalona, J.M., J. Flexas, and H. Medrano. 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiol.* 26:421-433.
- European Patent office WO/2000/064586. 2000. Device for micronizing materials. 72pp.
- Flexas, J., J. Bota, J.M. Escalona, B. Sampol and H. Medrano. 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biol.* 29:461-471.
- Flexas, J., J.M. Escalona, and H. Medrano. 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell and Environ.* 2:39-48.
- Girona, J., M. Mata, J. del Campo, A. Arbonés, E. Bartra and J. Marsal. 2006. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irr. Sci.* 24:115-127.
- Glen, D.M. and Puterka G.J. 2005. Particle Films: A New Technology for Agriculture. *Horticultural Rev.* 31:1-44.
- Glenn, D.M., A. Erez, G.J. Puterka, and P. Gundrum. 2003. Particle films affect carbon assimilation and yield in 'Empire' apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:356-362.
- Glenn, D.M., G.J. Puterka, S.R. Drake, T.R. Unruh, P. Baherele, E. Prado, and T. Baugher. 2001. Particle film application influences apple leaf physiology, fruit yield, and fruit quality. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:175-181.
- Glenn, D.M., G.J. Puterka, T. Van der Zwet, R.E. Byers, and C. Feldhake. 1999. Hydrophobic particle films: A new paradigm for suppression of arthropod pests and plant diseases. *J. Econ. Entomol.* 92:759-771.

- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:519-570.
- Ibrahim, H. 2001. Genèse et évolution des acides organiques dans les feuilles, les baies, les moûts et les vins des cépages Cot et Négrette (*Vitis vinifera* L.). Institut National Polytechnique de Toulouse France. PhD Diss. pp 299.
- Jifon, J.L. and J.P. Syvertsen. 2003. Kaolin particle film applications can increase photosynthesis and water use efficiency of 'Ruby Red' grapefruit leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:107-112.
- Kaiser, W.M., G. Schöner and S. Neimanis. 1981. Photosynthesis under osmotic stress. Differential recovery of photosynthetic activities of stroma enzymes, intact chloroplasts, and leaf slices after exposure to high solute concentrations. *Planta* 153:430-435.
- Matthews, M.A., M.M. Anderson and H.R. Schultz. 1987. Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis* 26:147-160.
- Medrano, H., J. M. Escalona, J. Cifre, J. Bota, and J. Flexas. 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 Biol.* 30:607-619.
- Moutinho-Pereira, J.M., C.M. Correia, B.M. Gonçalves, E.A. Bacelar, and J.M. Torres-Pereira. 2004. Leaf gas exchange and water relations of grapevines grown in three different conditions. *Photosynthetica* 42:81-86.
- Natali, S., C. Xiloyannis, and P. Castagneto. 1985. Effect of soil water content on leaf water potential and stomatal resistance of grapevine (*Vitis vinifera*) grafted to different rootstocks. *Acta Hort.* 171:331-340.
- Passioura, J.B., M.C. Ball, and J.H. Knight. 1992. Mangroves may salinize the soil and in so doing limit their transpiration rate. *Functional Ecol.* 6:476-481.
- Scholander P.F., Hemmingen, E. and Gary W. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Sci.* 148:339-346.
- Showler, A.T. 2002. Effects of water deficit stress, shade, weed competition and kaolin particle film on selected foliar free amino acid accumulations in cotton, *Gossypium hirsutum* (L.). *J. Chemical Ecol.* 28:631-651.
- Shultz H.R. 2003. Differences in hydraulic architecture account for nearisohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant Cell and Environ.* 26:1393-1405.
- Williams, L.E. 1996. Effects of soil water content and environmental conditions on vine water status and gas exchange of *Vitis vinifera* L. cv. chardonnay. In: 1^{er} Colloque International "Les terroirs viticoles", Angers, France, pp. 161-163.
- Williams, L.E. and F.J. Araujo. 2002. Correlations among predawn leaf, midday leaf, and midday stem water potential and their correlations with other measures of soil and plant water status in *Vitis vinifera*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127:448-454.
- Williams, L.E., N.K. Dokoozlian and R. Wample. 1994. Grape. In: Schaffer, B., Anderson, P.C. (Eds.), *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 85-133.
- Winkel, T. and S. Rambal. 1990. Stomatal conductance of some grapevines growing in the field under a Mediterranean environment. *Agr. For. Meteorol.* 51:107-121.

Figures

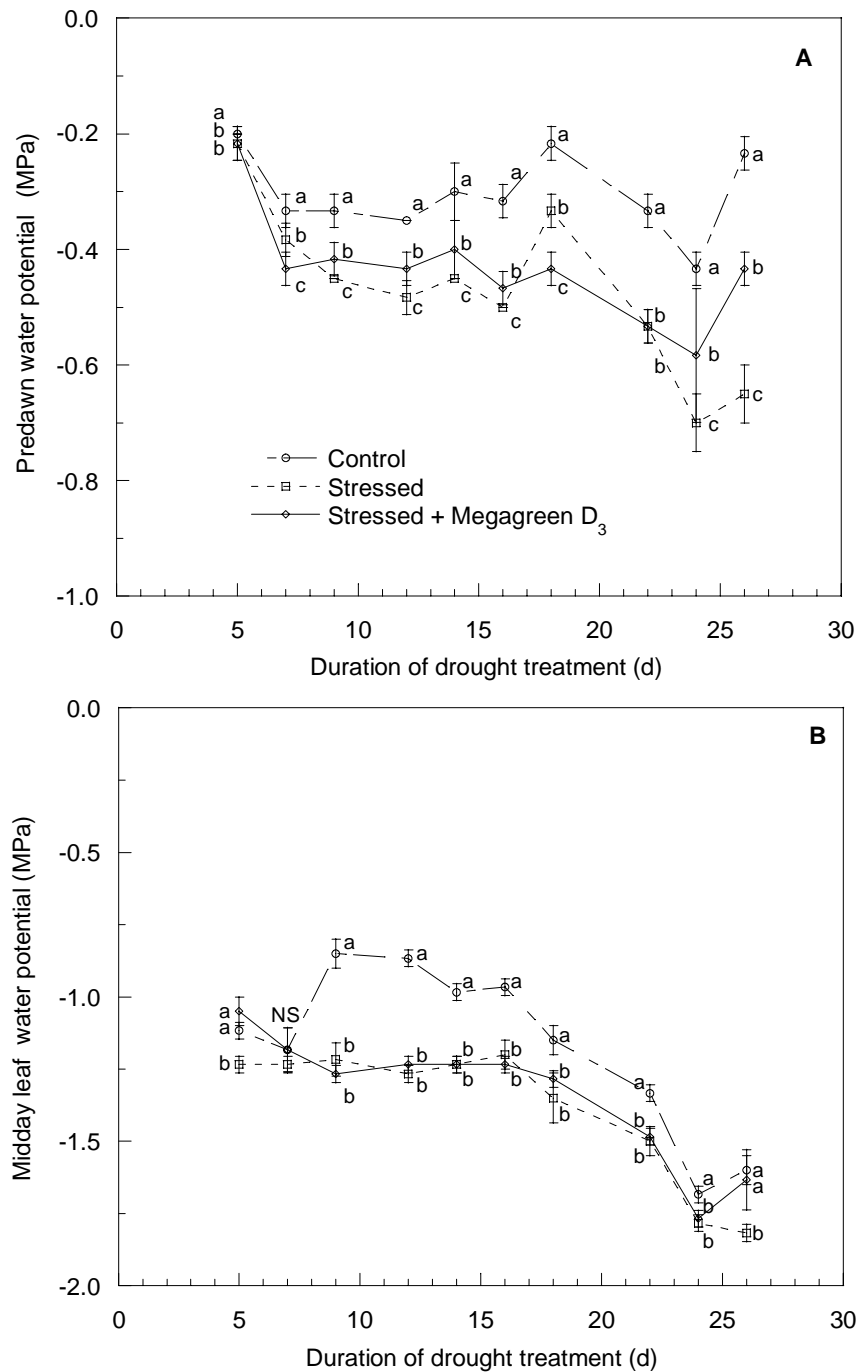


Fig. 1. Predawn (Ψ_{PD} A) and midday (Ψ_{MD} B) water potentials of fully expanded leaves of the Cot grape cultivar during the drought treatment. Each point represents a mean \pm SD ($n = 3$). NS,* indicate Nonsignificantly or significantly different means from control at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

Control: well-watered grapevines

Stressed: drought stressed grapevines

Stressed + Megagreen D₃: drought stressed grapevines subjected to Megagreen application.

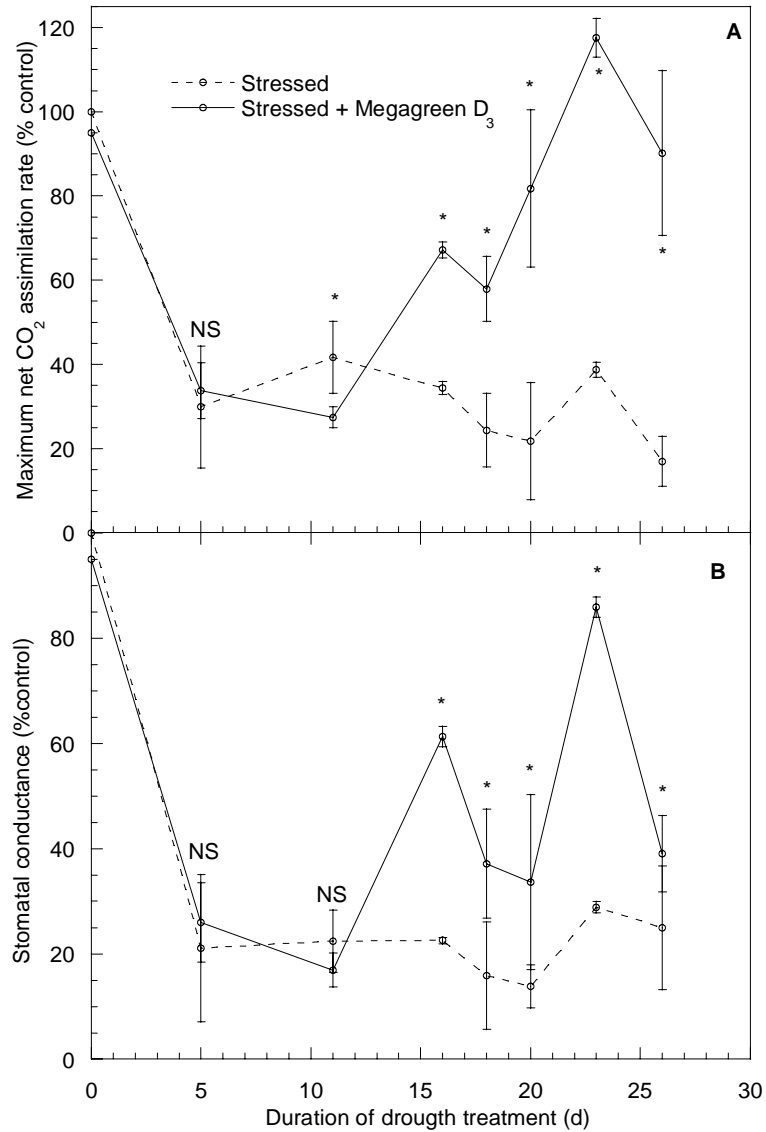


Fig. 2. Maximum net CO₂ assimilation rate (A_{max}) and stomatal conductance (g_s) of fully expanded leaves of the Cot grape cultivar after Megagreen treatments. Each point represents a mean \pm SD (n= 12). ^{NS,*} indicate Nonsignificantly or significantly different means from control at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

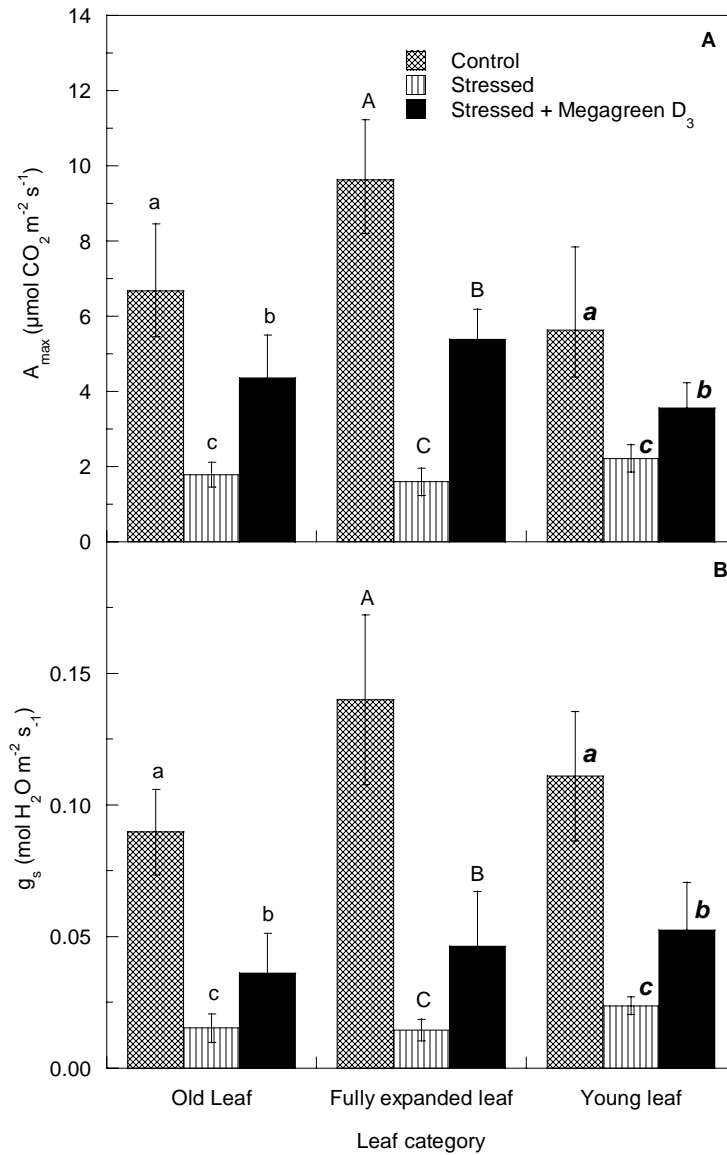


Fig 3. Maximum net CO₂ assimilation rate A_{max} (A) and stomatal conductance g_s (B) of old leaves, fully expanded leaves and young leaves for Cot grape cultivar subject to 4 weeks drought cycle and Megagreen treatments. Each bar represents mean \pm SD ($n = 7$). Treatments for the same leaf category sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

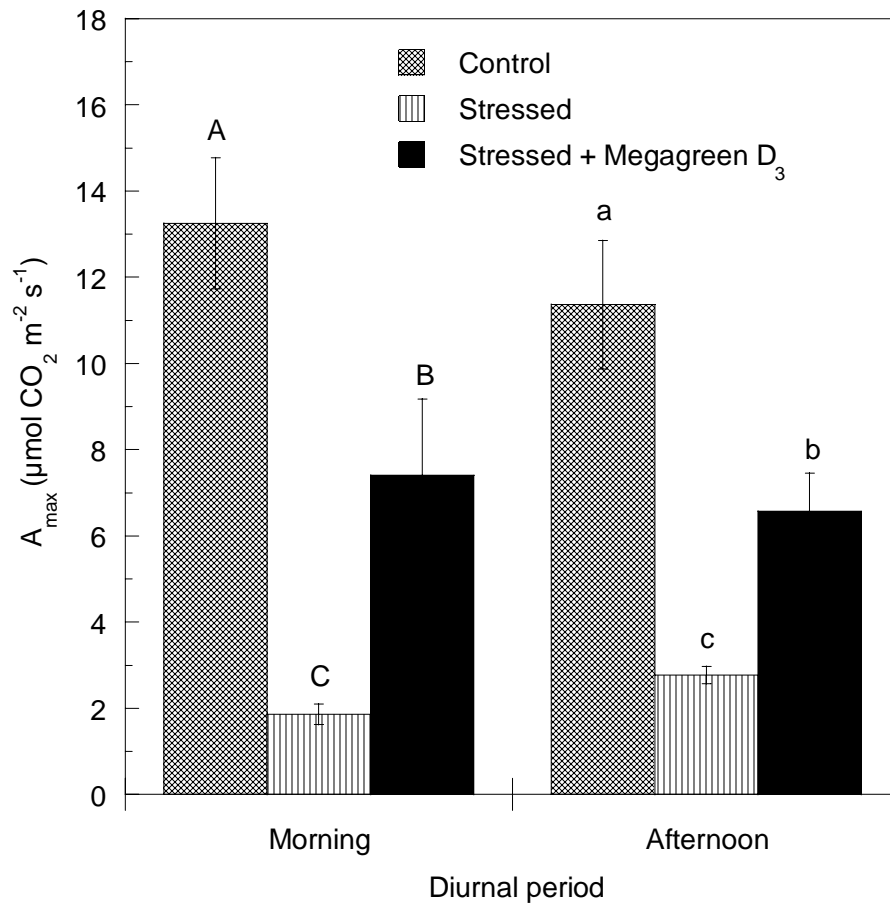


Fig. 4. Effect of Megagreen treatment on diurnal changes in maximum net CO₂ assimilation rate (A_{\max}). Each bar represents mean \pm SD ($n = 9$). Treatments sharing the same letter for each time measurement do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

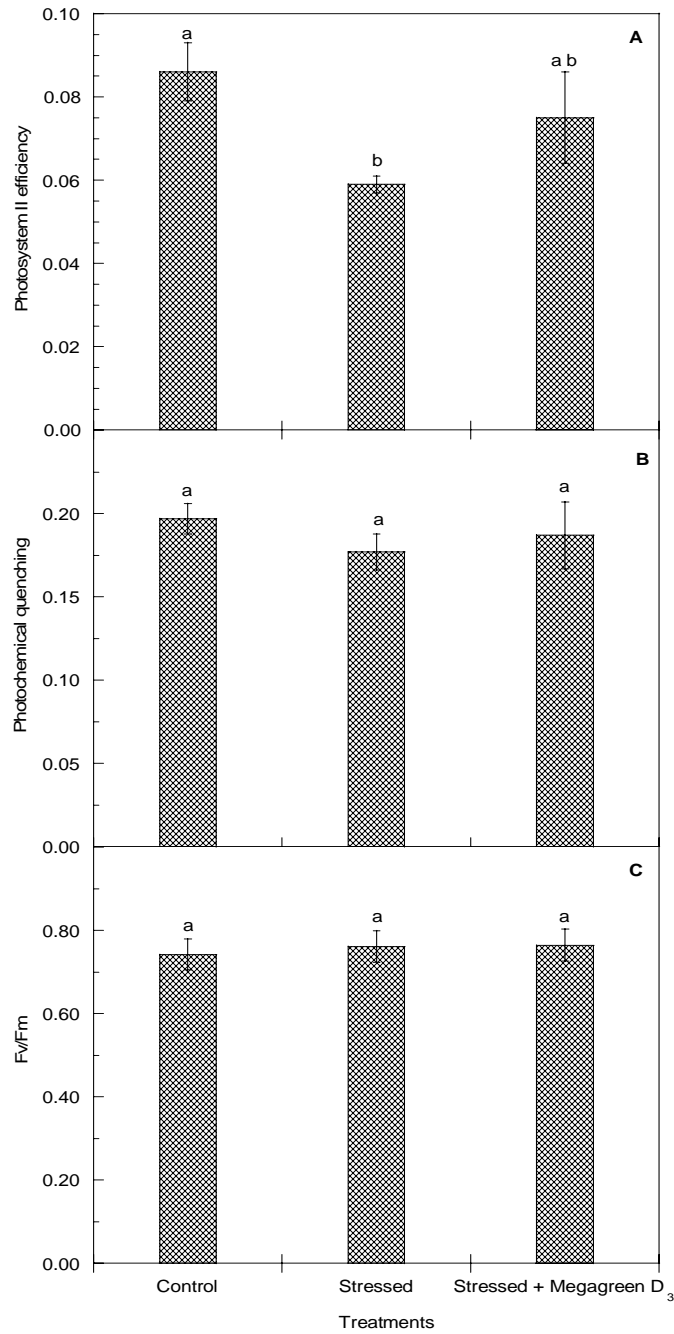


Fig. 5. Effect of Megagreen on Photosystem II efficiency (Φ PSII), photochemical quenching (qP) and photochemical efficiency of photosystem II of dark adapted (C) of fully expanded leaves subject to 4 weeks drought cycle of Cot grape cultivar. Each bar represents mean \pm SD ($n = 7$). Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

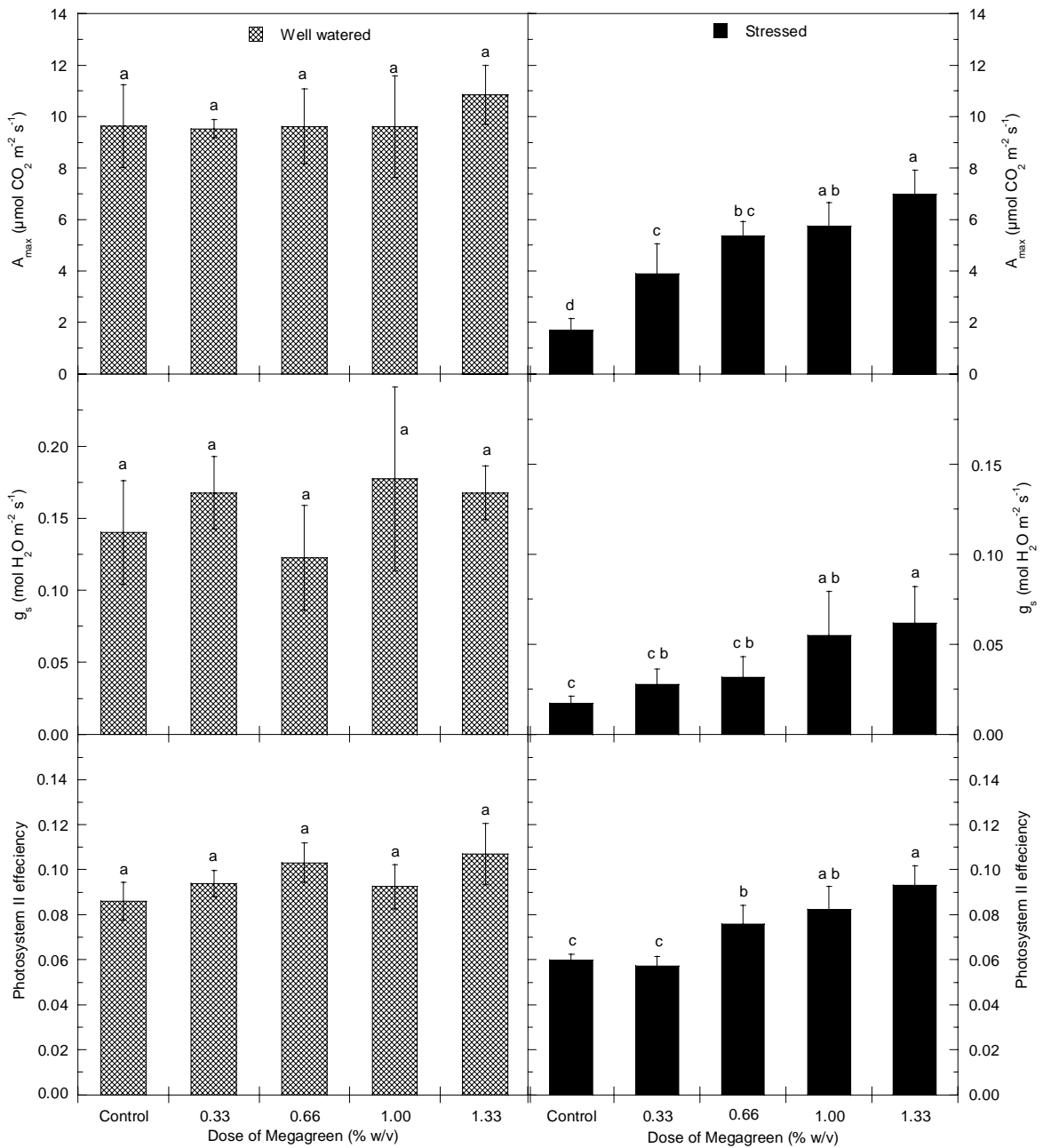


Fig. 6. Effect of different doses of Megagreen on maximum net CO₂ assimilation rate (A_{max}), stomatal conductance (g_s) and Photosystem II efficiency (Φ_{PSII}) of fully expanded leaves from well-watered and stressed treatments of Cot grape cultivar. D₀, D₁, D₂, D₃ and D₄ refer to 0.00, 0.33, 0.66, 1.00 and 1.33% (w/v) Megagreen dose respectively. Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

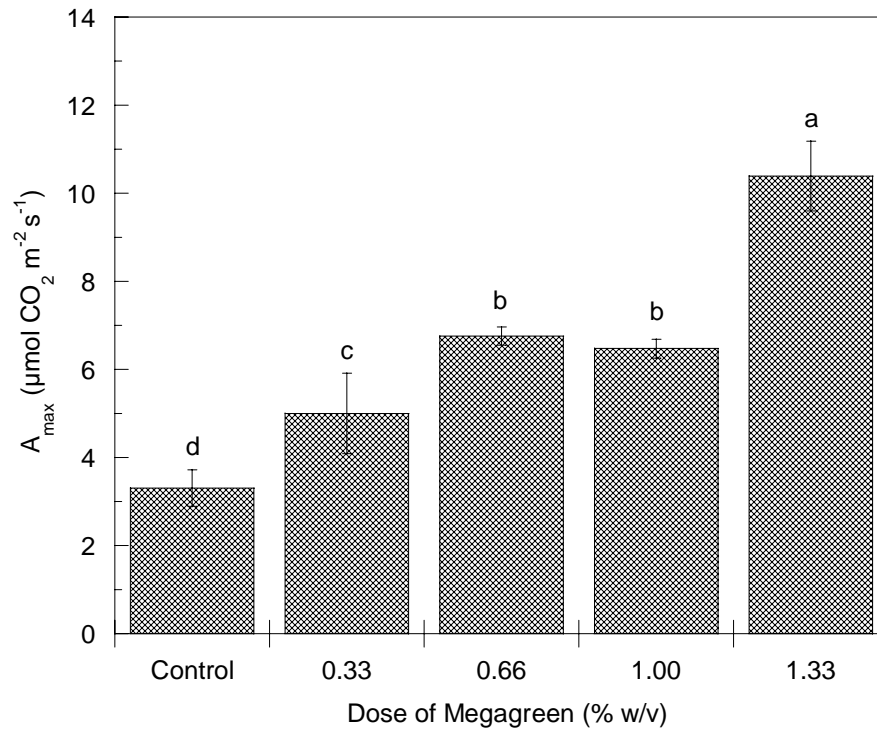


Fig. 7. Effect of different doses of Megagreen on maximum net CO₂ assimilation rate (A_{\max}), of fully expanded leaves from well-watered grapevines of Cot grape cultivar measured in the afternoon at high VPD day. Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

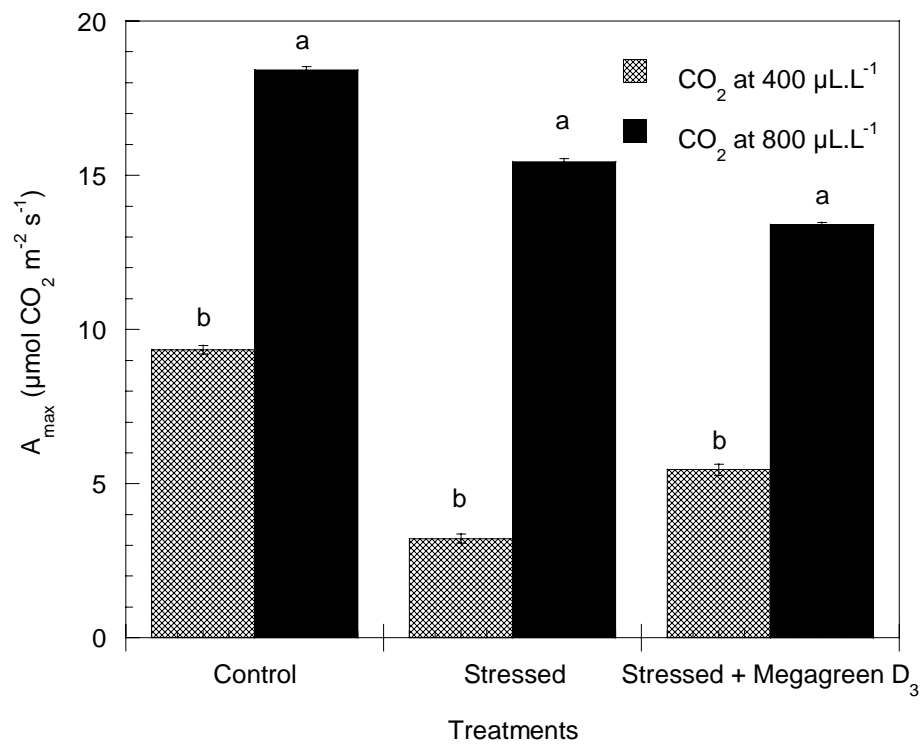


Fig. 8. Effect of the standard Megagreen treatment D_3 on maximal net assimilation rate (A_{max}) at 400 and 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ CO_2 concentrations of fully expanded leaves subject to 4 weeks of drought treatment. Treatments sharing the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$. Mean separation by Fisher's LSD.

Early Megagreen-induced cellular responses, implication for stomatal closure

Attia Faouzi^{1,*}, Errakhi Rafik^{2,*}, Garcia François³, Rona Jean Pierre², Martinez Laurent⁴, Lamaze Thierry⁵, Garcia Marc¹ and Bouteau François²

¹ *Institut National Polytechnique de Toulouse, ENSAT/CVOMP, Avenue de l'Agrobiopole BP32607, 31326 Auzeville Tolosane, Toulouse - France.*

² *Université Denis Diderot, Paris7. Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes EA3514 2, Place Jussieu 75005 Paris - France.*

³ *Université Montpellier 1 - Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault BP 14491, 34093 Montpellier cedex 5, France*

⁴ *Agronutrition Equipe Recherche et Développement, Parc Actinvestre 3 avenue de l'Orchidée - 31390 Carbonne - France.*

⁵ *Centre d'Etudes Spatiales de la Biosphère, 18 Avenue Ed. Belin - bpi 2801 ; 31401 Toulouse – France.*

* Authors contributed equally to this work

Contacts: Tel: +33 5 62 19 39 00; Fax: +33 5 62 19 39 66. Email: faouzi.attia@ensat.fr

In Preparation to be submitted to Plant Signalling and Behavior

Early MEG -induced cellular responses, implication for stomatal closure

Abstract

We found that the addition of Megagreen ® (MEG), new processed calcite particles, on leaf epidermis induces stomata closure in different species and an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration of aequorin expressing tobacco cells. MEG also induces Ca^{2+} related responses similar to those triggered during ABA-induced stomata closure, namely cell depolarization, activation of anion channels, medium alkalization and ROS production. Most of these responses were abolished or decrease when MEG was added in the presence of Ca^{2+} chelators. Inhibition of H^+ -ATPases and anion channel activation by MEG are both components leading to the plasma membrane depolarization. These two processes are independent because impairing anion currents did not suppress the alkalization. The MEG-induced H_2O_2 production could be abolished upon pre-treatment of cells with diphenylene iodonium (DPI) chloride, an inhibitor of NADPH-oxidases. DPI also reduced MEG-induced alkalization of the culture medium suggesting that H_2O_2 production participate in this alkalization. Thus, these data suggests that one of the first effect observed in response to MEG is an increase in cytosolic Ca^{2+} through plasma membrane, in guard cells Ca^{2+} might then operate as a second messenger to regulate guard cell turgor and finally stomata aperture.

Introduction

MEG ® is a preparation from processed calcite particles, elaborated from sedimentary limestones rock, which is finned and activated by tribomechanic process ([European Patent N° WO/2000/064586](#)). These processed calcite particles give a very reactive product which has a beneficial effect on several horticultural products such as olive tree, grapevine, maize, strawberry and lettuce under drought conditions. MEG application on potted grapevines subjected to water stress treatments, increased photosynthetic CO_2 fixation which is more important than that increase in leaf transpiration so that photosynthetic water use efficiency is improved ([Attia *et al.*, submitted JASHS](#)). MEG application also improves photosynthesis on well-watered plant under high leaf to air vapour pressure deficit. These processed calcite particles enhanced plant photosynthesis via stomata control.

Over the last 20 years evidence has accumulated suggesting that calcium, through its role as a second messenger, is important in the regulation of a diverse array of cellular activities ([Rasmussen and Barrett, 1984](#)) and physiological responses in plants ([Dieter, 1984](#), [Rudd and Franklin-Tong, 1999](#); [White and Broadly, 2003](#)). Direct roles of calcium were also evidenced in the functioning of different photosynthesis related enzymes ([Brand and Becker, 1984](#); [Steven and Lukins, 2003](#); [Murray and Barber, 2006](#); [Tozawa *et al.*, 2007](#)). However, Ca^{2+} is also involved in response to drought through ABA-induced stomata closure. Plants lose over 90% of water by transpiration through stomatal pores formed by pairs of guard cells on the leaf surface. The hormone ABA is synthesized in response to drought stress and triggers a signaling cascade in guard cells that results in stomata closing ([Hetherington and Quatrano, 1991](#); [Leung and Giraudat, 1998](#)). Several studies have also indicated that most of the ABA induced responses required during ABA-induced stomata closure, i.e. membrane depolarisation, activation of anion channels in the plasma membrane ([Allen *et al.*, 2000](#); [Schröder *et al.*, 2001](#)), media alkalization

and ROS production (Pei *et al.*, 1997), are Ca^{2+} dependent. ABA was even shown to activate Ca^{2+} channels during drought stresses via the function of ROS and Rboh proteins (Torres and Dangl, 2005). It was effectively also reported, that the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ inhibits stomata opening (De-Silva *et al.*, 1985a,b; McAinsh *et al.*, 1990; Irving *et al.*, 1992).

As the main component of MEG is calcium, the aim of this study was to identify the nature of the putative cellular signaling events induced by MEG and involved in stomata regulation. We carried out an experimental layout on *Arabidopsis* and tobacco to study the impact of MEG on different well described ABA-induced cellular responses to improve our knowledge on MEG signaling process.

Results

MEG induces a Ca^{2+} dependent stomata closure

As Ca^{2+} is involved ABA-induced stomata closure, we checked for the effects of MEG on stomata aperture. The application of 50 μM MEG on the *Arabidopsis thaliana* leaves epidermis decreases stomata opening. Thirty minutes after addition of 50 μM MEG, the epidermis stomata began to close reaching its maximum 2 hours later (Fig. 1A). To see whether there is a requirement for Ca^{2+} influx when MEG inhibited stomata opening Ca^{2+} chelators were added in the incubation media. Both EGTA and BAPTA (5 mM) were applied to epidermal strips in a pre-treatment period of 15 min. Calcium chelators had no effect on stomata opening in the control (not shown), but it significantly counteract the MEG induced closure of stomata (Fig. 1B). These results suggested that the effect of MEG on the guard cells depend on an influx of Ca^{2+} into the cytosol. We thus investigated the effect of MEG on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in tobacco suspension cells expressing the Ca^{2+} -sensitive luminescent protein aequorin. Immediately after the addition of MEG in the medium of the cells, we effectively observed two successive transient increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Fig. 2). The 2nd Ca^{2+} increase was MEG-dose dependant.

MEG induces a depolarization of plasma membrane due to anion channel activation

Ion fluxes modulations are one of the earlier plant responses to ABA, and inhibition of H^+ proton pump and activation of anion channels in response to ABA were shown to be dependent on an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in *Arabidopsis* cells (Brault *et al.*, 2004). We tested by using electrophysiological approach the effect of MEG on ion currents and membrane potential. Under control conditions, the value of the resting membrane potential (V_m) of *A. thaliana* suspension cells in their culture medium was -47 ± 5 mV ($n=96$) of the same order of magnitude of those recorded in our previous studies (Reboutier *et al.*, 2002; Bouizgarne *et al.*, 2006). MEG induced a depolarization of the cell plasma membrane (Fig. 3A). This membrane potential (V_m) variation was concentration dependent (Fig. 3B). Previous electrophysiological studies and pharmacological analysis had identified in the PM of *A. thaliana* cells an anion current, which display the main hallmarks of slow anion channels (Reboutier *et al.*, 2002) and is sensitive to structurally unrelated anion channel inhibitors, 9-anthracen carboxylic acid (9-AC) and glibenclamide (Reboutier *et al.*, 2002; 2005; Brault *et al.*, 2004). MEG induced a concentration dependent increase of anion current reaching 455% at 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figs. 3C,D) from a mean control value of -0.28 ± 0.08 nA ($n=45$). The increase in anion current certainly explained the observed depolarization.

MEG Inhibits the Plasma Membrane Proton Pumping

The ABA inhibition of H⁺ proton pump being also dependent on the variation of cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis* cells (Brault *et al.*, 2004) we search for the effect of MEG on external pH variations. The pH of the culture medium in cultured *Arabidopsis* cells was monitored continuously. The pH ranged from 5.6 to 5.8. In *Arabidopsis* cell cultures, MEG induced rapid alkalization of the medium, which is dependant on MEG concentrations (Fig. 4A). Vanadate at 200 μM, a well known inhibitor of H⁺-ATPase activity, drastically reduced the MEG-induced alkalization (Fig. 4B), suggesting that MEG alkalization could occur through H⁺-ATPase activity decrease.

Thus, in response to MEG two different depolarizing processes are enhanced: first the activation of anion currents and second the inhibition of the H⁺-ATPases. Both processes could account for the MEG-induced depolarization. In order to know if these processes are dependent or not, we analyzed the effects of two anion currents inhibitors 9-AC and Gli on the MEG-induced alkalization. In the presence of 200 μM 9-AC or Gli, MEG induced a medium alkalization (Fig. 5). This effect was similar to the once observed in the absence of the anion channel inhibitor. The triggering of H⁺-ATPase inhibition induced by MEG was therefore independent of the anion currents. On the opposite chelation of extracellular Ca²⁺ by 5 mM EGTA or BAPTA abolished MEG-induced medium alkalization (Fig. 6A). Since extracellular Ca²⁺ is required for the inhibition of H⁺-ATPases, we also examined the effects of a La³⁺, a Ca²⁺-channel inhibitor, on the MEG-induced medium alkalization. La³⁺ greatly reduced the medium alkalization induced by MEG (Fig. 6B), confirming the role of Ca²⁺ influx on the MEG induced H⁺-ATPase inhibition.

MEG induced H₂O₂ production which NADPH oxidase-dependent

Reactive oxygen species were also shown to participate to ABA-induced stomata closure (Suhita *et al.*, 2004). We therefore search for MEG effect on ROS production. MEG at different concentrations increased the production of H₂O₂ which was detected by increasing of luminal mediated chemiluminescence's. The maximum production of H₂O₂ was monitored with 150 and 200 μg/ml of MEG (Fig. 7A). Within 15 min after addition of MEG, the H₂O₂ concentration of the culture medium began to increase, reaching a maximum at about 8 h (Fig. 7B) when untreated cell suspensions presented no significant increase in external H₂O₂ level during the time of experiments. This effect was dose dependent (Fig. 7A). Addition of 12 μM diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of NADPH-oxidase and of other flavoprotein enzymes (Murphy and Auh, 1996; Van Gestelen *et al.*, 1997), into cell medium diminished ROS-dependent fluorescence by 65% (Fig. 7C). These results suggest the involvement of plant enzymes such NADPH-oxidase in H₂O₂-production induced by MEG. Moreover, the pretreatment of cell suspension with 12 μM DPI also reduces the MEG-induced alkalization indicating that the generation of H₂O₂ by MEG could participate to medium alkalization (Fig. 6B).

Discussion

Megagreen enhanced plant photosynthesis via stomata movement regulation (Attia *et al.*, 2007). Plants lose over 90% of water by transpiration through stomata, pores formed by pairs of guard cells on the leaf surface. The hormone ABA is synthesized in response to drought stress and triggers a signaling cascade in guard cells that results in stomata closing (Hetherington and Quatrano, 1991; Leung and J. Giraudat, 1998). Studies have indicated that membrane depolarisation and the activation of anion channels in the plasma membrane of guard cells are

required during ABA-induced stomata closing (Allen *et al.*, 2000; Schoroder *et al.*, 2001). Coupling of media alkalization and ROS production to membrane ion channel regulation is essential for this ABA-mediated response (Pei *et al.*, 1997). The aim of this study was to identify the nature of the cellular signaling induced by MEG, a processed calcite, since cytosolic Ca^{2+} variations are a key component of stomata regulation. Our study showed that MEG application reduced stomata opening and could increase cytosolic Ca^{2+} . The cytosolic free Ca^{2+} in the cell is under strict biochemical and physiological control. Cells generally operate to keep $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ low (~100-200 nM) in the 'resting' or quiescent state. Increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ can be used as a 'second messenger' following cell stimulation, and in this way $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ a cellular response to the stimulus. Characteristic changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ have been seen to precede the responses of plant cells and essentially stomata closure (Irving *et al.*, 1992; White and Broadly, 2003). As described for the action of ABA, the abolition of MEG-induced stomata closure by the BAPTA and EGTA can be interpreted that these calcium chelators disrupts the deployment of calcium as a second messenger and hence blocks the action of MEG on stomata movements (Fig. 1). In the other hand, we cannot entirely rule out the possibility that EGTA brings about alterations in the mechanical properties of the guard cell walls by chelating wall-associated calcium. The different calcium regimes employed here, including the treatments with EGTA, might be expected to modify the deformation properties of the cell walls to some extent.

By using cultured cells of Arabidopsis, a convenient model for studying ABA responses (Brault *et al.*, 2004), we showed that the addition of MEG induced a set of response identically to ABA. MEG induces a rapid alkalization of the medium. This effect is similar to those reported for ABA (Brault *et al.*, 2004), although the medium alkalization promoted by the proton pump inhibitors was more than 50% higher in magnitude. Since the MEG-induced alkalization does not occur in cells pre-treated with a classic H^+ -ATPase inhibitor (Fig. 4B), this alkalization is thus certainly dependent on active proton pumps. This suggests that the target of MEG that leads to the medium alkalization could be either the proton pump itself or a signaling pathway controlling its activity. An increase in cytosolic Ca^{2+} could be directly responsible for the decrease of H^+ -ATPase activity as previously reported (Kinoshita *et al.*; 1995) since BAPTA or EGTA decrease the MEG-induced alkalization of the medium.

Although the MEG-induced medium alkalization is concomitant with the MEG-induced plasma membrane depolarization, one part of the depolarization is certainly due to the activation of anion current by MEG (Fig. 3). Anion channels are the targets of multiple signaling pathways in guard cells (Levchenko *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2006). Our reported results showed that medium alkalization was independent from anion channel activation. Both responses are shown to participate in stomata closure (Brault *et al.*, 2002, Suhita *et al.*, 2004, de Agneli *et al.*, 2007). Among these two responses, anion channel opening has been proposed to provide the major driving force for stomata closure (Roelfsema and Hedrich, 2005) and could thus explained the stomata closure induced by MG.

MEG induced ROS production by NADPH-oxidase

We also report that MEG induced a marked increase in ROS production in Arabidopsis cells culture, like as reported for ABA (Suhita, *et al.*, 2004). Production of ROS on exposure to MEG could be prevented DPI (Fig. 7C) suggesting that MEG induced ROS production involves NADPH oxidase activation. The rapid increase in ROS production (the oxidative burst) was shown to be essential for many of these processes and notably ABA-induced stomata closure

(Suhita *et al.*, 2004). Genetic studies have shown that respiratory burst oxidase homolog (Rboh) genes, encoding NADPH oxidases, are the main producers of signal transduction-associated ROS in cells during these processes notably ABA signaling (Mittler *et al.*, 2004, Torres and Dangl, 2005).

In conclusion, this study reports preliminary data indicating that a MEG-induced increase in cytosolic calcium certainly participate in a signaling pathway leading to stomata closure caused by MEG. This signaling process present some similarities to those described for the well known phytohormone ABA. Further studies could take advantage of the well described responses to ABA to evaluate the effect of MEG on plant cells.

MATERIALS AND METHODS

Arabidopsis Cell Cultures

A suspension cell culture from *Arabidopsis* (ecotype Columbia) was maintained as described previously (Reboutier *et al.*, 2002). Cells were cultured at 24°C, under continuous white light (40 mE m⁻² s⁻¹) with an orbital agitation at 130 rpm, in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL Gamborg culture medium (pH 5.8) (Gamborg *et al.*, 1968) and transferred to fresh medium every 7 d. All the experiments were conducted on 4-d-old cells. The viability of the cells during the experimental time course was systematically checked with Evans blue tests (not shown).

Cytoplasmic Ca²⁺ Measurement

For determination of cytoplasmic Ca²⁺ variations upon MEG treatment, cell suspensions were prepared from leaves of *Nicotiana plumbaginifolia* plants transformed with the apoaequorin gene (Knight *et al.*, 1991) and maintained according to Lecourieux *et al.*, (2002). For calcium measurement, aequorin was reconstituted by overnight incubation of cell suspensions in Linsmaier and Skoog medium supplemented by 30 g x L⁻¹ Suc and 2.5 mM native coelenterazine (Uptima). A total of 200 µL of cell suspension was placed in a luminometer cuvette. Treatments were performed by pipet-injection of 2 µL medium containing or not MEG. Aequorin luminescence was monitored every 0.2 s with a FB12-Berthold luminometer. At the end of each experiment, the residual aequorin was discharged by addition of 10% ethanol and 2 M CaCl₂ (final concentration). The resulting luminescence was used to estimate the total amount of aequorin in each experiment. Calibration of calcium measurements was performed by using the equation: pCa $\frac{1}{4}$ 0.332588(-logk)15.5593, where *k* is a rate constant equal to luminescence counts per second divided by total remaining counts (Knight *et al.*, 1996). To test the effects of EGTA and the different calcium channel inhibitors, cell suspensions were pretreated for 15 min before the addition of MEG.

H₂O₂ measurement

H₂O₂ release in the medium culture was quantified by measuring the chemiluminescence of luminol reacting with H₂O₂ (Jabs *et al.*, 1997). Briefly, 1 mL of the cell suspension was inoculated with MEG. 200 µL of the medium culture were added to 600 µL phosphate buffer (50 mM, pH 7.9) prior to addition of 100 µL luminol 1.1 mM (and 100 µL K₃[Fe(CN)₆ 14 mM]. Chemiluminescence was monitored at 5 min interval with a FB12-Berthold luminometer, with a signal integrating time of 0.2 s.

pH Responses Measurements

Continuous measurements of extracellular pH were performed in 5 mL of cultured cells. The experiments were run simultaneously in 2 3 10-mL flasks (control and test) each containing 1gFW/5 mL of suspension medium, at 24°C, with orbital shaking at 60 rpm. For each condition, the medium pH at the beginning of the experiment was between 5.8 and 6.0. Simultaneous changes in pH were followed on both suspension medium by using two Metrohm 632 pH meters with pH sensitive combined electrodes functioning in parallel and values were monitored during 45 min. The effectors were added when a stable pH was obtained. The buffer capacity of the culture medium was 4 meq OH⁻/pH unit.

Electrophysiology

Cells were immobilized by means of a microfunnel (approximately 30–80 mm o.d.) and controlled by a pneumatic micromanipulator (de Fonbrune, Ets Beaudoin, Paris). Impalements were carried out with a piezoelectric micromanipulator (PCS-5000, Burleigh, NY) on suspension cells in a continuous flow chamber (500 mL) made of perpeX. The flow rate was adjusted by gravity to approximately 150 mL/min. MEG, was diluted in the bathing medium. The bathing medium was introduced via a polyethylene catheter, and the continuous flow could be stopped at any given time. Voltage-clamp measurements of whole cell currents from intact cells were carried out at room temperature (20–22°C) using the technique of the discontinuous single voltage-clamp microelectrode (Bouteau *et al.*, 1999; Jeannette *et al.*, 1999). In this technique, both current passing and voltage recording use the same microelectrode. Interactions between the two tasks are prevented by time sharing techniques. A specific software (pCLAMP 8) drives the voltage clamp amplifier (Axoclamp 2A, Axon Instruments, Foster City, CA). Microelectrodes were made from borosilicate capillary glass (Clark GC 150F, Clark Electromedical, Pangbourne Reading, UK) drawn out on a vertical puller (Narishige PEII, Japan). Their tips were 0.5 mm diameter, filled with 600 mM KCl, and had electrical resistances between 50 and 80 megohms with the buffer solution. Voltage and current were simultaneously displayed on a dual input oscilloscope (Gould 1425, Gould Instruments, Hainault, UK), digitalized with a PC computer fitted with an acquisition board (Labmaster TL 1, Scientific Solution, Solon, OH).

Acknowledgements:

The authors thank D Wendehenne et A Pugin (UMR INRA-Université de Bourgogne) for the kind gift of *Nicotiana plumbaginifolia* cells and M.R. Knight for MAQ2.4 the aequorin transformed *N. plumbaginifolia* strain.

Litterature cited

- Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K., Shimazaki, C.T., Vafeados, D., Kemper, A., Hawke, Tallman, S.D., G., Tsien, R.Y., Harper, J.F., Chory, J. & J.I. Schroeder, 2000. Alteration of Stimulus Specific Guard Cell Calcium Oscillations and Stomatal Closing in Arabidopsis det3 Mutant. *Science* 289:2338-2342.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Rebutier, D., Madiona, K., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Trouvier, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J.P., Ouhadouch, Y., El Hadrami, I. & F. Bouteau; 2006. Early physiological responses of Arabidopsis *thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signaling effects. *New Phytologist* 169:209-218.
- Bouteau, F, Dellis, O & J.P. Rona, 1999. Transient outward K1 currents through plasma membrane of laticifer from *Hevea brasiliensis*. *FEBS Lett* 458:185-187

- Brand J.J. and D.W. Becker, 1984. Evidence for Direct Roles of Calcium in Photosynthesis
SHORT REVIEW Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 16:239-249.
- Brault, M., Amiar, Z., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Zhang, Z., Cornel, D., Dellis, O., Knight, H., Bouteau, F. & Rona J.P., 2004. Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in Arabidopsis suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca^{2+} dependent. Plant Physiology 135:231-243.
- De Angeli, A., Thomine, S., Frachisse, J.M., Ephritikhine, G., Gambale, F. & Barbier-Brygoo H., 2007. Anion channels and transporters in plant cell membranes. FEBS Letters 581:2367-2374.
- DE Silva, D.L.R., COX, R.C., Hetherington, A.M. & T.A. Mansfield, 1985a. Suggested involvement of calcium and calmodulin in the responses of stomata to abscisic acid, New Phytologist, 101, 555-563.
- De Silva, D.L.R., Hetherington, A.M. & T.A. Mansfield, 1985b. Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. New Phytologist 100:473-482.
- Dieter, V., 1984, Normal ^3He : an almost localized Fermi liquid. Rev. Mod. Phys. 56:99-120.
- European Patent office WO/2000/064586. 2000. Device for micronizing materials. 72pp.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & K. Ojima, 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158.
- Hetherington, A.M & R.S. Quatrano, 1991. Mecanisms of action of abscisic acid at the cellular level. New Phytologist 119:9-32.
- Hetherington, A.M. & F.I. Woodward, 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. Nature 424:901-908.
- Irving, H.R., Gehring, C.A. & R.W. Parish, 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1790-1794
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. & D. Scheel, 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4800-4805.
- Jeannette, E., Rona, J.P., Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B. & E. Miginiac, 1999. Induction of RAB18 gene expression and activation of K^+ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in Arabidopsis thaliana suspension cells. The Plant Journal, 18:3-22.
- Kinoshita, T., Nishimura, M. & K. Shimazaki, 1995. Cytosolic concentration of Ca^{2+} regulates the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells of fava bean. Plant Cell 7:1333-1342.
- Knight, H., Trewavas, A.J. & M.R., Knight, 1996. Cold calcium signaling in Arabidopsis involved two cellular pools and changes in calcium signature after acclimatation. Plant Cell 8: 489-503.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. & A.J. Trewavas, 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. Nature 352:524-526
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. & A. Pugin, 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Plant Cell 14:2627-41.
- Leung, J. & J. Giraudat, 1998. Abscisic acid signal transduction. Annu. Rev. Plant. Physiol. 49:199-222
- Levchenko, V., Konrad, K.R., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. & R. Hedrich, 2005. Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca^{2+} signals. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 102: 4203-4208.

- Li, S., Assmann, S.M. & R. Albert, 2006. Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS BIOLOGY* 4:1732-1748.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C. & A.M. Hetherington, 1990. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* 343:186-188.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & F. Van Breusegem, 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498
- Murphy, T.M. & Auh C.K., 1996. The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiol* 110:621-629.
- Murray, J.W. & J. Barber, 2006. Identification of a calcium-binding site in the PsbO protein of photosystem II. *Biochemistry* 45:4128-4130.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M. & J.I. Schroeder, 1997. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* 9:409-423.
- Rasmussen, H. & P.Q. Barrett, 1984. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev*, 64:938-984.
- Reboutier, D., Bianchi, M., Brault, M., Roux, C., Dauphin, A., Rona, J.P., Legue, V., Lapeyrie, F. & F. Bouteau, 2002. The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in non host *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Plant Microbe Interaction* 15:932-938.
- Reboutier, D., Frankart, C., Vedel, R., Brault, M., Duggleby, R.G., Rona, J.P., Barny, M.A., F. Bouteau, 2005. A CFTR chloride channel activator prevents HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:567-572.
- Roelfsema, M.R.G. & R. Hedrich, 2005. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* 167:665-691.
- Roelfsema, M.R.G., Steinmeyer, R., Staal, M. & R. Hedrich, 2001. Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant Journal* 26:1-13.
- Rudd J. J. and V. E. Franklin-Tong, 1999. Calcium signaling in plants. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 55, 214-232.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M. & G.J. Allen., 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering of drought hardiness in plants. *Nature* 410:327-330.
- Stevens, G.B. & P.B. Lukins, 2003. Effects of Ca^{2+} and EGTA on P680 S^+ reduction kinetics and O_2 evolution of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1605 21-34.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M. & A. Vavasseur, 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology* 134:1536-45.
- Torres, M.A. & J.L. Dangl, 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8:397-403.
- Tozawa, Y., Nozawa, A., Kanno, T., Narisawa, T., Masuda, S., Kasai, K. & H. Nanamiya, 2007. Calcium-activated (p)ppGpp Synthetase in Chloroplasts of Land Plants. *Journal of biological chemistry*, 10.1074/jbc.M703820200.
- Van Gestelen, P., Asard, H. & R.J. Caubergs, 1997. Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH- O_2^- synthase from other NADPH oxidoreductases. *Plant Physiol.* 115:543-550.
- White, P.J. & M.R. Bradley; 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:487-511.

Figures

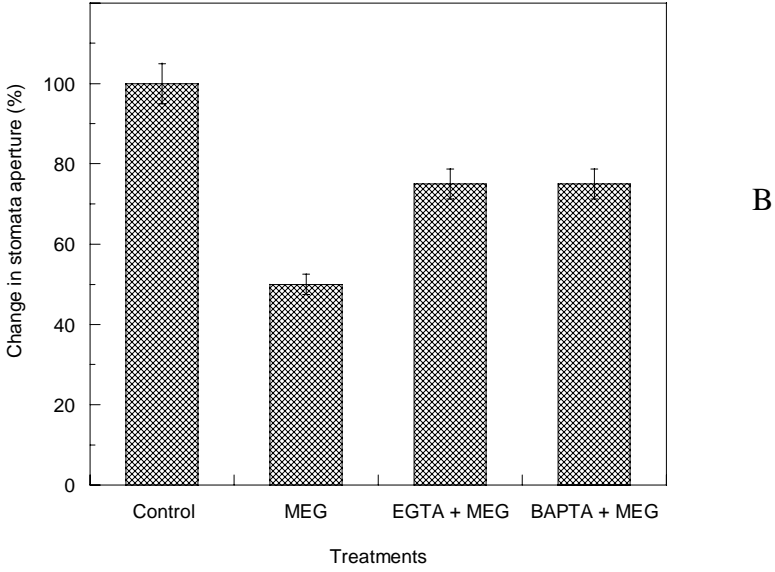
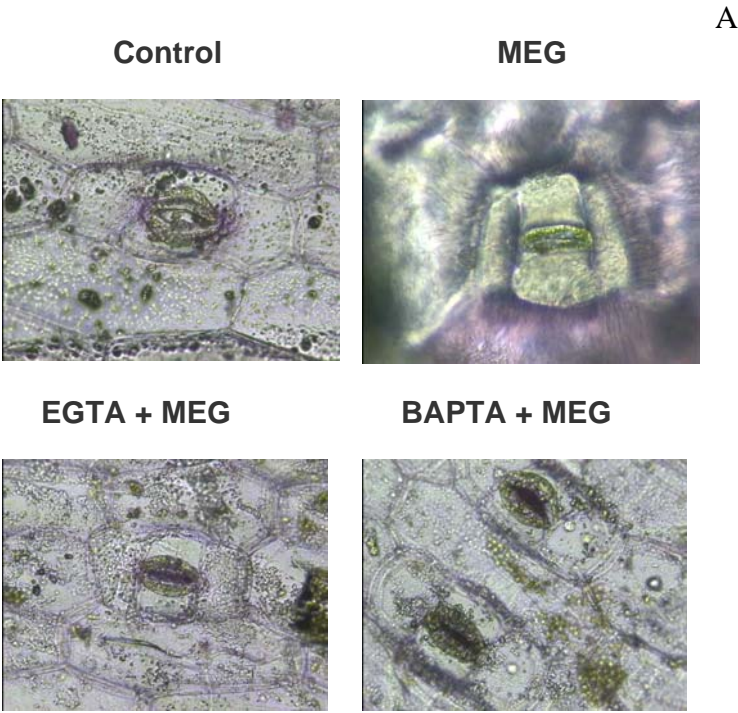


Figure 1 MEG inhibits stomata opening (A) which require a calcium influx. Response of stomata to MEG was also checked in the presence of calcium chelators 5 M EGTA and 5 M BAPTA (B). Means of 100 measurements of individual stomata, with standard errors.

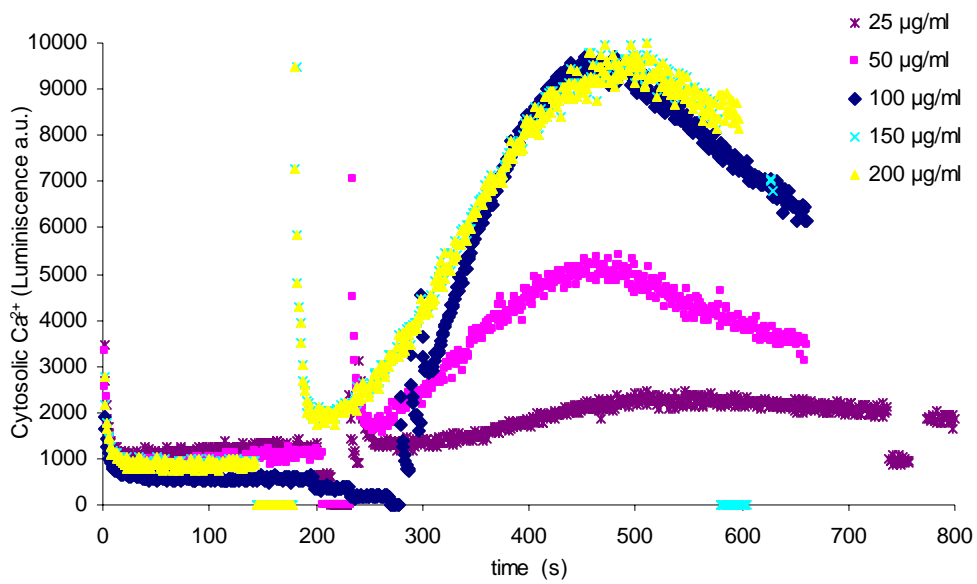


Figure 2 MEG treatment induced cytoplasmic Ca²⁺ variations on cell suspensions which were prepared from leaves of *Nicotiana plumbaginifolia* plants transformed with the apoaequorin gene.

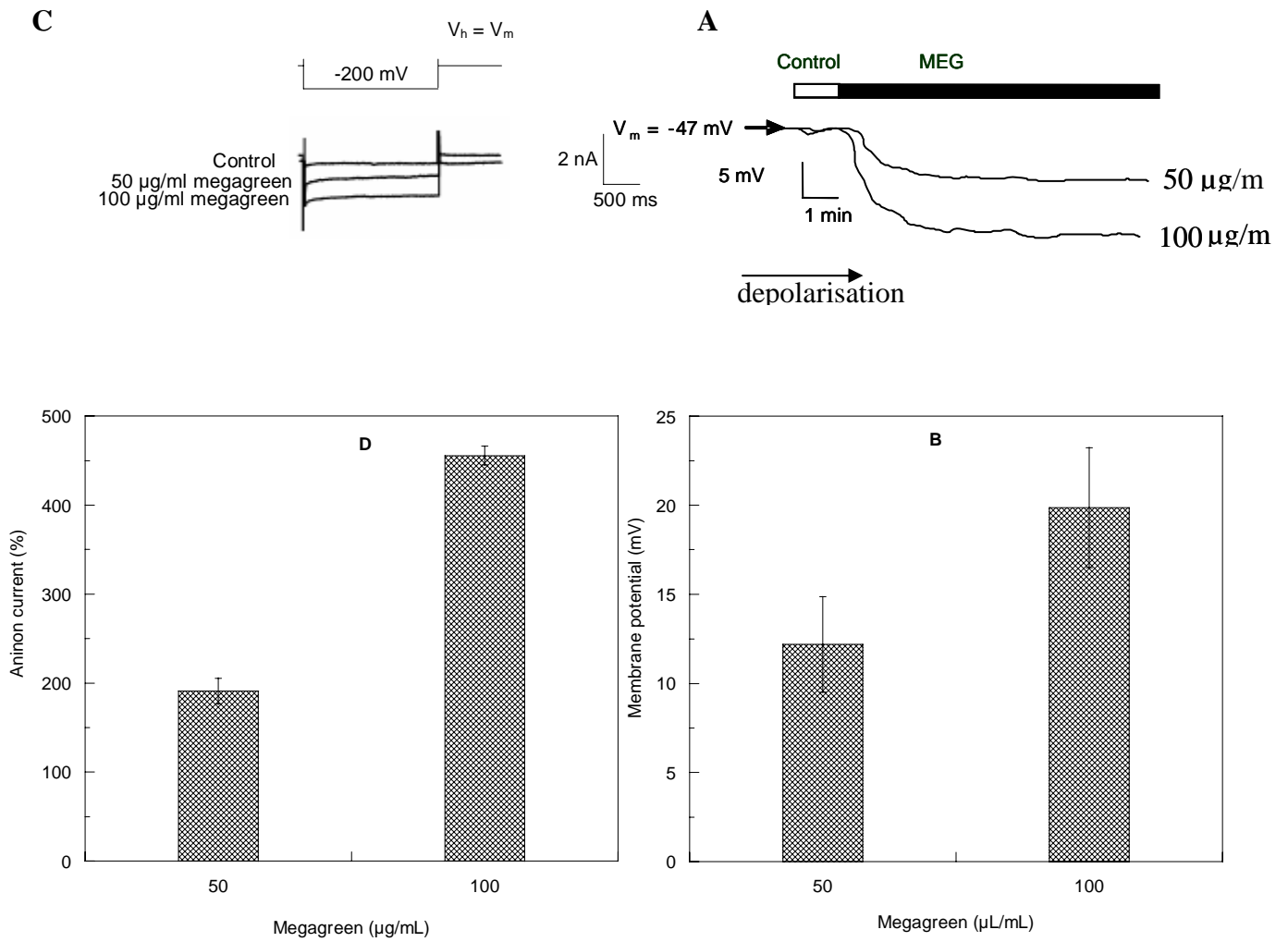


Figure 3 MEG induced changes in plasma membrane potential and anion currents of *A. thaliana* suspension cells. Mean values \pm SE were obtained from at least 6 cells.

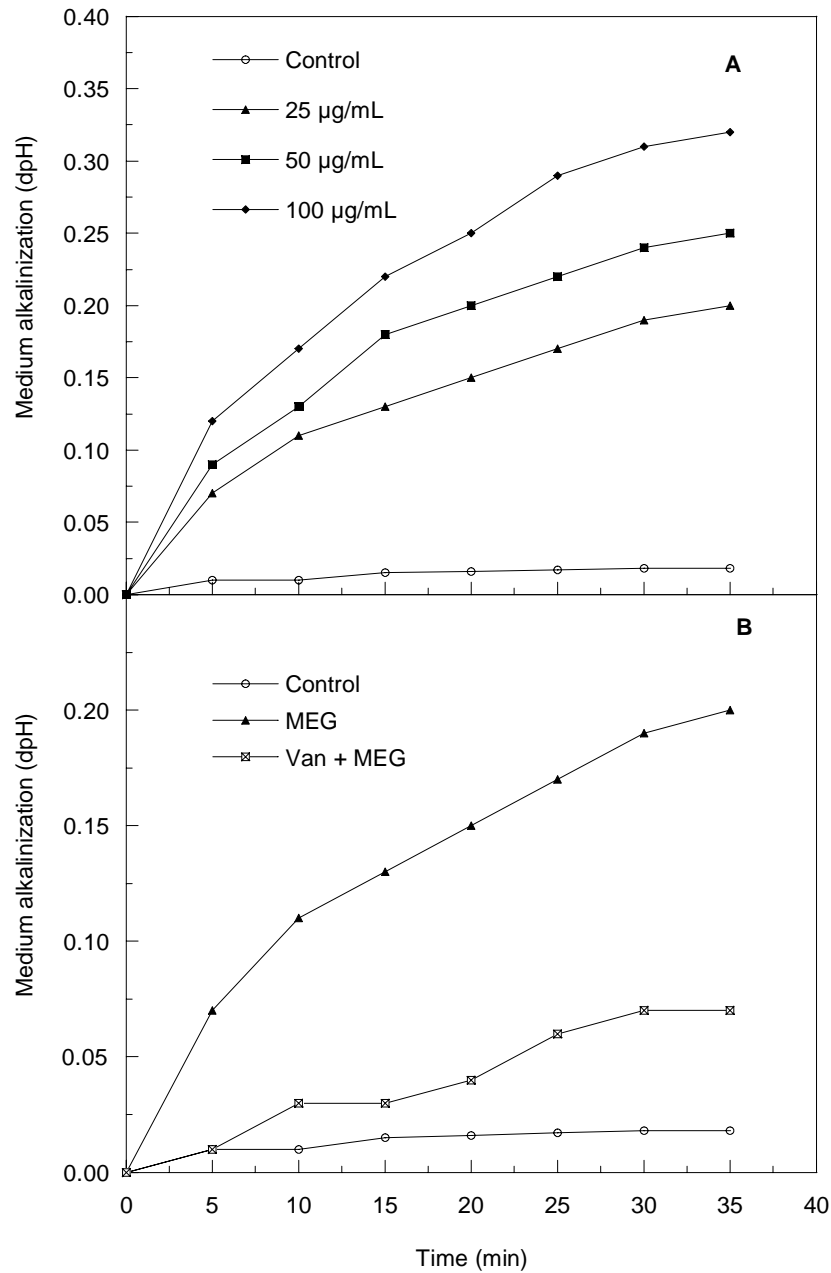


Figure 4 The medium alkalization elicited by MEG coincided with the plasma membrane depolarization induced by MEG. For **A** and **B**, the pH of the culture medium was monitored over time. MEG was introduced into the culture medium at time 0 min. **A**, MEG (for different concentrations) induced a medium alkalization by comparison to untreated cells (control). **B**, The medium alkalization induced by MEG 25 µg/ml was reduced when MEG was added in the presence of 200 µM vanadate (Van). The initial pH ranged from 5.6 to pH 5.8. Representative results out of 9 independent experiments are shown.

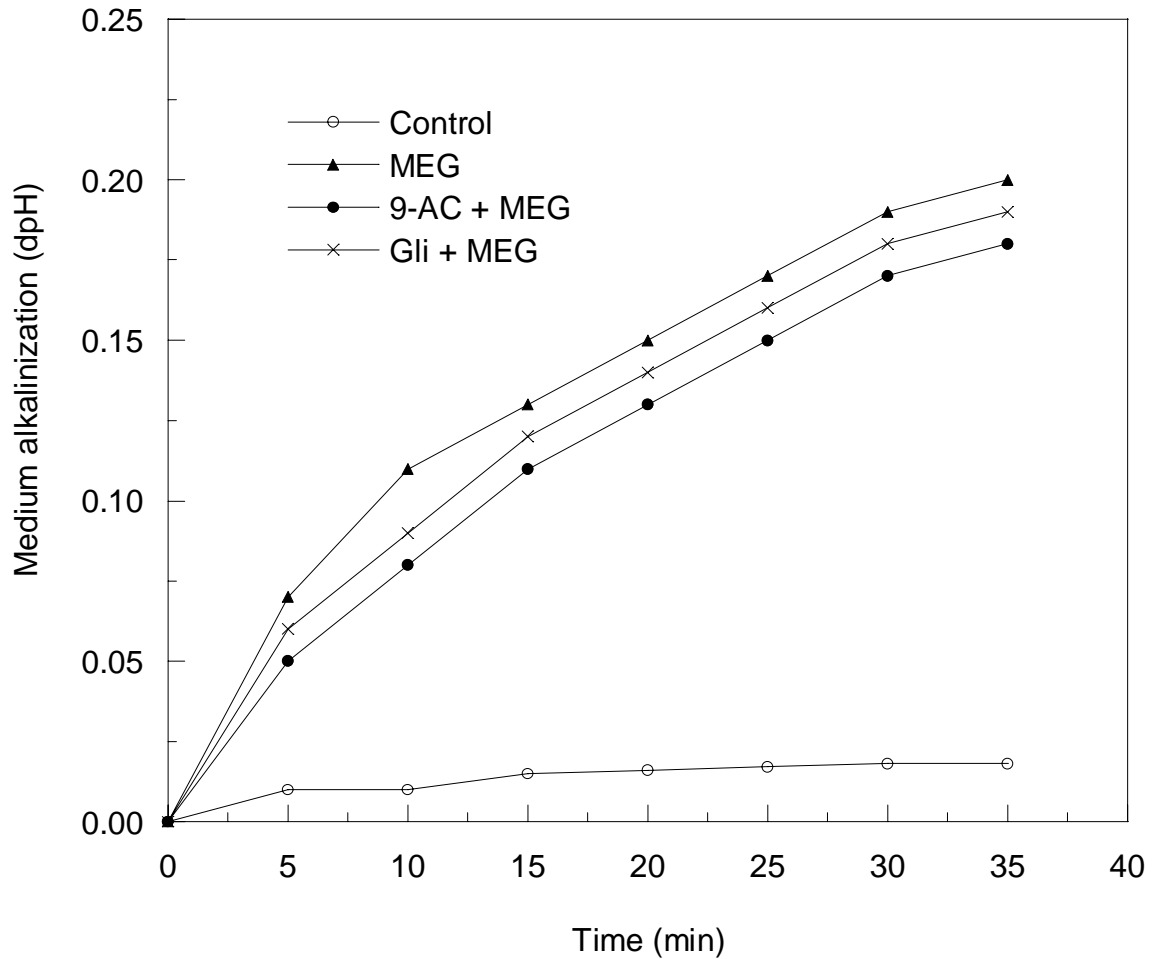


Figure 5 MEG induced H^+ -ATPase inhibition even if anion channels are blocked. *Arabidopsis* cell suspensions were first pre-treated with 200 μ M 9-AC or 200 μ M Gli. The pH of the culture medium was monitored over time after adding 25 μ g/ml MEG. In the presence of 9-AC or Gli, the medium alkalization induced by MEG was dpH $\frac{1}{4}$ 0.21 ± 0.01 and 0.2 ± 0.01 respectively.

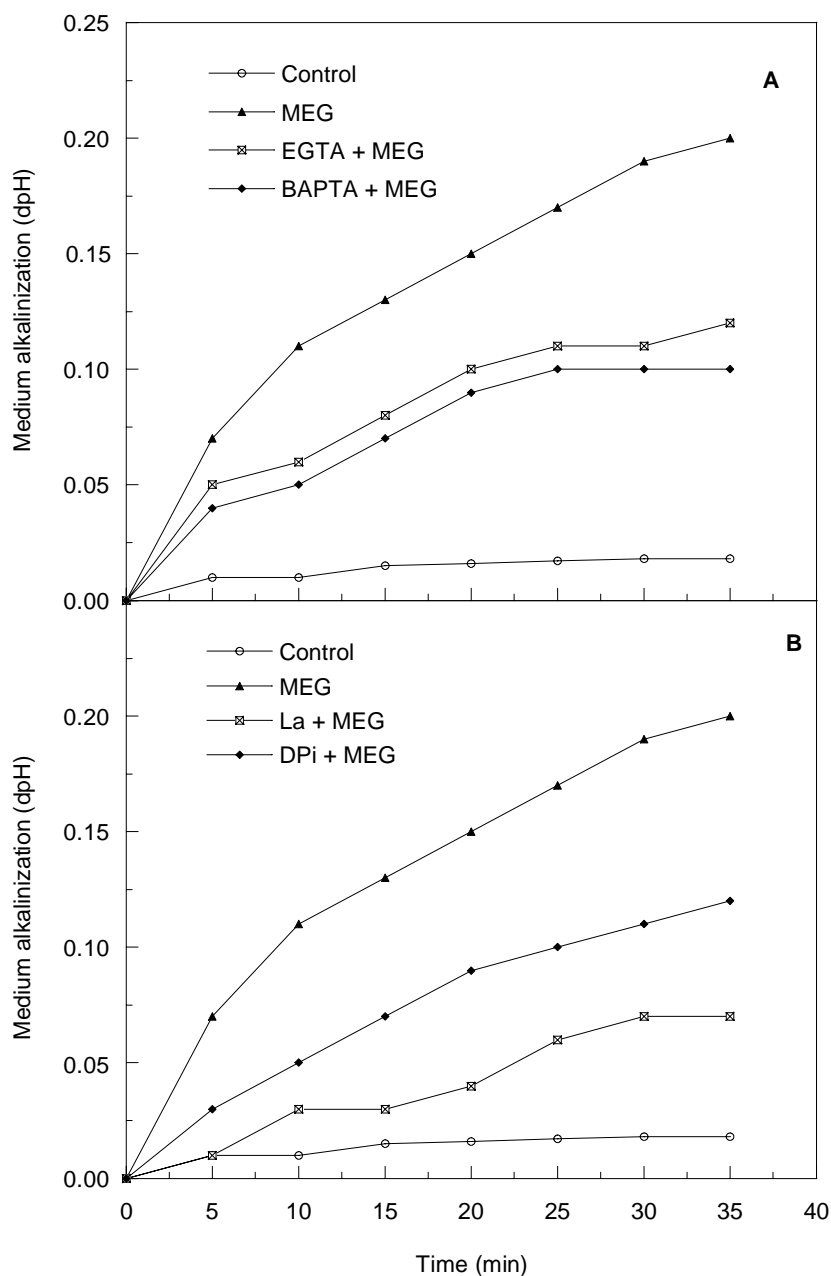


Figure 6 MEG-Induced H^+ -ATPase Inhibition Requires Ca^{2+} Influx and H_2O_2 production. **A:** *Arabidopsis* cell suspensions were first pretreated for 45 min with 5 mM EGTA and 5 mM BAPTA and pH cell suspension medium was monitored after adding of 25 μ g/ml MEG. **B:** *Arabidopsis* cell suspensions were first pretreated for 15 min with 100 μ M La^{3+} and 12 μ M DPi and pH cell suspension medium was monitored over time after adding of 25 μ g/ml MEG.

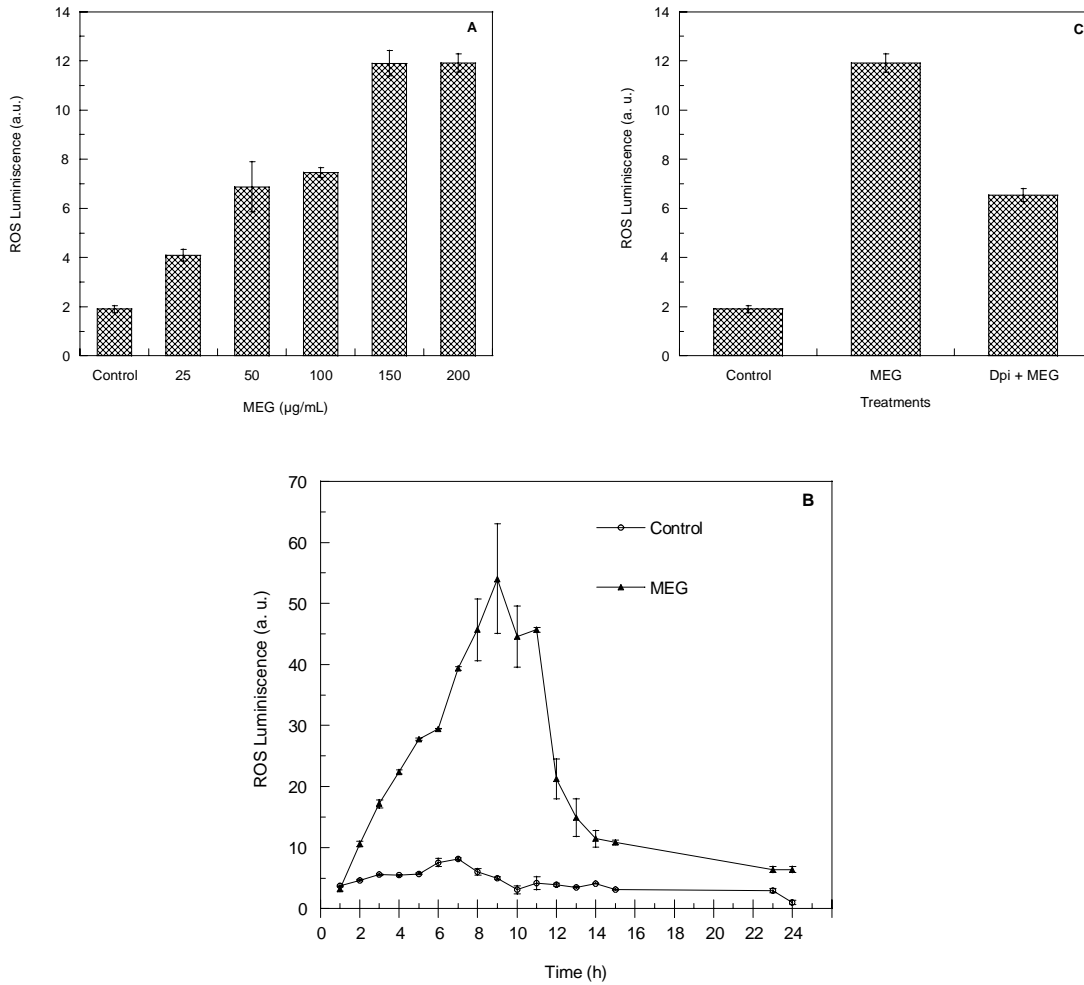


Figure 7 MEG induced H₂O₂ production by activation of NADPH oxidase. **A:** effect of MEG on H₂O₂ production. H₂O₂ production by Arabidopsis cells were measured by luminol after treatment with different MEG concentrations. **B:** H₂O₂ production was monitored each hour to check the kinetic of H₂O₂ production after adding 200 µg/ml of MEG. **C:** the effect of MEG on the H₂O₂ production was monitored in the presence of 12 µM of DPI (NADPH oxidase inhibitor).

CHAPITRE VI :

Conclusion et perspectives

Le comportement écophysologique de la vigne varie en fonction de l'alimentation hydrique, aussi, les paramètres des relations hydriques, de la photosynthèse et de la fluorescence chlorophyllienne sont influencés. Au cours de la phase de maturité, la contrainte hydrique influence aussi les aspects morphologiques de la baie de raisin ainsi que sa maturité phénolique. Les cépages étudiés ont montré un comportement spécifique vis-à-vis ses deux aspects.

Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique :

Le stress hydrique présente un effet significatif sur les paramètres de l'assimilation photosynthétique et de la fluorescence chlorophyllienne. Le comportement des cépages vis-à-vis de la contrainte est différent. Après une contrainte hydrique prolongée, le cépage Fer Servadou présente une bonne capacité à restaurer son assimilation photosynthétique, en comparaison avec les cépages Cot et Négrette, sous une concentration élevée en CO_2 ($800 \mu\text{L L}^{-1}$) ceci suggère qu'il possède une capacité plus importante de protéger son système de photosynthèse et de la maintenir à un état fonctionnel. Ceci est sous le contrôle de la conductance stomatique. En effet, la relation entre P_N et g_s est probablement étroite et dépend du cépage. Les cépages qui ont fait l'objet de cette étude montrent entre eux des différences assez nettes : l'évolution journalière de la conductivité hydraulique conforte les différences déjà observées de la conductance stomatique, et nous permet de suggérer un rôle prépondérant de ce paramètre dans le contrôle des mouvements stomatiques.

Effet du stress hydrique sur la maturité phénolique :

L'alimentation hydrique affecte différemment les cépages au niveau de la morphologie des baies essentiellement la proportion des différents compartiments de la baie. Dans notre étude nous avons montré l'importance de ses paramètres par rapport aux conséquences du stress hydrique sur la composition phénolique des baies. La contrainte hydrique montre un effet spécifique des cépages sur la modification de la taille de la baie, au cours de la maturité, dont les proportions des différents compartiments en dépendent. En plus, la contrainte hydrique stimule la biosynthèse des anthocyanes. La réponse de la vigne quant à la maturité phénolique montre un caractère spécifique du cépage.

Il est important de quantifier la variation due proprement au stress hydrique et celle due à la modification de la morphologie de la baie. En effet, dans une parcelle viticole, ces paramètres doivent être pris en compte pour une gestion optimale de la qualité de la vendange.

Modification de la photosynthèse de la vigne sous contrainte hydrique par application d'une calcite micronisée :

Notre travail, bien que centré sur l'étude de la réponse physiologique de la vigne en situation de contrainte hydrique et ses répercussions sur la maturité phénolique des baies ; met en évidence les aspects relatifs à la réponse de la vigne suite à l'application d'une calcite micronisée.

La signalisation cellulaire met en exergue une cascade de médiation cellulaire aboutissant à la fermeture des stomates avec une grande similitude par rapport à l'ABA.

PERSPECTIVES

La problématique du stress hydrique est une réalité d'avenir de la viticulture française. Les résultats obtenus concernant l'écophysiologie et la maturité phénolique montrent un comportement spécifique des cépages vis-à-vis de la contrainte hydrique. Dans le cadre de ce sujet, il serait opportun d'étudier le comportement de ces cépages sur terrain, afin de valider les résultats obtenus sous conditions contrôlées (les effets sur les paramètres végétatifs : surface foliaire totale par cep, vitesse de croissance des rameaux ainsi que les paramètres qualitatifs du raisin au cours de la maturité et ceux de la vendange.

Nous avons montré que le comportement des cépages serait différent vis-à-vis de la contrainte concernant le métabolisme primaire du cépage, qui est essentiellement lié aux mouvements des stomates et au statut hydrique via la conductivité hydraulique. Il serait aussi important de déterminer la répartition de l'ABA dans les différents compartiments (racines, tiges, feuilles et baies de raisin). La signalisation cellulaire via l'ABA explique t'elle le comportement des différents cépage quant au control stomatique des échanges gazeux ?

D'autre part, il nous semble aussi important d'étudier la répartition des photoassimilats, de l'utilisation de l'azote et des éléments minéraux sous la contrainte hydrique dans les différents compartiments de la plante, pour évaluer la stratégie développée par chaque cépage en vue de l'ajustement osmotique en situation de contrainte hydrique.

Actuellement, les techniques de la proteomique sont de plus en plus appliquées dans un objectif de criblage des gènes susceptibles d'intervenir i) dans la réponse immédiate au stress hydrique et ii) au cours de la réponse adaptative au stress. Dans ce cadre de ce sujet, il serait intéressant d'aller plus loin à travers l'étude de la réponse des différents cépages régionaux par la validation au niveau du gène de l'aptitude du cépage à tolérer le stress hydrique.

Nous avons montré des différences entre les cépages au niveau de la maturité phénolique, le stress hydrique induit l'accumulation d'anthocyanes. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du stress hydrique sur l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des anthocyanes, l'étude décrite par [Castellarin et al., \(2007a\)](#) est prometteuse à ce niveau.

L'utilisation d'une calcite micronisé a permis d'améliorer l'assimilation photosynthétique via un effet sur les mouvements stomatiques. Les résultats obtenus par [Abduljalel et collaborateurs \(2007\)](#) confirment l'utilisation de CaCl_2 pour améliorer la réponse des plantes au stress hydrique.

Il serait important d'étudier l'effet de la calcite micronisée (Megagreen) sur la régulation osmotique (glycine bétaine, polyamines, proline-oxidase, γ -glutamyl kinase) des plantes en situation de stress hydrique. L'étude de la signalisation cellulaire de Megagreen montre que la calcite agit sur l'ouverture des stomates avec une similitude importante concernant la réponse immédiate à l'ABA. Cette signalisation cellulaire est basée sur l'augmentation du calcium cytosolique, comme messenger secondaire et la production d'espèces réactives d'oxygène. Il serait important d'étudier l'effet de la calcite sur l'accumulation des phytoalexines, scopoletin et autres antioxydants afin d'élucider la stratégie mise en place en vue d'une réponse adaptative de la plante à la contrainte hydrique.

Références Bibliographiques

- Adams, D.O., 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *Amer. J. Enol. Vitic.* 57:249-256.
- Alamillo J.M. and D., Bartels 2001. Effects of desiccation on photosynthesis pigments and the ELIP-like dsp22 protein complexes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Science* 160:1161-1170.
- Allen M.S. and M.J. Lacey, 1999. Methoxypyrazines of grapes and wines, In: *Chemistry of Wine Flavor* A.L. Waterhouse and S.E. Ebeler Eds. American Chemical Society Washington, DC 31-38.
- Alleweldt G. and E., Rühl 1982. Investigations on gas exchange in grapevine. *Vitis* 21:313-324.
- Ambrosi H., Dettweiler-Munch E., Ruhl E.H., Schmid J. and F. Schuman, 1997. *Guide des cépages: 300 cépages et leurs vins*. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co, pp. 320.
- Apel K. and H. Hirt, 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Aradhyia M.K., Dangl G.S., Prins B.H., Boursiquot J.M., Walker M.A., Meredith C.P. and C.J. Simon, 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genet Res* 81:179-192.
- Baeza P., Ruiz C., Cuevas E., Sotes V. and J.R. Lissarague, 2005. Ecophysiological and agronomic response of tempranillo grapevines to four training systems. *Amer. J. Enol. Vitic.* 56:129-138.
- Baker N.R. and E. Rosenqvist, 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55:1607-1621.
- Baldi A., Romani A., and N. Mulinacci, 1995. HPLC/MS application to anthocyanidins of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:2104-2109.
- Ballif, J.L., 1994. Lysimètres en monolithes d'une rendzine brune sur craie cryoturbée. Bilans hydrique et minéral en sols nu, enherbé, cultivé et planté en vigne 1973-1974 à 1990-1991, INRA, Chalons en Champagne, 124 p.
- Bélaygue C., J. Wery, A.A. Cowan and F. Tardieu, 1996. How do leaf expansion, rate of leaf appearance and stolon branching contribute to plant leaf area establishment under Water deficit in white clover (*Trifolium repens* L.). *Crop Science*, 36:1240-1246.
- Blokhina O., Virolainen E. and K. Fagerstedt, 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress a Review. *Annals of Botany* 91:179-194.
- Blum A. and A. Ebercon. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21:43-47.
- Bogs J., A. Ebadi, D. McDavid, and S.P. Robinson, 2006. Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiol.* 140:279-291.
- Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J. and S.P. Robinson, 2006. Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves. *Plant physiol.* 193:652-663.
- Bota J., Flexas J. and H. Medrano, 2001. Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Annals of Applied Biology* 138:353-361.

- Bouchabke O., Tardieu F. and T. Simonneau, 2006. Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand in well-watered but not in water saturated soil. *Plant Cell & Environment* 29:1138-1148.
- Bourzeix, M., Weiland, D., and N. Heredia, 1986. A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l'O.I.V* 669-670:1173-254.
- Bravdo B., Hepner Y., Loinger C., Cohen S. and H. Tabacman, 1984a. Effect of grape level on growth, yield and wine quality of high yielding carignane vineyard. *Amer. J. Enol. Vitic.* 35:247-252.
- Bravdo B., Hepner Y., Loinger C., Cohen S. and H. Tabacman, 1984b. Effect of grape level on growth, yield and wine quality of Cabernet Sauvignon. *Amer. J. Enol. Vitic.* 36:132-139.
- Bravdo, B.A., 2005. Physiological mechanisms involved in the production of non-hydraulic root signals by partial rootzone drying. *Acta Hort.* 689:267-275.
- Brouillard R. and J.E. Dubois, 1977. Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* 99:1359-1364.
- Carbonneau A. and N. Ollat, 1993. Etude de la coulure et maîtrise de la production. *Progrès Agricole et Viticole* 110, 331-340.
- Castellarin S.D. and Di Gaspero, 2007. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* 7:46.
- Castellarin S.D., Matthews M.A., Di Gaspero G. and G.A. Gambetta, 2007. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 10.1007/s00425-007-0598-8.
- Castellarin S.D., Pfeiffer A., Sivilotti P., Degan M., Peterlunger E., and G. Di Gaspero, 2007. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell & Environment* 30:1381-1399.
- Champagnol, F. 1984. *Eléments de Physiologie de la Vigne et de Viticulture Générale*, Saint-Gely-du-Fesc, France, pp 351.
- Champagnol, F., 1980. La matière organique des sols de vigne du Midi de la France. *Le progrès agricole et viticole* 8 :161-172.
- Chaves M.M. and M.M. Oliveira, 2002. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55:2365-2384.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T. and C. Pinheiro, 2002. How plants cope with water stress in the field? photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89:907-916.
- Cheyrier V., Dueñas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J.M., Sarni-Manchado P., and H. Fulcrand . 2006. Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *Amer. J. Enol. Vitic.* 57:298-305.
- Cifre J., Bota J., Escalona J.M., Medrano H. and J. Flexas, 2005. Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L.) an open gate to improve water-use efficiency?. *Agric. Ecosystems & Environment* 106:159-170.
- Conde C., Silva P., Fontes N., Pires D.A.C., Tavares R. M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot S. and H. Gerós, 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1:1-22. Global Science Books.
- Condon A.G., Richards R.A., Rebetzke G.J. and G.D. Farquhar, 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55:2447-60

- Cong B., Liu J.P., and S.D. Tanksley, 2002. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:13606-13611.
- Coombe B.G. and M.G. McCarthy, 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 6:131-135.
- Coombe B.G. and M.G. McCarthy, 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 6:131-135.
- Cosgrove D.J., 2005. Growth of the cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6:850-861.
- Cosgrove, D.J., 1993. Water uptake by growing cells: An assesment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *Int. J. Plant Sci.* 154:10-20.
- Cowan A.K., Cripps R.F., Richings E.W. and N.J. Taylor, 2001. Fruit size: Towards an understanding of metabolic control of fruit growth using avocado as model system. *Physiol. Plant* 111:127-136.
- Cramer G.R., Ergül A., Grimple J., Tillett R.L., Tattersall E.A.R., Bohlman M.C., Vincent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D, Schlauch K.A., Schooley D.A., and J.C. Cushman, 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* 7:111-134.
- Cuevas E., Baeza P. and J.R. Lissarrague, 2006. Variation in stomatal behaviour and gas exchange between mid-morning and mid-afternoon of north-south oriented grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo) at different levels of soil water availability. *Scientia Horticulturae* 108:173-180.
- Da Silva F.G., Iandolino A., Al-Kayal F., Bohlmann M.C., Cushman M.A., Lim H., Ergul A., Figueroa R., Kabuloglu E.K., Osborne C., Rowe J., Tattersall E., Leslie A., Xu J., Baek J.M., Cramer G.R., Cushman J.C. and D.R. Cook, 2005. Characterizing the Grape Transcriptome. Analysis of Expressed Sequence Tags from Multiple *Vitis* Species and Development of a Compendium of Gene Expression during Berry Development. *Plant Physiol.* 139:574-597.
- Daniel O., Meier M.S., Schlatter J. and P. Freschknect, 1999. Selected phenolic compounds: Ecological functions, health implications and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives* 107:109-114.
- Davis WJ, Tardieu F and C.L. Trejo, 1994. How do chemical signals works in plants that grow in drying soil? *Plant Physiol.* 104:309-314.
- De Mattos E., Herzog B. and U. Luttge, 1999. Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress. *Journal of Experimental Botany* 50:253-261.
- Delas J., Molot C. and J.P. Soyer, 1991. Effects of nitrogen fertilization and grafting on the yield and quality of the crop of *Vitis vinifera* cv. Merlot. In: *The American Society for Enology and Viticulture: Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in grapes and Wine.* 242-248. Seattle, USA.
- Daverede, C. 1996. Influence de différents équilibre K-Ca sur la nutrition cationique et le manque d'acidité des moûts et des vins du cépage Négrette (*Vitis vinifera* L.) greffé sur 101-14 M.G., cultivé en hors-sol. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 151 p.
- Do Ó-Marques J., Reguinga R., Laureano O. and J.M. Ricardo-da-Silva, 2005. Changes in grape seed, skin and pulp tannins during berry ripening: effect of fruit pruning. *Ciência Téc. Vitiv.* 20:35-52.
- Droogers, P., 2000. Estimating actual evapotranspiration using a detailed agrohydrological model. *Journal of Hydrology* 229:50-58.

- Eckert M., Biela A., Siefritz F. and R. Kaldenhoff 1999. New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany*, 50:1541-1545
- Escalona J.M., Flexas J. and H. Medrano, 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology* 26:421-433.
- Farquhar G.D., O'Leary M.H. and J.A. Berry, 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9:121-137.
- Fernandez L., Pradal M., Lopez G., Berud F., Romieu C. and L. Torregrosa, 2006. Berry size variability in *vitis vinifera* L.. *Vitis* 45:53-55.
- Fernandez L., Torregrosa L., Terrier N., Sreekantan L., Grimplet J., Davies C., Thomas M.R., Romieu C. and A. Ageorges, 2007. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Mol. Biol.* 63:307–323.
- Ferreira R., Sellés G., Ruiz R.S. and I.M. Sellés, 2004. Effect of water stress induced at different growth stages on grapevine cv. Chardonnay on production and wine quality. *Acta Hort.* 664:233-236.
- Flexas J. and H. Medrano, 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plant: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89:183-189.
- Flexas J., Bota J., Galmés J., Medrano H. and M. Ribas-Carbó, 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127:343-352.
- Frankel E.N., Waterhouse A.L., and J.E. Kinsella, 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* 341:1103-1107.
- Freeman B.M. and Kliwer W.M., 1983. Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignane vines. II. Grape and wine quality. *Amer. J. Enol. Vitic.* 34:197-206.
- Galet P., 2000. *Dictionnaire Encyclopédique des Cépages*, Hachette.
- Galet, 1993. *Précis de viticulture 6^{ème} édition* Déhan, Montpellier 575pp.
- Galet, P., 2000. *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Hachette, pp. 936.
- Gaudillière J.P., Van Leuwwen C and N. Ollat, 2002. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany* 53:757-763.
- Gholami M., Hayasaka Y., Coombe B.G., Jackson J.F., Robinson S.P. and P.J. Williams, 1995. Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 1:19-24.
- Gholami M., Hayasaka Y., Coombe B.G., Jackson J.F., Robinson S.P. and P.J. Williams, 1995. Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 1:19-24.
- Gimenez C., Mitchell V.J. and D.W. Lawlor, 1992. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiol.* 98:516-524.
- Girona J., Mata M., del Campo J., Arbonés A., Bartra E., and J. Marsal, 2006. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irrigation Sci.* 24:115-127.
- Girona J., Mata M., Goldhamer D.A., Johnson R.S. and T.M. Dejong, 1993b. Patterns of soil and tree water status and leaf functioning during regulated deficit irrigation scheduling in peach. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118:580-586.
- Godde, D., 1999. Adaptations of the photosynthetic apparatus to stress conditions. In *Plant Responses to Environmental Stresses* (ed. H.R. Lerner), pp. 449–474. Marcel Dekker, New York.

Goetz G, Fkyerat A., Métais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R., and V. Pont, 1999. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* 52:759-767.

Goldhamer D.A. and M. Viveros, 2000. Effects of preharvest irrigation cutoff durations and postharvest water deprivation on almond tree performance. *Irrig. Sci.* 19:125-131.

Goldhamer D.A., Fereres E., Cohen M., Girona J. and M. Mata. 2000. Comparison of continuous and discrete plant-based monitoring for detecting tree water deficits and barriers to grower adoption for irrigation management. *Acta Hort.* 537:431-445.

Goldhamer D.A., Fereres E., Mata M., Girona J. and M. Cohen, 1999. Sensitivity of continuous and discrete plant and soil water status monitoring in peach trees subjected to deficit irrigation. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 124:437-444.

Granier C., Inzé D. and F. Tardieu, 2000. Spatial distribution cell division rate can be deduced from that of P34cdc2 kinase activity in maize leaves grown in contrasting conditions of temperature and water status. *Plant Physiol.* 124:1393-1402.

Grimplet J., Deluc L.G., Tillett R.L., Wheatley M.D., Schlauch K.A., Cramer G.R and J.C Cushman, 2007. Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8:187

Guan X.Q., Zhao S.J., Li, D.Q. and H.R. Shu, 2004. Photoprotective function of photorespiration in several grapevine cultivars under drought stress. *Photosynthetica* 42:31-36.

Gupta S.A. and G.A. Berkowitz, 1987. Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. *Plant Physiol.* 87:1040–1047.

Harbertson J.F., Kennedy J.A. and D.O. Adams, 2002. Tannin in skins and seeds of cabernet sauvignon, syrah and Pinot noir berries during ripening. *Amer. J. of Enol. and Vitic.* 53:54-59.

Harris J.M., Kriedemann P.E. and J.V. Possingham, 1968. Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis* 7:106-109.

Haslam, E. 1980. In *Vino veritas: oligolmeric procyanidins and the ageing of red wines.* *Phytochemistry* 19:2577-2582.

Haslam, E., 1998. *Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*, Cambridge University Press, Cambridge.

Hemingway, R.W., 1992. Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives, in *Plant polyphenols : synthesis, properties, significance* (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York.

Hilbert, G.M.P., 2002. Effet de la nutrition azotée et du stress hydrique sur la maturation et la composition en anthocyanes des baies de *vitis vinifera* L. au vignobles et en conditions contrôlées. Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux II. pp190.

Ho, L.C., 1992. Fruit growth and sink strength In: Marshall C., and J. Grace (Eds) *Fruits and seed production. Aspects of development, Environmental Physiology and Ecology*, 101-124. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Hollman, P.C.H., 2001. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:842-852.

Howell, G.S., 2001. Sustainable grape productivity and the growth-yield relationship: A review. *Amer. J. Enol. Vitic.* 52:165-174.

<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx> food and agriculture organization of the united nations The FAOSTAT core production data module.

Huglin P., 1986. *Biologie et ecologie de la vigne*, edition Payot Lausanne, Paris.

Huglin, P. and C. Schneider. 1998. *Biologie et écologie de la vigne*, Lavoisier Tec&Doc, Paris, 370 p.

- Iland P., Ewart A., Sitters J., Markides A. and N. Breur, 2000. Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking Campbelltown, S. Aust. Patrick Iland Wine Promotions
- Intrigliolo D.S. and J. R. Castel, 2004. Continuous measurement of plant and soil water status for irrigation scheduling in plum. *Irrig. Sci.* 23:93-102.
- IPCC 2001. Climate change 2001: impacts, adaptation and vulnerability. Intergovernmental Panel on Climate Change Contribution of Working Group II to the third assessment report of IPCC, Cambridge University Press, Cambridge. Pp 944.
- Jackson D.I. and P.B. Lombard, 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:409-430.
- Jagtap V., Bhargava S., Streb P. and J. Feierabend, 1998. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor*(L.) Moench. *Journal of Experimental Botany* 49:1715-1721.
- Jang M., Cai L., and G.O. Udeani, 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-20.
- Jones G.V., White M.A. and O.R. Cooper, 2005. Climate change and global wine quality. *Climatic Change* 73:319-343.
- Jones, H.G., 1992. *Plant and Microclimates (Ed): A quantitative approach to environmental plant physiology*, Cambridge University Press, London.
- Kaldenhoff R. and M. Eckert, 1999. Features and function of plant aquaporins. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 52:1-6.
- Keller M., Mills L.J., Wample R.L. and S.A. Spayd, 2005. Cluster thinning effect on three deficit irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *Amer. J. Enol. Vitic.* 56:91-103.
- Kennedy J.A., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E.J. and G.P. Jones, 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different Stages of berry development. *Jour. of Agricultural & Food Chemistry* 49:5348-5355.
- Kennedy J.A., Saucier C. and Y. Glories, 2006. Grape and wine phenolics: history and perspective. *Amer. J. Enol. Vitic.* 57:239-248.
- Kennedy J.A., Troup G.J., Pilbrow J.R., Hutton D.R., Hewitt D., Hunter C.A., Ristic R., Iland P.G. and G.P. Jones, 2000. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 6:244-254.
- Kiani P.S., P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego and A. Sarrafi, 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science* 172:773-787.
- Kim J.Y., Mahe A., Brangeon J. and J.L. Prioul, 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol.* 124:71-84.
- Kramer P.J. and J.S. Boyer, 1995. *Water relations of plants and soils (Book)*. Academic Press, Inc.
- Lacaille-Dubois, M.A. and H. Wagner, 1996. Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica* 143 :555-562.
- Langcake, P., 1981. Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* 9:77-86.
- Lavignac, G., 2001. *Cépages du Sud-Ouest*. Eds du Rouergue/INRA, pp.272.
- Lawlor D.W. and G. Cornic, 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell & Environment* 25:275-294.

- Lebon E., A. Pellegrino, F. Tardieu and J. Lecoecur, 2004. Shoot development in grapevine is affected by the modular branching pattern of the stem and intra and inter-shoot trophic competition. *Annals of Botany* 93:263-274.
- Lebon E., Pellegrino A., Louarn G. and J. Lecoecur, 2006. Branch development controls leaf area dynamics in grapevine (*Vitis vinifera*) growing in drying soil. *Annals of Botany* 98:175-185.
- Lecoecur J., J. Wery, O. Turc and F. Tardieu, 1995. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* 46:1093-1101.
- Leinonen I. and H.G. Jones, 2004. Combining thermal and visible imagery for estimating canopy temperature and identifying plant stress. *Journal of Experimental Botany* 55:1423-1431.
- Leon P. and J. Sheen, 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science* 8:110-116.
- Leslie A., Xu J., Baek J.M., Cramer G.R., Cushman J.C. and D.R. Cook, 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple vitis species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology*, 139:574-597.
- Lovisol C. and A. Schubert, 2006. Mercury hinders recovery of shoot hydraulic conductivity during grapevine rehydration: evidence from a whole-plant approach. *New Phytologist* 172:469-478.
- Lowlor, D.W., 2002. Limitation to photosynthesis to water stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89:871-885.
- Lu C. and J. Zhang, 1999. Effect of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 50:1199-1206.
- Luan F., Mosandl A., Degenhardt A., Gubesh M. and M. Wüst, 2006. Metabolism of linalool and substrate analogs in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Morio Muscat: demonstration of stereoselective oxygenation and glycosylation. *Analytica Chimica Acta*. 563:353-364.
- Matthews M.A. and Boyer J.S., 1984. Acclimation of photosynthesis to low leaf water potentials. *Plant Physiol.* 74: 161-166.
- Maurel C. and M.J. Chrispeels, 2001. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* 125: 135-138.
- Mazza G. and E. Miniati, 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains, Boca Raton Florida, USA.
- Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B. B. Ewert, 1999. Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agr. Food Chem.* 47, 4009-4017.
- Medrano H., Escalona J.M., Cifre J., Bota J. and J. Flexas, 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.
- Mizuno H., Hirano K. and G. Okamoto. Effect of anthocyanin composition in grape skin on anthocyanic vacuolar inclusion development and skin coloration. *Vitis* 45:173-177.
- Moonen A.C., Ercoli L., Mariotti M. and A. Masoni, 2002. Climate change in Italy indicated by agrometeorological indices over 122 years. *Agri. Forest Meteorol.* 111:13-27.
- Munné-Bosch S. and L. Alegre, 2000. The significance of beta-carotene, alpha-tocopherol and the xanthophylls cycle in droughted *Melissa officinalis* plants. *Aust J. Plant Physiol* 27: 139-146.
- Naor A. and S. Cohen, 2003. The sensitivity and variability of maximum trunk shrinkage, midday stem water potential, and transpiration rate in response to withholding of irrigation in field-grown apple trees. *Hort Science* 38:547-551.

- Naor A., 2006. Irrigation Scheduling and Evaluation of Tree Water Status in Deciduous Orchards. *Horticultural Reviews* 32:111-165.
- Nogués S. and N.R. Baker, 2000. Effect of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany* 51:1309-1317.
- O'Neill P.M., Shanahan J.F. and J.S. Schepers, 2006. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Sci.* 46:681-687.
- Ojeda H.; Deloire A., Carbonneau A., Ageorges A. and C. Romieu, 1999. Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* 38:145-150.
- Parry M.A.J., Flexas J. and H. Medrano, 2005. Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Annals of Applied Biology* 147:211-226.
- Passioura J.B., 1996. Drought and drought tolerance. *Review Plant Growth Regulation.* 20:79-83.
- Patakas A. and B. Noitsakis, 2001. Leaf age effects on solute accumulation in water-stressed grapevines. *Journal of Plant Physiology* 158:63-69.
- Patakas A. and Noitsakis B., 1999. Mechanisms involved in diurnal changes of osmotic potential in grapevines under drought conditions. *Journal of Plant Physiology* 154:767-774.
- Petrie P.R., Cooley N.M. and P.R. Clingeleffer, 2004. The effect of post-veraison water deficit on yield components and maturation of irrigated Shiraz (*Vitis vinifera* L.) in the current and following season. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 10:203-215.
- Planton, S., 2003. A l'échelle des continents: le regard des modèles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris.* 335:535-543.
- Possner D.R.E. and W.M. Kliewer, 1985. The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24:229-240.
- Pruvot G., Cuine S., Peltier G. and P. Rey, 1996. Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants. *Planta* 198:471-479.
- Rapoport H.F., Manrique T. and R. Gucci, 2004. Cell division and expansion in the olive fruit. *Acta Hort.* 636:461-465.
- Remorini D. and R. Massai, 2003. Comparison of water status indicators for young peach trees. *Irrig. Sci.* 22:39-46.
- Remy, S. 1999. Les tannins du vin rouge: caractérisation de structures natives et dérivées. Thèse de l'INRA (Montpellier).
- Rey P., Pruvot G., Becuwe N., Eymery F., Rumeau D. and G.A. Peltier, 1998. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant Journal* 13:97-107.
- Ricardo-da-Silva J. M., Rigaud J., Cheynier V., Cheminat A. and M. Moutounet, 1991. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 30:1259-1264.
- Roby G. and M.A. Matthews, 2004. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 10:74-82.
- Roby G., Harbertson J.F., Adams D.O. and M.A. Matthews, 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 10:100-107.
- Rodrigues M.L., Chaves M.M., Wendler R., David M.M., Quick W.P., Leegood RC, Stitt M and J.S. Pereira, 1993. Osmotic Adjustment in Water Stressed Grapevine Leaves in Relation to Carbon Assimilation. *Australian Journal of Plant Physiology* 20:309-321.

Rogiers S.Y., Greer D.H., Hatfield J.M., Orchard B.A. and M. Keller, 2006. Mineral sinks within ripening grape berries (*vitis vinifera* L.). *Vitis* 45:115-123.

Rogiers S.Y., Keller M., Holzapfel B. and J.M. Virgona, 2000. Accumulation of potassium and calcium by ripening berries on field vines of *vitis vinifera* (L.) cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 6:240-243.

Romeyer F.M., Macheix J.J., Goiffon J.P., Reminiac C.C. and J.C. Sapis, 1983. The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 31:346-349.

Ruiz-Sanchez M.C., Domingo R., Torrecillas A., and A. Perez-Pastor, 2000b. Water stress preconditioning to improve drought resistance in young apricot plants. *Plant Sci.* 156:245-251.

Saab I.N. and R.E. Sharp, 2004. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta* 179:466-474.

Sauter A., Davies W.J. and W. Hartung, 2001. The long-distance abscisic acid signal in the droughted the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany* 52:1991-1997.

Sayed, O.H., 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41:321-330.

Schneider K., Wells B., Schmelzer E., Salamini F. and D. Bartels, 1993. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189:120-131.

Selles G. and A. Berger, 1990. Physiological indicators of plant water status as criteria for irrigation scheduling. *Acta Hort.* 278:87-100.

Sharp, R.E., 2002. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell & Environment*, 25:211-222.

Shellie, K., 2006. Vine and berry response of Merlot (*Vitis vinifera* L.) to differential water stress *Amer. J. Enol. Vitic.* 57:514-518.

Shultz H.R. and M.A. Matthews, 1993. Xylem development and hydraulic conductance in sun and shade shoots of grapevine (*Vitis vinifera* L.): evidence that low light uncouples water transport capacity from leaf area. *Planta* 190:393-406.

Singleton, V.L., 1992. Tannins and the qualities of wines. In *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. R.W. Hemingway (Ed). Pp859-880. Plenum Press New York.

Smart R.E., Dick J.K., Gravett I.M. and B.M., Fisher, 1990. Canopy management to improve grape yield and wine quality - principles and practices. *South African Journal of Enology & Viticulture* 11:3-17.

Soar C.J., and B.R. Loveys, 2007. The effect of changing patterns in soil-moisture availability on grapevine root distribution, and viticultural implications for converting full-cover irrigation into a point-source irrigation system. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 13:2-13.

Soar C.J., Speirs J., Maffei S.M, Penrose A.B., McCarthy M.G. and B.R. Loveys, 2006. Grape vine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Australian Journal of Grape & Wine Research* 12:2-11.

Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., and M. Moutounet, 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43:509-512.

Su, C.T. and V. L. Singleton, 2001. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* 8:153-1558.

- Sun A.Y., Simonyi A. and G.Y. Sun, 2002. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med.* 32:314-322.
- Tanaka T., Ohyama M., Morimoto K., Asai F. and M. Iinuma, 1998. A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Phytochemistry* 48:1241-1244.
- Tardieu F., Zhang J. and D.J.G. Gowing, 1993. A model of stomatal control by both ABA concentration in the xylem sap and leaf water status. Test of the model and of alternative mechanisms for droughted and ABA-fed field-grown maize. *Plant Cell & Environment* 16:413-420.
- Tardieu, F., 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *C. R. Geoscience* 337:57-67.
- Tradiou F. and Simoneau, 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* 49:419-432.
- Tyerman S.D., Niemietz C.M. and Bramley H., 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell & Environment* 25:173-194.
- Vinocur B. & A. Altman, 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 1:123-132.
- Vivier M.A. and I.S. Pretorius, 2002. Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotechnol.* 20:472-478.
- Wang W., Vinocur B. and A. Altman, 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- Waterhouse A.L. and R.M. Lamuela-Raventos, 1994. The occurrence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries. *Phytochemistry* 37:571-574.
- Westgate M.E. and J.S. Boyer, 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164:540-549.
- Williams L.E. and F.J. Araujo, 2002. Correlations between predawn leaf, midday leaf, and midday stem water potential and their correlations with other measures of soil and plant water status in *Vitis vinifera*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 127:448-454.
- Wingler A., Lea P.J., Quick W.P. and R.C. Leegood, 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil.Trans. R. Soc. Bol. Sci.* 355:1517-1529
- Wu Y. and D.J. Cosgrove, 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany* 51:1543-1553.
- Yokthongwattana K. and A. Melis, 2006. Photoinhibition and recovery in oxygenic photosynthesis: Mechanism of a photosystem II damage and repair cycle. In Demmig-Adams, B., Adams III, W.W. & Mattoo, A.K. (eds). *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment*. Springer Netherlands, pp. 175-191.
- Zinselmeier C., Jeong B.R. and J.S. Boyer, 1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiol.* 121:25-36.