HAL
open science

Variabilité intraspécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau dans une famille de chêne pédonculé (Quercus robur L.): causes physiologiques et/ou anatomiques

Magali Roussel

To cite this version:

Magali Roussel. Variabilité intraspécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau dans une famille de chêne pédonculé (Quercus robur L.): causes physiologiques et/ou anatomiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Henri Poincaré (Nancy 1); Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie, Procédés, Produits et Environnement, 2008. Français. NNT : . tel-02821453v1

HAL Id: tel-02821453

https://hal.inrae.fr/tel-02821453v1

Submitted on 6 Jun 2020 (v1), last revised 29 Mar 2018 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement
Département de Formation Doctorale Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et Ecologie, Biotechnologies

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biologie Forestière

par **Magali ROUSSEL**

Variabilité intraspécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau dans une famille de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.): causes physiologiques et/ou anatomiques

Soutenue publiquement le 14 octobre 2008

Membres du jury:

Rapporteurs:	M. Hervé COCHARD	Directeur de Recherche, INRA Clermont-Ferrand
	M. Guillaume TCHERKEZ	Professeur, Université Paris XI
Examinateurs:	M. Pierre DIZENGREMEL	Professeur, UHP Nancy-I
	M. Grégoire LE PROVOST	Chargé de Recherche, INRA Bordeaux
	M. Oliver BRENDEL	Chargé de Recherche, INRA Nancy (Co-encadrant de thèse)
	M. Jean-Marc GUEHL	Directeur de Recherche, INRA Nancy (Directeur de thèse)

Equipe Bioclimatologie - UMR 1137 (Ecologie et Ecophysiologie Forestières) – IFR 110 - INRA Centre de Nancy - F-54280 Champenoux

Remerciements

Pour éviter tout oubli: merci à tous!

Je tenais tout de même à exprimer toute ma gratitude envers toutes celles et ceux qui m'ont apporté leur soutien, leur concours technique (préparation des plants à Bordeaux et à Nancy, entretien des plants et récolte, quelques analyses au spectro, quelques photos au MEB, quelques pesées de pots…), mais aussi à toutes ces personnes qui, à grand renfort d'humour et de blagounettes, ont amené quelques rayons de soleil en ce bas monde lorrain.

Enfin, ces remerciements s'adressent plus particulièrement à ma famille et aux amis, pour leur appui tout au long de ces années, et ce, dans tous les domaines.

Table des matières

Introduction générale 1

Rappels bibliographiques 3

1 Efficience d'utilisation de l'eau, et utilisation des isotopes de carbone 3
1.1 Efficience d'utilisation de l'eau et échelles d'intégration 3
1.2 Discrimination isotopique du ^{13}C 5

2 Décomposition de l'efficience d'utilisation de l'eau à l'échelle plante entière et foliaire, et apport des isotopes de l'oxygène comme estimateur de la conductance stomatique 9
2.1 A l'échelle "plante entière" 9
2.2 A l'échelle foliaire 11
2.3 Utilisation des isotopes de l'oxygène comme estimateur de la conductance stomatique 15

Problématique et objectifs principaux de cette thèse 22

1ère partie: Causes physiologiques et/ou anatomiques de la variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau chez le chêne pédonculé 25

I.1 Introduction 25

I.2 Matériel et méthodes 27

I.3 Analyse comparative des différentes méthodes de détermination de l'efficience d'utilisation de l'eau 30
I.3.1 Comparaisons des différentes approches de détermination de l'efficience d'utilisation de l'eau 30
I.3.2 Stabilité génotypique de l'efficience d'utilisation de l'eau estimée sur la base des valeurs de discrimination isotopique pour différentes fractions organiques et sous conditions environnementales variées 34

I.4 Causes anatomiques et/ou physiologiques de la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau 40
I.4.1 Variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau et de ses composantes au sein de cette famille de chêne pédonculé 40
I.4.2 Etudes des phénotypes extrêmes 43

I.5 Conclusions 85

2ème partie: Estimation de la conductance stomatique par la composition isotopique en oxygène 18 de la matière organique foliaire et de l'eau foliaire 89

II.1 Introduction 89

II.2 Relation entre conductance stomatique et composition en ^{18}O de l'eau foliaire et de la matière organique soluble foliaire 90
II.2.1 Introduction 90
II.2.2 Matériel & Méthodes 91
II.2.3 Résultats et discussion 96
II.2.4 Conclusions 104

II.3 Analyse de la composition isotopique en ^{18}O des sucres solubles foliaires 107

II.4 Conclusions 121

Conclusions/Perspectives 122

Annexe 1: Réponse de la conductance stomatique au VPD chez le chêne pédonculé 1

Introduction 1

Matériel & Méthodes 2
Matériel végétal et conditions de culture 2
Réponse de la conductance stomatique au déficit de pression de vapeur d'eau (VPD) 3
Analyse statistique 4

Résultats & Discussion 4
Evolution des échanges gazeux en réponse au VPD 4
Indices de sensibilité des stomates au VPD 5
Corrélations entre ces indices et g_s/W_i 7

Conclusions 7

Annexe 2: Water status and stomatal closure responses of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) rooted cuttings to water stress 1

Abstract 1

Introduction 2

Material & Methods 3
Plant material and growth conditions 3
Soil water content 4
Plant water relations 4
Statistical analyses 5

Results 6
Soil and plant water status 6
Plant water relations during drought 7

Discussion 7

Conclusions 9

Articles et Annexes

Articles

1. Roussel M, Lethiec D, Montpied P, Ningre N, Guehl JM, Brendel O. Diversity of water use efficiency in a *Quercus robur* family: contribution of related leaf traits.
Accepted. Annals of Forest Science.

2. Roussel M, Dreyer E, Montpied P, Le-Provost G, Guehl JM, Brendel O. The diversity of ^{13}C isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family is associated with differences in intrinsic water use efficiency, transpiration efficiency and stomatal conductance.
Submitted. Journal of Experimental Botany.

Projet d'articles

Roussel M, Bréchet C, Guilmette C, Guehl JM, Brendel O. Extraction of leaf soluble sugars for oxygen and carbon isotope analysis. *In prep.*

Annexes

1. Réponse de la conductance stomatique au VPD chez le chêne pédonculé.

2. Roussel M, Lederle M, Bogeat-Triboulot MB, Dreyer E, Guehl JM and Brendel O. Water status and stomatal closure responses of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) rooted cuttings to water stress. *In prep.*

Abréviations

	Définition	Unité
%C	proportion de carbone	%
%N	proportion d'azote	%
%O	proportion d'oxygène	%
a	discrimination contre le $^{13}CO_2$ durant la diffusion à travers les stomates	‰
A	assimilation nette de CO_2	µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}
A_{sat}	assimilation nette de CO_2 en conditions standardisées (température = 25℃, éclairement saturant (1200µmol photons m^{-2} s^{-1} dans le PAR), CO_2 ambiant)	µmol CO_2 m^{-2} s^{-2}
b	discrimination contre le $^{13}CO_2$ par les premières enzymes de carboxylation	‰
biom	biomasse sèche	g
C	concentration molaire de l'eau	mol m^{-3}
c	pente de la relation g_s *vs* PPFD	10^4 mol m^{-2} s^{-1}/unité de PPFD
C_a	fraction molaire de CO_2 dans l'atmosphère	µmol CO_2 mol^{-1} d'air
C_c	fraction molaire de CO_2 au niveau des sites de carboxylation	µmol CO_2 mol^{-1} d'air
C_i	fraction molaire de CO_2 dans les espaces intercellulaires	µmol CO_2 mol^{-1} d'air
Chl	contenu en chlorophylle	g m^{-2}
d	fractionnement causé par la photorespiration, la respiration et la diffusion du CO_2 des espaces intercellulaires aux sites de carboxylation	‰
D	diffusivité de H_2O^{18} dans l'eau	m^2 s^{-1}
dDiam	différence entre diamètre au collet final et initial	mm
E	transpiration foliaire	mmol H_2O m^{-2} s^{-1}
flush	nombre de pousses	
FS	surface foliaire	m^{-2}
g_l	conductance interne à la diffusion du CO2	mol CO_2 m^{-2} s^{-1}
g_s	conductance stomatique pour la vapeur d'eau	mol CO_2 m^{-2} s^{-2}
g_{sat}	conductance stomatique pour la vapeur d'eau en conditions standardisées (température = 25℃, éclairement satu rant (1200µmol photons m-2 s-1 dans le PAR), CO2 ambiant)	mol CO_2 m^{-2} s^{-3}
HR	humidité relative	%
HV (VH)	humidité volumique du sol	%
J_{max}	flux maximal d'électrons à lumière saturante	µmol $_{e-}$ m^{-2} s^{-1}
L	distance effective entre les sites d'évaporation et les veines	m
LET	épaisseur de l'épiderme inférieur	µm
LMA	masse surfacique	g m^{-2}
LMR	rapport entre la biomasse sèche des feuilles et de la biomasse sèche totale	g g^{-1}
m	indice de sensibilité des stomates au VPD	
m_C	fraction massique de C dans la biomasse sèche	
N_{area}	azote par unité de surface	g m^{-2}
N_{mass}	azote par unité de masse	mg g^{-1}
PMT	épaisseur du parenchyme palissadique	µm
QTL	Quantitative Trait Loci	
R/S	rapport entre les biomasses sèches racinaire et aérienne	g g^{-1}
REW	contenu relatif en eau extractible du sol	%
RMR	rapport entre la biomasse sèche des racines et de la biomasse sèche totale	g g^{-1}
RWC	contenu relatif en eau dans les feuilles	%
SA	surface des stomates	µm²
SAI	index de surface stomatique	mm^{-1}
SD	densité stomatique	mm^{-2}
SL	longueur des stomates	µm
SMR	rapport entre la biomasse sèche des tiges et de la biomasse sèche totale	g g^{-1}
SMT	épaisseur du mésophylle spongieux	µm
T	transpiration journalière	g H_2O
TE	efficience de transpiration	mg biomasse sèche g^{-1} d'eau
TLT	épaisseur foliaire totale	µm
TPT	transpiration totale du plant par unité de surface foliaire	kg H_2O m^{-2}
UET	épaisseur de l'épiderme supérieur	µm
V_{cmax}	vitesse maximale de carboxylation de la Rubisco	µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}
VPD	déficit de pression de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et les feuilles	kPa
VPD50	VPD pour 50% de fermeture stomatique	kPa
w_a	fraction molaire de vapeur d'eau dans l'atmosphère	mmol H_2O mol^{-1} d'air
w_i	fraction molaire de vapeur d'eau dans la feuille	mmol H_2O mol^{-1} d'air

	Définition	Unité
W_{inst}	efficience d'utilisation de l'eau instantanée	mmol CO_2 mol^{-1} H_2O
W_i	efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque	µmol CO_2 mol^{-1} H_2O
W_{sat}	efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque en conditions standardisées (température = 25℃, éclairement saturant (1200µmol photons m-2 s-1 dans le PAR), CO2 ambiant)	µmol CO_2 mol^{-1} H_2O
α	pente de la réponse de g_s *vs* lumière (cinétique)	10^4 mol m^{-2} s^{-1}/unité de rayonnement global
$\wp$	nombre de péclet	
$\delta^{13}C$	composition isotopique en ^{13}C	‰
$\delta^{13}C_{air}$	composition isotopique en ^{13}C du CO_2 atmospéhrique	‰
$\Delta^{13}C$	discrimination $^{13}C/^{12}C$	‰
$\Delta^{13}C_{Bc}$ ($\Delta^{13}C_C$)	discrimination $^{13}C/^{12}C$ dans la cellulose du bois	‰
$\Delta^{13}C_{Bt}$ ($\Delta^{13}C_W$)	discrimination $^{13}C/^{12}C$ dans le bois	‰
$\Delta^{13}C_{Fa}$ ($\Delta^{13}C_{st}$)	discrimination $^{13}C/^{12}C$ dans l'amidon foliaire	‰
$\Delta^{13}C_{Fs}$ ($\Delta^{13}C_{su}$)	discrimination $^{13}C/^{12}C$ dans les sucres solubles foliaires	‰
$\Delta^{13}C_{Ft}$ ($\Delta^{13}C_b$)	discrimination $^{13}C/^{12}C$ dans la matière organique foliaire totale	‰
$\delta^{13}C_{LS}$	composition isotopique en ^{13}C des sucres solubles foliaires	‰
$\delta^{13}C_{MOS}$	composition isotopique en ^{13}C de la matière organique soluble	‰
$\delta^{13}C_S$	composition isotopique en ^{13}C des sucres purs	‰
$\delta^{18}O$	composition isotopique en ^{18}O	‰
$\delta^{18}O_{LS}$	composition isotopique en ^{18}O des sucres solubles foliaires	‰
$\delta^{18}O_S$	composition isotopique en ^{18}O des sucres purs	‰
δ_s	composition isotopique en ^{18}O de la source	‰
$\Delta^{18}O$	enrichissement en ^{18}O par rapport à la source	‰
$\Delta^{18}O_e$	enrichissement en ^{18}O de l'eau au niveau des sites d'évaporation par rapport à la source	‰
$\Delta^{18}O_L$	enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire par rapport à la source	‰
$\Delta^{18}O_{MOS}$	enrichissement en ^{18}O de la matière organique soluble par rapport à la source	‰
$\Delta^{18}O_v$	enrichissement en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique par rapport à la source	‰
ε^*	fractionnement à l'équilibre causé par les changements de phase de l'eau liquide à l'eau vapeur	‰
ε_k	fractionnement cinétique pour la diffusion de la vapeur d'eau à travers les stomates et la couche limite	‰
ε_{wc}	fractionnement à l'équilibre entre l'O organique et le milieu aqueux	‰
ϕ	indice de sensibilité des stomates au VPD	
Φ_C	proportion de carbone perdue lors des processus non-photosynthétiques	
Φ_w	proportion d'eau perdue lors des processus non-photosynthétiques	
ν	déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère	mmol H_2O mol^{-1} d'air
θ	température	℃
Ψ_π	potentiel osmotique foliaire à turgescence	MPa
Ψ_p	potentiel hydrique foliaire de base	MPa

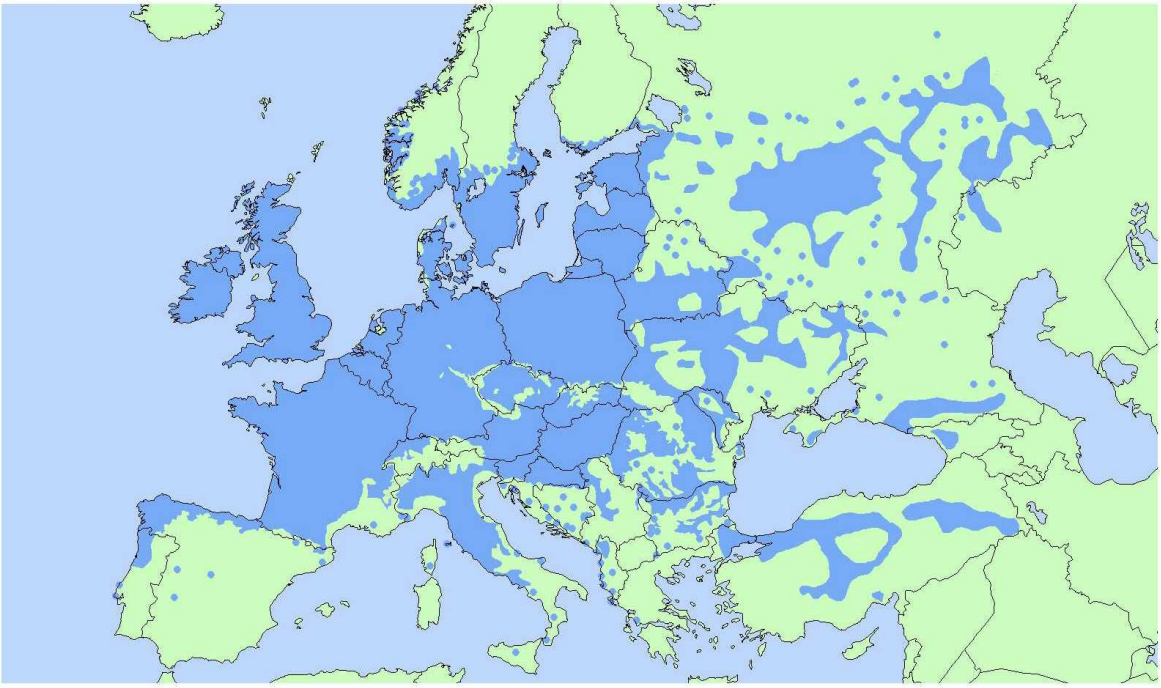


Figure 1: Aire de distribution du chêne pédonculé (en bleu).
D'après: Ducousso A & Bordacs S. 2004. EUFORGEN. Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 pages.
http://www.bioversityinternational.org/networks/euforgen/Euf_Distribution_Maps.asp

Introduction générale

Le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) appartient à la famille des *Fagaceae*. C'est une espèce post-pionnière nomade qui couvre une majeure partie de l'Europe et de l'Asie Mineure (Figure 1). Il présente une très large amplitude écologique et se rencontre depuis les sols très acides jusqu'aux sols calcaires. Le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) est, avec le chêne sessile, l'une des espèces de chêne la plus représentée dans les forêts françaises, pour la partie non méditerranéenne. Il représente 18% du volume total sur pied (données IFN, 2005-2006).

La diversité génétique de ces deux espèces de chêne (sessile et pédonculé) est un sujet de recherche en cours depuis plusieurs années. Cette diversité génétique est analysée *via* l'utilisation de marqueurs moléculaires (ADN nucléaire et chloroplastique), mais aussi *via* l'étude de caractères phénotypiques d'intérêt tels que la croissance, la qualité du bois… En ce qui concerne les analyses génomiques, deux types de régions sont étudiées :

- les régions neutres (relativement insensibles à la pression de sélection naturelle). Chez les chênes, il existe un fort polymorphisme génétique pour ces régions (Kremer & Petit, 1993).
- les régions non neutres ou adaptatives (soumises à la pression de sélection et donc à la pression évolutive, de même qu'aux facteurs environnementaux parce-que ces régions comprennent des gènes impliqués dans l'adaptation au milieu).

En ce qui concerne les caractères phénotypiques (traits foliaires, débourrement…), une forte diversité a été observée aussi bien en inter-spécifique (Ponton, 2002 ; Faivre, 2004) qu'en intra-spécifique (Kleinschmit, 1993; Ponton, 2002; Torti, 2005; Brendel *et al.*, 2008). L'efficience d'utilisation de l'eau représente, elle aussi, un caractère phénotypique d'intérêt. En effet, ce trait traduit le compromis que font les plantes entre gain de carbone et pertes en eau. Au cours d'une sécheresse, ce compromis peut évoluer : est-ce que les arbres vont continuer à transpirer pour maintenir leur gain de carbone ou vont-ils limiter leurs pertes en eau, ce qui peut se traduire par une diminution du gain de carbone ? Quand il y a stress hydrique, l'efficience d'utilisation de l'eau augmente, comme cela a notamment été montré chez différentes espèces (*Gossypium hirsutum*, Yakir *et al*. (1990) ; *Eucalyptus microtheca*, Li (2000) ; *Encelia farinosa*, Sandquist & Ehleringer (2003) ; *Populus deltoides* x *Populus nigra*, Monclus *et al.* (2006)…) ainsi que chez les chênes sessile et pédonculés (E. Dreyer, communication personnelle). De ce fait, on s'attendrait donc à ce que des populations acclimatées à des régions sèches aient une efficience d'utilisation de l'eau plus élevée que d'autres populations acclimatées à des régions plus humides. Mais, ce n'est pas toujours ce qui est observé, comme chez le pin maritime ou le châtaignier pour lesquels les populations issues des régions les plus sèches sont aussi celles qui ont la plus faible efficience d'utilisation de l'eau lorsque les conditions d'irrigation sont non-limitantes (respectivement, Guehl *et al*., 1995b; Lauteri *et al*., 1997). Outre ces aspects de compréhension du fonctionnement écologique des espèces, l'étude de l'efficience d'utilisation de l'eau couplée à l'étude de la biomasse lors d'un stress hydrique, permettrait d'identifier des génotypes capables de maintenir

leur gain de biomasse tout en limitant leurs pertes en eau dans ces conditions. Ces génotypes auraient ainsi un intérêt économique certain. Il s'agit d'une problématique inhérente aux espèces commerciales telles que le peuplier (Monclus *et al*., 2005).

Les chênes pédonculé et sessile sont des espèces sympatriques, qui cependant présentent des exigences écologiques contrastées. Sur un gradient topographique, le chêne sessile se trouve plutôt au niveau du plateau (zones plus sèches et drainées), alors que le chêne pédonculé se trouve plutôt en fond de vallon (zones plus humides). Parallèllement à ces différences d'exigence écologique, des différences fonctionnelles ont aussi été observées entre ces deux espèces, et notamment en terme d'efficience d'utilisation de l'eau. Ainsi, plusieurs travaux réalisés au sein de l'UMR EEF – INRA Nancy (Ponton, 2002 ; Faivre, 2004) ont montré que l'efficience d'utilisation de l'eau estimée *via* la discrimination isotopique du carbone était plus élevée pour le chêne sessile que pour le chêne pédonculé. De plus des différences de comportement face à une sécheresse édaphique ont aussi été observées. Pour illustrer ce propos, suite à des épisodes de sécheresse apparus dans les années 1970-80, il s'est avéré que le chêne pédonculé était plus sensible que le chêne sessile aux contraintes hydriques sévères (Becker & Levy, 1983). Le chêne sessile, quant à lui, a été très peu touché.

L'intensification des rejets de gaz à effet de serre de nature anthropique (dioxyde de carbone, méthane…) modifie le climat à l'échelle du globe (Kump, 2002). En France, une hausse printanière et une baisse estivale des précipitations sont prévues pour les années à venir. La diminution des précipitations estivales provoquerait un allongement de la période de sécheresse estivale (Lebourgeois *et al*., 2001), et le déficit hydrique ainsi généré limiterait alors la fixation de carbone, la croissance et la production nette primaire chez les plantes (Dawson, 1993). Il paraît ainsi pertinent d'étudier le comportement des espèces majeures des forêts françaises face à un climat de plus en plus modifié.

En conséquence des changements climatiques, plusieurs processus peuvent être observés, soit des dépérissements massifs au niveau des régions touchées par une augmentation de la sécheresse, soit une migration de l'espèce, soit une adaptation locale qui dépend de la diversité génétique de caractères adaptatifs pouvant répondre à ces changements environnementaux. Cette diversité génétique fonctionnelle sera donc décisive pour permettre à l'espèce de survivre dans son nouvel environnement, ce qui impliquerait donc une capacité d'adaptation importante.

Ces travaux s'inscrivent ainsi dans une optique de compréhension de la variabilité intra-espèce de l'acquisition du carbone et de la gestion de l'eau chez le chêne pédonculé, dans un contexte d'adaptation de cette espèce face aux changements climatiques et plus précisément à la contrainte hydrique.

Encadré 1 : Efficience d'utilisation de l'eau

Efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i):

W_i (µmol CO_2 mol^{-1} H_2O) se détermine à l'aide du rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) mesurées de façon instantanée à l'échelle foliaire.

Par analogie à la loi d'Ohm, le flux de CO_2 (A) de l'atmosphère vers l'intérieur de la feuille est décrit comme le produit entre la différence de fraction molaire de CO_2 entre l'atmosphère et les espaces intercellulaires (respectivement, C_a et C_i, en µmol CO_2 mol^{-1} d'air) et la conductance stomatique pour le CO_2 (g_c, mol CO_2 m^{-2} s^{-1}) qui est l'inverse d'une résistance, d'où $A = g_c (C_a-C_i)$. La vapeur d'eau diffusant 1.6 fois plus vite que le CO_2, alors: $g_s = 1.6\ g_c$.

Ainsi,

$$\mathbf{W_i = A/g_s = g_c (C_a-C_i)/g_s = (C_a-C_i)/1.6 = C_a (1- C_i/C_a)/1.6} \qquad (\mathbf{Eqn\ 1})$$

Efficience d'utilisation de l'eau instantanée (W_{inst}):

W_{inst} (mmol CO_2 mol^{-1} H_2O) représente le rapport entre les flux de CO_2 entrant dans la feuille et les flux de vapeur d'eau sortant de la feuille (ou transpiration, notée E en mmol H_2O m^{-2} s^{-1}) pendant la photosynthèse. La transpiration est calculée à l'aide du produit entre g_s et le gradient de fraction molaire de vapeur d'eau (ν, mmol H_2O mol^{-1} d'air) entre la feuille (w_i, mmol H_2O mol^{-1} d'air) et l'atmosphère (w_a, mmol H_2O mol^{-1} d'air) ($\nu = w_i - w_a$), d'où : $E = g_s*\nu$.

$$W_{inst} = A/E = [C_a (1-C_i/C_a)]/1.6\ \nu \qquad (\mathbf{Eqn\ 2})$$

De la même façon que W_i, W_{inst} est associé à l'échelle foliaire.

Efficience de transpiration (TE):

La détermination de TE se fait sur une période de temps relativement longue (de quelques semaines à plusieurs mois) et est associée à l'échelle "plante entière".

L'efficience de transpiration (notée TE_C) peut d'abord être définie comme étant le rapport entre le taux d'accumulation de carbone dans la biomasse sèche et les pertes en eau cumulées. L'équation 2 peut alors être étendue de l'échelle foliaire à l'échelle plante entière en ajoutant deux termes: Φ_C qui correspond à la proportion de carbone perdue lors de la respiration des racines et des tiges le jour, et de l'ensemble de la plante, y compris les feuilles la nuit (Φ_C = 30 à 50% de la quantité nette de carbone assimilée pendant la phase diurne chez les arbres) et Φ_W qui correspond à la proportion d'eau perdue par la plante du fait de l'ouverture partielle des stomates pendant la nuit, de la transpiration cuticulaire et de la transpiration des racines et des tiges.

$$TE_C \text{ (mmol C mol}^{-1} H_2O) = [(1- \Phi_C) (C_a-C_i)]/[1.6\ \nu\ (1+ \Phi_W)] = [C_a (1- \Phi_C) (1-C_i/C_a)] /[1.6\ \nu\ (1+ \Phi_W)] \qquad (\mathbf{Eqn\ 3})$$

L'efficience d'utilisation de l'eau peut aussi être exprimée, non plus par rapport au gain de C, mais par rapport au gain de biomasse sèche. Elle sera alors notée TE:

$$\mathbf{TE\ (g\ MS\ kg^{-1}\ H_2O) = TE_C\ [12/(18*m_C)] = [C_a (1- \Phi_C) (1-C_i/C_a)] /[1.6\ \nu\ (1+ \Phi_W)]\ [12/(18*m_C)]} \qquad (\mathbf{Eqn\ 4})$$

Où le facteur 12/18 représente le rapport entre les masses molaires du C et de la vapeur d'eau, et m_C, la fraction massique de C dans la biomasse sèche.

Rappels bibliographiques

1 Efficience d'utilisation de l'eau, et utilisation des isotopes de carbone

1.1 Efficience d'utilisation de l'eau et échelles d'intégration

L'efficience d'utilisation de l'eau correspond au rapport de la quantité de carbone fixée dans la biomasse sur la quantité d'eau transpirée par la plante pour une période de temps donnée. Il s'agit ainsi d'une mesure des performances des plantes en matière de compromis entre gain de carbone et perte d'eau. C'est un trait d'intérêt utilisé dans divers domaines: agronomie, foresterie ou écologie. En agronomie, l'amélioration de l'efficience d'utilisation de l'eau des plantes de grande culture est un moyen d'accroître leur production pour un apport d'eau défini (Richards *et al.*, 2002). Dans ce secteur, l'efficience d'utilisation de l'eau peut revêtir différents aspects selon qu'elle se rapporte au rendement ou à l'eau utilisée pour l'irrigation. Dans le domaine forestier, l'efficience d'utilisation de l'eau est souvent utilisée pour établir un lien entre production de bois et gestion de l'eau. Enfin, vis-à-vis des changements climatiques globaux, ce trait permet de connecter les cycles de carbone et d'eau de la végétation terrestre et est modulé par l'élévation du niveau de CO_2 atmosphérique et par la sécheresse édaphique (Guehl *et al.*, 1994).

L'efficience d'utilisation de l'eau peut être étudiée à l'échelle de l'écosystème (c'est alors le gain de carbone de l'écosystème sur l'évapotranspiration; Law *et al.*, 2002) ou à l'échelle de la plante. Dans ce dernier cas, plusieurs définitions coexistent, permettant d'accéder à différentes échelles spatiales et temporelles (encadré 1). En se plaçant tout d'abord à l'échelle foliaire, on peut définir une efficience d'utilisation de l'eau "photosynthétique" qui se décline en deux expressions. Ces deux types d'efficience d'utilisation de l'eau dites intrinsèque et instantanée (respectivement, W_i et W_{inst}) comprennent toutes deux une composante biologique se définissant comme le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). A la différence de W_i, W_{inst} dépend aussi d'une composante environnementale, ν (différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère). Dans ce travail, seule l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque ($W_i = A/g_s$, exprimée en µmol CO_2 mol^{-1} H_2O) a été analysée. En effet, seules les différences génétiques entre individus nous intéressaient. De ce fait, la grande majorité des traits analysés dans ce manuscrit ne sont dépendants que de la physiologie de la plante.

L'efficience de transpiration (TE) est définie comme étant une mesure intégrée dans le temps de l'efficience d'utilisation de l'eau à l'échelle de la plante entière. La détermination de TE se fait généralement sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois, et est basée sur des mesures gravimétriques d'accumulation de biomasse sèche (MS) et de pertes en eau cumulées sur toute la période

Encadré 2 : Discrimination isotopique du carbone

Il existe deux isotopes stables pour le carbone: ^{12}C et ^{13}C, dont les abondances naturelles relatives diffèrent de sorte que le rapport $^{13}C/^{12}C$ est de l'ordre de 1.1 %. La composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}C$, ‰) d'un échantillon compare le rapport $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon (R_{ech}) à celui d'un standard international (R_{std}) qui, dans ce cas, est la Pee Dee Belemnite.

$\delta^{13}C_{éch}$ (‰) = 1000 ($R_{ech} - R_{std}$)/R_{std}

Pour obtenir la discrimination isotopique entre le CO_2 atmosphérique et un échantillon végétal, la composition isotopique en ^{13}C de la matière végétale est alors comparée à la composition isotopique de la source de CO_2, c'est-à-dire la composition isotopique du CO_2 atmosphérique ($\delta^{13}C_{air} \approx -8$ ‰).

$\Delta_{éch}$ (‰) = 1000 ($\delta^{13}C_{air} - \delta^{13}C_{éch}$)/(1000 + $\delta^{13}C_{éch}$)

$\delta^{13}C_{éch}$ étant très petit devant 1000, l'équation précédente peut être simplifiée :

$\Delta_{éch}$ (‰) $\approx \delta^{13}C_{air} - \delta^{13}C_{éch}$

d'expérimentation. Ainsi, TE s'exprime en g MS g^{-1} H_2O. Toutefois, par définition, l'efficience de transpiration devrait correspondre à l'accumulation de carbone dans la biomasse sèche rapportée aux pertes en eau cumulées et s'exprimer en mmol C mol^{-1} H_2O pour être totalement en accord avec l'équation 1 de l'encadré 1. Outre la nécessité des pesées, la détermination de cette efficience d'utilisation de l'eau exige de connaître la fraction massique de carbone présente dans la matière organique, ceci étant effectué à l'aide d'un analyseur élémentaire (Cernusak *et al.*, 2007a). Dans cette étude, TE a été calculée en fonction du gain de biomasse sèche.

L'estimation de TE est laborieuse et se fait le plus fréquemment sur des plants en pots. A notre connaissance, seule l'étude de Olbrich *et al.* (1993) a porté sur des arbres matures, et l'estimation de TE nécessitait alors des mesures de flux de sève ainsi que l'évaluation du gain de volume de tige, puisque le gain de biomasse total (racines comprises) n'est pas aisé à déterminer. W_i étant beaucoup plus simple à estimer que TE, ce trait pourrait être utilisé pour en déduire TE du fait de la relation théorique entre ces deux termes (équation 4 de l'encadré 1). Cette relation (entre W_i ou W_{inst} et TE) a d'ailleurs pu être expérimentalement observée, chez les arbres, sous conditions environnementales variables, telles que l'apport en eau (Osorio & Pereira, 1994; Matzner *et al.*, 2001) ou la fertilisation azotée (Ripullone *et al.*, 2004). Peu d'études ont établi des corrélations entre ces deux traits en intra-spécifique et en conditions non-limitantes, excepté Li (2000) pour des populations d'eucalyptus. Comme le montre l'équation 4 de l'encadré 1, TE n'est dépendante qu'en partie de W_i. D'autres paramètres, tels que la proportion de carbone fixée pendant la photosynthèse et perdue par la respiration des racines et tiges le jour et des racines, tiges et feuilles la nuit (Φ_C), et la proportion d'eau perdue par la plante hors processus photosynthétiques (Φ_W) peuvent aussi intervenir pour expliquer les variations de TE indépendamment des variations de W_i. D'autre part, se pose le problème du temps d'intégration, puisque W_i représente une efficience d'utilisation de l'eau instantanée, alors que TE est intégrée sur une période de temps donnée. Tous ces éléments peuvent expliquer que certains travaux ne mettent pas en évidence de corrélation entre W_i et TE (e.g., en conditions non-limitantes: Roupsard *et al.*, 1998 pour des provenances d'acacia; Sun *et al.*, 1996 pour des croisements d'épinette blanche). La relation entre TE et W_i doit donc être vérifiée, puisque l'extrapolation de l'échelle foliaire instantanée à l'échelle plante entière et intégrée dans le temps n'est pas toujours réalisable.

Ces deux traits, TE et W_i, représentent donc deux extrêmes d'efficience d'utilisation de l'eau. L'utilisation des isotopes de carbone permet de s'affranchir du caractère instantané de W_i et d'estimer des efficiences d'utilisation de l'eau intégrées à plus ou moins long terme.

Encadré 3 : Relations entre discrimination isotopique du carbone et efficience d'utilisation de l'eau (W_i et TE)

Farquhar *et al.* (1982) ont établi un modèle permettant de relier la discrimination isotopique et le rapport C_i/C_a (respectivement, les fractions molaires de CO_2 entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère, en µmol CO_2 mol^{-1} d'air) chez les plantes en C_3:

$$\Delta_{éch} = a + [(b - a)\, C_i/C_a] - d \qquad \textbf{(Eqn 5)}$$

a: la discrimination contre le $^{13}CO_2$ durant la diffusion à travers les stomates (a=4.4‰);

b: la discrimination contre le $^{13}CO_2$ par les premières enzymes de carboxylation, Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase Oxygenase (Rubisco) et Phospho Enol Pyruvate Carboxylase (PEPc). Le facteur b dépend des proportions relatives de carboxylation effectuées par la Rubisco et par la PEPc et varie entre 27 et 30‰.

d: ce terme regroupe tous les processus de fractionnement causés par la photorespiration, la respiration et la diffusion du CO_2 des espaces intercellulaires aux sites de carboxylation (Farquhar *et al.*, 1989).

Les équations 1 (Encadré 1) et 5 (cet encadré) partagent le même facteur C_i/C_a, ce qui permet, en les combinant, d'obtenir une relation entre W_i et $\Delta_{éch}$:

$$\Delta_{éch} = b - d - [(b - a)\, 1.6\, W_i/C_a] \qquad \textbf{(Eqn 6)}$$

En combinant les équations 4 (Encadré 1) et 6 (cet encadré), cela permet d'obtenir une relation entre TE et $\Delta_{éch}$:

$$\Delta_{éch} = b - d - [(b - a)\, (18 * m_C / 12)\, (1.6\, \nu\, (1 + \Phi_W)/C_a\, (1 - \Phi_C))\, TE] \qquad \textbf{(Eqn 7)}$$

1.2 Discrimination isotopique du ^{13}C

Lors de la fixation de CO_2 dans la biomasse, les plantes discriminent contre l'isotope 13 du carbone. Chez les plantes en C_3, cette discrimination ($\Delta^{13}C$, encadré 2) est en partie causée par les premières réactions de carboxylation (principalement par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco)) et par la diffusion du CO_2 de l'atmosphère vers les espaces intercellulaires. Toutefois d'autres processus de fractionnements interviennent: dissolution et diffusion du CO_2 dans la phase liquide, photorespiration et respiration de jour (Farquhar *et al.*, 1988; Farquhar *et al.*, 1989). L'effet de ces fractionnements sur la valeur de $\Delta^{13}C$ est faible, mais significatif (Brugnoli & Farquhar, 2000; Ghashghaie *et al.*, 2003). Farquhar *et al.* (1982) ont établi un modèle corrélant positivement la discrimination du ^{13}C du CO_2 entrant dans la feuille et le rapport C_i/C_a (respectivement, les fractions molaires de CO_2 dans les espaces intercellulaires et dans l'atmosphère) (équation 5 de l'encadré 3). $\Delta^{13}C$ peut permetre d'avoir une estimation de C_i/C_a, non pas instantanée (comme avec les mesures d'échanges gazeux), mais intégrée dans le temps et pondérée par la quantité de carbone assimilée par unité de temps. C_i/C_a reflète l'importance relative de A et de g_s qui sont reliés respectivement à la demande et à la disponibilité de CO_2. Ce rapport représente un point de consigne (ou "setpoint") pour l'intégration et la coordination des échanges gazeux (Ehleringer & Cerling, 1995). La discrimination isotopique en ^{13}C du matériel végétal est une mesure rétrospective et intégrée de ce point de consigne et peut être utilisée soit comme indicateur des processus physiologiques et des conditions environnementales prévalant lors de l'assimilation de CO_2 (Ehleringer, 1993), soit comme outil de comparaison de l'efficience d'utilisation de l'eau des plantes sous conditions environnementales similaires.

Compte tenu des relations entre $\Delta^{13}C$ et C_i/C_a (équation 5 de l'encadré 3) et entre W_i et C_i/C_a (équation 1 de l'encadré 1), pour les plantes en C_3, la discrimination du carbone 13 est négativement liée à W_i *via* le rapport C_i/C_a (équation 6 de l'encadré 3; Farquhar & Richards, 1984). La relation théorique négative entre W_i (ou W_{inst}) et $\Delta^{13}C$ a été validée expérimentalement chez les arbres, en intra-spécifique, par plusieurs études (Zhang *et al.*, 1994; Lauteri *et al.*, 1997; Roupsard *et al.*, 1998; Cregg *et al.*, 2000; Grossnickle *et al.*, 2005). Chez le chêne pédonculé, Ponton *et al.* (2002) ont mis en évidence une relation négative entre W_i et $\Delta^{13}C$, sous différents traitements lumineux. Toutefois, quelques études ne parviennent pas à obtenir cette relation, comme par exemple en conditions non-limitantes en eau chez des populations d'épinette blanche (Sun *et al.*, 1996) ou des clones de peuplier (Monclus *et al.*, 2006) ou pour différents traitements hydriques et concentrations en CO_2 atmosphérique chez le chêne sessile (Picon *et al.*, 1996a). L'absence de relation entre W_i et $\Delta^{13}C$ est souvent due à des décalages d'échelle temporelle entre les mesures instantanées d'échanges gazeux (fortement soumises aux conditions

Espèce	Comparaison	Conditions de culture	Gamme $\delta^{13}C/\Delta^{13}C$	TE	W_i	A	g_s	Référence
Larix occidentalis	5 familles	plant. nat.	2.4 (Ft)			27	34	Zhang *et al.*, 1994
Picea glauca	10 croisements	plant. irr.	0.9 (Ft)	10	6			Sun *et al.*, 1996
Picea glauca x Picea engelmanii	4 clones (intra-famille)	plant. irr.	0.7 (Ft)		10	10	16	Grossnickle & Fan, 1998
Picea mariana	4 familles de plein-frères	plant. nat.	0.7-1 (Ft)					Flanagan & Johnsen, 1995
Picea mariana	21-27 familles (di-allèle)	plant. nat.	3.6-4.3 (Ft)					Johnsen *et al.*, 1999
Picea sitchensis x (Picea glauca x Picea engelmanii)	7 populations	plant. irr.				10	13	Fan *et al.*, 1997
Picea sitchensis x (Picea glauca x Picea engelmanii)	8 populations	plant. irr.	1.2 (Ft)		10	8	14	Fan *et al.*, 1999
Picea sitchensis x Picea glauca	hybrides	phyt. irr.	2.4 (plt)			2	2	Silim *et al.*, 2001
Pinus elliottii x P. caribaea var. *hondurensis*	8 hybrides	plant. nat.	1.1 (Ft)					Xu *et al.*, 2000
Pinus elliottii var. *elliotti x Pinus caribea* var. *hondurensis*	122 hybrides	plant. irr.	0.8 (Ft)					Prasolova *et al.*, 2003
Pinus halepensis	6 provenances	s irr.					9	Tognetti *et al.*, 1997
Pinus pinaster	3 provenances	s irr.	1.3 (Ft)	11				Guehl *et al.*, 1995a
Pinus pinaster	186-564 génotypes (intra/inter famille)	plant. nat.	3.2-3.6 (Bc)					Brendel *et al.*, 2002
Pinus ponderosa	26 populations	plant. irr.	1.9 (Ft)			6	9	Zhang & Marshall, 1995
Pinus ponderosa	4 provenances	plant. nat.	0.4 - 1.4 (Ft)		5	2	5	Cregg *et al.*, 2000
Pinus sylvestris	7 provenances	plant. nat.	1.5 (Ft)					Palmroth *et al.*, 1999
Pinus taeda	2 provenances (2 familles/provenance)	plant. nat.	0.5-0.7 (Ft)		8-13			Yang *et al.*, 2002
Pseudotsuga menziesii	25 populations	plant. irr.	2.7 (Ft)		17	15	21	Zhang *et al.*, 1993
Pseudotsuga menziesii	25 populations	plant. irr.	1.7 (Ft)			12	15	Zhang & Marshall, 1995
Thuja plicata	6 populations	plant. nat.	1 (Ft)		6	5	11	Grossnickle *et al.*, 2005
Tsuga mertensiana	12 provenances	s			6	5	9	Benowicz & El-Kassaby, 1999
Alnus sinuata	26 populations	plant. irr.				10		Benowicz *et al.*, 2000
Azadirachta indica	10 provenances	s irr.				17	21	Kundu & Tigerstedt, 1999
Betula papyrifera	18 populations	plant. irr.				5		Benowicz *et al.*, 2000
Betula papyrifera	4 populations	s irr.				7	20	Wang *et al.*, 1998a
Castanea sativa	6 provenances	plant. irr.	0.8-1.6 (Ft)			13	15	Lauteri *et al.*, 1997
Castanea sativa	population	phyt. irr.	1.6 (Ft)					Lauteri *et al.*, 2004
Castanea sativa	152-155 génotypes (intra-famille)	plant. nat.	5.5-6.6 (Ft)					Casasoli *et al.*, 2004
Eucalyptus globulus	3 clones	s irr.	0.7 (Ft)	4	9	15		Osorio & Pereira, 1994
Eucalyptus microtheca	5 populations	s irr.	0.5 (Ft)	16		22		Li, 2000
Eucalyptus microtheca	3 populations	s irr.	0.3 (Ft)					Li & Wang, 2003
Fagus sylvatica	11 provenances	s irr.	1.1-4.4 (Ft, Fmos, Fa)				31	Peuke *et al.*, 2006
Faidherbia albida	7 provenances	s irr.	1.1 (plt)	12	23	24	33	Roupsard *et al.*, 1998
Populus deltoides	4 provenances	plant. irr.				3-10	3-8	Rowland, 2001
Populus deltoides x Populus nigra	29 génotypes	plant. irr.	2.8 (Ft)					Monclus *et al.*, 2005
Populus deltoides x Populus nigra	29 génotypes	plant. irr.	2.7 (Ft)		25	32	17	Monclus *et al.*, 2006
Quercus douglasii	2 populations	s irr.	4.9 (Ft)					Matzner *et al.*, 2001
Quercus robur	183 génotypes (intra-famille)	s irr.	4.9-5.4 (Ft, Bc)		25	26	30	Torti, 2005
Quercus robur	114-207 génotypes (intra-famille)	plant. nat.	3-3.7 (Ft)		15	24	22	Brendel *et al.*, 2008

Tableau 1: Quelques données de variabilité intraspécifique de composition isotopique ou discrimination isotopique du carbone ($\delta^{13}C/\Delta^{13}C$), de l'efficience de transpiration (TE), ainsi que des traits foliaires: assimilation nette de CO_2 (A), conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) et efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque ($W_i=A/g_s$). Pour les données de $\delta^{13}C/\Delta^{13}C$, la gamme de valeurs (valeur maximale – minimale) a été reportée pour différents compartiments et métabolites: plt=plant; Ft=matière organique foliaire totale; Fmos=matière organique foliaire soluble; Fa=amidon foliaire; Bc= cellulose du bois. Pour les traits foliaires et TE, des coefficients de variation (écart-type*100/moyenne) ont été calculés. Les conditions de culture ont aussi été notées: plant.=plantation; phyt.=phytotron; s=serre. Lorsque, pour une étude, plusieurs conditions de croissance étaient proposées, seules les valeurs obtenues pour les conditions les moins contraignantes ont été retenues. Pour certaines études, les conditions d'alimentation en eau étaient non-limitantes (irr.=irrigation), alors que pour d'autres, la croissance des plants était soumise aux conditions naturelles (nat.).

environnementales ambiantes) à partir desquelles W_i est calculée, et $\Delta^{13}C$ qui représente une intégration dans le temps de W_i pondérée par l'assimilation.

Le modèle liant l'efficience d'utilisation de l'eau, définie à l'échelle instantanée et foliaire, et $\Delta^{13}C$ peut être extrapolé à l'échelle plante entière et intégrée sur une période de temps plus longue. En effet, en combinant les équations 4 et 6 (encadrés 1 et 3), on obtient ainsi une relation théorique entre la discrimination et l'efficience de transpiration (équation 7 de l'encadré 3). La discrimination isotopique du carbone peut ainsi être utilisée comme estimateur de W_i mais aussi de TE. Cette relation a été validée par quelques études sur des arbres. La variabilité des deux paramètres, responsable de la relation détectée, est la plupart du temps générée par des conditions environnementales variées: apport en eau (Osorio & Pereira, 1994; Picon *et al.*, 1996b; Sun *et al.*, 1996) ou nutrition azotée (Guehl *et al.*, 1995a; Ripullone *et al.*, 2004). En conditions non-limitantes peu d'études ont rapporté une telle relation en se basant sur la variabilité génétique, excepté les travaux de Li (2000) pour des populations d'*Eucalyptus microtheca* ou de Roupsard *et al.* (1998) pour des provenances d'acacia. De la même façon que pour la relation entre TE et W_i, d'autres facteurs (demande évaporative, Φ_C, Φ_W) peuvent intervenir expliquant parfois l'absence de corrélation entre TE et $\Delta^{13}C$ (Guehl *et al.*, 1995a; Matzner *et al.*, 2001; Ripullone *et al.*, 2004).

L'efficience d'utilisation de l'eau définie à long terme (efficience de transpiration, TE) ou à court terme (efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque, W_i) présente une variabilité intra-spécifique dont l'amplitude dépend de l'espèce étudiée (Tableau 1). Les coefficients de variation obtenus à partir des données de la littérature pour W_i et TE varient respectivement entre 5 et 25% et 4 et 16% (Tableau 1). La discrimination isotopique entre le CO_2 atmosphérique et la matière organique ($\Delta^{13}C$) est un outil permettant d'analyser plus facilement des différences d'efficience d'utilisation de l'eau entre génotypes. Concernant ce dernier point, de nombreuses études, dont quelques-unes sont référencées dans le tableau 1 ont mis en évidence une forte variabilité intra-spécifique de la discrimination isotopique du carbone, allant de 0.3 à plus de 6‰ chez les arbres, représentant une variation de W_i de 5 à 90% environ. Toutefois, les relations entre W_i, TE et $\Delta^{13}C$ sont tributaires de plusieurs facteurs et biais inhérents aux techniques de détermination. Il est donc important de vérifier que la variabilité de $\Delta^{13}C$ au sein d'une espèce reflète la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau à court et à long termes et de déterminer la précision que l'on peut espérer de l'estimation de W_i/TE par $\Delta^{13}C$.

Différents composés ou organes peuvent être utilisés pour l'analyse de leur composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}C$). La discrimination isotopique ($\Delta^{13}C$) est alors définie comme étant la discrimination du ^{13}C entre le CO_2 de l'air atmosphérique et le métabolite ou l'organe étudié (cf Encadré 2). Selon la fraction organique, $\Delta^{13}C$ est alors corrélée à une intégration de W_i pondérée par l'assimilation nette de CO_2 sur une période de temps variable. Aux deux extrémités de cette échelle, il y a, tout d'abord, la discrimination isotopique déterminée pour le CO_2 relâché par la feuille qui permet d'accéder à une

estimation instantanée de W_i (Evans *et al.*, 1986). L'analyse de la composition isotopique de la matière organique totale pour la plante entière représente l'autre extrémité de cette échelle. La discrimination associée représente ainsi une intégration à long terme d'une série complexe de processus physiologiques et biochimiques. Chacun de ces processus est susceptible d'ajouter des fractionnements isotopiques supplémentaires et est donc à l'origine de variations de la signature isotopique en carbone. Les organes sont constitués par des mélanges complexes de molécules dont les signatures isotopiques sont variables. Les feuilles et les tiges sont composées majoritairement de cellulose, d'hémicellulose, et de lignine. Ces molécules forment un pool de carbone présent dans les structures cellulaires mises en place au moment de la croissance de la feuille. Le deuxième réservoir de carbone correspond aux molécules à renouvellement rapide, telles que les sucres ou l'amidon. Une feuille de lumière peut contenir jusqu'à 20-25% de sucre et d'amidon et jusqu'à 10% pour les tiges (Hoch *et al.*, 2003). La composition isotopique de la matière organique totale est donc fonction de l'influence relative de chacun de ces deux pools (Brendel *et al.*, 2002).

De plus, la composition isotopique de la matière organique dépend aussi de la discrimination intervenant au cours des processus respiratoires et photorespiratoires (pour revue, Ghashghaie *et al*., 2003). Or, 80% (environ) du CO_2 relâché par la respiration ou la photorespiration est refixé (Loreto *et al*., 1999). Ceci a donc une influence non négligeable sur la signature finale. Lors de la photorespiration, le CO_2 libéré est appauvri en ^{13}C (discrimination positive), ceci modifie donc la discrimination observée lors des mesures d'échanges gazeux. L'impact de la photorespiration sur la composition isotopique de la plante est considéré comme faible, mais cette estimation dépend notamment des conditions de croissance (Ivlev *et al*., 1996).

Une quelconque discrimination ainsi que l'utilisation privilégiée de certains substrats enrichis ou appauvris en carbone 13 durant ce processus de respiration mitochondriale peuvent avoir pour effet de modifier la signature isotopique de la matière foliaire. En effet, la moitié du carbone fixée pendant une journée peut être respirée. La quantification d'un fractionnement lors de la respiration mitochondriale est donc critique pour l'interprétation physiologique du $\delta^{13}C_{MO}$. Les mesures de $\delta^{13}C$ du CO_2 respiré ($\delta^{13}C_R$) donnent des résultats parfois contradictoires. Lin & Ehleringer (1997) ne trouvent pas de discrimination isotopique du carbone 13 lors de la respiration mitochondriale de protoplastes de cellules du mésophylle de haricot (*Phaseolus vulgaris* L. var San Juan Select) et de maïs (*Zea mays* L. var Incredible Hybrid) mis en culture dans un milieu contenant des sucres de composition isotopique différente. Ces auteurs en concluent que la respiration mitochondriale n'a pas une influence significative sur la composition isotopique foliaire. Ceci confirme les assertions de Farquhar *et al.* (1982, 1989), Farquhar & Richards (1984) et Farquhar & Lloyd (1993) selon lesquelles la discrimination pendant la respiration mitochondriale est négligeable. Cependant, d'autres études effectuées sur *Phaseolus vulgaris* L. (Duranceau *et al*., 2001), *Nicotiana sylvestris* et *Helianthus annuus* (Ghashghaie *et al*., 2001) infirment les résultats précédents : le CO_2 relâché lors de la respiration mitochondriale peut être enrichi par rapport à la matière organique de 6‰. De même, Xu *et*

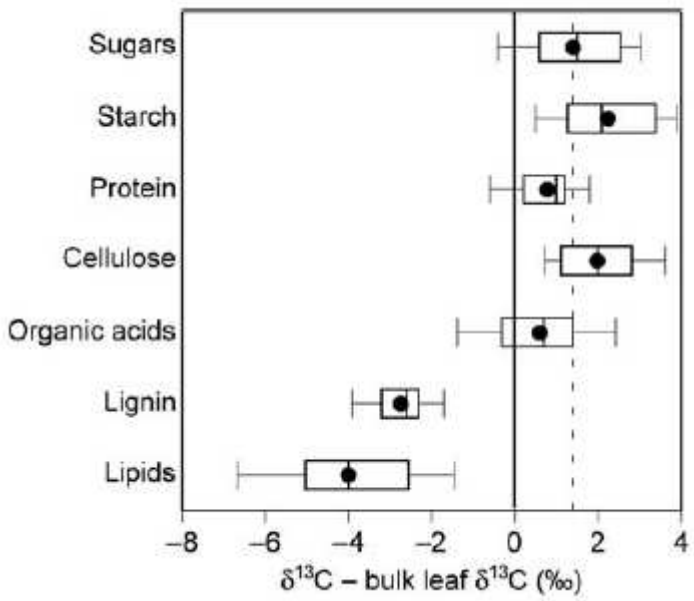


Figure 2: Graphique issu de la revue de Bowling *et al.* (2008; Figure 2) représentant une comparaison des compositions isotopiques de différents composés foliaires, exprimées par rapport à la composition isotopique de la matière organique totale foliaire de plantes de type C_3. Les boîtes à moustaches sont constituées de plusieurs éléments: les extrémités des boîtes représentent les premiers et troisièmes quartiles, la ligne représente la médiane, les ronds noirs correspondent à la moyenne, et les barres d'erreur montrent les centiles 10 et 90% de la distribution. La ligne verticale en pointillés correspond à la moyenne observée pour les sucres foliaires.

al. (2004) montrent sur cinq espèces : *Musa paradisiacal, Coffea arabica, Epipremumn pinnatum, Clitoria racemosa* et *Populus deltoides* que le $\delta^{13}C_R$ est supérieur au $\delta^{13}C_{MO}$. Cet enrichissement du CO_2 respiré modifie la signature du matériel végétal foliaire (Ghashghaie *et al*., 2003) qui est donc appauvri en carbone 13. Ghashghaie *et al*. (2003) suggèrent que le fractionnement isotopique (conduisant à un enrichissement ou à un appauvrissement en carbone 13 du CO_2 respiré par rapport à la composition isotopique des carbohydrates) pendant la respiration mitochondriale dépend de l'importance relative des voies métaboliques. Ce fractionnement est variable selon les espèces (Xu *et al*., 2004) et change avec le stade de développement des végétaux, avec les conditions environnementales et notamment la sécheresse (Ghashghaie *et al*., 2001).

Des variations de la signature en ^{13}C de la matière organique sont ainsi observables entre organes (Brugnoli & Farquhar, 2000; MacFarlane *et al.*, 2004; Peuke *et al.*, 2006; Cernusak *et al.*, 2007a), au cours du développement de la feuille (Holtum & Winter, 2005), tout au long de la saison de végétation (Jäggi *et al.*, 2002; Keitel *et al.*, 2003)… Entre ces deux extrêmes (CO_2 relâché et matière organique totale), différentes fractions carbonées peuvent être analysées. L'étude de la signature isotopique en ^{13}C de ces molécules permet d'accéder à différents temps d'intégration de W_i. La discrimination isotopique entre le CO_2 atmosphérique et les sucres solubles foliaires (glucose, fructose et surtout saccharose), premiers produits de la photosynthèse, reflètent une intégration des échanges gazeux de un à quelques jours (Brugnoli *et al.*, 1988; Brugnoli & Farquhar, 2000). La signature en ^{13}C de l'amidon est un intégrateur à moyen terme (environ une semaine; Jäggi *et al.*, 2002). L'analyse de constituants à plus longue durée de vie, tels que la cellulose, des feuilles ou des cernes, permet d'intégrer les échanges gazeux durant une période beaucoup plus importante (période de formation de la feuille, ou des différents types de bois). Toutefois, tous ces composés (sucre, cellulose…) présentent des signaux isotopiques variés dus à des processus de fractionnements post-photosynthétiques (pour revues, Brugnoli & Farquhar, 2000; Badeck *et al.*, 2005; Bowling *et al.*, 2008). En effet, la signature des molécules peut être modifiée suite à un fractionnement pendant le transport ou à leur utilisation dans une voie métabolique… La cellulose, les sucres solubles et l'amidon sont toujours enrichis en ^{13}C par rapport à la matière organique totale (Figure 2). Selon la fraction métabolique utilisée, l'estimation de l'efficience d'utilisation de l'eau sera donc intégrée sur une période de temps variable. Sous l'hypothèse que W_i et TE sont liées, est-ce que l'utilisation de la cellulose du bois pourrait permettre une estimation plus fine de TE? *A contrario*, l'estimation de W_i est-elle meilleure avec l'analyse de la signature isotopique de fractions métaboliques à renouvellement rapide?

Malgré les processus conduisant à une modification du signal entre molécules ou organes, les différences entre individus sont conservées d'une fraction métabolique à l'autre (Lauteri *et al.*, 2004; Harlow *et al.*, 2006) ou d'un organe à l'autre (Guehl *et al.*, 1998). D'autre part, les différences entre individus d'une même espèce ou entre espèces sont conservées dans le temps, comme l'ont montré Ponton *et al.* (2001) entre chêne sessile et chêne pédonculé, ainsi que Damesin *et al*. (1998) entre

	Avantages	Inconvénients
Efficience d'utilisation de l'eau		
W_i : intrinsèque/instantanée en conditions standardisées (lumière saturante, température et humidité relative optimales)	représente une W_i "optimale" relativement rapide (40 mn environ par feuille) conditions similaires, quels que soient le plant et l'heure de la journée	non intégré dans le temps mesures d'échanges gazeux effectuées sur quelques feuilles de lumière → WUE représentative de l'ensemble du houppier?
W_i : intrinsèque/instantanée – cinétiques journalière (photopériode naturelle)	représente l'évolution de W_i au cours de la journée rapide (30 s par feuille)	conditions environnementales (lumière) varient très rapidement au cours de la journée → la variabilité entre individus peut être provoquée par une variabilité environnementale si les séries de mesure sont trop longues non intégré dans le temps mesures d'échanges gazeux effectuées sur quelques feuilles de lumière → WUE représentative de l'ensemble du houppier?
TE	représente une WUE plante entière intégré dans le temps	expérimentation lourde effectuée sur plusieurs semaines à plusieurs mois avec pesées de pots et arrosage manuel journaliers destructif à moins d'utiliser des relations allométriques pour estimer le gain de biomasse "facile" à mettre en œuvre pour des plants en pots, mais très peu usité en plein champ
Estimation de $W_{i\,(A)}$		
$\delta^{13}C$ sucres solubles/amidon	estime une $W_{i\,(A)}$ intégrée sur quelques jours → comparables avec W_i calculée à partir des mesures d'échanges gazeux molécules purifiées (dans le cadre de comparaison intra-spécifique, la variabilité observée ne peut pas être attribuée à une variabilité de la composition des échantillons en molécules autres – lignine,…-)	extractions effectuées sur quelques feuilles de lumière par plant → estimation de $W_{i\,(A)}$ représentative de la plante entière? extraction longue (2 semaines pour une 50^{aine} d'échantillons)
$\delta^{13}C$ matière organique foliaire	estime une $W_{i\,(A)}$ intégrée sur une période de temps plus longue que $\delta^{13}C$ sucres solubles/amidon préparation rapide des échantillons	composition isotopique en ^{13}C analysée sur quelques feuilles de lumière → estimation de $W_{i\,(A)}$ représentative de la plante entière? hétérogénéité de la composition biochimique des échantillons: la variabilité observée entre échantillons peut aussi être causée par une variabilité de composition biochimique (présence en quantité variable d'autres molécules présentant une signature variable , e.g. lignine, …)

$\delta^{13}C$ cellulose du bois	estime une $W_{i\,(A)}$ intégrée sur une période plus longue/ $W_{i\,(A)}$ intégrée pour le houppier molécules purifiées (dans le cadre de comparaison intra-spécifique, la variabilité observée ne peut pas être attribuée à une variabilité de la composition des échantillons en molécules autres – lignine,…-) peut être comparée à TE	destructrif extraction longue (1 semaine)
$\delta^{13}C$ matière organique totale du bois	estime une $W_{i\,(A)}$ intégrée sur une période plus longue/ $W_{i\,(A)}$ intégrée pour le houppier peut être comparée à TE préparation rapide des échantillons	destructrif hétérogénéité de la composition biochimique des échantillons: la variabilité observée entre échantillons peut aussi être causée par une variabilité de composition biochimique (présence en quantité variable d'autres molécules présentant une signature variable , e.g. lignine,…)

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différentes techniques permettant d'estimer l'efficience d'utilisation de l'eau.

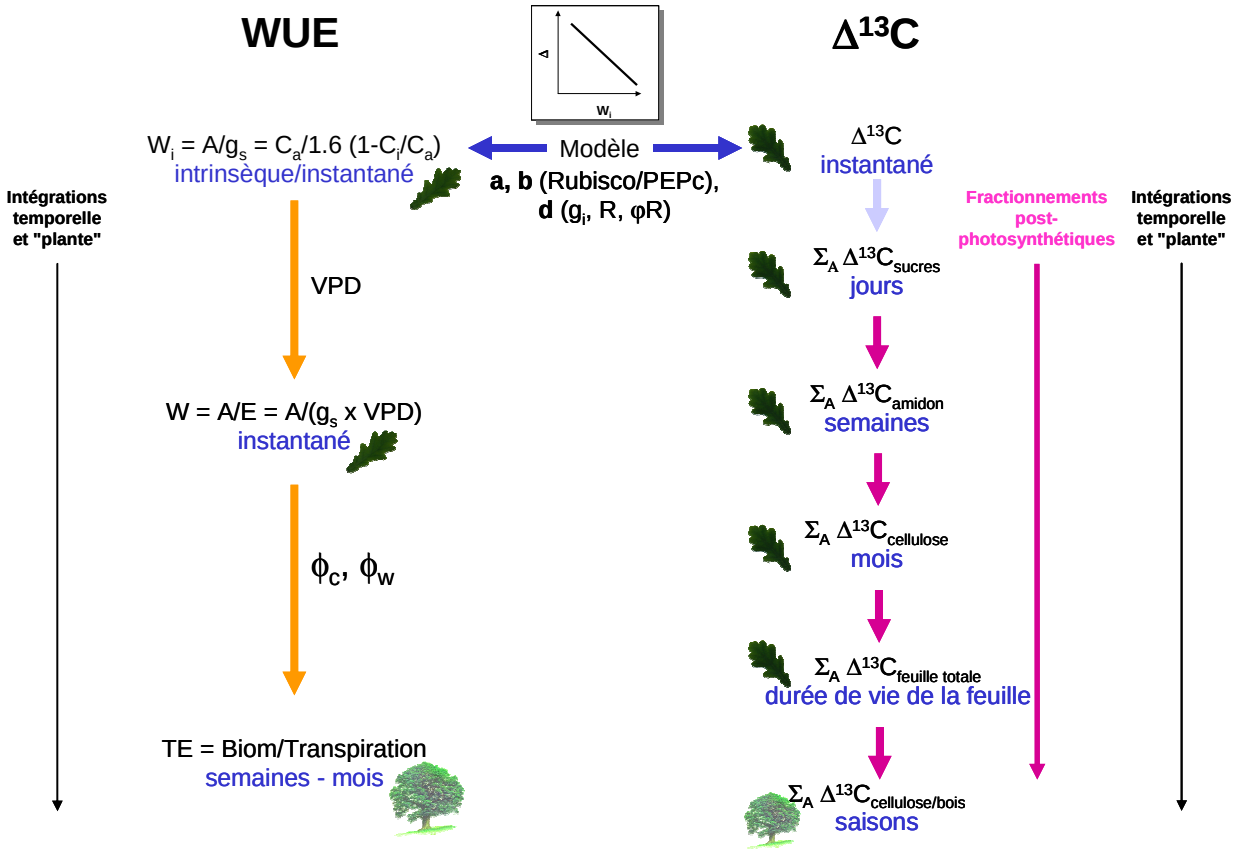


Figure 3 : Relations théoriques entre l'efficience d'utilisation de l'eau calculée à l'aide de mesures directes (W_i et W calculées à partir de mesures d'échanges gazeux, TE calculée à partir du gain de biomasse et des pertes en eau cumulées sur la période d'expérimentation) ou estimée *via* la discrimination isotopique du ^{13}C CO_2 de différentes fractions métaboliques. Pour les abréviations, cf Encadrés 1, 2 et 3.

chênes vert et pubescent ou encore Johnsen *et al.* (1999) dans une famille de *Picea mariana*. De même, le rang des génotypes est conservé pour des environnements contrastés (Ehleringer, 1993; Lauteri *et al.*, 1997; Guehl *et al.*, 2004). Ainsi, dans la mesure où $\delta^{13}C$ et W_i ou TE sont corrélées, cette stabilité génotypique de la signature isotopique en ^{13}C est donc censée refléter une stabilité génotypique de l'efficience d'utilisation de l'eau.

L'efficience d'utilisation de l'eau peut donc être soit calculée à partir de mesures directes (échanges gazeux, accumulation de biomasse/pertes en eau) ou être estimée *via* les analyses isotopiques en ^{13}C de différentes fractions organiques. Cependant, chacune de ces techniques présente ses avantages et ses inconvénients (récapitulés dans le tableau 2). Généralement, les analyses isotopiques du ^{13}C dans la matière organique sont privilégiées dans le cadre de l'étude de la variabilité intraspécifique d'une espèce (Tableau 1). Mais, extrapoler les conclusions obtenues à partir de ces analyses à des conclusions sur la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau peut être délicate, puisque, comme le résume la figure 3, d'autres facteurs peuvent varier entre individus. La variabilité intra-spécifique en $\Delta^{13}C$ observée alors, ne correspondrait pas à une variabilité intra-spécifique d'efficience d'utilisation de l'eau.

2 Décomposition de l'efficience d'utilisation de l'eau à l'échelle plante entière et foliaire, et apport des isotopes de l'oxygène comme estimateur de la conductance stomatique

2.1 A l'échelle "plante entière"

A l'échelle "plante entière" et de façon intégrée dans le temps, l'efficience d'utilisation de l'eau dépend du gain de biomasse et du cumul d'eau transpirée. Une forte efficience de transpiration est donc dépendante soit d'une forte accumulation de biomasse, soit de faibles pertes en eau, soit des deux. L'accumulation de biomasse est un trait capital, associé, depuis très longtemps, à des programmes de sélection d'arbres forestiers. Aux vues des changements climatiques, la sélection se fait non seulement au niveau de la biomasse, mais aussi au niveau de la capacité de ces arbres a augmenter leur biomasse en consommant un minimum d'eau (on parle alors d'arbres plus efficients pour la transpiration, TE). La mise en évidence d'un lien génétique potentiel existant entre efficience d'utilisation de l'eau et productivité devient donc une question cruciale. En effet, si la sélection des arbres pour une forte productivité se traduit par une sélection en faveur d'une faible efficience d'utilisation de l'eau (i.e., si l'efficience d'utilisation de l'eau est principalement influencée par les pertes en eau), alors ce schéma (association forte productivité/faible efficience d'utilisation de l'eau) pourrait être préjudiciable en cas de sécheresse. D'autre part, l'allocation du carbone dans la plante est un élément important à prendre

en compte. En effet, si la sélection pour une forte croissance de la partie aérienne se fait au détriment de la partie racinaire, alors ce schéma d'allocation peut être un facteur limitant au développement des plantes sous certaines contraintes environnementales (sécheresse).

Selon les espèces et les études, les variabilités intra-spécifiques de la croissance (biomasse, accroissement en hauteur, diamètre ou surface foliaire) et de l'efficience d'utilisation de l'eau sont corrélées. Certains travaux, en conditions naturelles (plantation) ou contrôlées et non-limitantes, mettent en évidence des corrélations positives entre ces deux traits (ou négatives lorsque la discrimination isotopique du carbone est utilisée comme estimateur de l'efficience d'utilisation de l'eau) (Johnsen *et al.*, 1999; Cregg *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Matzner *et al.*, 2001; Silim *et al.*, 2001; Prasolova *et al.*, 2003; Casasoli *et al.*, 2004). Des corrélations négatives entre croissance et efficience d'utilisation de l'eau ont aussi été observées, par exemple, chez trois populations de *Populus davidiana* (Zhang *et al.*, 2004) ou pour plusieurs populations d'*Eucalyptus microtheca* (Li, 2000). D'autres études, enfin, ne constatent pas de corrélation (Brendel *et al.*, 2002; Monclus *et al.*, 2005). Contrairement aux traits liés à la croissance, peu d'études sur des espèces ligneuses ont analysé l'effet de la transpiration totale sur l'efficience de transpiration, excepté quelques travaux dont ceux de Olbrich *et al.* (1993) et de Cernusak *et al.* (2007b).

Les corrélations entre efficience d'utilisation de l'eau et productivité sont aussi tributaires des conditions de l'étude (Flanagan & Johnsen, 1995; Zhang *et al.*, 1996; Brendel *et al.*, 2002): l'absence ou la présence de corrélations en conditions non-limitantes n'étant pas forcément le reflet de ce qui se passe en conditions limitantes. Enfin, ces corrélations découlent des relations entre gain de carbone et pertes en eau qui se passent plus en amont au niveau foliaire, et dépendent donc en partie de l'influence de chacune des composantes (assimilation nette de CO_2, A, et conductance stomatique pour la vapeur d'eau, g_s) sur W_i (Farquhar *et al.*, 1989). Cependant, le lien entre assimilation nette de CO_2 et productivité n'est pas si évident, puisque A découle d'une mesure instantanée, alors que la productivité est une mesure intégrée. De plus, A ne se mesure que sur quelques feuilles (qui ne sont pas toujours représentatives de l'arbre entier), et tout le carbone assimilé n'est pas uniquement alloué à la production de biomasse: il peut être exporté, mis en réserve ou métabolisé. De la même façon, la conductance stomatique ne conditionne que partiellement la transpiration totale (surface foliaire et déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère; Cernusak *et al.*, 2007b).

Pour les arbres forestiers, la relation génétique entre productivité et efficience d'utilisation de l'eau est donc importante à analyser, de même que les changements d'échelle: l'observation à l'échelle foliaire reflète-t-elle un comportement plus global, à l'échelle plante entière et intégré dans le temps?

cas	CV A	CV g_s	W_i *vs* A	W_i *vs* g_s
i		<	↘	↘
ii		=	→	→
iii		>	↗	↗

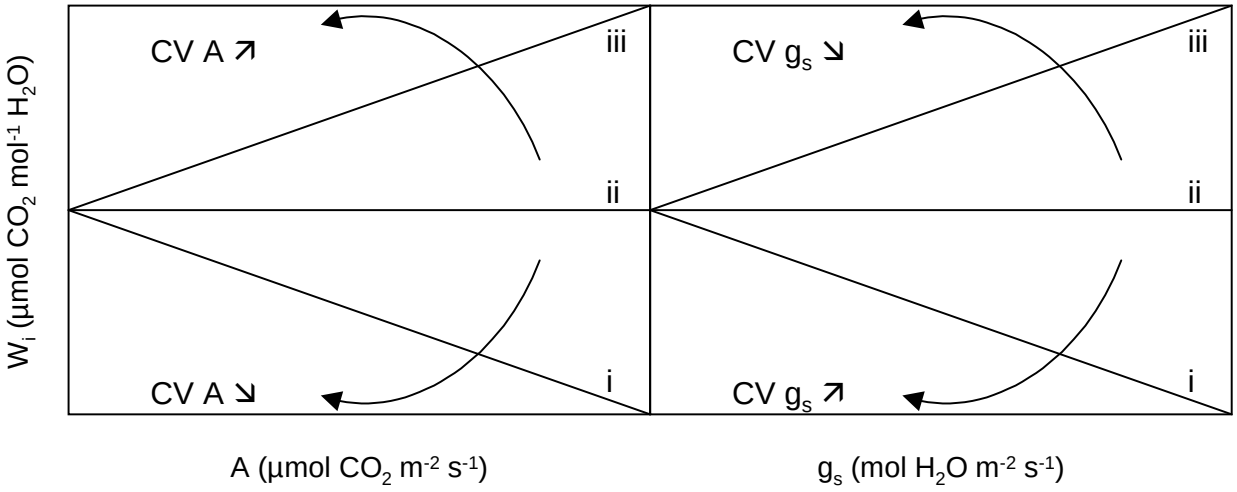


Figure 4: Relations théoriques entre l'assimilation nette de CO_2 (A), la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) et l'efficience d'utilisation de l'eau (W_i=A/g_s) selon 3 cas définis dans le tableau accompagnant cette figure, où CV correspond au coefficient de variation déterminé pour A (CV A) et g_s (CV g_s).

2.2 A l'échelle foliaire

L'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) se dissocie en deux composantes: l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). De ce fait, à l'échelle foliaire, la variabilité entre génotypes de W_i peut être liée soit à l'assimilation, soit à la conductance stomatique, soit aux deux. Pour déterminer lequel de ces deux traits a la plus grande influence sur la variabilité de W_i, des corrélations sont utilisées entre W_i (ou la discrimination isotopique du carbone) et ces deux traits. Plusieurs cas peuvent alors être envisagés:

(i) une relation négative entre W_i et ses deux composantes (cas i, Figure 4) est observée lorsque la variabilité de g_s est supérieure à celle de A, i.e., le coefficient de variation de g_s est supérieur à celui de A (e.g., études de Roupsard *et al.* (1998) pour des provenances d'acacia en conditions non-limitantes et de Grossnickle & Fan (1998) pour des hybrides d'épicéa; cf Tableau 1). Plus la variabilité entre individus de A sera faible devant celle de g_s, plus la pente de la relation entre A et W_i tendra vers $-\infty$.

(ii) une absence de relation entre W_i et ses deux composantes (cas ii, Figure 4) signifie que les variations de A et de g_s se compensent, i.e., les individus ont un W_i identique (e.g., étude de Rowland (2001) pour des provenances de peuplier; cf Tableau 1).

(iii) une relation positive entre W_i et ses deux composantes (cas iii, Figure 4) est attendue lorsque la variabilité de A est supérieure à celle de g_s, i.e., le coefficient de variation de A est supérieur à celui de g_s (e.g., étude de Monclus *et al.* (2006) pour des clones de peuplier). Plus la variabilité entre individus de g_s sera faible devant celle de A, plus la pente de la relation entre g_s et W_i tendra vers $+\infty$.

Cependant, il est souvent difficile de dissocier les effets de l'une ou l'autre de ses composantes sur W_i. En effet, une forte corrélation positive est généralement observée entre A et g_s (Lauteri *et al.*, 1997; Roupsard *et al.*, 1998; Monclus *et al.*, 2006). Cependant, la variabilité intra-spécifique de A et de g_s, différant selon les espèces d'arbres étudiées (Tableau 1) est, elle-même, contrôlée par des facteurs physiologiques et structuraux dont la variabilité intra-spécifique a aussi été démontrée (Lauteri *et al.*, 1997; Kundu & Tigerstedt, 1999; Cregg *et al.*, 2000; Monclus *et al.*, 2006). L'analyse de ces traits permet donc d'appuyer l'hypothèse du contrôle de W_i par l'une ou l'autre de ces deux fonctions.

L'assimilation nette de CO_2 se décompose en quatre processus: l'absorption de la lumière, la diffusion de CO_2 vers les cellules assimilatrices, le flux d'électrons, et les réactions biochimiques dans les

cellules du mésophylle. Différents traits peuvent être assignés à chacun d'entre eux. L'absorption de la lumière, au niveau des antennes collectrices situées sur la membrane des thylacoïdes, est un phénomène complexe qui est affecté par la quantité de pigments, mais aussi par la structure des feuilles (Niinemets & Tenhunen, 1997; Evans, 1999). Par exemple, Lauteri *et al.* (1997) ont montré des variations intra-spécifiques chez *Castanea sativa* du contenu en chlorophylle foliaire qui étaient positivement corrélées aux variations d'assimilation de CO_2. L'épaisseur des feuilles est, quant à elle, souvent associée à une photosynthèse plus importante, comme c'est le cas entre feuilles de lumière et feuilles d'ombre (Terashima *et al.*, 2001). D'autres traits, tels que la densité foliaire ou la masse surfacique (LMA, ou Leaf Mass-to-Area Ratio) sont fréquemment utilisés et présentent une variabilité intra-spécifique importante, notamment chez le chêne sessile (Bruschi *et al.*, 2003a, 2003b). Des profils de corrélations consensuels en inter-spécifique ont pu être établis entre ces différents traits et l'assimilation nette de CO_2 (Reich *et al.*, 1998; Niinemets, 1999; Reich *et al.*, 1999). La diffusion du CO_2 de l'atmosphère au site actif de la Rubisco suit une voie complexe. Cette voie est généralement simplifiée pour ne comporter que trois composantes principales, chacune affectée d'une conductance pour le CO_2: couche limite, stomate (développé dans le paragraphe suivant) et mésophylle (Farquhar & Sharkey, 1982). La conductance de la couche limite dépend de différents facteurs: la taille de la feuille, la structure des surfaces foliaires, l'emplacement des stomates et le mouvement d'air autour de la feuille. Les conductances mésophylliennes (ou conductance interne au CO_2, g_i) conditionnent le gradient de CO_2 des cavités sous stomatiques aux espaces intercellulaires et à travers le plasmalemme et les membranes chloroplastiques. Les conductances mésophylliennes ont d'abord été considérées comme négligeables (Farquhar, 1980). Cependant, des recherches plus récentes suggèrent que g_i est suffisamment faible pour diminuer de façon significative la concentration en CO_2 au niveau des sites de carboxylation (C_c) relativement à la concentration en CO_2 dans les cavités sous-stomatiques (C_i). Les conductances internes sont du même ordre de grandeur que g_s (Lauteri *et al.*, 1997), la différence C_i-C_c est donc similaire à la différence C_a-C_i conditionnée par g_s (avec C_a la concentration en CO_2 atmosphérique). Les conductances internes à la diffusion du CO_2 limitent donc la photosynthèse (von Caemmerer, 2000; Warren & Adams, 2006). Il est généralement admis que de fortes capacités photosynthétiques sont accompagnées par de fortes conductances internes comme l'ont observé Lauteri *et al.* (1997) et DeLucia *et al.* (2003), en intra- et en inter-spécifique. Toutefois, Warren & Adams (2006) ont démontré que cette assertion était incorrecte: les capacités photosynthétiques ne sont pas parfaitement corrélées à g_i. La comparaison des performances photosynthétiques entre individus s'appuie sur l'utilisation du modèle biochimique de la photosynthèse défini à l'échelle foliaire et développé par Farquhar *et al.* (1980). En effet, outre les limitations stomatiques de la photosynthèse, il existe des limitations biochimiques imposées par deux processus majeurs: (i) l'activité de la Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase Oxygenase (Rubisco), (ii) la régénération du Ribulose 1,5 bisphosphate dépendante du transport d'électrons. A partir de ces deux limitations, deux paramètres clefs sont respectivement définis: la vitesse maximale de carboxylation de la Rubisco (V_{cmax}) qui dépend en

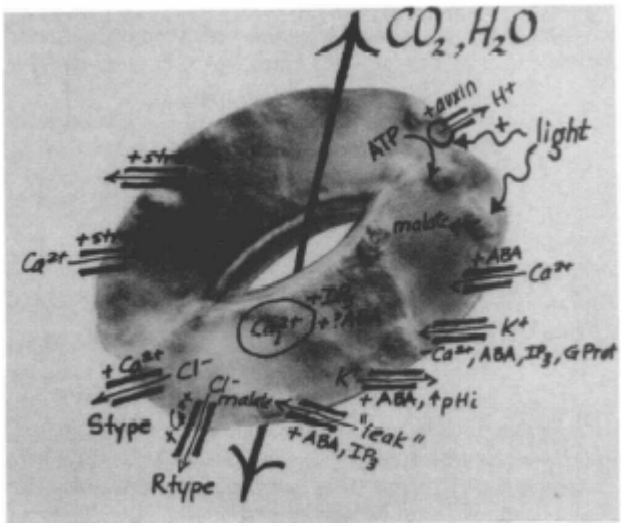


Figure 5: Facteurs impliqués dans la régulation de la turgescence des cellules de garde, d'après Kearns & Assmann (1993).

partie de la quantité de Rubisco active, et le flux maximal d'électrons à lumière saturante (J_{max}) qui est lié à l'absorption de lumière. La variabilité intra-spécifique de ces paramètres a été démontrée pour plusieurs espèces ligneuses (Lauteri *et al.*, 1997; Monclus *et al.*, 2006) et des corrélations positives entre les variabilités intra-spécifiques de ces traits et de l'assimilation nette de CO_2 sont couramment observées (Monclus *et al.*, 2006). Les capacités photosynthétiques des feuilles sont fortement influencées par la quantité d'azote. En effet, 75% de l'azote organique foliaire est investi dans la machinerie photosynthétique (chlorophylle, protéines des thylacoïdes et cofacteurs associés, enzymes cycle de Calvin (surtout la Rubisco qui représente à elle seule entre 20 et 40% de l'azote organique)) (Evans, 1989; Loomis, 1997). De ce fait, les capacités photosynthétiques sont souvent estimées par le contenu en azote foliaire, une quantité d'azote plus importante étant liée à des capacités photosynthétiques plus fortes (Field & Mooney, 1986).

Le rôle des stomates est d'optimiser les échanges gazeux (assimilation de CO_2 et transpiration) sous des conditions environnementales changeantes (Cowan, 1977). Pour ce faire, les stomates s'ouvrent ou se ferment en réponse à des stimuli environnementaux variés : les lumières bleue et rouge (Sharkey & Raschke, 1981), l'ultra-violet (Eisinger *et al*., 2000), le déficit de saturation de l'air en vapeur d'eau (Grieu *et al*., 1988), la température, le rayonnement. Ils répondent aussi à la concentration interne de CO_2 (Mott, 1988) ou encore aux phytohormones et notamment l'acide abscissique (ABA) (Rajasakeran & Blake, 1999). D'après Lu *et al*. (1997), les stomates pourraient aussi répondre à l'accumulation de saccharose au niveau de la paroi des cellules de garde. Cette accumulation serait fonction du taux de transpiration et permettrait la fermeture stomatique.
La régulation de la turgescence des cellules de garde est l'élément principal de l'ouverture ou de la fermeture stomatique. Les cellules épidermiques adjacentes interviennent aussi en exerçant une pression mécanique sur les cellules de garde. Les influx et efflux de potassium, chlore et malate à travers la membrane plasmique et le tonoplaste modifient la turgescence, mais pas exclusivement (Figure 5). D'autres évènements sont aussi impliqués dans la régulation de l'ouverture stomatique :

- l'évolution de l'organisation du cytosquelette et plus précisément une dépolymérisation des filaments d'actine. Ce phénomène a été observé par application d'ABA (qui provoque une fermeture stomatique) chez *Commelina communis* L. (Eun & Lee, 1997) et *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. (Eun *et al*., 2001). La désorganisation du réseau d'actine apparaît suite à l'inactivation d'une Rho GTP-ase (At Rac1) essentiellement retrouvée dans les cellules de garde chez *A. thaliana* (Lemichez *et al*., 2001).
- des modifications de l'expression de certains gènes (Hetherington, 2001)
- ou encore des modifications du trafic membranaire (Hetherington, 2001; Blatt, 2000; Homann & Thiel, 1999). En effet, les changements de volume lors de l'ouverture ou de fermeture des stomates sont assez conséquents, puisque le volume des cellules de garde peut varier d'un facteur 2 voire plus (*in* Blatt, 2000). Ces variations de volume se font par ajout ou suppression

d'une partie de matière membranaire. Ce processus nécessite une régulation du trafic vésiculaire vers et à partir du plasmalemme et du tonoplaste (Blatt, 2000).

Les voies de signalisation de l'ouverture stomatique sont multiples et impliquent entre autres le Ca^{2+} intracellulaire (pour revue, Blatt, 2000). L'existence de voies multiples permet de protéger les fonctions vitales que sont l'assimilation de carbone et la régulation des pertes en eau contre les effets délétères de certaines mutations de gènes impliqués dans la synthèse ou l'impact des intermédiaires des voies de signalisation.

La morphologie des stomates est un élément qui influence les mécanismes d'ouverture/fermeture des stomates, et donc la conductance stomatique (Franks & Farquhar, 2007). Aasamaa *et al.* (2001) ont ainsi mis en évidence, chez des arbres décidus de forêt tempérée, une relation positive entre la longueur des stomates et la conductance stomatique.

Outre la forme des stomates, la densité stomatique influence la conductance stomatique maximale selon le modèle de Nobel (1999). La relation positive décrite par ce modèle a été obsevée pour plusieurs espèces de peuplier (Pearce *et al.*, 2006) ainsi que pour des provenances d'*Azadirachta indica* (Kundu & Tigerstedt, 1999).

Quoi qu'il en soit, contrairement à A, peu de traits foliaires sont liés à la conductance stomatique, en dehors de quelques traits relatifs à l'anatomie des stomates. De même, peu d'études relatent la variabilité génétique de réponse des stomates aux fluctuations environnementales. Toutefois, quelques études ont montré l'existence d'une variabilité intra-spécifique de réponse des stomates au déficit de saturation de l'air en vapeur d'eau (Grossnickle & Fan, 1998; Grossnickle *et al.*, 2005), à la lumière (Grossnickle & Fan, 1998), à la sécheresse édaphique (Fan *et al.*, 1997)…

Il est important de noter que lors de la mesure de la conductance stomatique, la conductance cuticulaire est, elle aussi, prise en compte. En effet, l'eau passe directement à travers cette barrière lipophylique, et une faible proportion transite par des pores (Riederer & Schreiber, 2001). Ainsi, les propriétés de la cuticule affectent les échanges gazeux foliaires, mais il semblerait qu'elles ne soient pas corrélées à l'épaisseur de la couche de cire ou à la composition chimique de ces cires (Riederer & Schreiber, 2001). La conductance cuticulaire pour la vapeur d'eau peut atteindre jusqu'à 30 % de la conductance totale d'une feuille pour la vapeur d'eau (Boyer *et al*., 1997) et peut présenter des variations interspécifiques (Riederer & Schreiber, 2001).

L'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque est donc un caractère complexe dont la variabilité entre individus est la conséquence de la variabilité d'un ou plusieurs traits liés soit à l'assimilation nette de CO_2, soit à la conductance stomatique, soit aux deux. La décomposition de l'efficience d'utilisation de l'eau requiert donc de travailler sur un grand nombre de traits. Cependant, peu de traits sont liés à la conductance stomatique et permettent d'avoir des valeurs intégrées de ce trait fortement dépendant des variations environnementales. La signature isotopique en ^{18}O de la matière organique foliaire ou de

Encadré 4 : Théorie de l'enrichissement en ^{18}O de l'eau et de la matière organique foliaires

Il existe trois isotopes stables pour l'oxygène : ^{16}O, ^{17}O et ^{18}O. L'isotope ^{16}O est le plus abondant (99.76%), suivi de l'isotope ^{18}O représentant 0.20%. La composition isotopique en ^{18}O (δ, ‰) d'un échantillon compare le rapport $^{18}O/^{16}O$ de l'échantillon (R_{ech}) à celui du standard international (R_{std}) VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water).

$\delta_{éch}$ (‰) = 1000 ($R_{ech} - R_{std}$)/R_{std}

Le symbole δ représente la composition isotopique en ^{18}O, alors que le symbole $\Delta^{18}O$ représente l'enrichissement de l'échantillon par rapport à la source d'eau (δ_s). Ainsi :

$\Delta^{18}O_{éch} = \delta_{éch} - \delta_s$

1. Enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire au niveau des sites d'évaporation

L'enrichissement de l'eau au niveau des sites d'évaporation ($\Delta^{18}O_e$) par rapport à l'eau source est décrit par le modèle suivant (Craig & Gordon, 1965; Dongmann *et al.*, 1974):

$$\mathbf{\Delta^{18}O_e = \varepsilon_k + \varepsilon^* + (\Delta^{18}O_v - \varepsilon_k)\, w_a/w_i} \qquad \textbf{(Eqn 8)}$$

où: $\Delta^{18}O_e = \delta^{18}O_e - \delta_S$, avec $\delta^{18}O_e$ la composition isotopique en ^{18}O de l'eau au niveau des sites d'évaporation (‰) et δ_s la composition isotopique en ^{18}O de la source d'eau prélevée par les racines (‰)

$\Delta^{18}O_v = \delta_v - \delta_S$: enrichissement de la vapeur d'eau atmosphérique par rapport à la source d'eau, avec δ_v la composition isotopique en ^{18}O de la vapeur d'eau dans l'air (‰)

ε_k : fractionnement pour la diffusion de la vapeur d'eau à travers les stomates et la couche limite (‰);

$\varepsilon_k = (32g_s^{-1}+21g_b^{-1})/(g_s^{-1}+g_b^{-1})$ (Farquhar *et al.*, 1989) avec g_s et g_b les conductances (en mol H_2O m^{-2} s^{-1}) à la diffusion de la vapeur d'eau au niveau, respectivement, des stomates et de la couche limite. 32 et 21 sont les facteurs de fractionnement associés (Cappa *et al.*, 2003)

ε^* : fractionnement à l'équilibre causé par le changement de phase de l'eau liquide à l'eau vapeur (‰);

$\varepsilon^*=[2.644 - 3.206\,(10^3/T) + 1{,}534\,(10^6/T^2)]\,10^{-3}$ où T est la température (°K) (Bottinga & Craig, 1969)

w_i : fraction molaire de vapeur d'eau dans les espaces intercellulaires (mmol H_2O mol^{-1} d'air); $w_i=10^3*(6.1078*\exp^{(17.2694*\theta)/(237.2+\theta)})/p$, où θ est la température en °C et p, la pression atmosphérique (mbar)

w_a : fraction molaire de vapeur d'eau dans l'atmosphère (mmol H_2O mol^{-1} d'air); $w_a=w_i*100/HR$, avec HR, l'humidité relative (%)

Etant donné que ν représente la différence entre w_i et w_a, le rapport w_a/w_i de l'équation 8 peut être remplacé par ($1-\nu/w_i$), ainsi:

$\Delta^{18}O_e = \varepsilon_k + \varepsilon^* + (\Delta^{18}O_v - \varepsilon_k)\,(1-\nu/w_i)$

$$\Rightarrow \mathbf{\Delta^{18}O_e = \varepsilon^* + \Delta^{18}O_v - (\Delta^{18}O_v - \varepsilon_k)*\nu/w_i} \qquad \textbf{(Eqn 9)}$$

Comme le terme ($\Delta^{18}O_v - \varepsilon_k$) est négatif, alors $\Delta^{18}O_e$ sera d'autant plus élevé que ν est grand.

l'eau foliaire peut toutefois être utilisée comme un estimateur de la conductance stomatique et permettre des comparaisons entre génotypes.

2.3 Utilisation des isotopes de l'oxygène comme estimateur de la conductance stomatique

Compte tenu de l'interaction forte existant entre A et g_s, il est difficile de dissocier les effets de ces deux fonctions sur l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque. De même, la discrimination isotopique du ^{13}C est une estimation de W_i pondérée par l'assimilation nette de CO_2, limitant ainsi son utilisation pour des études dont l'objectif est d'analyser séparément A et g_s. L'analyse de la composition isotopique en ^{18}O ($\delta^{18}O$) de l'eau foliaire et de la matière organique foliaire est un outil permettant de contourner cette limitation. En effet, sous certaines conditions, elle permet d'estimer g_s et ceci, indépendamment de A, différenciant ainsi les variations de $\Delta^{13}C$ dues à A ou à g_s. Pour l'ensemble de ce chapitre, l'enrichissement en ^{18}O ($\Delta^{18}O$) est défini comme la différence entre la composition isotopique de l'échantillon ($\delta^{18}O$) et la composition isotopique de la source d'eau (δ_s).

2.3.1 Théorie de l'enrichissement de l'eau foliaire

L'enrichissement de l'eau foliaire totale ($\Delta^{18}O_L$) dépend de différents facteurs. Tout d'abord, la composition isotopique en ^{18}O de l'eau du sol (ou source) reflète une moyenne pondérée de $\delta^{18}O$ des précipitations et de l'évaporation à la surface du sol. L'eau du sol a une composition isotopique en ^{18}O comprise entre -10 et 2‰ (Schmidt *et al.*, 2001). Il n'existe pas, théoriquement, de fractionnement isotopique pendant le prélèvement et le transfert d'eau dans la plante. De ce fait, la composition isotopique de l'eau xylémique est supposée être la même que celle de l'eau dans le sol (Sternberg *et al.*, 2003), de même que la composition isotopique de l'eau circulant dans le pétiole (Gan *et al.*, 2002).
L'eau foliaire s'enrichit par rapport à l'eau xylémique. Cet enrichissement se produit au niveau des sites d'évaporation où $H_2{}^{16}O$ s'évapore plus vite, puisque $H_2{}^{18}O$ présente une diffusion plus lente et une pression de vapeur plus faible que $H_2{}^{16}O$. Cette eau enrichie est ensuite susceptible de refluer vers l'intérieur de la feuille. Ce reflux s'oppose au flux d'eau transpirée non enrichie: plus la transpiration est importante, plus le reflux d'eau est limité. Ce phénomène, ou "effet Péclet" (noté $\wp$, équation 10 de l'encadré 4; Farquhar & Lloyd, 1993) est à l'origine d'un gradient isotopique continu dans la feuille, avec un enrichissement maximal au niveau des sites d'évaporation puis une diminution exponentielle jusqu'à atteindre la signature isotopique de la source (δ_S) à proximité des veines. Puisque de l'eau enrichie se mélange en proportion variable avec de l'eau appauvrie, l'enrichissement de l'eau du mésophylle (ou eau foliaire totale, $\Delta^{18}O_L$) est donc plus faible que l'enrichissement observé au niveau des sites d'évaporation ($\Delta^{18}O_e$) (Farquhar & Lloyd, 1993). Le facteur $\wp$ est dépendant de la distance

2. Enrichissement en ^{18}O de l'eau du mésophylle foliaire

L'enrichissement en ^{18}O de l'eau du mésophylle ($\Delta^{18}O_L$) est reliée à $\Delta^{18}O_e$ (Farquhar & Lloyd, 1993) par l'équation suivante définie à l'équilibre isotopique:

$$\Delta^{18}O_L = \Delta^{18}O_e\,(1-e^{-\wp})/\wp \qquad \textbf{(Eqn 10)}$$

où $\Delta^{18}O_L = \delta_L - \delta_S$, où δ_L est la composition isotopique de l'eau du mésophylle (‰) et $\wp$ le nombre de Péclet, défini comme le rapport EL/CD avec E, la transpiration (mol H_2O $m^{-2}s^{-1}$; $E=g_s*\nu$, avec ν la différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère ($=w_i-w_a$, en mmol H_2O mol^{-1} d'air)); L, la distance effective entre les sites d'évaporation et les veines (L est compris entre 4 10^{-3} et 166 10^{-3} m, d'après Wang *et al.* (1998b)); C, la concentration molaire de l'eau (=55.5 mol m^{-3}); D, la diffusivité de H_2O^{18} dans l'eau (m^2 s^{-1}; D = 119 10^{-9} $e^{(637/(T-137))}$ où T est la température en °K (Cuntz *et al.*, 2007)).

Selon que les variations de E sont causées par des variations de ν ou de g_s, la relation entre $\Delta^{18}O_L$ et E sera positive ou négative, respectivement:

g_s	↗	=
ν	=	↗
$E=g_s\,\nu$	↗	↗
$\Delta^{18}O_e$	↘	↗
$\wp$= EL/CD	↗	↗
$\Delta^{18}O_L$	↘	↗

Tableau 3: Relations théoriques entre la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s), la différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν), la transpiration (E) et l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire par rapport à la source ($\Delta^{18}O_L$).

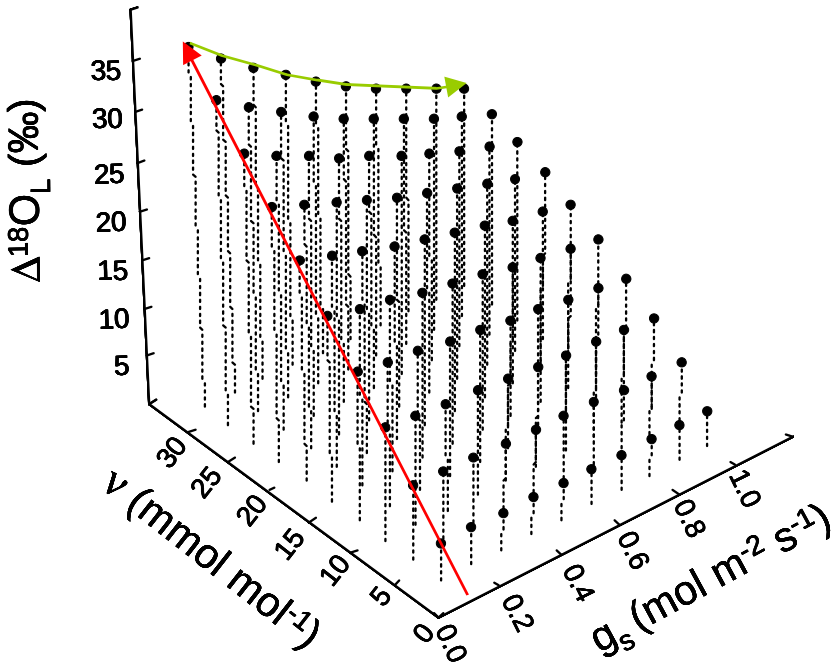


Figure 6: Relations entre l'enrichissement de l'eau foliaire par rapport à la source ($\Delta^{18}O_L$, ‰), la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) et la différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν, mmol H_2O mol^{-1} d'air) pour des gammes de valeurs de g_s de 0 à 1 mol $m^{-2}s^{-1}$, et de ν de 0 à 32 mmol mol^{-1} (calculée pour une température de feuille de 25°C et une variation d'humidité relative de 0 à 100%). Les résistances à la diffusion de la vapeur d'eau au niveau des stomates (g_s^{-1}) et de la couche limite (g_b^{-1}) ont été considérées proportionnelles ($g_s=5*g_b$).
Pour une conductance stomatique donnée, la relation entre $\Delta^{18}O_L$ et ν est positive (flèche rouge). Pour ν fixé, la relation entre $\Delta^{18}O_L$ et g_s est négative (flèche verte).

effective entre les sites d'évaporation et les veines (L). La distance réelle entre les veines et les stomates est d'environ 100µm pour la plupart des feuilles. Or il faut une distance effective bien supérieure (de l'ordre du mm, voire du cm, due à la tortuosité du chemin à parcourir) pour pouvoir observer des gradients significatifs d'enrichissement en ^{18}O. L dépend de la voie par laquelle l'eau transite (symplasmique à travers les plasmodesmes, transcellulaire à travers les aquaporines ou apoplasmique), mais aussi du site où l'eau est évaporée (espaces intercellulaires, cavités sous-stomatiques ou cellules avoisinant les cavités sous-stomatiques et les stomates) (Barbour & Farquhar, 2003). Le facteur $\wp$ est aussi déterminé par la transpiration (E) (encadré 4). Or, E est définie comme le produit de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) et le déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν). Lorsque les variations de E sont provoquées par des modifications de ν alors que g_s est constante, la relation entre $\Delta^{18}O_L$ et E (et donc ν) est positive (cf encadré 4: Tableau 3 & Figure 6). Par contre, lorsque ν est constante et que les variations de g_s sont à l'origine des variations de E, alors la relation entre $\Delta^{18}O_L$ et E (et donc g_s) est négative (cf encadré 4: Tableau 3 & Figure 6). Cette relation négative est causée par différents processus. Une augmentation de g_s a pour effet de diminuer le fractionnement cinétique au cours de la diffusion de la vapeur d'eau à travers les stomates et la couche limite (ε_k), ce qui conduit à une diminution de $\Delta^{18}O_e$ (équation 8 de l'encadré 4). De plus, lorsque les stomates se ferment et que la transpiration diminue, la température foliaire et donc w_i augmentent, ce qui se traduit aussi par une diminution de $\Delta^{18}O_e$ (équation 8 de l'encadré 4). Le changement de température peut aussi influencer le facteur de fractionnement à l'équilibre lié aux changements de phase de l'eau liquide à l'eau vapeur (ε^+, encadré 4), mais l'incidence sur $\Delta^{18}O_e$ est faible. Enfin, plus g_s est élevée, plus le reflux d'eau enrichie à partir des sites d'évaporation est limité par le flux transpiratoire ($\wp$ est élevé). Le mélange d'eaux enrichie et non enrichie est ainsi limité ce qui a pour effet de creuser l'écart entre $\Delta^{18}O_e$ et $\Delta^{18}O_L$.

Le modèle d'enrichissement de l'eau foliaire faisant intervenir l'effet Péclet ne tient compte que d'un enrichissement au niveau du trajet radial de l'eau (en-dehors des veines). Il existe d'autres modèles décrivant l'enrichissement isotopique de l'eau foliaire. Ces modèles prennent en considération d'autres gradients d'enrichissement (pour revue: Gan *et al.*, 2002; Ogée *et al.*, 2007), comme par exemple de la base de la feuille vers l'apex (Farquhar & Gan, 2003).

Outre cette hétérogénéité spatiale, des cycles diurnes d'enrichissement isotopique en ^{18}O de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$) ont été mis en évidence chez le lupin ($\Delta^{18}O_L$ variant de 0 à 25‰; Cernusak *et al.*, 2002), l'eucalyptus ($\Delta^{18}O_L$ compris entre 6 et 20‰; Cernusak *et al.*, 2005) ou le pin sylvestre ($\Delta^{18}O_L$ variant de 4 à 25‰; Barnard *et al.*, 2007). Il existe un modèle d'enrichissement de l'eau foliaire développé par Cernusak *et al.* (2002) et Farquhar & Cernusak (2005) prenant en compte cette hétérogénéité temporelle.

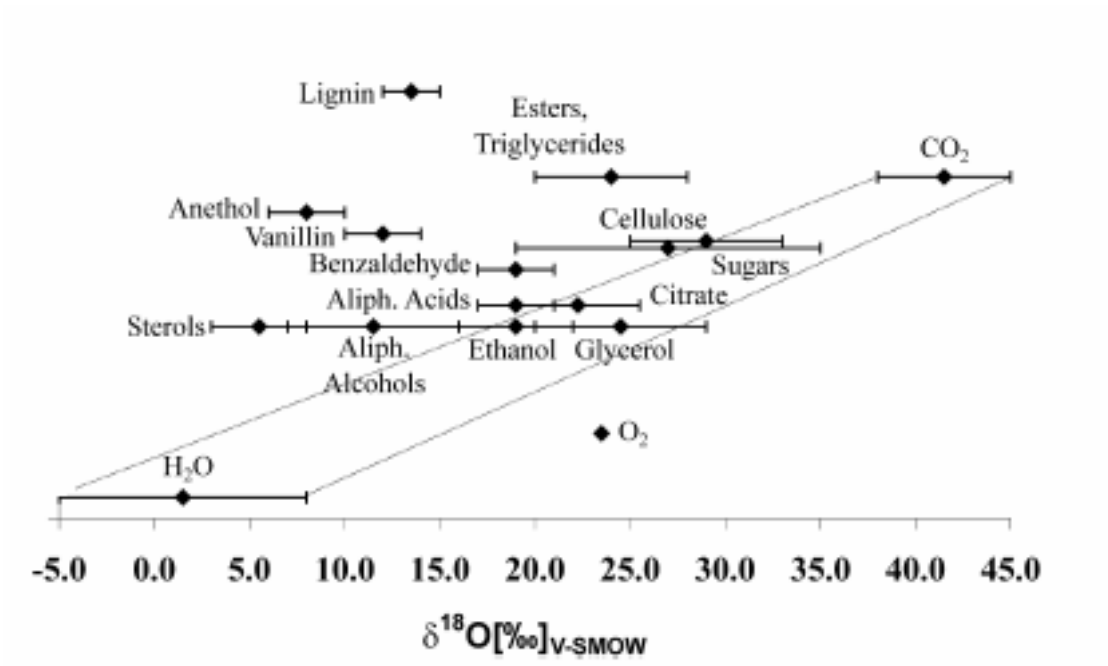


Figure 7: Composition isotopique en ^{18}O ($\delta^{18}O$) de molécules organiques, de l'eau, du CO_2 et de l'O_2, d'après la figure 9 de Schmidt *et al.* (2001).

Les études qui comparent les valeurs de $\Delta^{18}O_L$ observées et les valeurs théoriques trouvent généralement une bonne correspondance entre les deux (Cernusak *et al.*, 2002; Cernusak *et al.*, 2005; Barnard *et al.*, 2007; Gessler *et al.*, 2007). Donc, malgré ces variations à la fois temporelle et spatiale, la signature isotopique en ^{18}O de l'eau foliaire peut être utilisée comme un outil d'estimation de la conductance stomatique si les autres paramètres de l'équation sont connus (déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère, longueur du trajet des sites d'évaporation aux veines…). Ce modèle permet donc d'accéder à une mesure instantanée de g_s. L'utilisation de la signature isotopique en ^{18}O de la matière organique permet, quant à elle, d'accéder à des valeurs plus intégrées de g_s (Barbour, 2007).

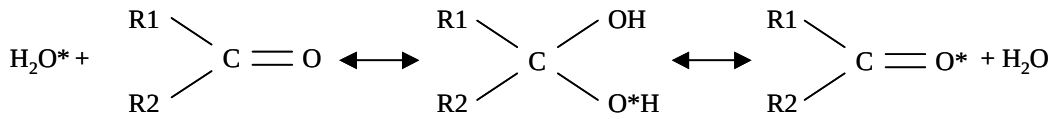
2.3.2 Théorie de l'enrichissement de la matière organique foliaire

La signature isotopique en ^{18}O peut être analysée sur des molécules à renouvellement rapide (telles que les sucres solubles), des molécules à renouvellement plus lent (comme la cellulose du bois), de la matière organique soluble ou de la matière organique totale, issues de différents compartiments: feuille ou tige. Dans cette synthèse, seule la matière organique du compartiment foliaire a été abordée.

Les oxygènes présents dans la matière organique foliaire sont issus de trois sources: le CO_2, l'eau foliaire et l'O_2 (Schmidt *et al.*, 2001). Toutefois, l'eau foliaire est la source la plus importante d'oxygène: lorsque la matière organique est au contact de l'eau, les oxygènes 18 se concentrent dans la matière organique. Il existe aussi un fractionnement au cours des différentes réactions de biosynthèse des molécules organiques. En effet, les enzymes peuvent modifier la composition isotopique en ^{18}O de ces molécules organiques: soit en catalysant des réactions avec H_2O, CO_2 ou O_2, soit en favorisant l'équilibre entre les molécules et l'eau du milieu. Enfin, l'eau foliaire peut aussi être une source indirecte *via* des échanges d'atomes d'oxygène avec le CO_2, ou encore *via* l'O_2 produit lors de la photolyse de l'eau (O_2 qui peut alors être utilisé lors de réactions catalysées par des oxygénases).

La composition isotopique en ^{18}O des composés organiques est variable (Figure 7, d'après Schmidt *et al.*, 2001) puisque, lors de leur biosynthèse, les atomes d'oxygène sont introduits par différents mécanismes qui ont des effets isotopiques différents. Une fois ces composés synthétisés, certaines de leurs fonctions chimiques sont susceptibles d'échanger des oxygènes avec l'eau dans laquelle ils sont transportés ou stockés et pour laquelle, comme nous l'avons vu précédemment, la signature isotopique en ^{18}O peut varier dans l'espace et le temps. La matière organique foliaire a donc une signature en ^{18}O qui reflète à la fois celle de la source (δ_s), et celle de l'eau foliaire dont l'enrichissement varie avec la transpiration, et donc dans certains cas, avec la conductance stomatique. Les échanges d'oxygènes

entre l'eau et les molécules organiques n'ont lieu qu'au niveau des fonctions carbonyles (-CO-) de ces molécules *via* la formation d'intermédiaire gem-diol (Samuel & Silver, 1965; Farquhar *et al.*, 1998):



Aux température et pH caractéristiques des plantes, les oxygènes des autres fonctions ne sont pas échangeables (Sternberg *et al.*, 1986). A l'équilibre, il existe ainsi un enrichissement en ^{18}O des molécules organiques portant des fonctions carbonyles par rapport à l'eau dans laquelle ces molécules ont été synthétisées. D'après Sternberg & DeNiro (1983), le fractionnement isotopique associé (ε_{wc}) est compris entre 25 et 30‰. Ce fractionnement est censé être identique pour tous les oxygènes des fonctions carbonyles de toutes les molécules (Farquhar *et al.*, 1998), même s'il peut y avoir des différences dues à la proximité d'autres atomes (groupements R1 et R2 qui influencent la force de liaison C=O) (Schmidt *et al.*, 2001). Par contre, la vitesse des échanges d'oxygène entre les molécules et l'eau varie en fonction du type de molécules. Par exemple, les trioses-phosphate (glycéraldéhyde 3 phosphate, produits par le cycle de Calvin) échangent très rapidement leurs oxygènes (Farquhar *et al.*, 1998).

Les trioses-phosphate formés après fixation du CO_2 permettent, lorsqu'ils sont exportés du stroma chloroplastique vers le cytosol, la synthèse de saccharose. Cette synthèse fait intervenir des hexoses (glucose et fructose), intermédiaires entre les trioses-phosphate et le produit final. Les trioses-phosphate ainsi que les hexoses portent des groupements carbonyles, ces molécules sont donc susceptibles d'échanger les oxygènes de ces fonctions avec l'eau chloroplastique ou cytolsolique. Le saccharose ne contient pas de fonctions carbonyles et ne présente donc pas d'oxygène potentiellement échangeable avec l'eau. Ainsi, à moins qu'il ne soit scindé en hexoses, le saccharose reflète la composition isotopique en ^{18}O de ses précurseurs et intermédiaires, et, de ce fait, la composition isotopique des eaux chloroplastique et cytosolique (Farquhar *et al.*, 1998). Comme les échanges d'oxygène entre les trioses-phosphate et l'eau sont très rapides, et que les trioses-phosphate sont exportés dans le cytosol avant d'entrer dans la voie de biosynthèse du saccharose, le saccharose est considéré comme étant en équilibre isotopique avec l'eau cytosolique (Barbour *et al.*, 2000a) dont l'enrichissement en ^{18}O est censé être identique à $\Delta^{18}O_L$ (Barbour & Farquhar, 2000). Ainsi, l'enrichissement du saccharose par rapport à la source ($\Delta^{18}O_{Sacch}$) est, théoriquement, $\Delta^{18}O_{Sacch}=\Delta^{18}O_L+\varepsilon_{wc}$. Cette relation a été vérifiée par plusieurs travaux sur différentes espèces: *Eucalyptus globulus*: (Cernusak *et al.*, 2005), *Pinus sylvestris* (Barnard *et al.*, 2007), *Ricinus communis* (Barbour *et al.*, 2000a; Cernusak *et al.*, 2003a; Gessler *et al.*, 2007). Toutefois, ces relations ont été établies non pas pour du saccharose foliaire purifié, mais pour de la matière organique soluble extraite à partir des feuilles ou du phloème. Cette technique est couramment employée pour accéder à la composition isotopique du saccharose. En effet, la matière organique soluble est constituée en

grande partie de sucres solubles ainsi que d'acides organiques et d'acides aminés (Brandes *et al.*, 2006). Puisque le saccharose représente la plus grande partie des sucres non structuraux (80% des sucres solubles foliaires chez le chêne pédonculé; Picon *et al.*, 1997), l'analyse de la matière organique soluble est un moyen plus aisé d'estimer la signature isotopique en ^{18}O du saccharose. D'autre part, si aucun fractionnement n'intervient pendant le chargement des molécules dans le phloème et que le saccharose n'est pas dégradé, alors, analyser la signature isotopique la matière organique soluble du phloème revient à analyser la signature isotopique de la matière organique soluble foliaire. Ainsi, $\Delta^{18}O_{MOS} = \Delta^{18}O_L + \varepsilon_{wc}$, où $\Delta^{18}O_{MOS}$ représente l'enrichissement de la matière organique soluble.

Lorsque l'analyse de la composition isotopique en ^{18}O se porte sur d'autres fractions métaboliques, telles que la cellulose ou la matière organique foliaires, d'autres facteurs sont à prendre en compte. Ainsi, l'enrichissement de la cellulose ($\Delta^{18}O_C$) est défini selon l'équation suivante: $\Delta^{18}O_C=\Delta^{18}O_L(1-p_{ex}p_x)+\varepsilon_{wc}$, où p_{ex} est la proportion d'oxygène échangeable dans la cellulose (p_{ex} est compris entre 0.3 et 0.5; Barbour, 2007) et p_x est la proportion d'eau non enrichie (eau source) dans la cellule qui se développe. La cellulose est synthétisée à partir de saccharose exporté des feuilles autotrophes vers les organes non photosynthétiques (feuilles en croissance, tiges, racines) et 40% (=p_{ex}), environ, des oxygènes sont échangés avec l'eau pendant la synthèse de cellulose dans ces organes. La signature isotopique de la cellulose est donc un mélange de signaux isotopiques provenant à la fois des feuilles matures et des organes non photosynthétiques (Sternberg *et al.*, 2003). Compte tenu du fait que la cellulose ne présente pas d'oxygène échangeable et qu'elle est mise en place très tôt dans le développement de la feuille, la cellulose foliaire reflète les conditions environnementales dans lesquelles les feuilles se sont formées. La matière organique foliaire totale étant moins enrichie en ^{18}O que la cellulose, un facteur empirique (ε_{cp}) est ajouté à l'équation précédente, de sorte que l'enrichissement de la matière organique totale ($\Delta^{18}O_P$) est décrit par: $\Delta^{18}O_P= \Delta^{18}O_L(1-p_{ex}p_x)+\varepsilon_{wc}+\varepsilon_{cp}$, ce qui a été vérifié expérimentalement (Barbour & Farquhar, 2000). La signature isotopique de la matière organique foliaire totale intègre les signaux de molécules provenant de voies de biosynthèse variées et présentant une large gamme de renouvellement, de plusieurs mois à quelques heures. L'enrichissement en ^{18}O de la matière organique foliaire totale est donc intéressante pour intégrer g_s sur une période de temps beaucoup plus importante que $\Delta^{18}O_{MOS}$.

Compte tenu de l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la composition en ^{18}O de l'eau foliaire, la signature en ^{18}O de la matière organique foliaire (soluble ou totale) est censée refléter ces variations. En effet, plusieurs études montrent des cycles diurnes d'enrichissement de la matière organique soluble foliaire (ou prélevée dans le phloème), et totale (Cernusak *et al.*, 2002; Gessler *et al.*, 2007). Toutefois, ces variations diurnes sont atténuées (différence de 4‰ entre les valeur maximales et minimales) par rapport aux variations diurnes de l'enrichissement de l'eau foliaire (de l'ordre de 10-20‰). Pour

	Relation 1	Relation 2	Relation 3
A	↗	=	↗
g_s	=	↗	↗
$W_i = A/g_s$	↗	↘	=
$\Delta^{13}C$	↘	↗	**=**
$\Delta^{18}O$	**=**	↘	↘

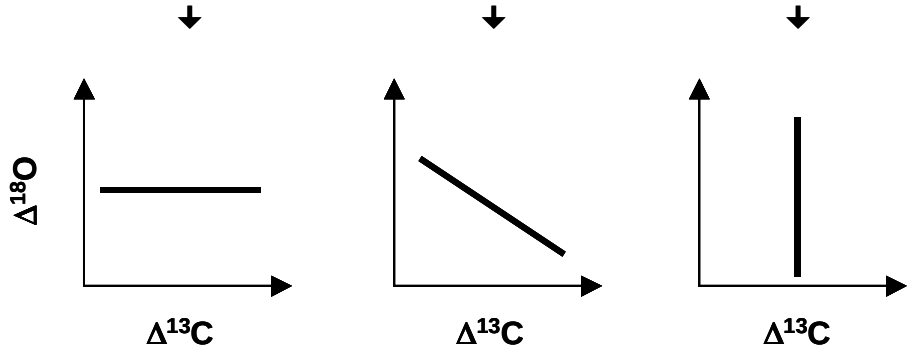


Tableau 4: Relations possibles entre l'assimilation nette de CO_2 (A), la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s), l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i), la discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$) et l'enrichissement de l'eau ou de la matière organique foliaires par rapport à l'eau source ($\Delta^{18}O$) lorsque le déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère est constant. Représentations schématiques de ces trois relations.

certains travaux, aucune variation n'est d'ailleurs notée au cours de la journée pour $\Delta^{18}O_{MOS}$ (Barnard *et al.*, 2007) ou $\Delta^{18}O_P$ (Gessler *et al.*, 2007).

Les variations de g_s provoquées par des facteurs édaphiques (stress hydrique; Cernusak *et al.*, 2003b), par ajout d'hormones (acide abscissique; Barbour & Farquhar, 2000) ou dues à des effets génétiques (Barbour *et al.*, 2000b) affectent la signature isotopique en ^{18}O de la matière organique (Farquhar *et al.*, 1998). Etant donné les variations de g_s dans le temps, l'utilisation de la signature en ^{18}O est un outil qui amène un bénéfice considérable, puisqu'il peut permettre d'estimer une conductance stomatique intégrée dans le temps, mais aussi parce-qu'il facilite l'expérimentation (plusieurs plants peuvent être récoltés dans un laps de temps relativement court).

2.3.3 Apport de la double approche isotopique ($^{13}C/^{18}O$)

L'enrichissement isotopique en ^{18}O de l'eau foliaire et, par conséquent, des molécules organiques foliaires, est fonction de la transpiration, qui est fortement liée à g_s lorsque les feuilles sont dans des conditions identiques de déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν). De ce fait, l'utilisation de l'outil isotopique ^{18}O peut permettre de différencier les variations d'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) liées à g_s ou à A. Lors de l'utilisation combinée des outils isotopiques ^{13}C et ^{18}O, trois relations peuvent être envisagées (Tableau 4):

(i) si les variations de $\Delta^{13}C$ sont causées par A, alors la pente de la relation entre $\Delta^{13}C$ et $\Delta^{18}O_L$ doit être proche de zéro, puisque des variations de A n'affectent pas $\Delta^{18}O_L$, alors qu'une augmentation de A est censée diminuer $\Delta^{13}C$.

(ii) si les variations de $\Delta^{13}C$ sont dues à g_s, alors $\Delta^{13}C$ et $\Delta^{18}O_L$ sont négativement corrélées. En effet, une augmentation de g_s est censée augmenter $\Delta^{13}C$, tout en diminuant $\Delta^{18}O_L$ (Tableau 3 & Figure 6 de l'encadré 4).

(iii) si les variations de $\Delta^{13}C$ sont causées par A et g_s simultanément, alors la pente de la relation entre $\Delta^{13}C$ et $\Delta^{18}O_L$ doit être fortement négative. En effet, en augmentant g_s, $\Delta^{13}C$ augmente et $\Delta^{18}O_L$ diminue. Cependant, si l'augmentation de A est telle qu'elle compense l'effet de g_s sur $\Delta^{13}C$, alors, les variations de $\Delta^{18}O_L$ par unité de variation de $\Delta^{13}C$ seront très grandes.

Cette double approche isotopique (^{13}C, ^{18}O) est donc un outil très intéressant lorsqu'il s'agit d'analyser les causes de la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau. Cependant, jusqu'à présent, peu d'études

ont utilisé cette double approche isotopique dans le cadre de comparaisons de génotypes en intra-spécifique et en conditions non-limitantes (excepté l'étude de Xu *et al*. (2000), pour des clones issus d'un croisement *Pinus elliottii* x *P. caribaea*). Cette approche doit donc, avant tout, être validée sur le modèle choisi, avant de l'utiliser sur un grand nombre d'individus.

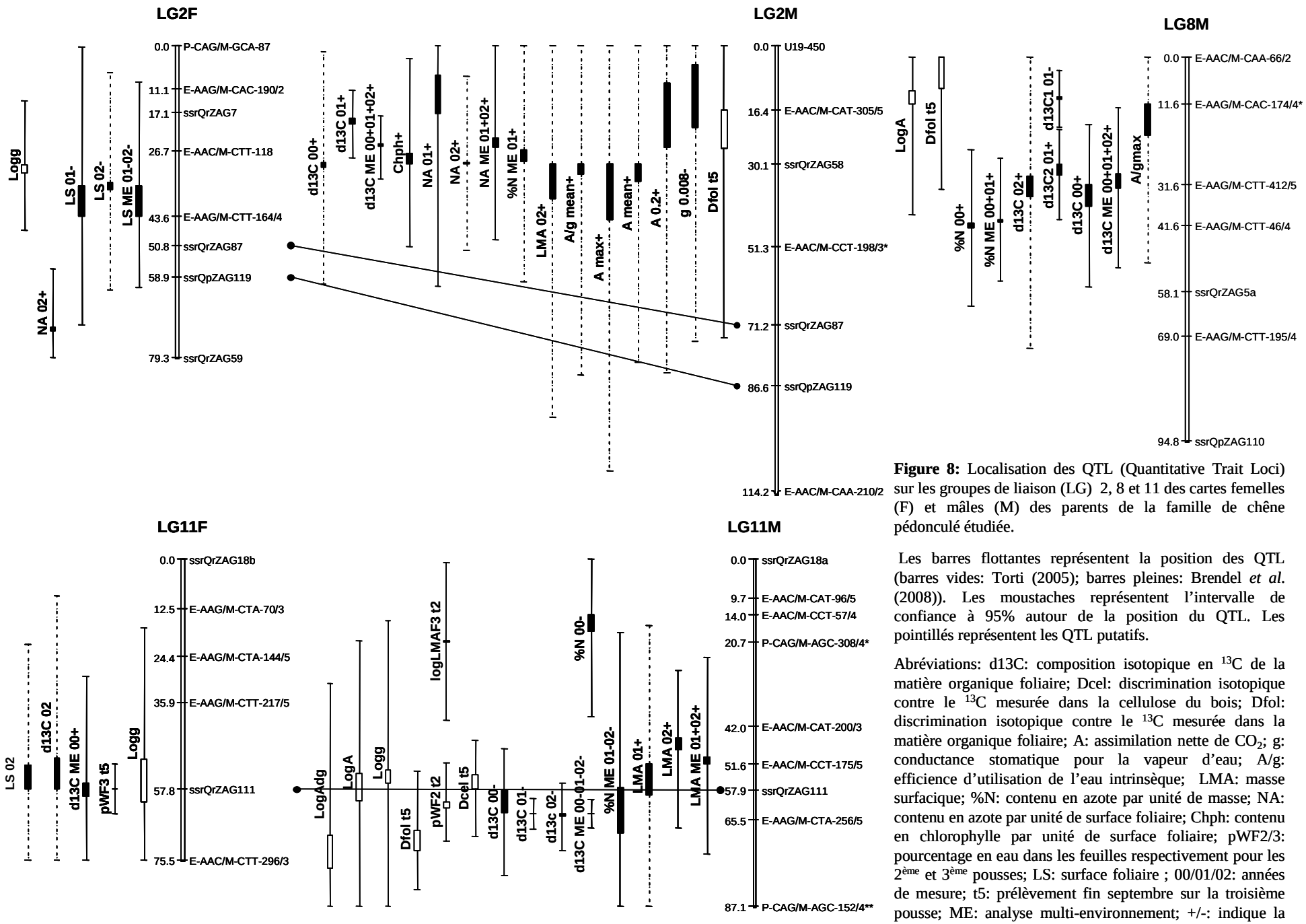


Figure 8: Localisation des QTL (Quantitative Trait Loci) sur les groupes de liaison (LG) 2, 8 et 11 des cartes femelles (F) et mâles (M) des parents de la famille de chêne pédonculé étudiée.

Les barres flottantes représentent la position des QTL (barres vides: Torti (2005); barres pleines: Brendel *et al.* (2008)). Les moustaches représentent l'intervalle de confiance à 95% autour de la position du QTL. Les pointillés représentent les QTL putatifs.

Abréviations: d13C: composition isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire; Dcel: discrimination isotopique contre le ^{13}C mesurée dans la cellulose du bois; Dfol: discrimination isotopique contre le ^{13}C mesurée dans la matière organique foliaire; A: assimilation nette de CO_2; g: conductance stomatique pour la vapeur d'eau; A/g: efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque; LMA: masse surfacique; %N: contenu en azote par unité de masse; NA: contenu en azote par unité de surface foliaire; Chph: contenu en chlorophylle par unité de surface foliaire; pWF2/3: pourcentage en eau dans les feuilles respectivement pour les 2ème et 3ème pousses; LS: surface foliaire ; 00/01/02: années de mesure; t5: prélèvement fin septembre sur la troisième pousse; ME: analyse multi-environnement; +/-: indique la direction de l'effet allélique. Les lignes joignent les marqueurs similaires des cartes mâle et femelle.

Problématique et objectifs principaux de cette thèse

Le chêne pédonculé présente une forte variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau que ce soit en conditions naturelles sur plusieurs populations (Ponton, 2002; B.Faivre, communication personnelle), en intra-famille en plantation ou en conditions contrôlées (Torti, 2005; Brendel *et al.*, 2008). Une gamme de discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$) de 3 à 4‰, correspondant à une gamme de variation de l'efficience d'utilisation de l'eau de 45 à 60%, a ainsi pu être mise en évidence pour l'ensemble de ces travaux. Les études de génétique quantitative menées par Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008), sur une même famille F1 de plein-frères de chêne pédonculé, ont permis de démontrer le déterminisme génétique de l'efficience d'utilisation de l'eau. L'étude de Brendel *et al.* (2008) a aussi montré que $\Delta^{13}C$ était héritable chez le chêne pédonculé. L'héritabilité d'un trait permet de décrire la proportion de la variation totale due à des différences génétiques entre individus (Ackerly *et al.*, 2000). Chez le chêne pédonculé, l'héritabilité de ce trait varie de 0.2 à 0.7 selon les années et les hypothèses utilisées (Brendel *et al.*, 2008).

La variation de l'efficience d'utilisation de l'eau (W_i ou $\Delta^{13}C$) suit une distribution normale au sein de populations, comme par exemple chez le pin maritime (Brendel *et al.*, 2002). Il s'agit donc d'un caractère quantitatif dont les variations sont imputables à l'environnement et à l'effet cumulé de plusieurs régions génomiques (locus). Chacune de ces régions a un effet plus ou moins marqué sur le caractère quantitatif en question (de Vienne, 1998). La génétique quantitative permet d'étudier l'architecture génétique d'un trait, c'est-à-dire d'identifier les régions génomiques impliquées dans la variabilité de ce trait à l'aide d'association entre des marqueurs moléculaires et la variabilité de ce trait entre individus. Les QTL (Quantitative Trait Loci) représentent des outils statistiques et graphiques permettant de situer, sur une carte génétique, ces régions génomiques (Gur *et al.*, 2004). Les études de génétique quantitative menées sur deux expérimentations indépendantes (serre et plantation) par Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008), ont mis en évidence un petit nombre de QTL à effet fort (4% à 25% de la variabilité phénotypique expliquée) liés à la variabilité de $\Delta^{13}C$ (Figure 8). Les travaux de Torti (2005) et de Brendel *et al.* (2008) ont aussi détecté des QTL liés à la variabilité de W_i: Brendel *et al.* (2008) n'en ont détecté qu'un seul, alors que Torti (2005) en ont trouvé six. Le caractère instantané des mesures d'échanges gazeux, permettant de calculer W_i, ainsi que leur forte dépendance aux variations environnementales peuvent expliquer que le nombre de QTL trouvés pour W_i est généralement faible. En effet, plus l'environnement influe sur un trait (héritabilité faible), plus il est difficile de caractériser le phénotype de chaque plein frère pour une condition environnementale donnée, et donc moins il y a de QTL détectés (Tanksley, 1993). Les QTL liés à la variabilité de W_i détectés dans ces deux études expliquent entre 6 et 9% de la variabilité phénotypique totale observée, et peuvent être colocalisés avec des QTL liés à la variabilité de $\Delta^{13}C$ (Figure 8).

W_i est contrôlée par l'assimilation nette de CO_2 (A) et/ou la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). Avant d'identifier précisément les gènes à l'origine de la variabilité observée, situés dans ces régions, la colocalisation de QTL permet de fournir une première information renseignant sur le contrôle de la variabilité entre génotypes de W_i par A, g_s ou les deux. Cependant, du fait de la forte coordination entre A et g_s, il n'est pas rare de trouver des colocalisations de QTL pour ces deux traits au niveau des mêmes régions. Ainsi, lorsqu'il y a colocalisation avec des QTL pour $\Delta^{13}C$, il est impossible de savoir si la variabilité de $\Delta^{13}C/W_i$ observée est seulement causée par l'une ou l'autre composante ou par les deux simultanément, comme c'est le cas chez le chêne pédonculé (Figure 8).

A la suite de ces travaux, un projet visant à comprendre les mécanismes physiologiques et génomiques à l'origine de la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau chez le chêne pédonculé, a été élaboré. Pour répondre à cette problématique, deux approches ont été combinées: une approche écophysiologique réalisée par l'UMR EEF (INRA Nancy) et une approche génomique développée par l'UMR BioGeCo (INRA Bordeaux). L'objectif final est d'identifier des gènes candidats liés à la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau observée, ces gènes candidats pouvant ensuite être utilisés soit dans le cadre d'une sélection à des fins commerciales (comme chez le peuplier, par exemple), soit dans le cadre de l'étude de la diversité fonctionnelle naturelle. Ma thèse portait sur l'approche écophysiologique de ce projet, et avait pour but de décomposer la variabilité génétique de l'efficience d'utilisation de l'eau existant chez le chêne pédonculé, mais aussi de fournir le matériel utilisé pour l'approche génomique.

Cette approche écophysiologique comportait deux grandes étapes:

(i) analyser et comparer des génotypes, en conditions non-limitantes, pour des traits foliaires physiologiques (capacité photosynthétique, conductance stomatique…) et structuraux (anatomie foliaire), mais aussi pour des traits plante entière (productivité…) liés à l'efficience d'utilisation de l'eau. Cette décomposition de l'efficience d'utilisation de l'eau visait à déterminer le(s) trait(s) contribuant le plus à la variabilité génétique intra-famille observée. Pour approfondir ce travail, cette première étape comportait une étude sur la possibilité d'utiliser les variations de composition isotopique en oxygène ($^{18}O/^{16}O$) de la matière organique foliaire pour décomposer des différences d'efficience d'utilisation de l'eau en composantes photosynthétiques et transpiratoires.

(ii) caractériser le comportement individuel de génotypes en conditions de sécheresse édaphique dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes d'acclimatation à ces conditions environnementales.

Au cours de ma thèse, ces deux étapes ont été abordées. Toutefois, ce manuscrit ne présente que les résultats relatifs à la première étape. Lors de la réalisation de la deuxième étape, des problèmes expérimentaux ont été à l'origine d'un fort effet environnemental sur le jeu de données obtenu. Cette étape ne sera donc détaillée que dans le chapitre "conclusions perspectives" de ce manuscrit.
Ce manuscrit a été divisé en deux parties:

(i) la première partie décrit l'étude de la variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau pour des génotypes de chêne pédonculé et des causes physiologiques et/ou anatomiques de cette variabilité en conditions non-limitantes de croissance.

(ii) la deuxième partie est consacrée à l'étude de l'outil isotopique ^{18}O comme estimateur de la conductance stomatique.

1ère partie: Causes physiologiques et/ou anatomiques de la variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau chez le chêne pédonculé

I.1 Introduction

Cette première partie avait pour objectif de déterminer les causes physiologiques et/ou anatomiques de la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) observée au sein de la famille F1 de plein-frère étudiée par Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008).

Pour répondre à cet objectif, trois expérimentations ont été réalisées. La première a été effectuée en 2004, au cours de mon DEA. L'analyse des échantillons et des données s'étant poursuivie durant ma première année de thèse (2005), les résultats relatifs à cette expérience ont donc été inclus dans ce manuscrit. Ma première année de thèse a aussi comporté une deuxième expérimentation afin d'approfondir les résultats obtenus en 2004. Pour ces deux années, le choix des génotypes était basé sur un compromis entre la mesure d'un grand nombre de traits (dû à la complexité de W_i), le nombre d'individus sur lesquels ont été effectuées les mesures et le maintien de la gamme de $\Delta^{13}C$ observée au sein de la famille F1 de plein-frères. Pour satisfaire cet ensemble de critères, les deux expérimentations de 2004 et 2005 ont porté sur des extrêmes phénotypiques choisis sur la base des valeurs de $\Delta^{13}C$ obtenus par Brendel *et al.* (2008) dans une plantation localisée à Bourran (Sud-Ouest de la France). Ces extrêmes ont été choisis selon deux stratégies conduisant à deux types de phénotypes extrêmes:

(i) le phénotype "Δ" était constitué par des génotypes sélectionnés pour des valeurs extrêmes (faible ("low") et forte ("high")) de $\Delta^{13}C$ simultanément pour les 3 années de mesure consécutives (2000 à 2002) à Bourran.

(ii) le phénotype "N" était constitué par des génotypes présentant des valeurs extrêmes (obtenues en 2001) simultanément pour $\Delta^{13}C$ et pour les contenus foliaires en azote et chlorophylle. En effet, Brendel *et al.* (2008) ont montré que la variabilité de $\Delta^{13}C$ pouvait être le fait d'une variabilité des capacités photosynthétiques compte tenu de la colocalisation entre plusieurs QTLs liés à la variabilité de $\Delta^{13}C$ et des contenus en azote et chlorophylle foliaires (Figure 8). Ainsi, ces génotypes étaient caractérisés (par rapport aux mesures de Bourran) par de fortes concentrations foliaires en chlorophylle et en azote couplées à un faible $\Delta^{13}C$ pour les extrêmes "high N", ou inversement pour les extrêmes "low N".

Chaque extrême ("low" ou "high") de chaque phénotype ("Δ" ou "N") était formé de trois génotypes distincts. Sur les douze génotypes des deux expérimentations de 2004 et 2005, sept d'entre eux étaient communs aux deux années.

Lors de ma deuxième année de thèse (2006), 54 génotypes de cette famille ont été étudiés. Cette expérimentation était à cheval entre les deux premières étapes du projet présentées dans le chapitre "Problématique et principaux objectifs de cette étude". Cette expérimentation n'a pas été présentée en détail dans ce manuscrit, suite à des problèmes expérimentaux et notamment des conditions lumineuses limitantes. Cependant, quelques données relatives à cette expérimentation ont été utilisées afin d'étayer les principaux résultats acquis dans cette première partie.

Cette première partie a été divisée en deux points:

(i) dans un premier temps, nous avons comparé à l'aide des données recueillies en 2005, les différentes techniques d'estimation de l'efficience d'utilisation de l'eau. L'objectif de cette comparaison inter-méthodes était de déterminer avec quelle précision l'outil isotopique permettait une estimation de l'efficience d'utilisation de l'eau à court et long termes chez le chêne pédonculé placé en conditions non-limitantes. Dans ce même chapitre, nous avons analysé si les différences de $\Delta^{13}C$ entre génotypes étaient stables quel que soit l'environnement, et quelle que soit l'intégration spatiale ou temporelle observée. En effet, cette famille de chêne pédonculé a été utilisée à de multiples reprises pour des analyses de $\Delta^{13}C$: en conditions naturelles à Bourran au cours de trois années consécutives (Brendel *et al.*, 2008) ou encore en serre et en conditions contrôlées (Torti, 2005). Les travaux de Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008) ont donc fourni des valeurs supplémentaires de $\Delta^{13}C$, relatives aux génotypes utilisés pour constituer les phénotypes extrêmes.

(ii) le deuxième point de cette première partie consistait à analyser, en conditions non-limitantes, les causes anatomiques et/ou physiologiques de la variabilité de $\Delta^{13}C$ trouvée au sein de cette famille de chêne pédonculé. Pour répondre à cet objectif, des régressions globales ont été établies entre l'efficience d'utilisation de l'eau et ses composantes directes foliaires (assimilation nette de CO_2 et conductance stomatique pour la vapeur d'eau) et ceci pour l'ensemble des génotypes étudiés au cours de mon DEA et de ma thèse. Une étude basée uniquement sur les données obtenues en 2005 nous a permis de vérifier si les conclusions relatives à l'échelle foliaire pouvaient être applicables à l'échelle plante entière. Suite à cette analyse globale, une étude plus fine des traits liés à chacune de ces composantes a été réalisée à l'aide des phénotypes extrêmes.

	Type de choix	Nombre de génotypes étudiés	Objectifs	Conditions environnementales
2004 (DEA)	Extrêmes phénotypiques	12	Identifier les traits écophysiologiques à l'origine de la variabilité de $\Delta^{13}C$ observée dans cette famille	serre conditions non-limitantes (eau + fertilisation)
2005 (Thèse)	Extrêmes phénotypiques	12	Identifier les traits écophysiologiques à l'origine de la variabilité de $\Delta^{13}C$ observée dans cette famille en complétant l'étude de 2004 par ajout de traits relatifs au comportement stomatique, de caractères "plante entière"…	serre conditions non-limitantes (eau + fertilisation)
2006 (Thèse)	Génotypique	54	Relier les régions génomiques d'intérêt à une variabilité fonctionnelle	serre conditions non-limitantes (eau + fertilisation) + stress hydrique
2006 (Thèse)	Génotypes présentant une gamme de variabilité de g_s assez importante	7	Etudier la variabilité entre génotypes de la réponse de g_s au VPD	serre conditions non-limitantes (eau + fertilisation)

Tableau 5 : Récapitulatif des expérimentations réalisées entre 2004 et 2006 sur des boutures issues de la même famille de chêne pédonculé et cultivées en serre à Nancy.

Figure 9: Photographies du dispositif expérimental.

I.2 Matériel et méthodes

Tous les génotypes de chêne pédonculé utilisés au cours de mon DEA et de ma thèse représentaient des plein-frères, issus d'un croisement contrôlé effectué par l'UMR BioGeCo (INRA Pierroton, Bordeaux) entre le père (A4), originaire d'Arcachon, et la mère (3P), localisée sur la station de recherche forestière INRA Pierroton.

Cette partie s'appuie sur deux expérimentations principales effectuées sur plusieurs de ces génotypes entre 2004 et 2005:

- expérimentation de 2004 (DEA): étude des phénotypes extrêmes (12 génotypes: 136, 151, 159, 170, 171, 237, 259, 261, 263, 267, 287, 351)
- expérimentation de 2005 (thèse): étude des phénotypes extrêmes (12 génotypes: 101, 109, 118, 126, 136, 151, 170, 171, 219, 267, 287, 351)

mais fait aussi appel à d'autres expérimentations réalisées au cours de ma thèse en 2006:

- étude de 54 génotypes (9, 14, 87, 104, 110, 112, 121, 126, 153, 164, 165, 173, 175, 177, 178, 186, 188, 189, 192, 193, 194, 200, 203, 214, 223, 226, 237, 241, 243, 250, 257, 260, 270, 275, 280, 288, 301, 308, 310, 315, 317, 319, 326, 327, 333, 338, 348, 349, 350, 352, 356, 357, 365, 373). Bien que le choix de ces 54 génotypes n'ait pas été fait au hasard (les critères de ce choix seront présentés ultérieurement), leur ensemble peut être considéré comme un sous échantillon de cette famille F1 de chêne pédonculé car ils sont distribués sur toute la gamme de variation de $\Delta^{13}C$.
- étude de la réponse de la conductance stomatique au déficit de pression de vapeur d'eau sur sept génotypes (118, 136, 173, 178, 186, 214, 348) présentée en annexe 1.

Pour l'ensemble de ces expérimentations (récapitulées dans le tableau 5) les boutures de chaque génotype ont été produites par l'UMR BioGeCo (INRA Pierroton, Bordeaux) puis transportées à l'INRA de Nancy où elles ont été transférées dans des pots de 10L contenant un mélange tourbe/sable (1/1, v/v). Les chênes ont été fertilisés tous les 100 jours avec de l'engrais à libération lente (Nutricote T 100 13-13-13, NPK) et avec du calcaire magnésien (amendement calcique) à raison de 4,5 g L^{-1} et 0,2 g L^{-1} respectivement. Les plants ont été cultivés en serre (Figure 9), et les conditions de croissance étaient identiques d'une année sur l'autre: conditions contrôlées de température (comprise entre 15 et 25°C), humidité relative (comprise entre 60 et 70%), concentration en CO_2 ambiante (comprise entre 360 et 400 µmol CO_2 mol^{-1} d'air), et photopériode naturelle. Les arbres ont été arrosés à capacité au champ, avec de l'eau osmosée.

Dans cette partie, nous avons aussi utilisé des données obtenues lors de précédentes études sur cette même famille F1 de chêne pédonculé (Thèse de X. Torti (2005) et travaux de Brendel *et al.* (2008)).
Les traits écophysiologiques étudiés dans cette partie sont décrits en détail dans les chapitres I.4.2.1 et I.4.2.2 (études des phénotypes extrêmes). Cependant, les protocoles de détermination des traits utilisés dans les premiers chapitres de cette partie sont rappelés brièvement:

- Extraction des différentes fractions organiques pour analyse de leur composition isotopique en ^{13}C:

La méthode d'extraction des sucres solubles foliaires a été adaptée des travaux de Dickson & Larson (1975). Elle nécessite l'utilisation d'un mélange méthanol-chloroforme-eau afin de séparer les composés hydrosolubles des protéines, chlorophylle, lipide, amidon, cellulose… Puis, cette fraction hydrosoluble est passée sur une colonne constituée de Polyvinylpolypyrrolidone, et de deux résines échangeuses d'ions: Dowex -50 (H^+) et Amberlite IRA-402 (Cl^-) permettant de piéger respectivement les tanins, les acides aminés et les acides organiques. Les sucres solubles sont obtenus par élution de cette colonne avec de l'eau. L'éluat est ensuite séché sous vide. Le culot obtenu étant relativement visqueux, de l'eau est à nouveau ajoutée. Un certain volume de cette solution est prélevé et transféré dans des capsules qui sont ensuite lyophilisées 24h, puis analysées au spectromètre de masse isotopique.
Au cours de la première étape d'extraction des sucres solubles, la fraction hydrosoluble est séparée de la fraction insoluble contenant, entre autre, de l'amidon. L'extraction d'amidon se fait ensuite à l'aide d'acide chlorhydrique (HCl 6N) à partir de cette fraction insoluble. Du méthanol 60% est ajouté au mélange HCl-amidon, ce qui provoque une floculation de l'amidon qui peut ainsi être récupéré après séchage sous vide.
Le protocole d'extraction de la fraction cellulosique a été décrit par Leavitt & Danzer (1993), puis modifié par Loader *et al.* (1997) et enfin amélioré par B. Richard (UMR INRA-UHP EEF). La première étape d'extraction consiste à éliminer les cires, les lipides, les résines et les composés phénoliques par lavages successifs, à chaud, des échantillons dans 250 ml d'un mélange toluène-éthanol (2:1, v/v) dans un soxhlet, puis dans 250 ml d'éthanol absolu. L'élimination de la fraction soluble (sels inorganiques, polysaccharides, amidon…) s'effectue dans de l'eau distillée portée à 100°C. Un bain, dans une solution de chlorite de sodium et d'acide acétique glacial (2.46 g par gramme de matière sèche, et 1.69 ml par gramme de matière sèche, respectivement) et d'eau distillée, permet la digestion des lignines. La présence d'hémicellulose est réduite dans une solution alcaline de soude 1N. Enfin, une acidification permet de dégager les carbonates éventuellement formés lors de l'étape précédente.
Les mesures de composition isotopique en carbone 13 ont été effectuées sur un milligramme de matière sèche. Toutes les analyses de ^{13}C ont été effectuées (travaux de Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008), y compris) à l'INRA de Nancy par C. Bréchet et C. Hossann (UMR INRA-UHP EEF).

L'analyse de la composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}C$) des échantillons se fait par couplage d'un analyseur élémentaire carbone-azote (Na 1500 Carlo Erba, Italie) à un spectromètre de masse isotopique (Thermo Finnigan Delta S, Allemagne). $\delta^{13}C$ est alors déterminé selon l'équation suivante: $\delta^{13}C$=(Rs-Rb).1000/Rb, où Rs et Rb sont les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon et du standard Pee Dee Belemnite (PDB), respectivement.

Pour accéder à la discrimination isotopique entre le ^{13}C du CO_2 atmosphérique et la matière organique (**$\Delta^{13}C$, ‰**) la composition isotopique de l'air a été déterminée à partir de la composition isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire de maïs (Marino & McElroy, 1991). En effet, les plantes caractérisées par un métabolisme de type C_4, comme le maïs, discriminent moins le ^{13}C au cours de l'assimilation. La composition isotopique des tissus foliaires de ces plantes reflète ainsi la composition isotopique atmosphérique. La discrimination du ^{13}C est alors calculée à partir de l'équation suivante (Marino & McElroy, 1991):

$\delta^{13}C\ (CO_2)_{serre} = 3.276 + \delta^{13}C$maïs.

Nous avons utilisé la signature isotopique du maïs comme estimateur intégré dans le temps de $\delta^{13}C_{air}$. L'analyse isotopique en ^{13}C de prélèvements d'air n'aurait fourni que des valeurs instantanées, peu comparables aux données de $\delta^{13}C$ de la matière organique foliaire ou du bois.

- Echanges gazeux foliaires

L'assimilation nette de CO_2 (**A_{sat}, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}**) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (**g_{sat}, mol H_2O m^{-2} s^{-1}**), en conditions standardisées, ont été déterminées à l'aide d'un système ouvert de mesures d'échanges gazeux LiCor 6400 (LiCor, Lincoln,USA). Les conditions de mesure des échanges gazeux étaient les suivantes: CO_2 ambiant (370-390 ppm), éclairement saturant (flux de photons de 1200 µmol m^{-2} s^{-1} dans le PAR (Photosynthetic Active Radiation)), température de 25°C et flux d'air passant dans la chambre de 300 µmol s^{-1}. Avant toute mesure, la photosynthèse était induite pendant 40 mn environ (durée variable selon les individus). Le déficit de pression de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère mesuré dans la chambre fluctuait entre 1 et 1,5 kPa. A la suite de ces mesures, l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (**W_{sat}, µmol CO_2 mol^{-1} H_2O**) a été calculée à l'aide du rapport A_{sat}/g_{sat}.

- Efficience de transpiration

L'efficience de transpiration (**TE, mg biomasse sèche g^{-1} H_2O**) correspond au rapport entre le gain de biomasse et la quantité d'eau transpirée sur une période de temps définie. Ce trait n'a été déterminé que pour l'expérimentation réalisée en 2005. Pour accéder au gain de biomasse sèche (**biom, g**), la biomasse sèche finale a été soustraite à la biomasse sèche initiale. La quantité d'eau transpirée a été obtenue entre mi-avril 2005 et mi-octobre 2005 par pesée journalière des pots, réhydratés à capacité au champ après chaque pesée. Outre son utilisation dans la détermination de TE, la quantité d'eau

transpirée a aussi été ramenée à la surface foliaire pour déterminer une transpiration par unité de surface (**TPT, kg H_2O m^{-2}**).

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA Version 7.1 (StatSoft, Inc. 2005) à partir des moyennes génotypiques. Les corrélations ainsi que les régressions entre les traits déterminées sur la base des moyennes géométriques (ou régression de type II) (Sokal & Rohlf, 2000) ont été considérées comme significatives pour $p<0.05$.

I.3 Analyse comparative des différentes méthodes de détermination de l'efficience d'utilisation de l'eau

Le premier objectif de cette analyse était de comparer les différentes techniques d'estimation de l'efficience d'utilisation de l'eau et de définir la précision avec laquelle la discrimination isotopique sur différents organes ou métabolites pouvait refléter l'efficience d'utilisation de l'eau mesurée directement (W_i/TE). Ce point concerne les données acquises lors de ma première année de thèse (2005) au cours de laquelle l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque ainsi que l'efficience de transpiration ont été évaluées et comparées aux valeurs de discrimination isotopique du carbone. Le deuxième objectif était de comparer les données de de discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$) obtenues sur différentes années en conditions naturelles dans une plantation située à Bourran (Brendel *et al.*, 2008) et en serre à Nancy (thèse de X. Torti (2005) et mes données de DEA et de thèse), sur deux types d'organe (feuille et bois) et sur de la matière organique totale ou fractionnée (sucres solubles, amidon, cellulose du bois). L'analyse de ces données nous a donc permis de diversifier les changements d'échelle, autant spatiaux que temporels, afin de vérifier la stabilité des valeurs phénotypiques de $\Delta^{13}C$ sur les génotypes de chênes pédonculés choisis. Cette analyse a été effectuée sur les 17 génotypes (101, 109, 118, 126, 136, 151, 159, 170, 171, 219, 237, 259, 261, 263, 267, 287, 351) choisis pour l'étude des différences entre extrêmes phénotypiques (chapitres I.4.2.1 et I.4.2.2).

I.3.1 Comparaisons des différentes approches de détermination de l'efficience d'utilisation de l'eau

D'après les équations présentées dans les encadrés 1 et 3, il existe des corrélations entre l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) définie à l'échelle foliaire et instantanée, l'efficience de transpiration (TE) définie à l'échelle plante entière et intégrée dans le temps et la discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$) permettant une intégration de W_i dans le temps et l'espace. De ce fait, les différences entre génotypes sur la base des valeurs de $\Delta^{13}C$ observées par Torti (2005) ou Brendel *et al.* (2008) devraient refléter des différences entre génotypes de W_i et, par extension, d'efficience de

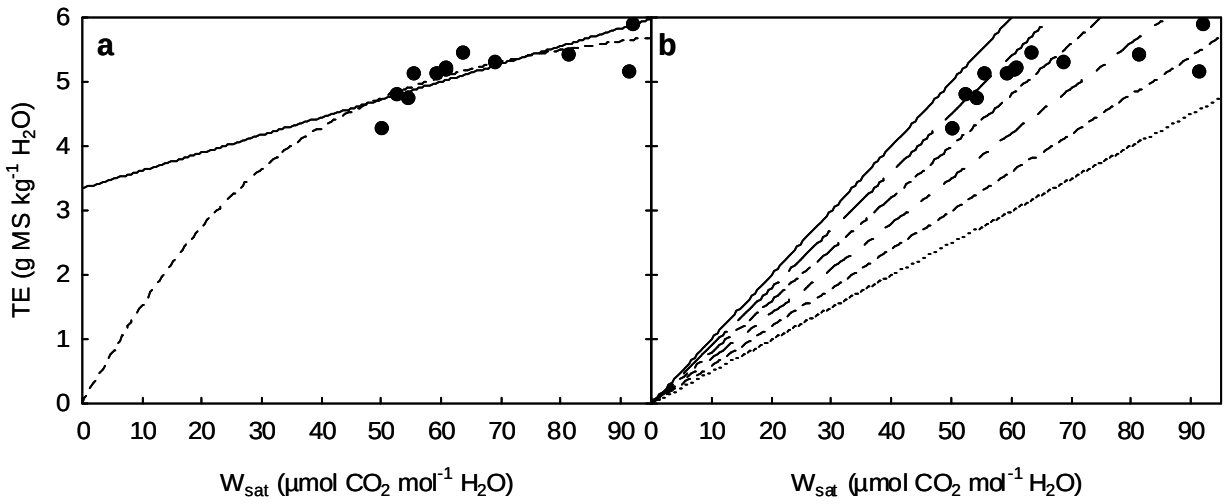


Figure 10: Relation entre l'efficience de transpiration (TE) et l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque déterminée pour des conditions standardisées de mesure des échanges gazeux (W_{sat}), dans le cadre de l'étude de 2005. Initialement, W_{sat} a été déterminée sur des feuilles des deuxième et troisième pousses de chaque arbre. Afin de s'affranchir de l'effet "pousse", une moyenne des moindres carrés a été utilisée pour W_{sat} en utilisant le modèle suivant: $y_{ijr} = \mu + \alpha_i + b_j + g_{ij} + \varepsilon_{ij}$, où i se réfère à l'effet génotype, j à l'effet pousse, y_{ij} est la variable d'intérêt, μ la moyenne, α_i l'effet génotype, b_j l'effet pousse, g_{ij} l'interaction entre les deux effets, et ε_{ij} les résidus. Chaque point (•) représente la moyenne phénotypique (4 copies) de chaque génotype. Différents ajustements ont été réalisés:
(a) droite de régression s'ajustant sur les points expérimentaux d'équation (—): $TE=0.027*W_{sat}+3.34$ ($R^2=0.50$; $p=0.01$); ajustement de type hyperbole non rectangulaire d'équation (- -): $TE=[6.7+0.2*W_{sat}-((6.7+0.2*W_{sat})^2-2.8*6.7*0.2*W_{sat})^{1/2}]/1.4$ ($R^2=0.60$)
(b) droites passant par 0 : $TE = 0.10*W_{sat}$ (—); $TE = 0.09*W_{sat}$ (— —); $TE = 0.08*W_{sat}$ (— - -); $TE = 0.07*W_{sat}$ (— -); $TE = 0.06*W_{sat}$ (- -); $TE = 0.05*W_{sat}$ (· · · ·).

transpiration. Toutefois, comme le montre les relations des encadrés 1 et 3, plusieurs facteurs peuvent perturber ces relations. Ces facteurs peuvent être variables entre génotypes, et donc ajouter une variabilité non contrôlée, ne permettant pas de détecter une relation commune. Ce chapitre est donc consacré à l'analyse des corrélations entre ces trois traits pour les génotypes de chêne pédonculé étudiés lors de ma première année de thèse, en 2005.

I.3.1.1 Efficience d'utilisation de l'eau et échelles d'intégration

Pour les douze génotypes de chêne pédonculé étudiés en 2005, une relation linéaire a pu être déterminée entre l'efficience de transpiration (TE) et l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque déterminée pour des conditions standardisées et optimales de mesure des échanges gazeux (W_{sat}) (Figure 10a). Peu de travaux ont mis en évidence une relation positive entre TE et W_i en intra-spécifique et en conditions non-limitantes, mis à part Li (2000) pour des populations d'*Eucalyptus microtheca*. Les études de Roupsard *et al.* (1998) et de Sun *et al.* (1996), respectivement pour des provenances d'acacia et des croisements d'épinette blanche n'ont pas pu établir une telle relation.

Bien que dans cette étude, nous ayons montré une relation entre TE et W_i, 50% des variations de TE n'étaient pas expliquées par W_{sat} et, la figure 10a montre que la variabilité de W_{sat} était plus importante que celle de TE (coefficients de variation respectivement 20 et 8%). Plusieurs points peuvent expliquer cette observation. D'une part, cette relation revient à comparer des mesures intégrées sur l'ensemble du plant à des mesures d'échanges gazeux réalisées sur quelques feuilles de lumière qui ne sont pas forcément représentatives de l'ensemble du plant. D'autre part, W_i a été mesurée en instantané, et dans des conditions quasiment optimales, alors que TE intègre les échanges gazeux ainsi que d'autres processus sur une période de temps fixée, pour laquelle les conditions environnementales sont variables. Dans notre étude, seule la luminosité (e.g., journées avec une forte couverture nuageuse) a pu intervenir puisque les arbres ont été cultivés dans des conditions environnementales (température, humidité relative, apport en eau) non-limitantes et relativement constantes tout au long de l'expérimentation. La variabilité entre génotypes de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) aurait ainsi pu être atténuée les journées peu ensoleillées, expliquant ainsi une variabilité plus faible de TE entre les génotypes. Cependant, d'autres campagnes de mesures d'échanges gazeux ont été effectuées par temps couvert, en serre, ou en modulant artificiellement l'intensité lumineuse dans la chambre de mesure des échanges gazeux (LiCor 6400). Pour ces campagnes de mesure, nous avons observé une diminution de A et de g_s en réponse à une intensité lumineuse plus faible. Cependant, la variabilité de W_i entre génotypes n'a été que faiblement réduite (coefficient de variation supérieur à 17%).

Ces divergences de variabilités génotypiques observées entre TE et W_{sat} se caractérisent graphiquement par une régression entre ces deux traits dont l'ordonnée à l'origine n'est pas nulle contrairement à ce que prévoit la relation théorique (équation 4 de l'encadré 1). Deux hypothèses

Equation théorique	Equations expérimentales	R^2	p
$\Delta = 27 - 0.09*W_i$	$\Delta^{13}C_{Ft_2} = 22.50 - 0.06*W_{sat_2}$	0.68	<0.001
	$\Delta^{13}C_{Bc} = 19.22 - 0.07*W_{sat_2}$	0.71	<0.001
	$\Delta^{13}C_{Bt} = 19.77 - 0.06*W_{sat_2}$	0.77	<0.001
	$\Delta^{13}C_{Ft_3} = 22.19 - 0.06*W_{sat_3}$	0.63	< 0.01
	$\Delta^{13}C_{Bc} = 18.41 - 0.06*W_{sat_3}$	0.74	<0.001
	$\Delta^{13}C_{Bt} = 19.04 - 0.06*W_{sat_3}$	0.83	<0.001
$\Delta = 27 - 1.08*TE$	$\Delta^{13}C_{Ft_2} = 29.04 - 2.17*TE$	0.43	0.02
	$\Delta^{13}C_{Ft_3} = 30.29 - 2.39*TE$	0.56	<0.01
	$\Delta^{13}C_{Bc} = 26.85 - 2.29*TE$	0.67	0.001
	$\Delta^{13}C_{Bt} = 26.70 - 2.05*TE$	0.71	<0.001

Tableau 6: Régressions obtenues entre les moyennes génotypiques de discrimination isotopique contre le ^{13}C (‰) de la matière organique foliaire totale ($\Delta^{13}C_{Ft_2}$ et $\Delta^{13}C_{Ft_3}$, respectivement pour les 2ème et 3ème pousses), de la cellulose extraite du bois ($\Delta^{13}C_{Bc}$), du bois total ($\Delta^{13}C_{Bt}$), et les moyennes génotypiques d'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_{sat_2} et W_{sat_3}, en µmol mol^{-1}, respectivement pour les 2ème et 3ème pousses) et d'efficience de transpiration (TE, mg g^{-1}). Pour chaque régression, le coefficient de Pearson, ainsi que la p-value correspondante ont été indiqués. Le nombre de génotype est de 12. Les équations théoriques ont été déterminées selon les équations de l'encadré 3 avec les paramètres suivants: a = 4.4 ‰; b = 27‰; Φ_C et Φ_W ont été fixés à 40 et 15% respectivement (Cernusak *et al.*, 2007b); C_a et ν ont été moyennés sur toute la période d'expérimentation (ν=9 mmol mol^{-1}; C_a=401 µmol mol^{-1}); m_c représente la moyenne des pourcentages de carbone dans chacun des compartiments (en moyenne sur l'ensemble des plants: dans les feuilles: %C=47.3±0.4% ; dans les tiges: %C=45.9±0.3%; le pourcentage de carbone dans les racines a été estimé à 46%) pondérée par la masse de chacun de ces compartiments, d'où, en moyenne sur l'ensemble des plants: m_c=46.1±0.2%; le facteur d a été considéré comme négligeable.

peuvent expliquer cette situation: (i) l'ajustement n'est pas linéaire (Figure 10a: ajustement de type hyperbole non rectangulaire), (ii) chaque génotype a sa propre équation linéaire passant par zéro (équation que l'on pourrait obtenir en faisant varier les conditions environnementales pour chaque génotype, Figure 10b). Ces deux cas impliqueraient que certains facteurs de l'équation, qui en théorie sont fixes, varient entre génotypes. Une analyse de sensibilité de TE vis-à-vis des différents facteurs utilisés dans son calcul théorique (C_i/C_a, ν, Φ_C et Φ_W, cf encadré 1 pour les définitions) a permis de démontrer que TE était surtout dépendante de C_i/C_a et donc de W_i, mais que TE était aussi très sensible à ν et beaucoup moins à Φ_C et Φ_W (Cernusak *et al.*, 2007b). Dans notre étude, le dispositif expérimental ainsi que le fait de se baser sur des moyennes par génotype permettent de limiter l'effet environnemental. Il semble donc peu probable que des variations du déficit de fraction molaire entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν) interviennent dans la relation entre TE et W_i. Par contre, des variations de Φ_C et Φ_W entre génotypes sont envisageables, bien que nous n'ayons aucune données pour le confirmer.

Les différences d'efficience d'utilisation de l'eau à court terme entre génotypes de chêne pédonculé se répercutent donc sur l'efficience de transpiration, même s'il paraît évident que d'autres facteurs (présentant éventuellement une variabilité entre génotypes) sont impliqués dans la relation entre ces deux traits.

I.3.1.2 Discrimination isotopique du carbone et efficience d'utilisation de l'eau

Chez le chêne pédonculé, plusieurs études ont mis en évidence des corrélations entre efficience d'utilisation de l'eau et discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$). Cependant, ces relations ont souvent été obtenues sous conditions environnementales variables et confondent donc des effets génétiques avec des effets environnementaux. Des variations du climat lumineux (Ponton *et al.*, 2002) ont ainsi permis d'établir une relation entre W_i et $\Delta^{13}C$ de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}C_{Ft}$), d'équation $\Delta^{13}C_{Ft}$=-0.13*W_i +23.8 (R^2=0.75, $p<0.01$) (S. Ponton, communication personnelle). Une relation positive et significative a aussi pu être observée entre la composition isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire ($\delta^{13}C_{Ft}$) et W_i au sein de la famille F1 de plein-frères étudiée dans ce manuscrit (R^2=0.25-0.77; Brendel *et al.*, 2008). Picon *et al.* (1996b) ont obtenu une relation entre TE et $\Delta^{13}C_{Ft}$, d'équation $\Delta^{13}C_{Ft}$=-1.35*TE+31.9 (R^2=0.81, $p<0.05$) en faisant varier la contrainte hydrique pour une concentration ambiante en CO_2 atmosphérique. Cette relation n'est toutefois pas observée pour différentes conditions nutritionnelles azotées (Guehl *et al.*, 1995b).
Dans cette étude et quels que soient le type d'efficience d'utilisation de l'eau (intégrée ou intrinsèque) et le compartiment utilisé pour la détermination de la discrimination du carbone, les relations étaient toutes significatives et négatives (Tableau 6), comme prédit par la théorie (cf encadré 3).

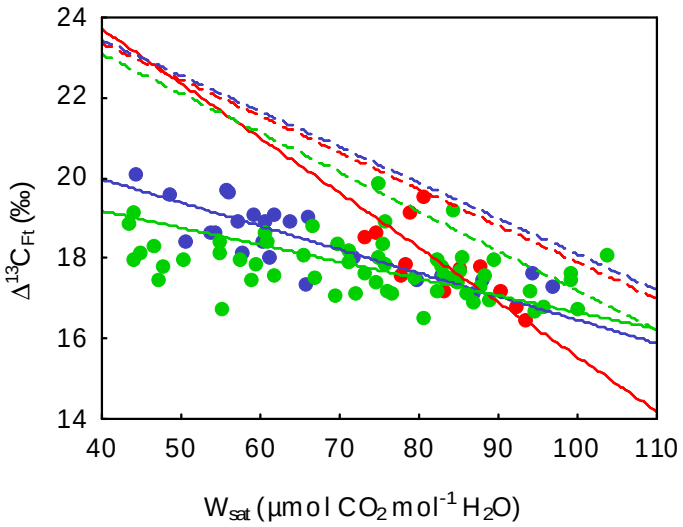


Figure 11: Relations entre la discrimination isotopique du carbone de la matière organique foliaire totale ($\Delta^{13}C_{Ft}$) et l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) mesurée en conditions standardisées (W_{sat}) au cours de trois expérimentations effectuées sur la même famille F1 de chêne pédonculé. Chaque point correspond à un génotype et chaque couleur à une expérimentation: en rouge, données relatives à l'expérimentation sur phénotypes extrêmes présentée dans le chapitre I.4.2.1, régression géométrique (trait plein): $\Delta^{13}C_{Ft}$=29.2-0.136*W_{sat}, droite théorique (traits pointillés): Δ=27-0.091*W_i (pour $\delta^{13}C_{air}$=-9.80‰ et C_a=394 µmol mol^{-1}); en bleu, données relatives à l'expérimentation sur phénotypes extrêmes présentée dans le chapitre I.4.2.2 auxquelles ont été ajoutées les données du phénotype "N", régression géométrique (trait plein): $\Delta^{13}C_{Ft}$=22.3-0.058*W_{sat}, droite théorique (traits pointillés): Δ=27-0.089*W_i (pour $\delta^{13}C_{air}$=-10.05‰ et C_a=401 µmol mol^{-1}); en vert, données relatives à l'expérimentation effectuée en 2006 sur 54 génotypes, régression géométrique (trait plein): $\Delta^{13}C_{Ft}$=20.9-0.042*W_{sat}, droite théorique (traits pointillés): Δ=27-0.098*W_i (pour $\delta^{13}C_{air}$=-8.42‰ et C_a=362 µmol mol^{-1}).

L'analyse de la signature isotopique en ^{13}C de différentes fractions métaboliques permet de diversifier les temps d'intégration des échanges gazeux ainsi que leur intégration spatiale. Cependant, étudier la signature isotopique en ^{13}C d'un échantillon associé à une intégration temporelle et/ou spatiale trop grande peut réduire la relation entre $\Delta^{13}C$ et W_i calculée à partir des échanges gazeux. De la même façon, étudier la signature isotopique en ^{13}C d'un échantillon associé à une intégration temporelle et/ou spatiale trop petite peut réduire la relation entre $\Delta^{13}C$ et TE. Dans cette étude de 2005, la comparaison des différentes régressions W_i *vs* $\Delta^{13}C$ a montré que seule l'ordonnée à l'origine était significativement variable (ANCOVA sur les données centrées, $p<0.05$). Il en est de même pour les régressions TE *vs* $\Delta^{13}C$. Les écarts d'ordonnées à l'origine peuvent être attribués aux mécanismes de discrimination post-photosynthétique qui modulent le signal isotopique de chaque composé (fractionnement, biochimique, pendant le transport des molécules, ou respiratoire). Par contre, ces phénomènes de discrimination post-photosynthétique n'affectent pas les différences relatives entre génotypes puisque les pentes sont similaires, quels que soient la fraction métabolique (cellulose ou matière organique totale) et l'organe (feuille ou tige) utilisés. Les coefficients de corrélations sont variables d'une régression à l'autre et sont plus importants pour les régressions faisant intervenir les discriminations isotopiques du carbone basées sur la cellulose extraite du bois ou le bois total ($\Delta^{13}C_{Bc}$ et $\Delta^{13}C_{Bt}$, respectivement). Cette observation est notamment remarquable pour les relations TE *vs* $\Delta^{13}C$. De ce fait, la discrimination isotopique du carbone déterminée pour des fractions métaboliques se référant à différents niveaux d'intégrations spatiales et temporelles des échanges gazeux, permet une meilleure estimation de TE.
Quoi qu'il en soit, dans cette étude de 2005, l'efficience d'utilisation de l'eau à court et à long termes peut être estimée sur la base des valeurs de $\Delta^{13}C$ quelle que soit la fraction métabolique et/ou l'organe analysé.

Ces régressions ont été construites à partir de valeurs obtenues pour des génotypes choisis selon des critères précis, à savoir des valeurs extrêmes de $\Delta^{13}C$. Cependant, ces douze génotypes balayaient toute la gamme de $\Delta^{13}C$ déterminée au sein de la famille de plein-frères (Figure 11). Pour confirmer la relation obtenue entre W_{sat} et $\Delta^{13}C$, des données supplémentaires ont été ajoutées. En effet, au cours de mon DEA et de mes deux premières années de thèse, W_{sat} et $\Delta^{13}C_{Ft}$ ont été estimés pour différents génotypes issus de la même famille, placés dans des conditions de culture similaires. Ces jeux de données ont permis de déterminer une régression pour chaque année (2004, 2005 et 2006). La figure 11 représente donc les différences entre génotypes de W_{sat} et de $\Delta^{13}C_{Ft}$ déterminés pour des conditions environnementales non-limitantes. Quelle que soit l'année, les régressions entre W_{sat} et $\Delta^{13}C_{Ft}$ sont relativement semblables. Toutefois, pour 2004, la pente est plus importante, mais les valeurs obtenues pour les génotypes étudiés s'alignent avec celles des génotypes des années suivantes. D'après cette

figure, nous pouvons donc conclure que les différences de $\Delta^{13}C$ entre génotypes sont représentatives des différences de W_i. De plus, cette relation est applicable à l'ensemble des génotypes de la famille.
Pour chacune de ces expérimentations, une droite théorique a pu être déterminée. Quelles que soient les expérimentations, pour un $\Delta^{13}C$ donné, la droite théorique surestime toujours la valeur de W_i (Figure 10). Les droites expérimentales diffèrent toutes de leur droite théorique respective pour les deux paramètres de l'équation, pente et ordonnée à l'origine (ANCOVA, $p<0.05$). Ceci montre donc que les facteurs fixés pour les équations théoriques ne sont peut-être pas bien ajustés pour le chêne pédonculé. Dans le modèle théorique simple (cf encadré 3), le facteur "b" représente la discrimination relative à l'assimilation du CO_2 par la Rubisco et la PEPc. Lorsqu'on effectue un ajustement sur des données expérimentales, la pente de la relation ou facteur "b'" représente facteur "b", mais peut aussi intégrer tous les autres facteurs décrits par le modèle complet. Ce dernier modèle fait apparaître le facteur "d" (cf encadré 3) qui résume les discriminations causées par la photorespiration, la respiration mitochondriale et la conductance interne du CO_2. D'autres processus impliquent des complications relatives à cette relation (hétérogénéité de l'ouverture stomatique, conductance cuticulaire; Brugnoli & Farquhar, 2000) et peuvent donc être à l'origine des divergences observées entre droites théoriques et expérimentales. Toutefois, même si l'ajustement observé et le modèle théorique ne concorde pas parfaitement, le classement des génotypes est conservé entre un calcul d'efficience d'utilisation de l'eau réalisé à partir de mesures directes, et $\Delta^{13}C$ utilisé comme estimateur de W_i.

Nous avons donc montré qu'une variabilité de $\Delta^{13}C$ entre génotypes reflétait une variabilité génotypique en efficience d'utilisation de l'eau, quel que soit le type d'analyse (W_i *vs* $\Delta^{13}C$ ou TE *vs* $\Delta^{13}C$). Ainsi, $\Delta^{13}C$ est un bon estimateur de W_i ($R^2>0.68$), mais aussi, dans le cadre de cette étude, d'une efficience d'utilisation de l'eau intégrée dans le temps et à l'échelle plante entière (TE) (R^2 compris entre 0.43 et 0.71). Puisque la variabilité de $\Delta^{13}C$ entre génotypes est liée à la variabilité de W_i et de TE, il y a donc de fortes chances pour que les QTL à effet fort détectés pour $\Delta^{13}C$ représentent des QTL liés à l'efficience d'utilisation de l'eau, confirmant ainsi les colocalisations obtenues par Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008).

I.3.2 Stabilité génotypique de l'efficience d'utilisation de l'eau estimée sur la base des valeurs de discrimination isotopique pour différentes fractions organiques et sous conditions environnementales variées

L'utilisation des isotopes de carbone est une technique simple à mettre en œuvre pour accéder à l'efficience d'utilisation de l'eau. De plus, l'analyse de la signature isotopique de fractions métaboliques variées permet de moduler les échelles d'intégration (spatiale et temporelle) des échanges gazeux.

Conditions de culture	Année	Nbre de génotypes communs	Age des boutures	Organe analysé	Matière organique analysée	Abréviations	Références
Plantation (P)	2000	17	3 ans	Feuille (F)	MO totale (t)	0_P_Ft_2	Brendel *et al.*, 2008
	2001	13	4 ans	Feuille (F)	MO totale (t)	1_P_Ft_2	
	2002	17	2 ans	Feuille (F)	MO totale (t)	2_P_Ft_2	
Serre (S)	2001	15	3 ans	Feuille (F)	MO totale (t)	1_S_Ft_3	Torti, 2005
		14		Bois (B)	Cellulose (c)	1_S_Bc_3	
	2004	12	1 an	Feuille (F)	Sucres solubles (s)	4_S_Fs_2	DEA, chapitre I.4.2.1
					Amidon (a)	4_S_Fa_2	
					MO totale (t)	4_S_Ft_2	
	2005	12	3 ans	Feuille (F)	MO totale (t)	5_S_Ft_2	Thèse, chapitre I.4.2.2
						5_S_Ft_3	
				Bois (B)	Bois sans écorce (t)	5_S_Bt_2	
					Cellulose (c)	5_S_Bc_2	

Tableau 7: Description des différentes expérimentations relatives à l'étude de la famille F1 de chêne pédonculé. Pour les expérimentations en serre (en 2001, 2004 et 2005), les plants ont été placés en conditions de croissance non-limitantes en eau et en fertilisation, sous contrôle de la température, à concentration ambiante de CO_2 et sous photopériode naturelle.
Signification des abréviations : le premier chiffre correspond à l'année de mesure; la lettre P ou S correspond au lieu de culture (P: plantation (sur le site de Bourran, Sud-Ouest de la France)) ou S: serre (à Nancy, Nord-Est de la France)); les deux lettres suivantes correspondent: à l'organe analysé (feuille ou bois), et au type de matière organique analysée (totale ou partielle), le dernier chiffre correspond à la pousse (2ème ou 3ème) utilisée.

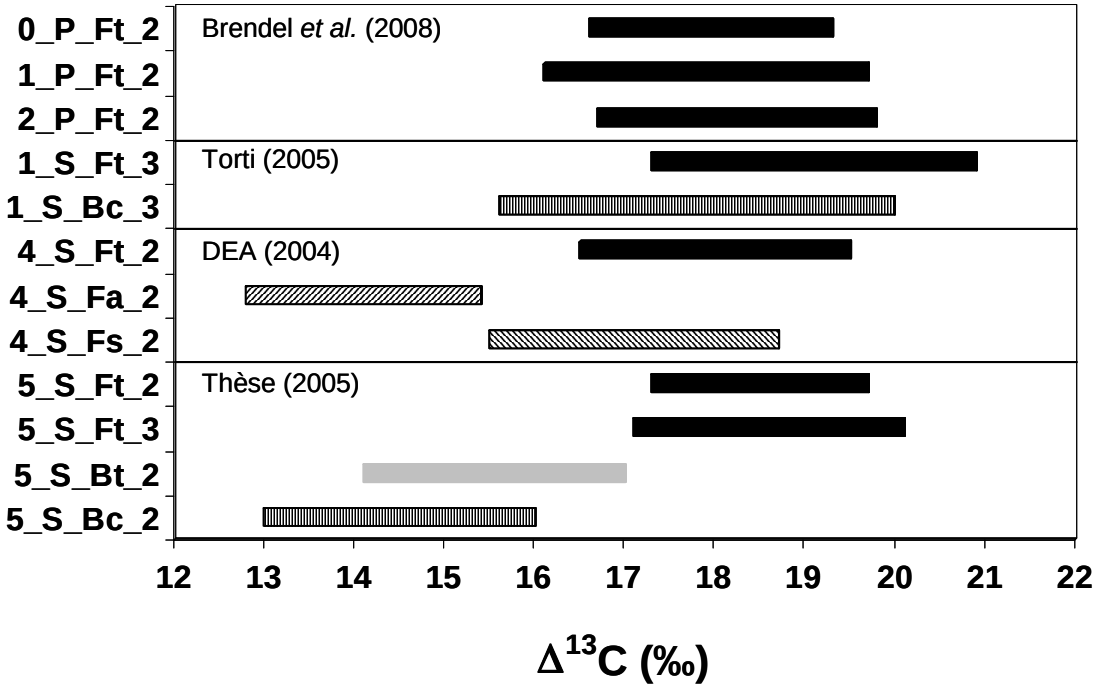


Figure 12: Gammes de valeurs (minimum et maximum) de discrimination isotopique de carbone pour les différentes campagnes de mesure. Cf Tableau 5 pour la liste d'abréviations.
Les mesures effectuées sur de la matière organique totale (feuille ou bois, en noir et gris, respectivement) sont représentées par des barres pleines. Les barres striées sont associées à des fractions métaboliques purifiées (\\\\ : sucres solubles foliaires; //// : amidon foliaire; |||| : cellulose extraite du bois).

Ainsi, les sucres solubles et l'amidon foliaires représentent, à l'échelle de la feuille, un temps d'intégration des échanges gazeux de l'ordre respectivement de un jour et une semaine environ (Brugnoli *et al.*, 1988; Jäggi *et al.*, 2002). L'analyse de la signature isotopique de la cellulose extraite d'un cerne donne une valeur intégrative des échanges gazeux (pondérée par le taux d'assimilation de carbone et les conditions environnementales) sur l'ensemble du houppier de l'arbre et sur toute la période de croissance de ce même cerne. La famille de chêne pédonculé, dont sont issus les génotypes présentés dans ce manuscrit, a été étudiée à de multiples reprises, pour différentes années, en conditions naturelles dans une plantation située à Bourran (Brendel *et al.*, 2008) et en serre à Nancy (thèse de X. Torti (2005) et mes données de DEA et de thèse). Nous disposions donc d'un jeu de données comprenant des valeurs de $\Delta^{13}C$ obtenues sur plusieurs années (avec des conditions différentes), sur de la matière organique foliaire totale, du bois, et des molécules à renouvellement rapide ou lent (Tableau 7). Ce jeu de données a permis de vérifier que les différences entre génotypes de chêne pédonculé sur la base des valeurs de $\Delta^{13}C$ étaient conservées, quelle que soit la fraction métabolique analysée ou les conditions expérimentales imposées.

1.3.2.1 Analyse de la discrimination isotopique des différentes fractions métaboliques

Les gammes de valeurs de $\Delta^{13}C$ étaient d'environ 3-4‰ quelle que soit l'expérimentation (Figure 12), ce qui correspond à une gamme d'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque de 45-60% pour chaque expérimentation sur les 17 génotypes utilisés. Cette gamme de 3‰ a aussi été observée en conditions naturelles par Ponton (2002) et correspond à la gamme définie par Torti (2005) et Brendel *et al*. (2008) sur plus de 200 génotypes de cette famille de plein-frères. Les génotypes choisis étaient donc représentatifs de la variabilité observée au sein de cette famille.

La figure 12 montre que le bois total, la cellulose extraite du bois ainsi que les sucres solubles et l'amidon foliaires présentaient, en moyenne, des valeurs de discrimination isotopique du carbone plus faibles que la matière organique foliaire totale, de 0.5‰ (entre les sucres solubles foliaires et la matière organique foliaire) à 4‰ (entre le bois et matière organique foliaire) (Figure 12). La matière organique foliaire totale est constituée d'un ensemble de molécules caractérisées par des signaux isotopiques variables (Figure 2). Des valeurs plus élevées de $\Delta^{13}C$ pour la matière organique foliaire (4_S_Ft_2, Figure 12) par rapport aux sucres solubles (4_S_Fs_2, Figure 12) ou encore à l'amidon (4_S_Fa_2, Figure 12) sont imputables en grande partie à la présence de lignine, très appauvrie en ^{13}C (Figure 2). Cette explication prévaut aussi pour le décalage de 1‰ observé entre le bois total et la cellulose extraite du bois (5_S_Bt_2 et 5_S_Bc_2, Figure 12). Après formation des premiers produits de la photosynthèse (sucres solubles), des mécanismes de fractionnement post-photosynthétique (dus aux processus biochimiques, au transport des molécules…) sont à l'origine de modifications de la signature isotopique des composés. Ainsi, l'amidon est enrichi d'environ 3‰ (4_S_Fa_2, Figure 12)

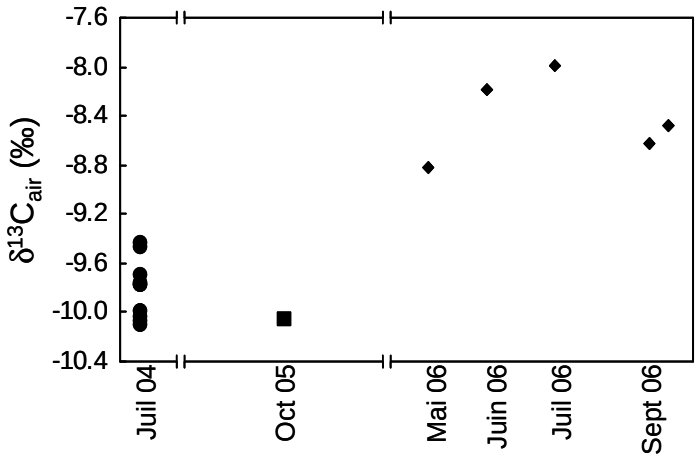


Figure 13: Composition isotopique en ^{13}C de l'air ($\delta^{13}C_{air}$) calculée à partir du $\delta^{13}C$ de la matière organique foliaire totale de maïs selon Marino & McElroy (1991). Chaque symbole représente une année et chaque point une mesure. Toutes ces valeurs ont été obtenues entre 2004 et 2006, dans la même serre, et pour du maïs cultivé dans des conditions de croissance similaires et non-limitantes.

par rapport aux sucres solubles foliaires (4_S_Fs_2, Figure 12). Des différences du même ordre de grandeur ont été observées par Brugnoli *et al.* (1988) pour du peuplier. De la même façon, la cellulose extraite du bois présente un $\Delta^{13}C$ plus faible que les sucres solubles foliaires (Brugnoli & Farquhar, 2000; Bowling *et al.*, 2008; cf Figure 2). Cependant, les écarts de $\Delta^{13}C$ entre sucres solubles foliaires et cellulose définis par ces deux revues sont moindres par rapport à ceux que nous avons obtenus (3‰) (Figure 12). De plus, ces écarts ne sont pas valables pour toutes les expérimentations. En effet, d'après la figure 12, des décalages parfois importants ont pu être mis en évidence pour les gammes de variations obtenues sur le même matériel organique, entre les différentes expérimentations. Ces décalages sont surtout flagrants pour les analyses de la cellulose extraite du bois entre l'expérimentation de Torti (2005) et ma première année de thèse (différence de 3.1‰ entre les moyennes calculées pour les deux expérimentations). Ces décalages de $\Delta^{13}C$ existent aussi pour la matière organique foliaire (différence maximum de 1.3‰ entre les moyennes calculées pour chaque expérimentation).

Pour la matière organique foliaire totale, les décalages de valeurs observées (Figure 12) peuvent être associés à des différences de composition biochimique (composition variable en lignine…) entre expérimentations. Ils peuvent aussi être attribués à des conditions environnementales variées (plantation *vs* serre), influençant indirectement la signature isotopique de la matière organique foliaire à travers des modulations de la photosynthèse et de l'ouverture stomatique. De plus, la période entre l'apparition des feuilles et leur récolte n'était pas fixe entre expérimentations. La période d'intégration des processus physiologiques et biochimiques foliaires est donc variable d'une expérimentation à l'autre. Ces décalages (pour la matière organique foliaire comme pour la cellulose) peuvent aussi être la conséquence d'un biais dû à la méthode d'estimation de la composition isotopique du CO_2 atmosphérique ($\delta^{13}C_{air}$). Pour les données de Brendel *et al.* (2008), $\delta^{13}C_{air}$ n'a pas été mesuré et a donc été fixé à -8‰ (Marino & McElroy, 1991; Farquhar & Lloyd, 1993). Pour les expérimentations réalisées en serre (Torti, 2005; DEA, 2004; Thèse, 2005), le calcul de $\delta^{13}C_{air}$ a été réalisé à partir de la composition isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire de maïs (Marino & McElroy, 1991). La précision attendue pour ce type de mesure est de 0.5‰ (Picon, 1996). D'autre part, au cours de mon DEA et de ma thèse (de 2004 à 2006), des valeurs de $\delta^{13}C_{air}$ ont été obtenues dans la même serre. $\delta^{13}C_{air}$ est variable d'une année à l'autre (-9.80‰, -10.05‰ et -8.42‰ en 2004, 2005 et 2006, respectivement), mais aussi d'un mois à l'autre (année 2006), où un écart de 0.8‰ peut être observé, ou pour une même date (juillet 2004) où une dispersion de 0.6‰ autour de la valeur moyenne a pu être calculée (Figure 13). $\delta^{13}C_{air}$ peut donc introduire une erreur sur la valeur de discrimination isotopique calculée. Toutefois, si toutes ces remarques peuvent expliquer les décalages observés pour la matière organique foliaire entre les différentes expérimentations, elles ne permettent pas de justifier l'écart (de 3.1‰) observé pour la cellulose entre les expérimentations de Torti (2005) et ma première année de thèse (2005). Seul un biais dû à la méthode d'extraction peut expliquer un tel écart. En effet, Ponton

		Brendel *et al.* (2008)			Torti (2005)		DEA (2004)			Thèse (2005)			
		0_P_Ft_2	1_P_Ft_2	2_P_Ft_2	1_S_Ft_3	1_S_Bc_3	4_S_Fs_2	4_S_Fa_2	4_S_Ft_2	5_S_Ft_2	5_S_Ft_3	5_S_Bt_2	5_S_Bc_2
Brendel *et al.* (2008)	0_P_Ft_2	*											
	1_P_Ft_2	**0.67** (13)	*										
	2_P_Ft_2	**0.66** (17)	**0.76** (13)	*									
Torti (2005)	1_S_Ft_3	**0.34** (15)	**0.58** (12)	**0.42** (15)	*								
	1_S_Bc_3	**0.59** (14)	**0.86** (12)	**0.69** (14)	**0.62** (14)	*							
DEA (2004)	4_S_Fs_2	**0.67** (12)	*0.37* (9)	**0.49** (12)	- (10)	**0.50** (9)	*						
	4_S_Fa_2	**0.86** (12)	**0.71** (9)	**0.76** (12)	*0.40* (10)	**0.69** (9)	**0.86** (12)	*					
	4_S_Ft_2	**0.77** (12)	**0.74** (9)	**0.67** (12)	*0.38* (10)	**0.67** (9)	**0.58** (12)	**0.81** (12)	*				
Thèse (2005)	5_S_Ft_2	**0.77** (12)	- (8)	**0.62** (12)	**0.37** (11)	*0.37* (10)	**0.67** (7)	**0.72** (7)	- (7)	*			
	5_S_Ft_3	**0.85** (12)	- (8)	**0.58** (12)	*0.30* (11)	**0.40** (10)	**0.67** (7)	**0.77** (7)	*0.46* (7)	**0.88** (12)	*		
	5_S_Bt_2	**0.61** (12)	- (8)	**0.58** (12)	- (11)	- (10)	**0.72** (7)	**0.81** (7)	*0.49* (7)	**0.79** (12)	**0.86** (12)	*	
	5_S_Bc_2	**0.58** (12)	- (8)	**0.55** (12)	- (11)	*0.36* (10)	**0.69** (7)	**0.79** (7)	*0.53* (7)	**0.71** (12)	**0.85** (12)	**0.95** (12)	*

Tableau 8: Coefficient de corrélation (R^2) entre les différentes mesures de discrimination isotopique du carbone pour les différentes campagnes de mesure. Cf Tableau 5 pour la liste des abréviations. Les valeurs de coefficient de corrélation pour les corrélations significatives ($p<0.05$) sont en gras. Lorsque les corrélations sont significatives à 10%, les coefficients de corrélation sont en italique. "-" signifie que la corrélation n'est pas significative. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de génotypes communs pour chaque corrélation.
En haut et à gauche, la partie grisée ▒ correspond aux corrélations obtenues par Torti (2005; 1_S_Ft_3 et 1_S_Bc_3) et Brendel *et al.* (2008; 0_P_Ft_2, 1_P_Ft_2 et 2_P_Ft_2). En bas et à droite, la partie grisée ■ correspond aux corrélations obtenues en serre en 2004 (4_S_Fs_2, 4_S_Fa_2 et 4_S_Ft_2), et en 2005 (5_S_Ft_2, 5_S_Ft_3, 5_S_Bt_2 et 5_S_Bc_2).

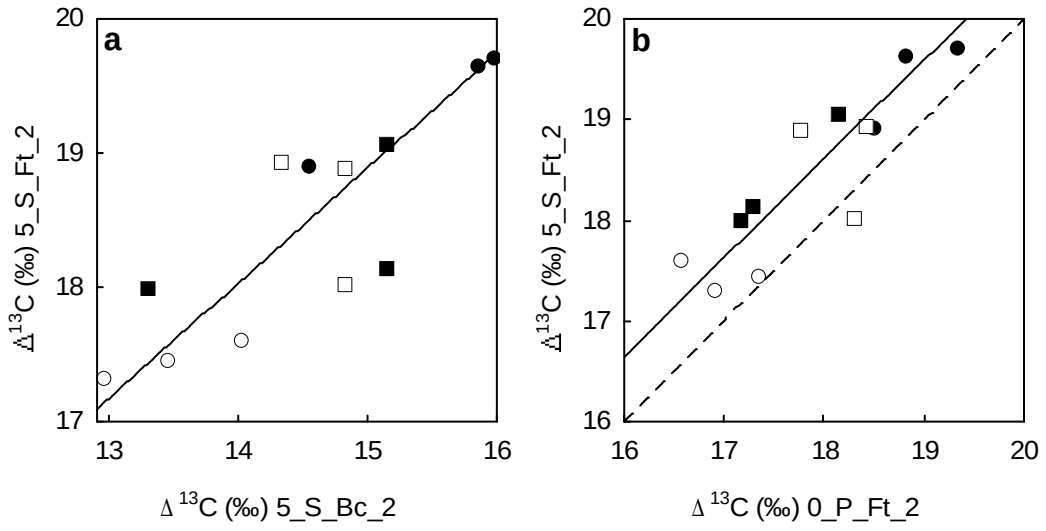


Figure 14: Régressions entre la discrimination isotopique contre le ^{13}C ($\Delta^{13}C$) déterminée en 2005, en serre, pour la matière organique foliaire totale et sur la deuxième pousse de l'année ($\Delta^{13}C$ (‰) 5_S_Ft_2) et (a) $\Delta^{13}C$ de la cellulose extraite du bois de la deuxième pousse ($\Delta^{13}C$ (‰) 5_S_Bc_2), la droite en trait plein représente la régression géométrique d'équation : $\Delta^{13}C_{5_S_Ft_2}=0.86*\Delta^{13}C_{5_S_Bc_2}+6.04$ ($R^2=0.71$, $p<0.001$); (b) $\Delta^{13}C$ de la matière organique foliaire totale déterminée en 2000, en plantation et sur la deuxième pousse de l'année ($\Delta^{13}C$ (‰) 0_P_Ft_2), la droite en trait plein représente la régression géométrique d'équation: $\Delta^{13}C_{5_S_Ft_2}=-0.98*\Delta^{13}C_{0_P_Ft_2}+0.91$ ($R^2=0.77$, $p<0.001$). Les tirets représentent la bissectrice.
Chaque point correspond à un génotype. Les symboles sont associés aux quatre extrêmes phénotypiques définis dans les chapitres I.4.2.1 et I.4.2.2: ○: génotypes "low Δ"; ●: génotypes "high Δ"; □ : génotypes "low N"; ■: génotypes "high N".

(2002) a montré que la méthode d'extraction pouvait avoir une influence sur le signal de la cellulose. L'obtention de cellulose pure n'est parfois pas parfaitement réalisée, et il peut y avoir contamination avec de la lignine notamment, ce qui peut expliquer des décalages vers des valeurs plus élevées de $\Delta^{13}C$.

Malgré ces décalages, est-ce que les différences relatives entre génotypes sont maintenues à l'intérieur de la gamme de 3-4‰ observée, entre expérimentations et entre fractions métaboliques pour une même expérimentation? Pour répondre à cette question, la stabilité phénotypique des génotypes a été vérifiée à l'aide de corrélations établies entre les différentes campagnes de mesure (Tableau 8). Sur 66 corrélations effectuées avec un nombre de génotypes variant entre 7 et 17, quasiment les 3/4 étaient significatives à 5% avec un R^2 compris entre 34 et 96% (Tableau 8), et 9 d'entre elles étaient significatives à 10%. Un test de Spearman a aussi été effectué afin de vérifier que les rangs des génotypes étaient conservés quelle que soit l'année et/ou la fraction métabolique analysée. Les résultats sont identiques à la matrice de corrélation présentée sur le tableau 8, excepté l'absence de corrélation entre 1_S_Bc_3 et 5_S_Bc_2. Les deux sous-chapitres suivants analysent plus précisément les corrélations intra-expérimentation (pour différentes fractions métaboliques) et inter-années (pour le même matériel organique) observées.

I.3.2.2 Stabilité des différences entre génotypes pour différentes fractions métaboliques: analyse intra-expérimentation

Cette analyse "intra-expérimentation" a été effectuée sur les données de Torti (2005), de mon DEA (2004) et de ma première année de thèse (2005). La figure 14a illustre une des régressions obtenues en 2005 entre la matière organique foliaire totale et la cellulose extraite du bois. Les régressions "intra-expérimentation" présentaient des pentes proches de 1 (1.06±0.14 en moyenne (±écart-type) pour toutes les régressions). Une pente proche de 1 signifie donc que la variabilité créée par l'ensemble des génotypes étudiés est similaire quel que soit le matériel organique analysé. Ces régressions étaient toutes significatives ($p<0.05$ et R^2 compris entre 0.58 et 0.95) (Tableau 8). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les différences relatives entre génotypes étaient conservées entre organes (feuille et bois; R^2=0.79-0.86 en 2005), entre pousses (R^2=0.88, en 2005), entre fractions purifiées (R^2=0.86 entre amidon et sucres solubles en 2004), et entre matière organique et fractions purifiées (feuille ou bois *vs* amidon, sucres solubles ou cellulose; $0.58<R^2<0.95$).
En 2004 et 2005, disposant de plusieurs copies par génotype, nous avons pu tester, sur chaque jeu de données, un effet génotype, un effet de la matière organique et l'interaction entre les deux. Ces deux analyses mettent en évidence des effets significatifs du génotype et du type de matière organique utilisée ($p<0.05$). L'interaction entre génotype et matière organique n'est pas significative ($p=0.17$ en 2004 et $p=0.90$ en 2005). Ainsi, quels que soient les effets des mécanismes de fractionnement post-

photosynthétique sur le signal isotopique des molécules, la composition biochimique des échantillons ou la pousse étudiée, les différences relatives entre génotypes sont conservées.

D'après cette analyse "intra-expérimentation", aucune différence entre génotypes pour les processus de fractionnement post-photosynthétique n'a donc été détectée. D'autre part, quelle que soit l'échelle spatiale (feuille ou plante entière) et temporelle (de quelques jours à plusieurs mois) à laquelle renvoient ces régressions, les différences entre génotypes sont relativement stables. Ces résultats suggèrent donc que les différents niveaux d'intégration de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque pondérée par l'assimilation, estimée par la discrimination isotopique du carbone, ne perturbent pas de façon marquée les différences entre génotypes.

I.3.2.3 Stabilité environnementale des différences entre génotypes: analyse inter-années

Pour analyser la stabilité phénotypique des génotypes entre expérimentations, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la matière organique foliaire (déterminée lors de chaque campagne de mesures; Tableau 7), et à la cellulose (étudiée à deux reprises; Tableau 7). La figure 14b illustre une des régressions obtenues pour les valeurs génotypiques de $\Delta^{13}C$ de la matière organique foliaire totale entre deux années de mesure (2000 et 2005) et deux conditions de culture différentes (plantation et serre).

Contrairement à l'analyse précédente, toutes les régressions n'étaient pas significatives. Sur 21 régressions, 14 étaient significatives à 5%, avec un R^2 compris entre 0.34 et 0.85, et 4 étaient significatives à 10%, dont celle corrélant les valeurs de $\Delta^{13}C$ de la cellulose (Torti (2005) *vs* thèse (2005), Tableau 8). Pour ces régressions, les pentes étaient, en moyenne (± écart-type), de 0.92±0.31, ce qui signifie donc que même si la gamme de variabilité créée par les génotypes est relativement conservée d'une expérimentation à l'autre, certaines gammes sont plus importantes que d'autres (Figure 12).

Pour la matière organique foliaire, de faibles corrélations, voire des corrélations inexistantes ont surtout été mises en évidence entre les données de Brendel *et al*. (2008) pour l'année 2001 (1_P_Ft_2) ou de Torti (2005) (1_S_Ft_3), et les données obtenues au cours de mon DEA (4_S_Ft_2) et de ma thèse (5_S_Ft_2 et 5_S_Ft_3) (Tableau 8). Contrairement aux autres expérimentations, le nombre de copies par génotype était moindre en 2001. En effet, Brendel *et al*. (2008) n'ont utilisé, en 2001, que deux copies par génotype. Selon le génotype, ces copies pouvaient être spatialement éloignées l'une de l'autre ou proches dans la plantation (O. Brendel, communication personnelle). Ainsi, la moyenne génotypique calculée pour 2001 a pu être biaisée par des facteurs micro-environnementaux non contrôlés. L'étude de Torti (2005), quant à elle, ne comportait qu'une seule copie par génotype et une

variabilité micro-environnementale à l'intérieur de la serre n'était pas à exclure. D'autre part, des différences de composition biochimique des feuilles (dues à des conditions environnementales variées) peuvent aussi entraîner une variabilité, autre que génotypique, autour de ces relations. Pour la cellulose, une corrélation significative à 10% a été mise en évidence entre expérimentations (1_S_Bc_3 *vs* 5_S_Bc_2, Tableau 8). Si, toutefois, des problèmes d'extraction sont à l'origine des décalages de gammes de variation observées entre ces deux études, il est probable que cela puisse aussi avoir une influence sur la qualité de la relation obtenue.

Malgré tout, 67% des corrélations étaient significatives à 5%. Ces résultats confirment donc que les différences entre génotypes de $\Delta^{13}C$ sont relativement conservées d'une année sur l'autre et pour des environnements contrastés (Lauteri *et al.*, 1997; Johnsen *et al.*, 1999; Guehl *et al.*, 2004). Ils corroborent aussi l'hypothèse d'un contrôle génétique de $\Delta^{13}C$ dans cette famille F1 de chêne pédonculé, que ne parviennent pas à masquer des conditions environnementales variables.

I.4 Causes anatomiques et/ou physiologiques de la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau

Le chapitre précédent a permis de montrer que la discrimination isotopique du carbone était sous contrôle génétique fort dans cette famille de chêne pédonculé. Nous avons aussi démontré que les différences de $\Delta^{13}C$ entre génotypes étaient représentatives des différences d'efficience d'utilisation de l'eau à court et à long termes. W_i est un caractère complexe impliquant les deux grandes fonctions physiologiques: photosynthèse et conductance stomatique pour la vapeur d'eau, elles-mêmes liées à des composantes physiologiques ou anatomiques multiples. L'objectif de ce travail était donc de déterminer quelles étaient, parmi toutes ces composantes, celle(s) qui contribuai(en)t le plus à la variabilité de $\Delta^{13}C/W_i$ dans cette famille F1 de chêne pédonculé.

Nous avons tout d'abord analysé les corrélations globales entre l'efficience d'utilisation de l'eau et ses composantes directes (au niveau foliaire: assimilation nette de CO_2 et conductance stomatique pour la vapeur d'eau; au niveau plante entière et intégré dans le temps: biomasse et quantité d'eau transpirée). En ce qui concerne les relations à l'échelle foliaire, l'analyse a été effectuée sur l'ensemble des données recueillies au cours de mon DEA et de ma thèse. Pour les données plante entière, seule l'expérimentation de 2005 a permis d'effectuer cette analyse. Suite à cette analyse globale, une étude plus fine des traits liés à chacune de ces composantes a été réalisée à l'aide des phénotypes extrêmes. Ces résultats ont été présentés sous forme de deux publications. La première publication (chapitre I.4.2.1) reprend les résultats obtenus en 2004 (expérience menée pendant mon stage de DEA) et se limite à quelques traits foliaires mesurés sur les deux phénotypes. La deuxième publication (chapitre I.4.2.2), correspondant aux résultats obtenus lors de ma première année de thèse (2005), ne présente que les différences phénotypiques observées entre extrêmes du phénotype "Δ", mais pour un plus grand nombre de traits foliaires auxquels ont été ajoutés des traits "plante entière". Lors de ma première année de thèse (2005), les différences existant au sein du phénotype "N" ont aussi été étudiées. Mais, les résultats étant similaires à ceux obtenus en 2004 (chapitre I.4.2.1), nous n'avons pas jugé utile de les faire apparaître dans la deuxième publication (chapitre I.4.2.2).

I.4.1 Variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau et de ses composantes au sein de cette famille de chêne pédonculé

Les deux composantes de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) sont l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). De ce fait, à l'échelle foliaire, la variabilité de W_i peut être liée soit à l'assimilation, soit à la conductance stomatique, soit aux deux. A et g_s sont très fortement corrélés pour des génotypes appartenant à une même espèce, comme cela a été observé au sein de plusieurs espèces ligneuses (Lauteri *et al.*, 1997; Roupsard *et al.*, 1998; Monclus *et*

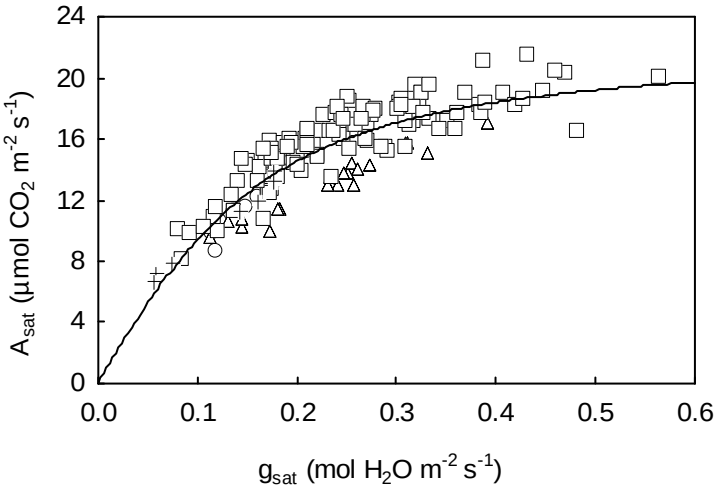


Figure 15: Relation entre l'assimilation nette de CO_2 (A_{sat}) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{sat}) pour l'ensemble des données recueillies sur cette famille F1 de chêne pédonculé en serre et en conditions non-limitantes de croissance. Chaque point correspond à un génotype et chaque symbole correspond à une expérimentation: ○, données relatives à l'expérimentation sur phénotypes extrêmes présentée dans le chapitre I.4.2.1; △, données relatives à l'expérimentation sur phénotypes extrêmes présentée dans le chapitre I.4.2.2 auxquelles ont été ajoutées les données du phénotype "N"; □, données relatives à l'expérimentation effectuée en 2006 sur 54 génotypes; +, données (déterminées pour un VPD (déficit de pression de vapeur d'eau) <1.5kPa) issues de l'expérimentation visant à analyser la variabilité de réponse de la conductance stomatique au VPD présentée en annexe 1. L'ajustement utilisé est une hyperbole non rectangulaire (—), d'équation: $A_{sat}=(22.1+115.4*g_{sat} -((22.1+115.4*g_{sat})^2-2.8*22.1*115.4*g_{sat})^{½})/1.4$, $R^2=0.79$.

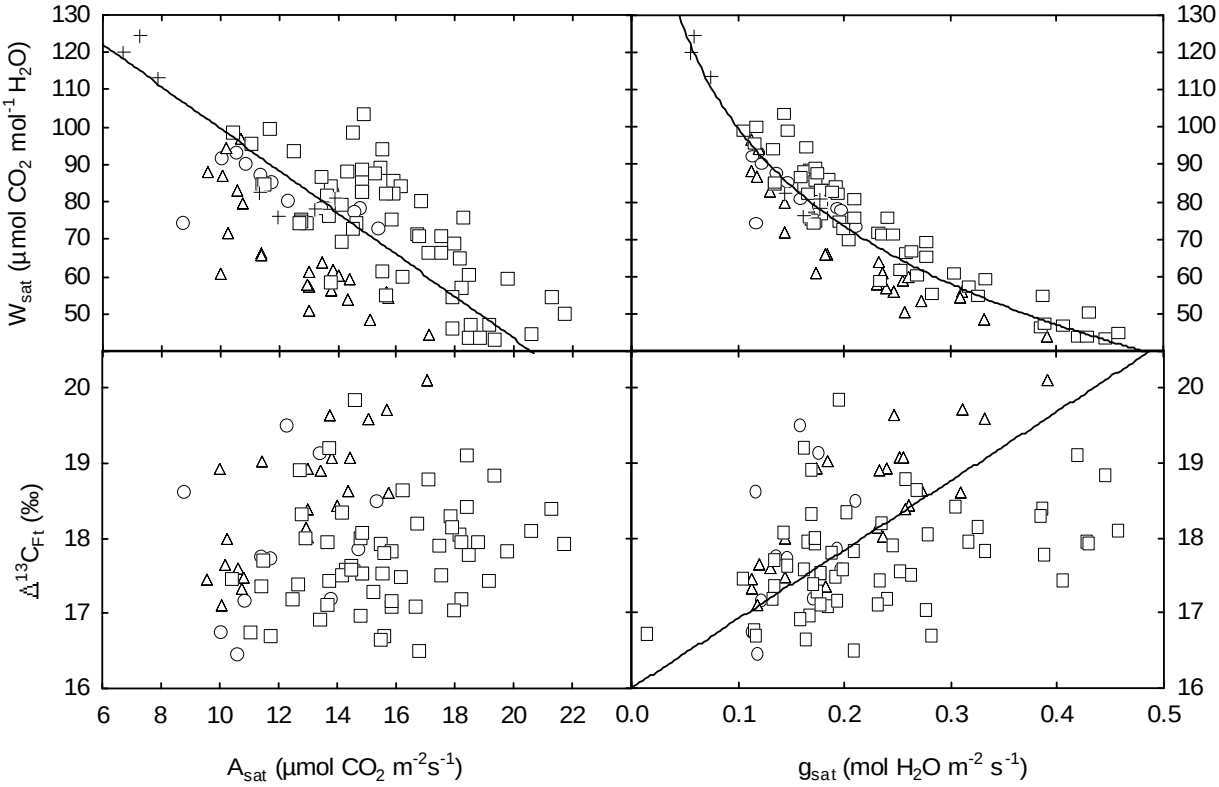


Figure 16: Relations entre la discrimination isotopique contre le ^{13}C déterminée sur la matière organique foliaire totale ($\Delta^{13}C_{Ft}$), l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque déterminée à l'aide de mesure d'échanges gazeux en conditions standardisées (W_{sat}), l'assimilation nette de CO_2 (A_{sat}) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{sat}) pour l'ensemble des données recueillies sur cette famille F1 de chêne pédonculé en serre et en conditions non-limitantes de croissance. Chaque point correspond à un génotype et chaque symbole correspond à une expérimentation: ○, données relatives à l'expérimentation sur phénotypes extrêmes présentée dans le chapitre I.4.2.1; △, données relatives à l'expérimentation sur phénotypes extrêmes présentée dans le chapitre I.4.2.2 auxquelles ont été ajoutées les données du phénotype "N"; □, données relatives à l'expérimentation effectuée en 2006 sur 54 génotypes; +, données (déterminées pour un VPD (déficit de pression de vapeur d'eau) <1.5kPa) issues de l'expérimentation visant à analyser la variabilité de réponse de la conductance stomatique au VPD présentée en annexe 1.

Les droites en traits pleins représentent les régressions géométriques d'équations: $W_{sat}=-5.6*A_{sat}+155.9$ ($R^2=0.42$, $p<0.001$); $W_{sat}=-38.0*Ln(g_{sat})+12.3$ ($R^2=0.86$, $p<0.001$); $\Delta^{13}C_{Ft} =9.2*g_{sat}+16.0$ ($R^2=0.15$, $p<0.001$). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre A_{sat} et $\Delta^{13}C_{Ft}$.

al., 2006). Dans cette étude, une corrélation globale a pu être tracée entre A_{sat} et g_{sat} pour les différents génotypes de chêne pédonculé étudiés de 2004 à 2006 (R^2=0.79, Figure 15). Cette relation montre qu'un génotype avec une forte conductance stomatique est aussi caractérisé par une forte assimilation nette de CO_2 pour les conditions imposées (pour la croissance et pendant la mesure). L'ajustement réalisé sur les données expérimentales montre aussi une saturation de l'assimilation nette de CO_2 pour de fortes conductances stomatiques. Ainsi, pour les génotypes placés sur ce plateau, une augmentation de conductance stomatique n'est pas accompagnée par une augmentation proportionnelle d'assimilation nette de CO_2, ce qui se traduit *in fine* par un W_{sat} d'autant plus bas que g_{sat} est fort pour ces génotypes. Les génotypes se trouvant sur la partie linéaire de l'ajustement ont, quant à eux, des valeurs de W_{sat} similaires, puisque les variations de A_{sat} sont compensées par des variations de g_{sat} pour cette partie de la courbe. D'après la figure 15, la variabilité de g_{sat} entre génotypes est supérieure à la variabilité de A_{sat}. En effet, les coefficients de variation de g_{sat}, quelle que soit l'année, sont compris entre 22 et 40% contre 16-17% pour A_{sat}. Une corrélation négative est alors attendue entre W_{sat} et ses deux composantes (cf cas i Figure 4), ce qui est confirmé par nos données expérimentales (Figure 16).

Sur la figure 16, seules les régressions globales pour l'ensemble des données acquises au cours de mon DEA et de ma thèse (de 2004 à 2006) ont été tracées. Quelle que soit l'année, les mesures d'échanges gazeux ont été effectuées dans des conditions standardisées et identiques. Le signal isotopique intègre, quant à lui, les processus physiologiques et environnementaux sur des durées différentes selon les années: la période de temps séparant l'apparition des feuilles et la récolte ayant été variable d'une année à l'autre. La variabilité autour des relations globales est beaucoup plus importante pour les relations faisant intervenir $\Delta^{13}C$ (Figure 16). Cette variabilité est surtout causée par les données relatives à 2006. Au cours de cette expérimentation, seule une copie par génotype a été analysée, et une forte hétérogénéité des tailles, bien plus marquée entre individus que pour les années précédentes, a été observée. De plus, en 2006, les analyses de $\Delta^{13}C$ et d'échanges gazeux n'ont pas été réalisées sur les mêmes pousses. Toutefois, ces régressions montrent qu'un génotype caractérisé par une forte efficience d'utilisation de l'eau (forte W_i ou faible $\Delta^{13}C$) est caractérisé par de faibles conductance stomatique et assimilation nette de CO_2. Ainsi, dans cette famille de chêne pédonculé, et en conditions non-limitantes, W_{sat} (ou $\Delta^{13}C_{Ft}$) est plus influencé par la conductance stomatique que par l'assimilation nette de CO_2.

D'après les études de Torti (2005) et de Brendel *et al.* (2008), la variabilité de $\Delta^{13}C$ observée au sein de cette famille de chêne pédonculé ne pouvait être clairement attribuée à l'assimilation nette de CO_2 (A) ou à la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). En effet, des QTL liés à la variabilité de ces deux composantes ou de leurs estimateurs étaient colocalisés avec les QTL liés à la variabilité de $\Delta^{13}C$ (Figure 8). Toutefois, Brendel *et al.* (2008) ont trouvé une corrélation positive entre les valeurs génotypiques de W_i et celles de A. Dans l'étude de Torti (2005), les relations étaient variables en fonction de la pousse étudiée, mais d'une manière générale cette étude montre une relation négative

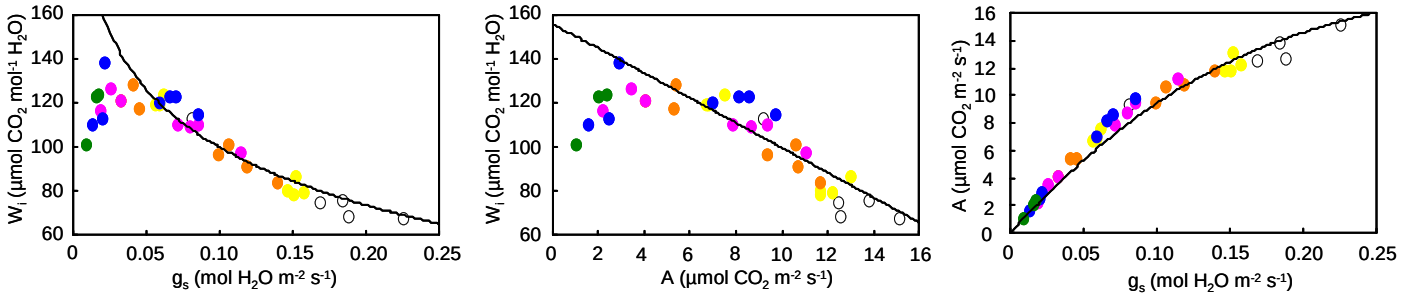


Figure 17: Relations entre l'assimilation nette de CO_2 (A), la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) et l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i=A/g_s) sous conditions variables de déficit de pression de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (VPD). Chaque point représente la moyenne calculée pour 5 à 8 feuilles d'un génotype distinct. Les points de différentes couleurs représentent les différentes conditions de VPD sous lesquelles les mesures d'échanges gazeux ont été réalisées: ○ : VPD<1 kPa; ●: 1<VPD<1.5kPa; ●: 1.5<VPD<2.0kPa; ●: 2.0<VPD<2.5kPa; ●: 2.5<VPD<3.0kPa; ●: VPD>3kPa. Les courbes en traits pleins représentent les relations globales trouvées dans cette étude (cf Figures 12, 13): W_{sat}=-5.6*A_{sat}+155.9 (R^2=0.42, p<0.001); W_{sat}=-38.0*Ln(g_{sat})+12.3 (R^2=0.86, p<0.001); A_{sat}=(22.1+115.4*g_{sat}-((22.1+115.4*g_{sat})^2-2.8*22.1*115.4*g_{sat})^{½})/1.4, R^2=0.79.

	Δ^{13C}_{Ft}	Δ^{13C}_{Bt}	Δ^{13C}_{Bc}	TE	W_{sat}	biom	TPT	A_{sat}	g_{sat}
biom	-	-		-	-	*			
TPT	0.68	0.73	0.75	-0.59	-0.65	-	*		
A_{sat}	0.83	0.89	0.89	-0.76	-0.84	-	0.78	*	
g_{sat}	0.88	0.94	0.93	-0.81	-0.91	-	0.75	0.98	*

Tableau 9: Relations entre les moyennes génotypiques de discrimination isotopique contre le ^{13}C ($\Delta^{13}C$) de la matière organique foliaire totale ($\Delta^{13}C_{Ft}$), de $\Delta^{13}C$ de la cellulose extraite du bois ($\Delta^{13}C_{Bc}$), de $\Delta^{13}C$ du bois total ($\Delta^{13}C_{Bt}$), d'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_{sat}), d'efficience de transpiration (TE), de biomasse produite (biom), de quantité d'eau transpirée par unité de surface (TPT), d'assimilation nette de CO_2 (A_{sat}, mesurées en conditions standardisées) et de conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{sat}, mesurées en conditions standardisées). Les trois traits TE, biom et TPT ont été déterminés sur toute la période d'expérimentation (six mois environ). Seules les corrélations significatives (p<0.05) sont notées. "-" indique une corrélation non significative.

entre W_i et g_s quelle que soit la pousse, et des relations soit non significatives, soit positives entre W_i et A.

Les régressions présentées sur la figure 16 sont dont en accord avec les relations observées par Torti (2005), mais contredisent celles décrites par Brendel *et al.* (2008). Cependant, lors de l'étude de Brendel *et al.* (2008), les mesures d'échanges gazeux ont été effectuées en 2001, année présentant un déficit de pression de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère élevé (compris entre 1.5 et 4.5 MPa; Brendel *et al.*, 2008). Or, les relations observées entre ces traits sont fortement dépendantes des conditions climatiques. En effet, lorsque les conditions d'humidité de l'air sont modifiées, toute chose égale par ailleurs, la variabilité de W_i entre génotypes peut soit être expliquée par A, soit par g_s (Figure 17) selon sur quelle portion de la courbe A *vs* g_s se trouvent les génotypes. Lorsqu'ils sont dans la partie basse de la courbe (VPD>3kPa), la variabilité de W_i est alors contrôlée par A, ce qui explique la relation positive observée entre W_i et A ou g_s. Lorsque le VPD diminue, les relations entre W_i et A ou g_s se transforment progressivement en relations négatives (Figure 17).

Nous avons ensuite vérifié que ce qui était observé à l'échelle foliaire pouvait aussi être extrapolé à l'échelle plante entière. Cette analyse s'est basée sur les données obtenues en 2005 sur l'ensemble des génotypes (douze en tout) de cette expérimentation pour lesquels nous avions mesuré l'efficience de transpiration (TE), la quantité d'eau transpirée par unité de surface foliaire (TPT) et le gain de biomasse (biom) sur toute la période de végétation. Le tableau 9 montre que, à l'échelle plante entière et intégrée dans le temps, TE est négativement corrélée à TPT, ce qui se traduit par une corrélation positive entre $\Delta^{13}C$ et TPT. D'autre part, TPT est aussi très fortement corrélé aux traits foliaires (A_{sat}, g_{sat}, W_{sat}), montrant ainsi que, dans cette étude, les profils observés à l'échelle foliaire sont extrapolables à l'échelle plante entière et intégrée dans le temps. La variabilité entre génotypes du gain de biomasse n'est, quant à elle, corrélée ni à TE, ni à $\Delta^{13}C$, ni aux échanges gazeux (Tableau 9). Cependant, cette absence de relation, dans les conditions de l'étude, ne signifie pas que sous d'autres conditions, ces corrélations n'apparaissent pas.

Les relations globales mises en évidence dans ce chapitre montrent que ces résultats sont extrapolables à l'ensemble de la famille de chêne pédonculé, mais seulement si les individus sont placés dans des conditions similaires à celles imposées dans ce travail. Ainsi, en conditions non-limitantes, les différences entre génotypes de W_i sont vraisemblablement déterminées par une variabilité entre génotypes de la conductance stomatique plutôt que par une variabilité entre génotypes des capacités photosynthétiques. Ces profils sont aussi valables à l'échelle plante entière et intégrée dans le temps, dans les conditions de cette étude. En effet, un génotype avec une forte efficience d'utilisation de l'eau (fort TE) est alors caractérisé par une quantité d'eau transpirée par unité de surface plus faible qu'un génotype présentant un faible TE, pour une biomasse égale.

I.4.2 Etudes des phénotypes extrêmes

L'analyse des corrélations a permis de montrer qu'en conditions non-limitantes, la conductance stomatique était à l'origine de la variabilité de $\Delta^{13}C$ observée. Or, les composantes A et g_s sont elles-mêmes liées à plusieurs traits anatomiques ou physiologiques. L'objectif de ce chapitre était donc de disséquer ces deux caractères en leurs multiples composantes. Ne pouvant pas travailler sur l'ensemble des individus de cette famille, seuls les extrêmes phénotypiques pour les valeurs de $\Delta^{13}C$ mesurées par Brendel *et al*. (2008), mais aussi pour les contenus foliaires en azote et en chlorophylle ont été retenus. Deux phénotypes ont ainsi été définis: le phénotype "Δ" constitué de six génotypes (2 extrêmes x 3 plein-frères ou génotypes par extrême) extrêmes pour les valeurs de $\Delta^{13}C$ sur trois années consécutives de mesure, et le phénotype "N" composé de six génotypes (2 extrêmes x 3 plein-frères ou génotypes par extrême), extrêmes pour leurs contenus foliaires en azote et en chlorophylle et leurs valeurs de $\Delta^{13}C$. Sur ces phénotypes, de nombreux traits foliaires ou "plante entière" ont été mesurés. Pour chacun de ces traits, les comparaisons ont été effectuées entre extrêmes faible ("low") et fort ("high") de chaque phénotype. Cette approche "phénotype extrême" a fait l'objet de deux publications. La première publication (chapitre I.4.2.1) concerne des résultats obtenus sur les deux phénotypes extrêmes lors de mon DEA, alors que la seconde (chapitre I.4.2.2), qui est une étude plus approfondie des traits physiologiques, anatomiques et plante entière, ne traite que du phénotype "Δ" (résultats obtenus en 2005).

I.4.2.1 Diversity of water use efficiency in a Quercus robur family: contribution of related leaf traits

Magali ROUSSEL, Didier LE THIEC, Pierre MONTPIED, Nathalie NINGRE, Jean-Marc GUEHL, Oliver BRENDEL*

Revised Version submitted to AFS on the 18 november 2008 MS ID **f08120**

INRA, UMR1137 INRA - Nancy-Université « Ecologie et Ecophysiologie Forestières », IFR 110 F-54280 CHAMPENOUX.

***Corresponding author** : Oliver BRENDEL; INRA Nancy, F 54280 CHAMPENOUX ; Phone: +33 (0)3 83 39 41 00 ; fax: +33 (0)3 83 39 40 22 ; brendel@nancy.inra.fr

Short title: Diversity of water use efficiency in oak

Key words: carbon isotope discrimination / intrinsic water use efficiency / pedunculate oak / stomatal conductance / stomatal density

Abstract

Previously, a large intra-specific diversity and a tight genetic control has been shown for $\Delta^{13}C$ (carbon isotope discrimination) in a pedunculate oak (*Quercus robur* L.) family, which is an estimator for intrinsic water use efficiency (W_i), a complex trait defined as the ratio of net CO_2 assimilation rate (A) to stomatal conductance for water vapour (g_s). In the present study, twelve genotypes with extreme phenotypic values of $\Delta^{13}C$ were selected within this family to (i) asses the stability of genotype differences across contrasting environments and for different measures of intrinsic water use efficiency (W_i); (ii) Quantify the relationship between $\Delta^{13}C$ and W_i within this family; (iii) Identify which leaf traits drive the diversity in W_i observed in this family. Genetic variability of $\Delta^{13}C$ and W_i was largely independent from different temporal integration scales and their correlation was found to be strong (R^2=88% for leaf sugars) within this family. Weak correlations between measures of W_i with estimators of photosynthetic capacity, suggest a minor role of the latter in the diversity of W_i. However, the tight correlation between g_s and $\Delta^{13}C$ as well as W_i, and the related genotypic variation in stomatal density, suggest that the genotypic diversity in W_i within this pedunculate oak family might be due to differences in g_s.

List of abbreviations:

$\Delta^{13}C$: ^{13}C isotope discrimination [‰]; $\Delta^{13}C_{su}$: $\Delta^{13}C$ of extracted leaf sugars; $\Delta^{13}C_{st}$: $\Delta^{13}C$ of extracted leaf starch; $\Delta^{13}C_b$: $\Delta^{13}C$ of bulk leaf material; $\delta^{13}C$: carbon isotope composition [‰]; $\delta^{13}C_{air}$: $\delta^{13}C$ of atmospheric CO_2 in the greenhouse; c_i: CO_2 mole fraction in intercellular air spaces [µmol mol^{-1}]; c_a: atmospheric CO_2 mole fraction [µmol mol^{-1}]; W_i: intrinsic water use efficiency [µmol mol^{-1}]; A: net CO_2 assimilation rate[µmol m^{-2} s^{-1}]; A_{sat}: light saturated A at ambient CO_2 concentration; g_s: stomatal conductance for water vapour [mol m^{-2} s^{-1}]; V_{cmax}: apparent maximum carboxylation rate of Rubisco [µmol m^{-2} s^{-1}]; N_{mass}: nitrogen content on a mass basis [mg g^{-1}]; N_{area}: nitrogen content on an area basis [g m^{-2}]; Chl: chlorophyll content [g m^{-2}]; SD: stomatal density [mm^{-2}]; SL: stomatal length [µm]; SA: stomatal area [µm^2]; SAI: stomatal area index [mm^{-1}]; LMA: leaf mass-to-area ratio [g m^{-2}]; TLT: total leaf thickness [µm]; UET: upper epidermis thickness [µm]; LET: lower epidermis thickness [µm]; PMT: palisade mesophyll thickness [µm]; SMT: spongy mesophyll thickness [µm].

Introduction

A large intra-specific variability of ^{13}C isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) has been observed within natural stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.; Ponton *et al.*, 2001), a widespread broad-leaved forest tree species from Western Europe. Leaf $\Delta^{13}C$ is a widely used estimator of intrinsic water use efficiency, W_i, defined as the ratio of net CO_2 assimilation rate (A) to stomatal conductance for water vapour (g_s). The predicted relationship between $\Delta^{13}C$ and W_i is negative (Farquhar and Richards, 1984) which has been observed for pedunculate and sessile oaks under different levels of shading (Ponton *et al*., 2002). W_i is a complex trait related to many physiological and structural leaf traits that directly or indirectly influence A or g_s. Genetic variation in W_i or $\Delta^{13}C$ has been shown within many tree species and was ascribed to variations in A (Johnsen and Major, 1995; Major and Johnsen, 1996; Xu *et al.*, 2000), in g_s (Cregg *et al.*, 2000) or in both (Farquhar *et al.*, 1989).

Brendel *et al.* (2008) investigated the genetic determinism of water use efficiency in a pedunculate oak full-sib family comprising 278 siblings. They found in this progeny a 40% variation of W_i as estimated by leaf $\Delta^{13}C$. The genetic control of $\Delta^{13}C$ was oligogenic, with only a few Quantitative Trait Loci (QTL) explaining a large fraction of the observed variability of $\Delta^{13}C$ (30% to 50%). The detected QTL pointed to two major regions on the genetic map of this full-sib family. The first region explained 21-31% of the observed variability, and was detected with independent measurements conducted for three successive years, suggesting that only low QTL x environment interactions occurred. The second region suggested an influence of photosynthetic capacity on the observed diversity in $\Delta^{13}C$ and explained 9% of the observed variability.

Variation in A, when independent from g_s, is due to variation in photosynthetic capacity. Theoretical considerations show that compounds involved in photosynthesis may account for well over three-quarter of total leaf nitrogen (Field and Mooney, 1986). Thus for different species photosynthetic capacity was found to correlate with total leaf nitrogen (Evans, 1989), including several oak species (Takashima *et al.*, 2004). Leaf anatomy traits such as leaf density and thickness may also influence photosynthetic capacity (Niinemets, 1999) and modulate the photosynthesis-nitrogen relationships (Reich *et al.*, 1998).

Physiological processes leading to stomatal aperture or closure are well known and recent progress has been made on genes involved in ABA and Ca^+ signalling (Webb and Baker, 2002) and stomatal development (Bergmann, 2006). However, the main causes driving diversity in g_s in natural populations are not yet well understood, both within and among species. Franks and Farquhar (2007) found an influence of the stomatal morphology of different species on maximum stomatal apertures and rapidity of movements. It has also

been shown for temperate deciduous trees that the size of guard cells has an influence stomatal aperture and therefore contributes to the diversity of g_s (Aasamaa *et al.*, 2001). Further it has been suggested that maximum stomatal conductance is influenced by stomatal density (Nobel, 1999). Little is however known on the causes of within species diversity of stomatal conductance.

To study genetic, intraspecific diversity, and to assess genetic determinism and control of traits, a large number of siblings and vegetative copies (several hundred individuals) are required. This puts a severe practical constraint on the number of leaf traits that can be measured. Therefore we focused on a smaller number of individuals while maximising the differences in W_i and $\Delta^{13}C$. To this end, a few individuals (called genotypes hereafter) were selected for their extreme phenotypic values as observed by Brendel *et al.* (2008), to cover the diversity detected within the pedunculate oak full-sib family. Two strategies were used to sample genotypes: first, using $\Delta^{13}C$ data measured during three successive years and second, using a combination of $\Delta^{13}C$ with leaf nitrogen and chlorophyll content data. With the first sampling strategy genotypes were selected that have accumulated alleles with positive (or negative) effects on $\Delta^{13}C$, independently from the physiological process affecting discrimination. The second strategy aimed at maximizing the diversity of $\Delta^{13}C$ caused by photosynthetic capacity, by selecting genotypes with simultaneously extreme phenotypic values for $\Delta^{13}C$, leaf nitrogen and chlorophyll content.

Although bulk leaf matter is often used for rapid estimates of $\Delta^{13}C$ (e.g. for QTL studies as in Brendel *et al.*, 2008), it is an aggregate of different carbon containing compounds, each with different integration patterns of W_i. This can cause discrepancies between W_i estimated from leaf bulk $\Delta^{13}C$ and W_i estimated directly and instantaneously from gas exchange measurements. Soluble sugars and starch provide a $\Delta^{13}C$ signal with a short time-integration due to their high turn-over rate (few days) (Brugnoli *et al.*, 1988). $\Delta^{13}C$ was therefore assessed from three different pools of organic matter (bulk leaf matter, starch, soluble sugars) to downscale from field measurements (Brendel *et al.*, 2008) to instantaneous gas exchange. Further, genetic variation of certain leaf traits could disturb the relationship between $\Delta^{13}C$ and intrinsic water use efficiency (W_i) by affecting the parameters of the theoretical model.

Therefore our main objectives were to:

(i) Asses the stability of genotype differences across contrasting environments and for different measures of intrinsic water use efficiency (W_i);

(ii) Quantify how genetic variation in $\Delta^{13}C$ relates to genetic variation in W_i within this family;

(iii) Identify which leaf traits drive the diversity in W_i observed in this family.

Material and Methods

Plant material and growth conditions

Genotypes used in this study were selected within a pedunculate oak progeny (F1 of 278 clones) which has been used several times for QTL detection (Scotti-Saintagne *et al.*, 2004; Scotti-Saintagne *et al.*, 2005; Parelle *et al.*, 2007; Brendel *et al.*, 2008). Selection criteria were based on phenotypic data recorded under natural conditions at Bourran (South Western France) (Brendel *et al.*, 2008). The traits used were carbon isotope discrimination of bulk leaf organic matter ($\Delta^{13}C_b$), chlorophyll (Chl) and nitrogen content (N_{area}, N_{mass}) of leaves. Genotypes with extreme phenotypes for $\Delta^{13}C$ (i.e. "low Δ" or "high Δ") were selected on the basis of extreme values of leaf $\Delta^{13}C$ recorded during three years of measurements (2000 to 2002). Genotypes were chosen which showed extreme low or extreme high leaf $\delta^{13}C$ data for all three years. In parallel, genotypes with extreme phenotypes concurrently for $\Delta^{13}C$, chlorophyll concentration and leaf N (i.e. "low N" or "high N") were selected on the basis of displaying simultaneously high values of leaf $\Delta^{13}C$ and low values of chlorophyll concentration and leaf nitrogen content recorded in 2001 and inversely. This selection was founded on the hypothesis that genotypes with low photosynthetic capacity, estimated by low values of leaf nitrogen and chlorophyll would show low W_i, and thus high leaf $\delta^{13}C$. Three genotypes were chosen for each of the extreme phenotypes: "low Δ" (siblings 159, 171, 287), "high Δ" (136, 170, 263), "low N" (151, 237, 351) and "high N" (259, 261, 267), forming a set of twelve genotypes overall.

Clonal copies of the selected genotypes were produced in summer 2003 by UMR BioGECo, INRA Pierroton (South Western France) and then transferred to a greenhouse at Champenoux near Nancy (North Eastern France) during December 2003. The experiment took place during summer 2004. The trees were transplanted to 10 l containers with a peat and sand mixture (1/1, v/v). A complete fertilisation (4.5 g l^{-1} of slow-release fertiliser Nutricote T100: N, P, K, Mg, 13,13,13,2 + trace elements and 0.2 g l^{-1} of lime) was provided. All individuals were watered to field capacity three times daily with deionised water. Air temperature control of the greenhouse was set to a minimum of 15°C and a maximum of 25°C, itherwise within this range greenhouse temperature was following outside temperature variations. Relative humidity (68±12%, average ± standard deviation), CO_2 concentration (394±12 µmol mol^{-1}) and daily global irradiance were continuously recorded in the greenhouse. The plants were grown under natural photoperiod. As pedunculate oaks show a periodical growth during the growing season ("flushes"), all measurements were done on unshaded adult second flush leaves.

Four vegetative copies (rooted cuttings) of each genotype were used as replicates. The complete experiment consisted of 40 plants overall that were placed in a greenhouse with a

randomized complete block design. One vegetative copy of each gentoype was placed in each block, with four blocks overall. Due to some mortality of rooted cuttings, especially in the phenotype “high Δ”, the number of clonal copies of three genotypes was only one or two.

Extraction of soluble sugars and starch from leaves, and carbon isotope analysis

At the beginning of July, one leaf was harvested on each individual plant, oven-dried (60°C) and ball-milled for carbon isotope analysis of bulk leaf matter. Additionally, three to five leaves were harvested separately for extraction of soluble sugars and starch, freeze-dried for 24 hours and then ball-milled. The method of extraction was adapted from Dickson and Larson (1975). Extraction was carried out using 200 mg of leaf powder with 2 ml of a mixture of methanol/chloroform/water (12:5:3, v/v/v). After shaking with a vortex mixer, and 30 minutes at ambient temperature, tubes were centrifuged for 10 minutes at 2000g and 4°C. The supernatant was recovered, a second extraction was run on the pellet and the second supernatant was added to the first. Then 1 ml of methanol 60% was added to the pellet, and this solution was stored at –20°C for starch extraction. Sugar extraction continued using the supernatant by addition of 2 ml of a mixture methanol/chloroform (1:1 v/v) and 1.2 ml of distilled water. After vortexing, and centrifugation (5 min, 2000g, 4°C), the upper phase was collected and 0.5 ml of methanol (60%) was added to the remainder. After vortexing again, and centrifugation, the supernatant was retained and added to the first one. Methanol and water were then evaporated overnight in a vacuum concentration system (1 mbar, 30°C, Heto, Denmark). The pellet was rehydrated with 0.5 ml distilled water and vortexed. Soluble sugars were then separated from the aqueous extract through a multilayer extraction column, consisting of (i) PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone, Sigma-Aldrich, Germany) to retain phenols and tannins; (ii) Dowex -50 *(H^+)* resin (Sigma-Aldrich, Germany) used for separation of amino acids from organic acids and sugars and (iii) Amberlite IRA-402 (Cl^-) resin (Sigma-Aldrich, Germany) used for separation of organic acids from sugars. The soluble sugars were eluted with 8ml of distilled water. The eluate was reduced in a vacuum concentration system. The pellet was stored at -20°C before carbon isotope analysis.

The pellet kept for starch extraction in methanol was centrifuged (10 min, 2000g, 4°C), the supernatant was discarded and the residue was dried for 15 min in a vacuum concentration system. The pellet was then suspended in 1 ml of HCl 6N. After vortexing and centrifugation (5 min, 2000g, 4°C), the supernatant was retained and mixed with 8 ml of methanol 60%. Starch was then precipitated one day at -20°C and dried with the vacuum concentration system. Samples of starch were stored at -20°C before carbon isotope analysis. Extracted sugars and starch represented about 9% and 5% of the bulk leaf dry mass, respectively.

The carbon isotope composition of 1 mg of bulk leaf, soluble sugar or starch organic material was measured with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S;

Thermo Finnigan, Bremen, Germany) coupled to an elemental analyser (Carlo Erba NA 1500 NC, Rodano, Italy). The relative abundance of ^{13}C (‰) was expressed as (Craig, 1957):

$\delta^{13}C=(R_s-R_b)/R_b$ x1000

where R_s and R_b refer to the $^{13}C/^{12}C$ ratio in the sample and in the Pee Dee Belemnite standard, respectively.

Carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) was calculated as:

$\Delta^{13}C \approx \delta^{13}C_{air} - \delta^{13}C_{sample}$

where $\delta^{13}C_{air}$ is the carbon isotope composition of atmospheric CO_2. $\delta^{13}C_{air}$ was assessed in the greenhouse by growing *Zea mays* plants, recording the $\delta^{13}C$ of leaf organic matter and using the procedure of Marino and McElroy (1991) to compute $\delta^{13}C_{air}$ which was found to be equal to -9.80 ± 0.23‰ (average ± standard deviation).

The modelled relationship between $\Delta^{13}C$ and W_i is (Farquhar and Richards, 1984) :

$$\Delta^{13}C_{sample} = b - (b - a) \times \frac{1.6\ W_i}{c_a}$$

With: *a*, discrimination during diffusion of CO_2 through stomata (4.4‰) and *b*, discrimination during carboxylation of RuBP (27‰ taking into account 10% C fixed by PEPC; Farquhar and Richards, 1984) and c_a, atmospheric CO_2 mole fraction (continuously monitored in the greenhouse with a mean value of 394±12 µmol mol^{-1}). The resulting equation is then $\Delta^{13}C_{sample} \approx 27 - 0.092*W_i$.

Gas exchange measurements

Leaf gas exchange was recorded on one leaf per individual plant during July 2004, with an open flow gas exchange system (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Leaves were inserted into the chamber and photosynthesis was induced for about 40 min at 25°C, at a CO_2 mole fraction of 390 µmol mol^{-1}, a photosynthetic photon flux density of 1200 µmol m^{-2} s^{-1}, and an air flux of 300 µmol s^{-1}. Light saturated net CO_2 assimilation rate (A_{sat}) and stomatal conductance for water vapour (g_s) were recorded and intrinsic water use efficiency (W_i) was computed as the ratio between A_{sat} and g_s. Response curves of net assimilation rate (A) to CO_2 mole fraction in intercellular air spaces (c_i) were recorded with the following procedure: a decrease in CO_2 mole fraction from 390 µmol mol^{-1} to 50 µmol mol^{-1} in five steps. For each step, four minutes were allowed for gas exchange stabilization before measuring three times environmental parameters, A and estimating c_i. These curves were used to adjust maximal carboxylation rate of Rubisco (V_{cmax}; von Caemmerer and Farquhar, 1981) as described by Dreyer *et al*. (2001). The adjusted model did not explicitly include internal conductance to CO_2, and the computed values represent therefore apparent V_{cmax}.

Chlorophyll content

Relative chlorophyll content (in CCI unit) was estimated using a CCM-200 (Chlorophyll Content Meter, Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Total chlorophyll content per leaf area (Chl) was derived using the following relationship calibrated for oak using biochemical chlorophyll extraction according to Barnes *et al*. (1992):

$Chl(g\ m^{-2}) = 0.021(CCI\ unit) + 0.05$

Total chlorophyll content was measured two times at different dates on three leaves per tree with three to five replicates per leaf. The data presented in this study are the least-square mean for each gentoype calculated from an Analysis of Variance model taking into account the date effect.

Leaf nitrogen content and leaf mass-to-area ratio

Leaf mass-to-area ratio (LMA) and leaf nitrogen content (N_{area}, N_{mass}) were estimated for the leaves used for $\delta^{13}C$ analysis of bulk leaf organic matter. Area of fresh leaves was measured with a Leaf Area Meter (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK), whereas mass was determined after drying and LMA was calculated as the ratio of leaf mass per area. N_{mass} was measured during isotopic analysis with the elemental analyser (Carlo Erba NA 1500 NC, Rodano, Italy) that was coupled to the mass spectrometer. Leaf nitrogen content on an area basis (N_{area}) was calculated from N_{mass} times LMA.

Leaf anatomy

An additional three leaves were harvested for leaf anatomy. Overall 14 discs ($1cm^2$) were punched from three leaves per vegetative copy of each genotype for measuring stomatal density and leaf anatomy and were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Microphotographs were made with a variable pressure scanning electron microscope (model 1450VP, Leo, Cambridge, UK, 20-30 Pa inside chamber, accelerating voltage 15kV, working distance 12 mm) and analysed for stomatal density and stomatal dimensions using the Visilog software (Noesis, France).

One microphotograph of the abaxial epidermis (0.72 mm^2) of nine discs from three different leaves was used to estimate stomatal density (SD). On each of the microphotographs 50 stomata were sampled for measuring guard cell surface (SA) and length (SL). Stomatal area index (SAI; Bruschi *et al.*, 2003) was calculated as stomatal density x stomatal length, which can be seen as a rough indicator of potential total stomatal opening per leaf surface.

On the five other discs (1 cm^2), four semi-thin cryo sections were photographed to measure total leaf thickness (TLT) and thickness of palisade (PMT), or spongy mesophyll (SMT), or upper and lower epidermal layers (UET and LET, respectively).

Statistical analyses

Using the whole data-set, correlations between traits were computed using STATISTICA software Version 7.1 (StatSoft, Inc. 2005). Correlations are based on genotype means and can therefore be seen as representing genetic differences among siblings within the family. Pearson's correlation coefficients were estimated with a correlation matrix or with regression analyses. As all correlations were based on the combination of two continuous variables, model II regression (geometric mean regression) was used to estimate the equation parameters (Sokal and Rohlf, 2000). All statistical tests were considered significant when $p<0.05$.

Analyses of variance were done with the R 2.5.0 software (R Development Core Team, 2007) and effects were considered significant at $p<0.05$. Comparisons with earlier results (Brendel *et al.*, 2008) on $\delta^{13}C_{bulk}$ were analysed using the following model :

$$y_{ijk} = \mu + g_i + e_j + (ge)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

where y_{lmn} is the variable of interest, μ the overall mean, g_i the genotype effect, e_j the environment effect, $(ge)_{ij}$ the genotype x environment interaction and ε_{ikr} the residuals. Partial coefficients of determination (R^2) for the effects of this ANOVA were calculated as the sums of squares (SS) of the effect divided by total SS- This is a measure of the proportion of the total variation that is explained by one effect.

The difference of “low *versus* high” within “Δ” or “N” extremes (thereafter called phenotype effect) was analysed on each variable of interest with a linear mixed model (*nlme* R-package, Pinheiro *et al.*, 2007) of the form:

$$y_{lmr} = \mu + \alpha_l + b_m + g_i + \varepsilon_{lir},$$

where y_{lmr} is the variable of interest, μ the overall mean, α_l the phenotype fixed effect, b_m the random block effect, g_i the fixed genotype effect and ε_{lir} the residuals.

Block effects were checked with a log likelihood ratio test between models with and without a random block effect. They were for all traits non-significant ($p>0.05$) and excluded from the model.

Residuals were assumed to follow a joint normal distribution with zero means, zero covariances and variances either constant (homoscedastic model) or different among copies of each genotype (heteroscedastic model). Heteroscedasticity was checked with a log likelihood ratio test between homoscedastic and heteroscedastic models and the appropriate model was retained for each analysis.

	$\Delta^{13}C_{su}$	$\Delta^{13}C_{st}$	$\Delta^{13}C_b$	W_i	A_{sat}	g_s	V_{cmax}	N_{mass}	N_{area}	Chl	SD	SL	SA	SAI	LMA	TLT	UET	LET	PMT	SMT
$\Delta^{13}C_{su}$	*																			
$\Delta^{13}C_{st}$	**0.93**	*																		
$\Delta^{13}C_b$	**0.76**	**0.90**	*																	
W_i	**-0.94**	**-0.87**	**-0.73**	*																
A_{sat}	*0.55*			*-0.53*	*															
g_s	**0.72**	*0.56*		**-0.71**	**0.97**	*														
V_{cmax}					**0.91**	**0.83**	*													
N_{mass}								*												
N_{area}								**0.76**	*											
Chl										*										
SD	*0.52*	*0.53*	**0.68**	*-0.55*	*0.55*	**0.62**					*									
SL	*-0.57*	*-0.55*	**-0.59**	**0.67**		*-0.51*					**-0.62**	*								
SA	*-0.57*	*-0.55*	*-0.53*	**0.75**								**0.82**	*							
SAI			**0.61**		*0.51*	*0.56*					**0.97**			*						
LMA	*0.56*			*-0.51*					*0.55*						*					
TLT									**0.59**						**0.62**	*				
UET								*-0.50*									*			
LET																		*		
PMT									**0.61**						*0.52*	**0.96**			*	
SMT									*0.53*						**0.68**	**0.93**			**0.81**	*

Table 10: Correlation coefficients between genotype means of leaf traits (N=12). Significant correlations at 5% are in bold, and correlations at 10% are in italic. See list of abbreviations for trait names.

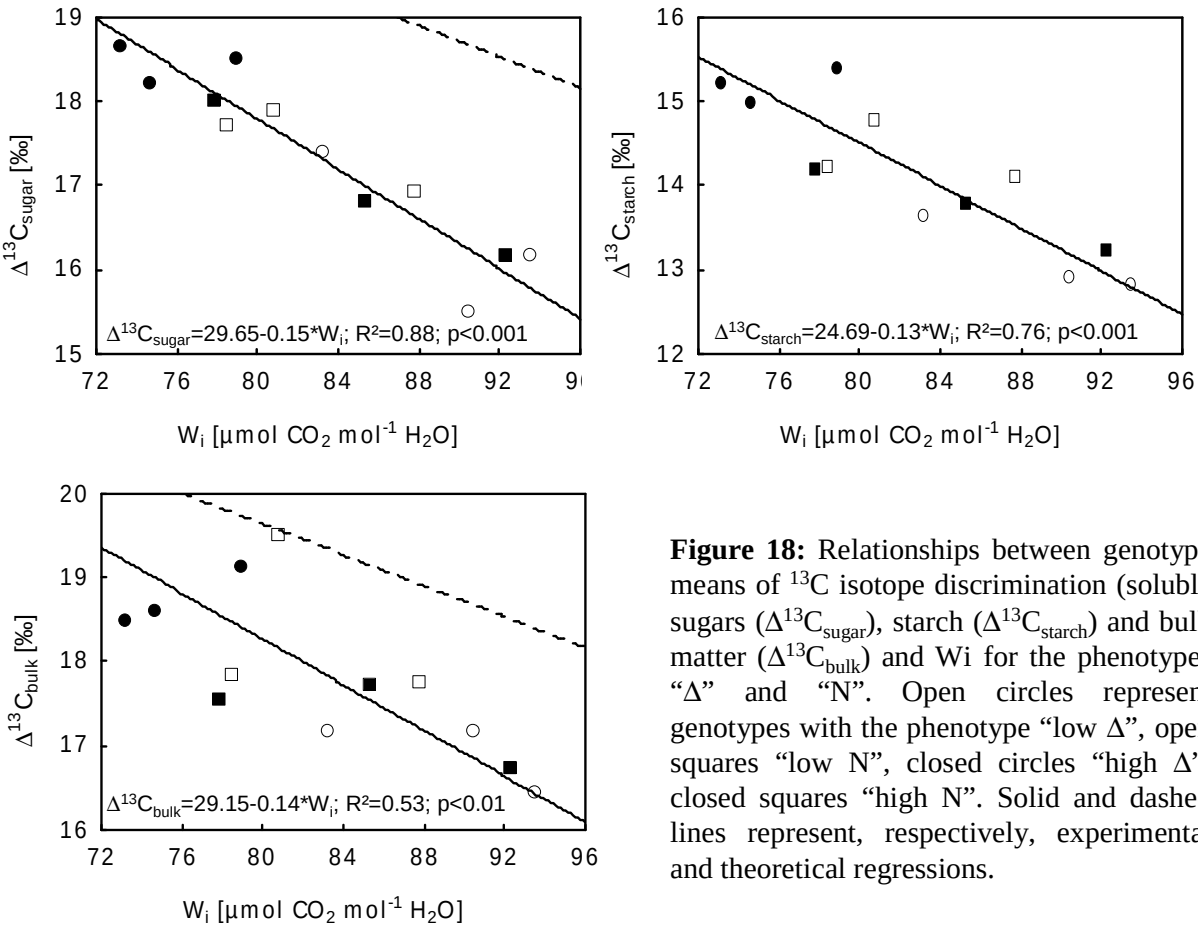


Figure 18: Relationships between genotype means of ^{13}C isotope discrimination (soluble sugars ($\Delta^{13}C_{sugar}$), starch ($\Delta^{13}C_{starch}$) and bulk matter ($\Delta^{13}C_{bulk}$) and Wi for the phenotypes "Δ" and "N". Open circles represent genotypes with the phenotype "low Δ", open squares "low N", closed circles "high Δ", closed squares "high N". Solid and dashed lines represent, respectively, experimental and theoretical regressions.

Results

Comparison with earlier results

An ANOVA using individual data (years 2000 and 2002) from Brendel *et al.* (2008) and $\Delta^{13}C_b$ from the present study showed significant effects ($p<0.05$) for genotype (partial R^2 = 39%), environment (37%) and genotype x environment interaction (6.0%), explaining overall 82% of the observed variance.

Correlations among different measures of W_i

$\Delta^{13}C$ of the different metabolic compartments (bulk leaf, soluble sugars and starch) were all significantly correlated to W_i calculated from gas exchange measurements (Table 10, Fig. 18). There was an improvement of the correlation from bulk leaf matter (R^2 = 52.9%), over starch (R^2 = 76.4%), to sugars (R^2 = 87.6%). Slopes were similar between $\Delta^{13}C_{su}$ /W_i and $\Delta^{13}C_{st}/W_i$, whereas the intercept differed due to the isotopic shift from sugars to starch (3.2±0.4‰). The slope with bulk leaf matter differed from the two above, but the isotopic signal of sugars was closer to the overall bulk leaf matter (difference 0.5±0.7‰).

The relationship of W_i with $\Delta^{13}C_{su}$ was similar to that predicted by the model (Farquhar and Richards, 1984), but had a significantly steeper slope ($p<0.01$; ANCOVA), whereas the slopes for $\Delta^{13}C_{st}$ and $\Delta^{13}C_b$ did not differ from the model. Regressions of W_i with carbon isotope composition data of bulk leaf material recorded in the field by Brendel *et al.* (2008) were highly significant ($p<0.005$), and R^2 was 0.77 (N=12, data recorded during 2000), 0.74 (N=9, data recorded during 2001) and 0.67 (N=12, data recorded during 2002).

Genotypes with higher W_i had significantly lower stomatal conductance (Fig. 19a), and had also a tendency to lower A_{sat} (Table 10). Genotypes with higher A_{sat} showed higher values of V_{cmax} (Table 10) and higher stomatal conductance (Fig. 19b). Traits related to photosynthesis such as chlorophyll content, leaf nitrogen content or V_{cmax} were not intercorrelated (Table 10). However, genotypes with higher stomatal conductance did also have an increased stomatal density (Table 10) and a higher $\Delta^{13}C_b$ (Fig. 20). Differences among genotypes in stomatal anatomy were concurrent with differences in density such that genotypes with longer stomata (SL) had a lower stomatal density. Differences among genotypes in thickness of leaf parenchyma did not concur with differences in $\Delta^{13}C_b$, W_i or gas exchange parameters.

Differences in $\Delta^{13}C$ and associated leaf traits between extreme phenotypes

Genotypes for this study had been chosen because they displayed extreme phenotypes. Therefore, we compared genotypes with high *versus* low phenotype values using an

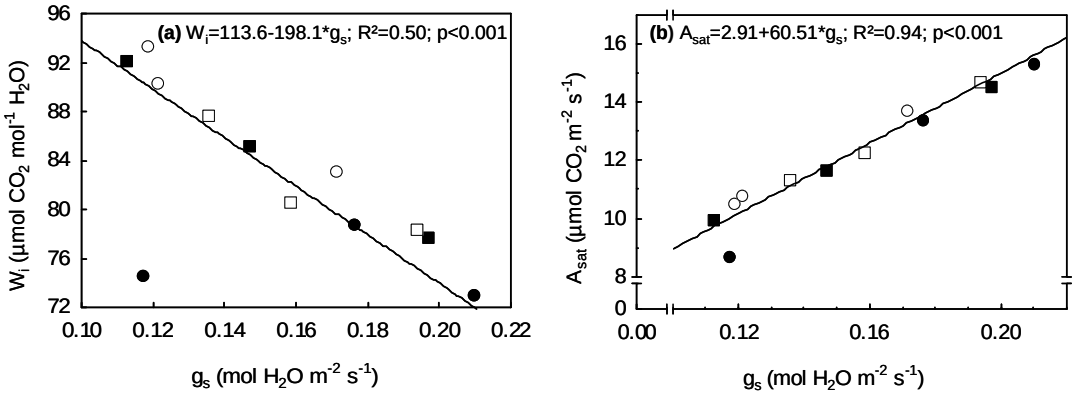


Figure 19: Relationships between stomatal conductance and (a) intrinsic water use efficiency (W_i) or (b) light saturated assimilation rate (A_{sat}). Each point represents the mean of a genotype. Symbols as in Fig. 18. For the outlier in graph a, only one copy had been available for this genotype (170).

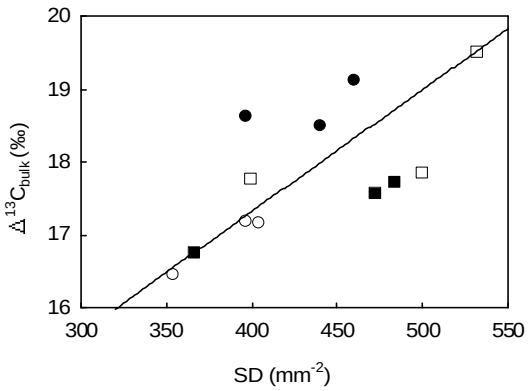


Figure 20: Relationship between $\Delta^{13}C$ of bulk leaf matter ($\Delta^{13}C_b$) and stomatal density (SD). Symbols as in Fig. 18. Equation of the geometric mean correlation: $\Delta^{13}C_b$ = 10.6+0.02*SD, r=0.68, p=0.02. Each point represents the mean of a genotype.

	Phenotypes Δ			Phenotypes N		
	mean ± SD		effect	mean ± SD		effect
	low Δ	high Δ		low N	high N	
$\Delta^{13}C_{su}$ (‰)	16.4 ± 1.1	18.5 ± 0.5	**<0.001**	17.5 ± 0.8	17.1 ± 0.9	-
$\Delta^{13}C_{st}$ (‰)	13.1 ± 0.6	15.3 ± 0.4	**<0.001**	14.4 ± 0.5	13.8 ± 0.6	**<0.01**
$\Delta^{13}C_b$ (‰)	17.0 ± 0.5	18.8 ± 0.6	**<0.001**	18.4 ± 1.1	17.4 ± 0.7	**<0.01**
W_i (µmol mol^{-1})	89.0 ± 14.5	75.7 ± 7.5	-	82.3 ± 12.2	84.4 ± 14.5	-
A_{sat} (µmol m^{-2} s^{-1})	11.7 ± 2.4	13.2 ± 3.2	-	12.8 ± 3.1	12.3 ± 3.0	-
g_s (mol m^{-2} s^{-1})	0.14 ± 0.04	0.18 ± 0.05	-	0.16 ± 0.06	0.16 ± 0.07	-
$V_{c\,max}$ (µmol m^{-2} s^{-1})	76.2 ± 12.0	78.1 ± 18.0	-	75.4 ± 15.8	80.2 ± 14.2	-
N_{mass} (mg g^{-1})	32.3 ± 3.2	32.1 ± 3.0	-	29.9 ± 4.3	34.8 ± 3.9	**0.01**
N_{area} (g m^{-2})	2.78 ± 0.39	3.02 ± 0.23	-	2.67 ± 0.44	2.96 ± 0.28	**0.04**
Chl (g m^{-2})	0.93 ± 0.16	0.95 ± 0.09	-	0.96 ± 0.11	0.98 ± 0.06	-
SD (mm^{-2})	384 ± 39	438 ± 37	**0.04**	476 ± 75	447 ± 64	-
SL (µm)	24.1 ± 1.1	23.5 ± 0.7	-	22.8 ± 0.7	23.7 ± 0.8	**<0.001**
SA (µm²)	352 ± 32	334 ± 21	-	339 ± 19	344 ± 24	-
SAI (mm^{-1})	9.2 ± 0.6	10.3 ± 1.0	**0.03**	10.8 ± 1.5	10.6 ± 1.5	-
LMA (g m^{-2})	86.3 ± 9.0	94.9 ± 11.7	-	89.6 ± 11.8	85.6 ± 7.7	-
TLT (µm)	149 ± 14	152 ± 5	-	158 ± 10	153 ± 5	-
UET (µm)	10.6 ± 0.6	10.7 ± 0.6	-	10.6 ± 0.8	10.5 ± 1.0	-
LET (µm)	9.5 ± 1.2	8.9 ± 0.5	-	9.2 ± 0.6	9.3 ± 0.8	-
PMT (µm)	67.1 ± 7.5	67.9 ± 3.0	-	71.4 ± 7.3	68.5 ± 2.8	**0.02**
SMT (µm)	61.8 ± 7.0	64.4 ± 3.7	-	66.7 ± 4.3	65.2 ± 3.7	-

Table 11: Genotype effect estimated for all data (p-level; explained variance) and means, standard deviations (SD) and differences (p-level) between extreme phenotypes "Δ" and "N" (see text for the definition of the phenotypes). Significant p values (<0.05) are shown in bold, "-" no significant difference. See list of abbreviations for trait names.

ANOVA. This is a more stringent test compared to the correlation analysis and results are presented in Table 11.

Values of ^{13}C isotope discrimination of bulk, starch and soluble sugars ($\Delta^{13}C_b$, $\Delta^{13}C_{st}$ and $\Delta^{13}C_{su}$, respectively) differed significantly between the phenotypes "low Δ" and "high Δ". Differences between the phenotypes "low N" and "high N" were significant for $\Delta^{13}C_b$ and $\Delta^{13}C_{st}$ only. The mean differences in $\Delta^{13}C$ correspond to a 6 to 13% difference in W_i between the extremes "N" and 26 to 30% between the extremes "Δ". Differences between "low N" and "high N" or "low Δ" and "high Δ" were not significant for intrinsic water use efficiency (W_i), light saturated net CO_2 assimilation rate at ambient CO_2 concentration (A_{sat}), stomatal conductance for water vapour (g_s), and apparent maximal carboxylation rate of Rubisco (V_{cmax}) (Table 11).

The "high N" phenotypes displayed a consistently higher leaf N than "low N", whereas there was no difference between "low Δ" and "high Δ" (Table 11) for leaf nitrogen. Chlorophyll content (Chl) and leaf mass-to-area ratio (LMA) were similar among the phenotypes (Table 11).

Among the measured leaf anatomy traits, only palisade mesophyll thickness (PMT) differed between "low N" and "high N" only, the former being 2.9 µm thicker (Table 11). Stomata were significantly longer in "high N" compared to "low N" (Table 11) whereas stomatal density (SD) and stomatal area index (SAI) were significantly smaller for "low Δ" compared to "high Δ" (Table 11).

Discussion

Stability of genotypic differences for different measures of W_i

The tight correlations found between $\Delta^{13}C$ recorded on different metabolic compartments with varying turnover rates (bulk material, starch and soluble sugars), and therefore temporal integration scales (Brugnoli *et al.*, 1988; Brugnoli and Farquhar, 2000), suggest that differences among genotypes are robust with respect to these time-scales. The relationships found between temporally independent measurements of W_i and $\Delta^{13}C$ are close to the relationship predicted by the theoretical model (Farquhar and Richards, 1984), where $\Delta^{13}C$ of material with shorter temporal integration results in tighter correlation with W_i estimated from instantaneous gas exchange measurements (Fig. 18). It should be stressed that these relationships between W_i and $\Delta^{13}C$ were due to genetic differences among genotypes under common, optimal conditions and not due to acclimation of water use efficiency to different environmental conditions as observed in earlier studies (Guehl *et al.*, 1994; Picon *et al.*, 1996; Ponton *et al.*, 2002). An observed genetic variability of $\Delta^{13}C$ can relate to a variability of W_i as well as to a variability of the parameters of the theoretical model linking these two

traits. In fact, the correlation between $\Delta^{13}C$ and W_i observed by Brendel *et al.* (2008) was weak ($R^2 = 0.07$), suggesting that either a large part of the variability of $\Delta^{13}C$ was not related to Wi or that W_i from gas exchange measurements were estimated with much noise due to environmental influence. The here presented data, using more representative gas exchange measurements, showed that up to 87% of the genetic variability observed in $\Delta^{13}C$ can be related to W_i. Therefore, the closeness between observations and model affirms that measurement of carbon isotope discrimination on leaf bulk material in this pedonculate oak family (e.g. Brendel *et al.* 2008) reflected to a high degree variation in W_i.

"Low Δ" and "high Δ" phenotypes showed values for $\Delta^{13}C$ consistent with the sampling strategy, i.e., "low Δ" displayed significantly lower values than "high Δ". When data from the present study and from Brendel *et al.* (2008) were compared, the relative differences among genotypes for $\Delta^{13}C$ were found to be largely independent from environmental conditions, that is there was very little genotype x environment interaction. The relatively large overall environmental effect is probably due to the climate differences, where the field site in southern France was drier and hotter compared to the well-irrigated plants in the temperature controlled greenhouse. Thus, genotypic differences in $\Delta^{13}C$ were conserved among years, through contrasting environments and among different metabolic pools, which extends observations made by Johnsen *et al.* (1999) on *Picea mariana* and Lauteri *et al.* (1997) on *Castanea sativa*.

Variables driving variation of W_i within this pedunculate oak family

W_i is calculated as the ratio between assimilation rate and stomatal conductance and therefore systematic variation of both traits among genotypes can change W_i. Furthermore, variation in A might be controlled by variation in g and *vice versa*. Here, variation detected among genotypes for light saturated g_s and A_{sat} suggest a strong control of g_s on A_{sat} and thus a major influence of g_s on differences in W_i. Differences in A_{sat} were representing differences in photosynthetic capacity as estimated by V_{cmax}, however, again, there was an overall correlation between V_{cmax} and g_s. Variation in leaf nitrogen and chlorophyll content among genotypes did not have an effect on V_{cmax}, A_{sat} or on W_i. Also thickness of leaf parenchyma, which could theoretically have an impact on photosynthetic capacity, did not show any relationship with estimators of W_i. Overall, variation in traits related to photosynthetic capacity did not seem to be the driver for variation in any of the estimators of intrinsic water use efficiency.

Variation in W_i due to photosynthetic capacity had been studied specifically by using the selected "low N" and "high N" genotypes. This selection was effective for $\Delta^{13}C$ and leaf nitrogen content, as the expected differences were observed between the extreme phenotypes, whereas it was not effective for leaf chlorophyll content. This might be due to a

low heritability of leaf chlorophyll. To our knowledge, heritability of chlorophyll content has not yet been estimated in a temperate forest tree species. Narrow sense heritability estimates for leaf chlorophyll content for other plant types rarely exceed 50% (e.g. Kabanova *et al.* 2000 and Collaku *et al*. 2005 for wheat, Hervé *et al.* 2001 for sunflower), suggesting considerable environmental influence. This might be due to rapid (within days) acclimation to current irradiance, as shown by Frak *et al.* (2001) for *Juglans nigra x regia* seedlings. Additionally to the specific selection of "N" genotypes, the pedunculate oak saplings in the present study were raised with optimal water supply, which should reduce the stomatal limitation of assimilation rate and thus facilitate the expression of differences in photosynthetic capacity. However, "low N" and "high N" did not present difference in A_{sat} or in V_{cmax}, suggesting that the diversity of photosynthetic capacity might either not be well estimated by leaf N and chlorophyll content or not be a driver for variability in W_i within this family.

Otherwise, variation in stomatal conductance was a driver for the variation of W_i, as suggested by the strong correlation of g_s with W_i and $\Delta^{13}C_{su}$. Brendel *et al*. (2008) had not detected an correlation between $\delta^{13}C$ or W_i and g_s, probably due to the difficulties of measuring gas exchange in the field. Further, the differences among genotypes in g_s concur with differences in stomatal density (SD), i.e. genotypes with higher g_s also dispayed more stomata per leaf surface. Differences in stomatal density were also related to differences in $\Delta^{13}C_b$, and a similar tendency was detected for other estimates of W_i. Few publications have analysed the relationship between $\Delta^{13}C$ and stomatal density among genotypes. A positive relationship between $\Delta^{13}C$ and stomatal density was also found among poplar clones (Monclus *et al.*, 2006), and for *Pinus ponderosa* provenances (Cregg *et al.*, 2000). Genotypes with larger stomatal density showed higher g_s, which could lead to lower W_i. The model proposed by Nobel (1999) suggests a positive relationship between stomatal density and g_s. This was confirmed by Pearce *et al.* (2006) for several poplar species in a common garden and by Kundu and Tigerstedt (1999) for different provenances of *Azadirachta indica* in a greenhouse. A positive relationship between stomatal density and g_s would thus be the link for the observed positive correlation between $\Delta^{13}C$ and stomatal density, and could therefore be a cause for the observed diversity in W_i among genotypes of this pedunculate oak family.

We also observed that genotypes with an increased stomatal density had smaller stomata (based on estimates of stomatal guard cell length SL). A similar relationship was observed by Hetherington and Woodward (2003) across different species but also within species. This relationship suggests a compensating effect resulting in a stable total stoma opening area. However our data suggest that this trade-off was only of limited extent as stomatal area index (SAI=SL*SD), an estimator of total stoma opening area, still showed differences

among genotypes related to differences in $\Delta^{13}C_b$. Aasamaa *et al.* (2001) have shown for tree species that the size of guard cells has an influence on stomatal aperture and thus on gs. These results suggest a possible impact of stomatal density on variation in $\Delta^{13}C$ and thus W_i via a genetic diversity in maximum stomatal conductance within this family of pedunculate oak. According to Bergmann and Sack (2007), few gene products are required to regulate patterns of stomata in leaves. It has been shown in *Arabidopsis thaliana* that the gene ERECTA, which influences water use efficiency, can affect modulates mesophyll cell proliferation as well as stomatal density (Masle *et al.*, 2005).

Conclusions

Using a relatively small number of siblings from a large pedunculate oak progeny, we showed that the diversity detected for $\Delta^{13}C$ in this progeny was closely related to instantaneous, intrinsic water use efficiency (W_i), as expected from the theoretical model linking these two traits (Farquhar and Richards, 1984). Genetic variability of $\Delta^{13}C$ and W_i was largely independent from different temporal integration scales and from different environments. We were not able to substantiate the influence of photosynthetic capacity on W_i or $\Delta^{13}C$ that had been suggested by the co-localisation of QTL for $\Delta^{13}C$, nitrogen and chlorophyll content. However, the large genetic variation in stomatal density and stomatal area index, as well as the tight correlation between stomatal conductance and $\Delta^{13}C$ suggest that differences in water use efficiency within this pedunculate oak family might be due to differences in stomatal conductance.

Acknowledgements

We would like to thank Erwin Dreyer as well as two anonymous reviewers for their abundant suggestions on the manuscript. We are also grateful to Claude Bréchet for the $\delta^{13}C$ measurements and help in sugar and starch extractions, Pascale Maillard for the procedure of sugar and starch extraction, Patrick Gross for greenhouse management, Jean-Marie Gioria and Christophe Bailly for their technical assistance in greenhouse. We also thank Evangelista Bertocchi of INRA Pierroton for producing the rooted cuttings and Antoine Kremer for providing access to the pedunculate oak off-spring family.

References

Aasamaa K., Sõber A. and Rahi M., 2001. Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. Aust. J. Plant Physiol. 28: 765-774.

Barnes J.D., Balaguer L., Manrique E., Elvira S. and Davison A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Environ. Exp. Bot. 32: 85-100.

Bergmann D., 2006. Stomatal development: from neighborly to global communication. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 478-483.

Bergmann D.C. and Sack F.D., 2007. Stomatal Development. Ann. Rev. Plant Biol. 58: 163–181.

Brendel O., Le Thiec D., Saintagne C., Kremer A. and Guehl J.M., 2008. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. Tree Genet. Genomes 4: 263-278.

Brugnoli E., Hubick K.T., von Caemmerer S., Wong S.C. and Farquhar G.D., 1988. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C_3 plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. Plant Physiol. 88: 1418-1424.

Brugnoli E. and Farquhar G.D., 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, eds. Photosynthesis: Physiology and Metabolism, Kluwer Academic Publishers, 399-434.

Bruschi P., Grossoni P. and Bussoti F., 2003. Within- and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations. Trees 17: 164-172.

Collaku, A., Harrison, S.A., 2005. Heritability of waterlogging tolerance in wheat. Crop Sci. 45: 722-727.

Craig H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for massspectrometric analysis of carbon dioxide. Geochim. Cosmochim. Acta 12: 133-149.

Cregg B.M., Olivas-Garcia J.M. and Hennessey T.C., 2000. Provenance variation in carbon isotope discrimination of mature ponderosa pine trees at two locations in the Great Plains. Can. J. For. Res. 30: 428-439.

Dickson R.E. and Larson P.R., 1975. Incorporation of 14C-photosynthate into major chemical fractions of source and sink leaves of cottonwood. Plant Physiol. 56: 185-193.

Dreyer E., Le Roux X., Montpied P., Daudet F.A., Masson F., 2001. Temperature response of leaf photosynthetic capacity in seedlings from seven temperate tree species. Tree Physiol. 21: 223-232.

Evans J.R., 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C_3 plants. Oecologia 78: 9–19.

Farquhar G.D. and Richards R.A., 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. Aust. J. Plant Physiol. 11: 539-552.

Farquhar G.D., Ehleringer J.R. and Hubick K.T., 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 503-537.

Field C. and Mooney H.A., 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: Givnish TJ, ed. On the Economy of Plant Form and Function, Cambridge University Press, Cambridge, 25–55.

Frak, E., Le Roux, X., Millard, P., Dreyer, E., Jaouen, G., Saint-Joanis, B. and Wendler, R., 2001. Changes in total leaf nitrogen and partitioning of leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. Plant, Cell & Env. 24: 1279-1288.

Franks P. and Farquhar G., 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. Plant Physiol. 143: 78-87.

Guehl J.M., Picon C., Aussenac G. and Gross P., 1994. Interactive effects of elevated CO_2 and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. Tree Physiol. 14: 707-724.

Hervé, D., Fabre, F., Berrios, E.F., Leroux, N., Alchaarani, G., Planchon, C., Sarrafi, A. and Gentzbittel, L., 2001. QTL analysis of photosynthesis and water use status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. J. Ex. Bot. 52: 1857-1864.

Hetherington, A.M., Woodward, F.I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. Nature. 424: 901-908.

Johnsen K.H. and Major J.E., 1995. Gas exchange of 20-year-old black spruce families displaying a genotype x environment interaction in growth rate. Can. J. For. Res. 25: 430-439.

Johnsen K.H., Flanagan L.B., Huber D.A., Major J.E., 1999. Genetic variation in growth, carbon isotope discrimination, and foliar N concentration in *Picea mariana*: analyses from a half-diallel mating design using field-grown trees. Can. J. For. Res. 29: 1727-1735.

Kabanova, S.N., Kabashnikova, L.F., Chaika, M.T., 2000. Specifity of genetic determination of content of photosynthetic pigments in Triticale. Biol. Plant. 43: 529-535.

Kundu S.K. and Tigerstedt P.M.A., 1999. Variation in net photosynthesis, stomatal characteristics, leaf area and whole-plant phytomass production among ten provenances of neem (*Azadirachta indica*). Tree Physiol. 19: 47-52.

Lauteri M., Scartazza A., Guido M.C. and Brugnoli E., 1997. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of Castanea sativa adapted to different environments. Funct. Ecol. 11: 675-683.

Major J.E. and Johnsen K.H., 1996. Family variation in photosynthesis of 22-year-old black spruce: A test of two models of physiological response to water stress. Can. J. For. Res. 26: 1922-1933.

Marino B.D. and McElroy M.B., 1991. Isotopic composition of atmospheric CO_2 inferred from carbon in C4 plant cellulose. Nature 349: 127–131.

Masle J., Gilmore S.R. and Farquhar G.D., 2005. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. Nature 436: 866 – 870.

Monclus R., Dreyer E., Villar M., Delmotte F.M., Delay D., Petit J.M., Barbaroux C., Le Thiec D., Bréchet C. and Brignolas F., 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. New Phytol. 169: 765–777.

Niinemets Ü., 1999. Research review. Components of leaf dry mass per area – thickness and density-alter leaf photosynthetic capacity in reverse direction in woody plants. New Phytol. 144: 35-47.

Nobel P.S., 1999. Resistances and conductances – Transpiration. In: Physicochemical and Environmental Plant Physiology. 2nd Edition. Academic Press, San Diego, 635 pages, 301-303.

Parelle J., Zapater M., Scotti-Saintagne C., Kremer A., Jolivet Y., Dreyer E. and Brendel O., 2007. Quantitative Trait Loci of tolerance to water-logging in a European oak (*Quercus robur* L.): physiological relevance and temporal effect patterns. Plant Cell Environ. 30: 422-434.

Pearce D.W., Millard S., Bray D.F. and Rood S.B., 2006. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. Tree Physiol. 26: 211-218.

Picon C., Guehl J.M. and Aussenac G., 1996. Growth dynamics, transpiration and water use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO_2 and drought. Ann. Sci. For. 53: 431-446.

Pinheiro J., Bates D., DebRoy S. and Sarkar D., 2007. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-81.

Ponton S., Dupouey J.L., Breda N. and Dreyer E., 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. Plant Cell Environ. 24: 861-868.

Ponton S., Dupouey J.L., Breda N. and Dreyer E., 2002. Comparison of water use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. Tree Physiol. 22: 413-422.

R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org

Reich P.B., Ellsworth D.S. and Walters M.B., 1998. Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. Funct. Ecol. 12: 948-958.

Scotti-Saintagne C., Bodenes C., Barreneche T., Bertocchi E., Plomion C. and Kremer A., 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. Theor. Appl. Genet. 109: 1648-1659.

Scotti-Saintagne C., Bertocchi E., Barreneche T., Kremer A. and Plomion C. 2005. Quantitative trait loci mapping for vegetative propagation in pedunculate oak. Ann. For. Sci. 62: 369-374.

Sokal R.R. and Rohlf F.J., 2000. In: Biometry, 3rd edition, W.H. Freeman and Company, New York, 887 pages.

Takashima T., Hikosaka K. and Hirose T., 2004. Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species. Plant Cell Environ. 27: 1047-1054.

Von Caemmerer S. and Farquhar G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. Planta 153: 376-387.

Webb A. and Baker A., 2002. Stomatal biology: new techniques, new challenges. New Phytol. 153: 365-369.

Xu Z.H., Saffigna P.G., Farquhar G.D., Simpson J.A., Haines R.J., Walker S., Osborne D.O. and Guinto *D., 2000.* Carbon isotope discrimination and oxygen isotope composition in clones of the F_1 hybrid between slash pine and Caribbean pine in relation to tree growth, water use efficiency and foliar nutrient concentration. Tree Physiol. 20: 1209–1217.

I.4.2.2 The diversity of ^{13}C isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family correlates with differences in intrinsic water use efficiency, in transpiration efficiency and in stomatal conductance.

Authors

Roussel Magali*, Dreyer Erwin*, Montpied Pierre*, Le-Provost Grégoire**, Guehl Jean-Marc*, Brendel Oliver*[1]

*INRA, UMR1137 "Ecologie et Ecophysiologie Forestières", IFR 110 "Génomique, Ecophysiologie, Ecologie Fonctionnelle", F-54280 Champenoux.

* Nancy Université, UMR1137,"Ecologie et Ecophysiologie Forestières", F54500 Vandoeuvre

**INRA, UMR1202 "Biodiversité, Gènes, Communautés", F-33612 Cestas.

** Université de Bordeaux I UMR1202 "Biodiversité, Gènes, Communautés" F33405 Talence

[1]**Corresponding author**: Oliver BRENDEL, UMR 1137, Centre INRA de Nancy; F-54280 CHAMPENOUX; Phone: +33 (0)3 83 39 41 00; fax: +33 (0)3 83 39 40 22; brendel@nancy.inra.fr

Number of Tables and Figures: 2 Tables and 4 Figures.

Running title: Delta ^{13}C and water use efficiency in oaks.

Abstract

^{13}C discrimination in organic matter with respect to atmospheric CO_2 ($\Delta^{13}C$) is under tight genetic control in many plant species, including the pedunculate oak (*Quercus robur* L.) full-sib progeny used in this study. $\Delta^{13}C$ is expected to reflect intrinsic water-use efficiency, but this assumption requires confirmation due to potential interferences with mesophyll conductance to CO_2, or post-photosynthetic discrimination. In order to dissect the observed $\Delta^{13}C$ variability in this progeny, six genotypes that have previously been found to display extreme phenotypic values of $\Delta^{13}C$ (either very high, "high Δ" or low, "low Δ" phenotype) were selected, and transpiration efficiency, TE (accumulated biomass / transpired water), net CO_2 assimilation rate, A, stomatal conductance for water vapour, g_s and intrinsic water-use efficiency ($W_i = A/g_s$) were compared to $\Delta^{13}C$ in bulk leaf matter, wood and cellulose in wood. As expected, "high Δ" displayed higher values of $\Delta^{13}C$ not only in bulk leaf matter, but also in

wood and cellulose. This confirms the stability of the genotypic differences in $\Delta^{13}C$ recorded earlier. "High Δ" also displayed smaller TE, smaller W_i, and higher g_s. Only a small difference was detected in photosynthetic capacity, however none in mesophyll conductance to CO_2. "High Δ" and "low Δ" displayed very similar leaf anatomy, except for higher stomatal density in "high Δ". Finally, diurnal courses of leaf gas exchange revealed a higher g_s in "high Δ" in the morning, whereas the difference decreased in the afternoon. The gene "ERECTA", involved in the control of leaf differentiation and stomatal development, displayed larger expression levels in "low Δ". In this progeny, the variability of $\Delta^{13}C$ correlated closely with that of W_i and TE. Genetic differences of $\Delta^{13}C$ and W_i can be ascribed to differences in stomatal conductance and stomatal density, and not in photosynthetic capacity.

Keywords

carbon isotope discrimination, water use efficiency, pedunculate oak, stomatal conductance, stomatal density, transpiration efficiency.

List of abbreviations

$\Delta^{13}C$: ^{13}C isotope discrimination; $\Delta^{13}C_b$: $\Delta^{13}C$ of bulk leaf material, ‰; $\Delta^{13}C_C$: $\Delta^{13}C$ of cellulose in the wood, ‰; $\Delta^{13}C_w$: $\Delta^{13}C$ of wood, ‰; $\delta^{13}C_{air}$: $\delta^{13}C$ of atmospheric CO_2 in the greenhouse, ‰; C_i: CO_2 mole fraction in intercellular air spaces, µmol mol^{-1}; C_a: atmospheric CO_2 mole fraction, µmol mol^{-1}; dDiam: difference between initial and final root collar diameter, mm; biom: biomass gain, g; LA: leaf area estimated from dry biomass (m^2); TE: transpiration efficiency, mg DM g^{-1} H_2O; PT: plant transpiration, kg H_2O m^{-2} leaf area; W_i: intrinsic water use efficiency; A: net CO_2 assimilation rate; g_s: stomatal conductance for water vapor; W_{sat}: W_i at ambient CO_2 concentration and light saturation, µmol mol^{-1}; A_{sat}: light saturated A at ambient CO_2 concentration, µmol m^{-2} s^{-1}; g_{sat}: g_s at ambient CO_2 concentration and light saturation, mol m^{-2} s^{-1}; g_i: mesophyll conductance for CO_2, (mol m^{-2} s^{-1}); V_{cmax}: maximum carboxylation rate of Rubisco, µmol m^{-2} s^{-1}; J_{max}: maximal electron transport rate, µmol m^{-2} s^{-1}; A_{mean}: average A calculated from daily course of gas exchange, µmol m^{-2} s^{-1}; g_{mean}: average g_s calculated from daily course of gas exchange, mol m^{-2} s^{-1}; W_{mean}: average W_i calculated from daily course of gas exchange, µmol mol^{-1}; A_{max}: maximum A measured during daily course of gas exchange, µmol m^{-2} s^{-1}; g_{max}: maximum g_s measured during daily course of gas exchange, mol m^{-2} s^{-1}; α: slope of the response of g_s to light determined with daily course of gas exchange, 10^4 mol m^{-2} s^{-1}/unit of global irradiance; N_{mass}: nitrogen content on a mass basis, mg g^{-1}; N_{area}: nitrogen content on an area basis, g m^{-2}; Chl: chlorophyll content, g m^{-2}; SD: stomatal density, mm^{-2}; LMA: leaf mass-to-area ratio, g m^{-2}; TLT: total leaf thickness, µm; UET: upper epidermis thickness, µm; LET: lower epidermis thickness, µm; PMT: palisade mesophyll thickness, µm; SMT: spongy mesophyll thickness, µm.

Introduction

Water use efficiency is a composite and complex trait that currently receives much attention from agronomists, ecophysiologists and geneticists (see the review by Condon *et al.*, 2004 among others). Water use efficiency is usually defined as the amount of biomass (or harvestable organs) produced for a given amount of transpired water, i.e., as transpiration efficiency (TE, g DM g^{-1} H_2O). At an instantaneous time scale, it is defined as the ratio between net CO_2 assimilation (A) and (i) leaf transpiration, i.e. instantaneous water use efficiency or (ii) stomatal conductance (g_s), i.e., intrinsic water use efficiency (W_i, µmol CO_2 mol^{-1} H_2O). Based on the modelled relationship between carbon isotope discrimination during photosynthesis ($\Delta^{13}C$) and C_i/C_a (the ratio of CO_2 mole fractions in sub-stomatal air spaces and in the atmosphere), W_i can be estimated using $\Delta^{13}C$ as an indicator (Farquhar and Richards, 1984). Depending on plant compartments and compounds (e.g. soluble leaf sugars, bulk leaf material, wood-extracted cellulose), $\Delta^{13}C$ represents a time-integrated estimate of C_i/C_a, and of W_i weighted by net CO_2 assimilation rate. At the two extremes of the time-scale, $\Delta^{13}CO_2$ of air between inlet and outlet of a leaf gas exchange chamber would yield an instantaneous estimation of W_i, whereas $\Delta^{13}C$ of wood represents a long-term integration of W_i over a whole growing season with possible contributions from storage compounds assimilated even earlier.

$\Delta^{13}C$ has been widely used as an index for changes in micro-environment, as it proved very plastic in response to changes in environment such as water availability, vapour pressure deficit or temperature. The most striking application of this plasticity is the use of tree ring $\Delta^{13}C$ over years and decades to evidence year-to-year variability, as well as long term drifts in climate (Bert *et al.*, 1997; Duquesnay *et al.*, 1998; Saurer *et al.*, 2004). In addition to the large environmental influence on $\Delta^{13}C$, intra-specific genetic variability of $\Delta^{13}C$ was detected in crops (Farquhar and Richards, 1984; Condon *et al.*, 2004; Rebetzke *et al.*, 2006) and in trees (Guehl, 1996; Lauteri *et al.*, 1997; Roupsard *et al.*, 1998). This genetic variability of $\Delta^{13}C$ was used as an index for genetic variability of W_i and hence of TE. This may not be as straightforward as expected due to interference of processes leading to ^{13}C discrimination independently of C_i/C_a (e.g. changes in mesophyll conductance or post photosynthetic discrimination; Evans *et al.*, 1986; Warren and Adams, 2006; Seibt *et al.*, 2008). The simple model relating $\Delta^{13}C$ and W_i (Farquhar and Richards, 1984) makes the assumption that mesophyll conductance to CO_2 is infinite , while it has been proposed that it is of similar order of magnitude as stomatal conductance (see reviews by Evans and von Caemmerer, 1996; Flexas *et al.*, 2008; Warren 2008).

Therefore, when $\Delta^{13}C$ is used as an indicator of W_i in studies involving a high number of individuals (Brendel *et al.*, 2002; Casasoli *et al.*, 2004, Brendel *et al.*, 2008) there is a need to check for the tightness of the relationship between the two traits. Measuring W_i and TE is much more challenging and time-consuming than recording $\Delta^{13}C$ in dry matter. W_i estimated from leaf gas exchange is subject

to a large temporal variability and to measurement uncertainties (lack of precision of the gas exchange techniques, Flexas *et al.*, 2007), while TE requires a careful record of transpiration with weighing or sap flow measurement techniques and estimation of biomass accumulation using allometric relationships.

There is only a rather small number of reports confirming that intra-specific genetic differences in $\Delta^{13}C$ were matched by differences in TE in trees (Zhang and Marshall 1994; Guehl *et al.*, 1996; Roupsard *et al.*, 1998 ; Cernusak *et al.*, 2007), whereas comparisons with gas-exchange based estimates of W_i have been published for a number of species (e.g. Cregg *et al.*, 2000 for *Pinus ponderosa* provenances, Livingston *et al.*, 1999 for *Picea glauca* crosses). The published results usually displayed some degree of correlation, with nevertheless significant deviation from the expected model (Ponton *et al.*, 2002).

Variation in W_i (= A / g_s), can be controlled by either of the two traits (Farquhar *et al.*, 1989). Genetic variation of W_i has been studied for different tree species using gas exchange techniques, but rarely relates clearly to one of the two traits (Zhang *et al.*, 1993, Lauteri *et al.*, 1997, Olivas-Garcia *et al.*, 2000). Very few studies have attempted a more in-detail study of genetic variabiltiy of W_i of tree species and attribute it to related leaf level traits (Olivas-Garcia *et al.*, 2000, Grossnickle *et al.*, 2005, Lauteri *et al.*, 1997). Further, few gene products have yet been found that can be related directly to variation in W_i. Masle *et al.* (2005) have shown that the expression of the gene ERECTA influences water use efficiency in *Arabidopsis thaliana*. This gene affects gas exchange coordination through its impact on leaf anatomy, such as mesophyll cell proliferation and stomatal density. It is therefore a likely candidate gene to take into account in case of studying the natural diversity of W_i.

Oak and in particular pedunculate oak (*Quercus robur* L.), is a perfect candidate for addressing such questions. A large inter and intra-specific variability of $\Delta^{13}C$ was detected in oaks. The two species *Q. robur* L and *Q. petraea* Matt. Liebl. have been demonstrated to consistently differ by 1‰ when growing in mixed populations as well as in common garden plantations (Ponton *et al.*, 2001, 2002). Ponton *et al.* (2002) found that the correlation between $\Delta^{13}C$ and W_i was identical in the two species, providing an argument in support of the hypothesis that the inter-specific difference of $\Delta^{13}C$ actually reflected differences in W_i. A large within-species variability was also detected in a common garden plantation of a *Q. robur*; extreme values differed by as much as 4 ‰. In order to clarify the genetic determinism and identify potential genomic regions involved in the control of this variability, Brendel *et al.* (2008) used a full-sib family of pedunculate oak comprising 278 siblings. A small number of highly significant Quantitative Trait Loci (QTL) was detected for $\Delta^{13}C$, *i.e.*, there were a few well defined regions in the genome that control $\Delta^{13}C$. Among these regions, a major QTL was detected using data from 3 successive years, it explained repeatedly over 20% of the variability of $\Delta^{13}C$ in this family. However, none of the QTL detected for A, g_s, or W_i was in close vicinity to this major QTL for $\Delta^{13}C$. Therefore, little information was provided on the physiological causes of the $\Delta^{13}C$

variability. Given the numerous factors other than W_i that might contribute to the variability of $\Delta^{13}C$ (see above), it was of high importance to document whether the observed variability within this family was correlated with differences in intrinsic water use efficiency (W_i). Moreover the variability of transpiration efficiency remains unknown in this family.

The present study aimed at investigating the physiological and anatomical causes of the $\Delta^{13}C$ variability. The approach used was to concentrate on a small number of genotypes (siblings) displaying large differences in $\Delta^{13}C$ recorded from bulk leaf organic matter by Brendel *et al*. (2008), in order to multiply the number of complementary measurements. In the present study, three genotypes that displayed very high values of $\Delta^{13}C$ during the QTL study in the field, were selected as a "high Δ" phenotype, and the same procedure was used for a "low Δ" phenotype. The two “phenotypes” were grown together in a greenhouse and compared in order to test the following working hypotheses :

- the "high Δ" phenotype displays also larger values of $\Delta^{13}C$ in wood and cellulose extracted from the wood;
- the "high Δ" phenotype displays a lower intrinsic water use efficiency (W_i) and a similar mesophyll conductance to CO_2 compared to the “low Δ” phenotype;
- it also displays a lower whole plant transpiration efficiency (TE);
- lower values of W_i correlate with higher stomatal conductance and density rather than with lower photosynthetic capacity;
- the differences in W_i and stomatal density are paralled by differences in the expression of the ERECTA gene

Material and Methods

Plant material and growth conditions

Clonal copies of several genotypes were sampled within the full-sib progeny of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) created at INRA Bordeaux (Scotti-Saintagne *et al.*, 2004, Brendel *et al.*, 2008). The procedure described by Roussel *et al.* (submitted) was used. Briefly, genotypes were selected on the basis of $\Delta^{13}C$ measurements made during three consecutive years (2000 to 2002) in the nursery at Bourran (South Western France). Three genotypes displaying the highest values of $\Delta^{13}C$ (N101, 171, 287) were selected and propagated *via* rooted cuttings, as well as three genotypes with the lowest values of $\Delta^{13}C$ (N118, 136, 170). Four vegetative copies were used per genotype. This procedure allowed to sample two phenotypes called “high Δ” and "low Δ”, respectively, each comprising four copies of three genotypes.

The complete experimental design consisted of 24 individuals overall that were placed in a greenhouse with a randomized complete bloc design. One vegetative copy of each genotype was placed in each of the four blocs.

The vegetative copies of the selected genotypes were produced during 2002 by UMR BioGeCo, INRA Pierroton (South Western France) and then transferred to Champenoux (North Eastern France) during January 2005, where they were transplanted to 10L containers with a peat and sand mixture (1/1, v/v). A complete fertilisation (4.5 g L^{-1} of slow-release fertiliser Nutricote T100; N, P, K, Mg; 13,13,13,2 + trace elements and 0.2 g L^{-1} of lime) was provided. All individuals were watered daily to field capacity with deionized water. Variation of air temperature was limited to the range of 15 and 25°C during the experiment. Relative humidity (66±8%, average ± standard deviation), CO_2 concentration (401±23 µmol mol^{-1}) and daily global irradiance were continuously recorded in the greenhouse. The plants were grown under a natural photoperiod. The experiments were run from the end of February 2005 to the middle of October 2005.

Carbon isotope composition: total organic matter, wood and cellulose.

Carbon isotope analyses were conducted on three different carbon pools: bulk leaf organic matter, wood and cellulose extracted from wood. Sun-exposed leaves were harvested from the second and third growth flush after measuring diurnal cycles of leaf gas exchange (see below). The harvested leaves were stored at –80°C before being oven dried for 72 hours at 50°C and ball-milled prior to mass spectrometer analysis.

A segment of the main stem was harvested at the level of the second growth flush. The bark was removed and wood was oven-dried for one week at 50°C and ball-milled. Fifty mg of this powder was used for cellulose extraction according to the method of Leavitt and Danzer (1993), modified by Loader *et al*. (1997).

Carbon isotope composition of one mg of bulk leaf material, wood and cellulose was measured using a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S; Thermo Finnigan, Bremen Germany). The relative abundance of ^{13}C (‰) was expressed as:

$$\delta^{13}C=(R_s-R_b)/R_b.1000$$

where R_s and R_b refer to the $^{13}C/^{12}C$ ratio in the sample and in the Vienna Pee Dee Belemnite standard, respectively.

Carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) was calculated as:

$$\Delta^{13}C \approx \delta^{13}C_{air} - \delta^{13}C_{sample}$$

where $\delta^{13}C_{air}$ is the carbon isotope composition of atmospheric CO_2. $\delta^{13}C_{air}$ was assessed in the greenhouse by growing *Zea mays* plants and recording the $\delta^{13}C$ of leaf organic matter according to Marino and McElroy (1991). $\delta^{13}C_{air}$ was found to be close to –10.05‰.

Plant growth traits and determination of transpiration efficiency (TE)

During the experimental period, the diameter at root collar was recorded weekly on each individual. The difference between initial and final diameter (dDiam, mm) was calculated. At the end of the experiment, the height (*i.e.*, length of the longest stem) of each individual was recorded. Then plants were harvested, divided into stems, leaves and roots and oven-dried (50°C) for one to two weeks before being weighted. Final biomass was calculated as the sum of shoot and root biomass. From leaf dry biomass, leaf area (LA, m^2) was estimated using a relationship calibrated on ten supplementary pedunculate oaks: LA (m^2) = 0.0131 + 0.0143*leaf dry weight (g) (R^2=0.97; $p < 0.001$).

Biomass accumulation was calculated for each of the 24 individuals as the difference between the final and initial biomass. Initial biomass was estimated from allometric relationships using data recorded on additional vegetative copies from the same family harvested during April. These plants were cut into individual branch segments. Diameter and length were recorded to compute the cylinder volume of each segment. Then segments were oven dried for three days (50°C) and weighted. The resulting relationship between volume and dry mass (Dry mass (g)=0.013+7.10^{-4}*volume (mm^3); R^2=0.99; $p<0.001$) allowed to estimate the initial above-ground biomass. The initial root biomass was estimated using the estimated initial shoot biomass and the final root/shoot biomass ratio, assuming it remained stable during the course of the experiment. Initial root biomass represented only about 4% of the final root biomass and errors in its estimation could only have minor consequences for the estimate of accumulated biomass.

Cumulated water use was estimated from daily weighing two potted individuals of each genotype (12 individuals overall) from April 2005 to October 2005. Pots were covered with plastic to limit direct evaporation from the soil. Leaf-specific plant transpiration (PT, kg H_2O m^{-2}) was estimated as the ratio between cumulated water loss and leaf area. Transpiration efficiency (TE, g DM g^{-1} H_2O) was computed as the dry biomass accumulated during the experiment relative to cumulated water loss.

Leaf traits

Measurements were made on fully expanded leaves of the second and the third flushes. The second flush started at the end of April and the third flush one month later.

Photosynthesis and stomatal conductance.

Leaf gas exchange was recorded under saturating light on four sun-exposed leaves per individual (two leaves for each flush) during August and September 2005, with an open flow gas exchange system (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE). Leaves were inserted into the chamber and photosynthesis was induced for about 40 min at 25°C, at a CO_2 mole fraction of 370 µmol mol^{-1}, a PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) of 1200 µmol m^{-2} s^{-1}, and an air flux of 300 µmol s^{-1}. Light-saturated net CO_2 assimilation rate (A_{sat}, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) and stomatal conductance for water vapor (g_{sat}, mol H_2O m^{-2}

s^{-1}) were recorded and used to compute intrinsic water-use efficiency under saturating irradiance (W_{sat}, µmol CO_2 mol^{-1} H_2O). Afterwards, for one leaf per flush, a response curve of A to CO_2 mole fraction in intercellular air spaces (C_i, µmol mol^{-1}) was recorded with the following procedure: CO_2 mole fraction was gradually decreased from 370 µmol mol^{-1} to 50 µmol mol^{-1} in five steps, and afterwards increased from 370 µmol mol^{-1} to 2000 µmol mol^{-1} in five steps. During each step, four minutes were allowed for gas exchange stabilization. Environmental parameters, as well as A, g_s and C_i were recorded three times during each step. These A-C_i curves were used to adjust the photosynthesis model of Farquhar *et al.* (2001) producing estimates of maximal RuBP carboxylation rate (V_{cmax}, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) and maximal electron transport rate (J_{max}, µmol e^- m^{-2} s^{-1}) as described by Dreyer *et al.* (2001). The adjusted model did not explicitly include mesophyll conductance to CO_2 (g_i, mol CO_2 m^{-2} s^{-1}), and the computed values represent therefore apparent values of V_{cmax} and J_{max} under the hypothesis of infinite g_i. With the same A-C_i curves, the procedure developed by Ethier and Livingston (2004) was used to compute g_i and to derive unbiased estimates of V_{cmax} and J_{max}. Unfortunately, the fitting procedure with the three parameters g_i, V_{cmax} and J_{max} did not always produce reliable data and therefore unbiased estimates were computed for 27 out of the 36 curves.

Daily courses of net assimilation rate, stomatal conductance and intrinsic water-use efficiency

Eight daily time-courses of leaf gas exchange (A, g_s) were recorded during September and October from 8am to 7pm with a portable photosynthesis chamber LiCor 6200 (LiCor, Lincoln, USA). During each time-course gas exchange of sun-exposed leaves were measured on the six individuals of a bloc, either from the second or the third growth-flush, resulting in 14 to 24 points per day, leaf and flush.
During each time-course (one day of measurement), one flush of the six individuals of one bloc was analysed, yielding therefore eight days of measurement (two flushes x four blocs). To test the repeatability of the data, one time course was repeated on two consecutive days. No significant day effect was detected using a pairwise t-test for A and g_s data. Means were therefore used for the bloc and flush measured during these two time-courses.
Length and width of the leaves were measured and their product was used to estimate leaf area using a relationship previously obtained on 30 leaves representing a large range of areas:
Leaf area = 0.39 + 0.55* length*width (R^2=0.98; $p<0.001$)
Mean values of A, g_s and resulting W_i (A_{mean}, g_{mean} and W_{mean}, respectively) as well as the maximum stomatal conductance (g_{max}) and maximal net assimilation rate (A_{max}) were recorded on each flush of each plant.
The response of stomata to the increase of light in the morning was calculated using daily time course data: minimum g_s (g_{s1}, before 10am) and maximum g_s (g_{s2}, before 3pm) as well as corresponding values of global irradiance (respectively I_1 and I_2) were used to calculate a slope ($\alpha=(g_{s2}-g_{s1})/(I_2-I_1)$). This estimator (thereafter called "α") was expressed in mol H_2O W^{-1} s^{-1}.

Chlorophyll and nitrogen content, leaf mass-to-area ratio

Chlorophyll content per unit leaf area was estimated using a CCM-200 (Chlorophyll Content Meter, Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Total chlorophyll content per leaf area (Chl, g m^{-2}) was derived from CCM readings (CCI) using the following relationship calibrated for oak using biochemical chlorophyll extraction according to Barnes *et al.* (1992):

Chl (g m^{-2}) = 0.021 (CCI unit) + 0.05

Chlorophyll content was recorded weekly on 10 leaves per individual with three replicates on each leave for the second flush between April and July. A least-square mean, generated from an Analysis of Variance model taking into account the date effect, was computed for each flush and individual.

Leaf mass-to-area ratio (LMA, g m^{-2}) was obtained from 3 to 10 leaves per flush and individual. Area of fresh leaves was measured with a Leaf Area Meter (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, U.K.). LMA was estimated after drying the leaves at 50°C for 72h. Leaf nitrogen content on a mass basis (N_{mass}, mg N g^{-1}) was measured with an elemental analyser (Carlo Erba NA 1500 NC, Rodano, Italy) on the leaves used for $\Delta^{13}C$ measurements, and leaf nitrogen content on an area basis (N_{area}, g N m^{-2}) was calculated from N_{mass} and LMA.

Leaf anatomy and stomatal density

Overall 14 discs (1 cm^2) were punched from three leaves per individual for measuring stomatal density and leaf anatomy and were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Microphotographs were made with a scanning electron microscope (LEO 1450 VP, Cambridge, UK; 20-30 Pa inside chamber, accelerating voltage 15 KV, working distance 12 mm). One microphotograph of the abaxial epidermis (1.7 mm^2) of nine discs from three different leaves was used to estimate stomatal density (SD) using Scion software (Scion Corporation, USA).

On the five other disks (1 cm^2), four semi-thin cryo sections were photographed per disk to record anatomical features using the Visilog 6.3 software (Noesis, France): total thickness (TLT, µm), and thickness of palisadic and spongy mesophylls (PMT and SMT, respectively), upper and lower epidermis (UET and LET, respectively). Leaf density (Dens, g cm^{-3}) was computed as the ratio between LMA and leaf thickness.

ERECTA expression

Five leaves were harvested from the top of each individual during a sunny day of October 2005 between 8h00 and 10h30. Leaves were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before analysis. Total RNA of each phenotype from each bloc (i.e., the five leaves of each of the three

genotypes) was extracted in triplicate following the method described by Le Provost *et al.* (2007). RNA quality and quantity were estimated by spectrophotometry and visual inspection on 2% agarose gel. To eliminate the residual genomic DNA present in the samples, RNA were treated with RNase free DNase RQ1 (Promega®, Madison, WI, USA). One microgram of total RNA was then reverse transcribed using Improm-IITM reverse transcription system (Promega®) according to the manufacturer's instructions. After reverse transcription, the cDNA solution was diluted ten fold before Q-PCR analysis. Q-PCR reaction and quantification were performed on a Chromo4™ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) following the procedure described by Pavia *et al.* (2008). PCR primer pairs were designed using the primer2 software (Rozen and Skaletsky, 2000) for the ERECTA gene and a control gene corresponding to an oak actin protein. Primers were designed to have an optimal size of 20 bp (18-22 bp), GC content of 40-60%, and Tm of 60°C. Other criteria such as primer self-annealing were also taken into account. Olignonucleotides were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium). Primer pairs are listed below:

Erecta Forward: 5'TGCAAGCCAGTGCTATCAAG3'

Erecta Reverse: 5'CCATGAAGCAGATCCCAAAG3'

qPCR and data analysis were performed following the procedure described by Paiva *et al.* (2008). Briefly, data were analysed using the Excel (Microsoft) macro GENEX v1.10 (Gene expression Analysis for iCycle iQ® Real-time PCR Detection System, v1.10, 2004, Bio-Rad Laboratories), using the methods derived from the algorithms of Vandesompele *et al.* (2002).

Differences in ERECTA expression between "low Δ" and "high Δ" extremes were analysed simultaneously for blocs 1, 2 and 4, whereas a different Q-PCR was performed for the third bloc. These data are not comparable and thus significant differences were not tested.

Statistical analyses

Response variables were analysed with a linear mixed model to deal with the covariance structure of the data. For analysing whole plant responses, only "phenotype" was treated as fixed whereas "Bloc" and "Genotype" were treated as crossed random effects. For leaf responses, "flush number" was added as fixed effect as well as its interaction with "phenotype" whereas "Bloc" effect was treated as random crossed with both random effects "Genotype" and "Individual" nested in "Genotype". In the latter case when interaction was found to be non significant, the analyses were rerun after removing the interaction in the fixed part of the model.

All models were fitted with R 2.7.2 (R Development Core Team, 2008) software, and namely the "lmer" function from the library "lme4" (Bates *et al.*, 2008). For testing fixed effects, a MCMC sample was drawn from the output of the fitted model, and an effect was declared significant when its 95% highest posterior density interval did not contained zero.

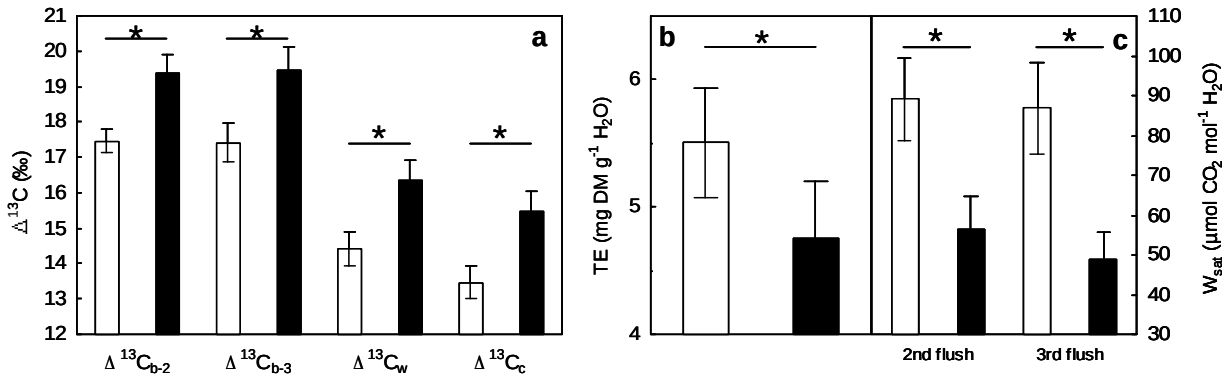


Figure 21: Means (± 95% confidence intervals) in the two phenotypes "low Δ" (open bars) and "high Δ" (closed bars) of: (a) carbon isotope discrimination recorded in bulk matter of leaves from the second ($\Delta^{13}C_{b-2}$), and the third ($\Delta^{13}C_{b-3}$) growth flush, in wood ($\Delta^{13}C_w$) and in the cellulose extracted from the wood ($\Delta^{13}C_c$); (b) transpiration efficiency (TE); (c) intrinsic water-use efficiency calculated as net CO_2 assimilation *vs.* stomatal conductance from light-saturated leaf gas exchange (W_{sat}) for leaves from the second and the third growth flush. Stars indicate significant differences between phenotypes ($p<0.05$). No difference was recorded for $\Delta^{13}C_b$ and W_{sat} between the two growth flushes.

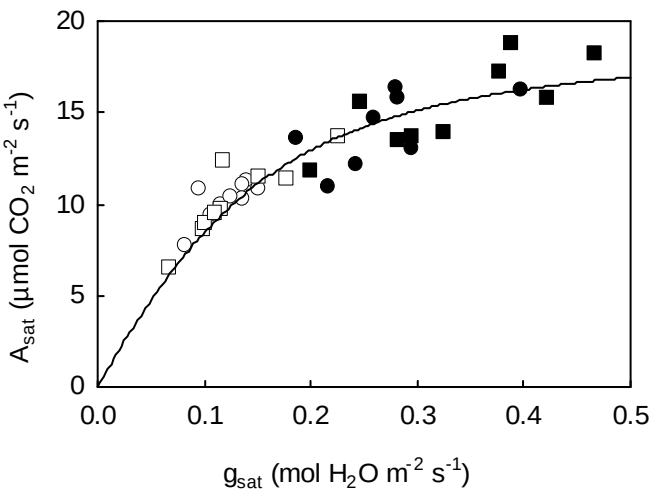


Figure 22: Net CO_2 assimilation rate (A_{sat}) *vs.* stomatal conductance for water vapor (g_{sat}) under ambient CO_2 and saturating irradiance. Open and closed symbols: "low Δ" and "high Δ" phenotype, respectively. Values from 2nd and the 3rd flushes are represented with circles and squares, respectively. Each point represents an individual value of A_{sat} and g_{sat}. A non-rectangular hyperbola: $A_{sat}=(19+104*g_{sat}-((19+104*g_{sat})^2-2.8*19*104*g_{sat})^{½})/1.4$, $R^2=0.78$ was adjusted.

	Mean ± s.d.		Low *vs* high effect
	"low Δ"	"high Δ"	
Biom	371±133 (12)	370±102 (12)	-
dDiam	11.5±2.3 (12)	14.2±2.2 (12)	*
Height	2.0±0.6 (10)	1.7±0.5 (10)	-
LA	0.77±0.22 (12)	0.73±0.18 (12)	-
PT	82.6±9.5 (6)	109.7±14.2 (6)	*

Table 12: Means ± standard deviations (s.d.) and p-level values for the difference between "low Δ" and "high Δ" phenotypes for: biomass gain (Biom, g), diameter increment during the experiment (dDiam, mm), length of the main stem (Height, m), total leaf area (LA, m^2), and cumulated transpiration on a leaf area basis (PT, kg m^{-2}). The number in brackets refers to the number of plants in each phenotype used for computing average values and testing low *vs* high effect.

Results

$\Delta^{13}C$ in different compartments.

Carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) recorded in the three carbon pools: bulk leaf organic matter, wood, and cellulose extracted from wood ($\Delta^{13}C_b$, $\Delta^{13}C_w$ and $\Delta^{13}C_c$, respectively) differed significantly between the two phenotypes, $\Delta^{13}C$ being higher in the "high Δ" phenotype independently of the carbon pool measured (Figure 21). The difference was as high as 2‰ in all compartments, which would translate, according to the model (Farquhar and Richards, 1984), into a 30% difference of intrinsic water-use efficiency (W_i). Leaves from the two growth flushes displayed very close values of $\Delta^{13}C$ (no flush effect was observed for $\Delta^{13}C_b$). Wood $\Delta^{13}C$ values were lower by 3.5‰ and cellulose by almost 4.5‰, compared to leaf material.

Transpiration efficiency (TE)

Transpiration efficiency (TE), recorded as the ratio of accumulated biomass on cumulated water use, was significantly higher in the "low Δ" compared to the “high Δ” phenotype (5.5 *vs*. 4.8 mg g^{-1}, *i.e.*, a 16% difference, Figure 21). Table 12 displays water use and biomass accumulation in the two phenotypes during the experimental period. Biomass production and growth were large and no bloc effect was detected (homogeneity over the whole experimental design). Biomass production, height and leaf area were not significantly different in the two phenotypes, with a large intra-phenotype variability. "High Δ" displayed a slightly larger diameter at root collar. The cumulated water use was stable among blocs (p=0.53) and was much larger in "high Δ" despite some intra-phenotype variability. When expressed relative to total leaf area, cumulated transpiration (PT) was still significantly higher in "high Δ".

Leaf gas exchange under saturating irradiance.

Under saturating irradiance and ambient CO_2, large differences were recorded between the two phenotypes, "low Δ" displaying consistently smaller values of A_{sat} and g_{sat} whether on leaves from the second or the third flush (Table 13). This resulted nevertheless in the very clear difference in W_{sat} shown in Figure 21. W_{sat} was 58% and 78% higher in the "low Δ" phenotype for the second and the third flush respectively (Figure 21). No flush effect was observed for W_{sat}. The data for both flushes fit to the same A_{sat} (g_{sat}) trendline in Figure 22. This trendline displayed a severe curvature and a saturation at the highest values of g_{sat} yielding significantly smaller values of W_{sat} for the individuals with the "high Δ" phenotype.

No differences were found between the phenotypes for maximal carboxylation velocity (V_{cmax}), neither under the hypothesis of infinite mesophyll conductance to CO_2 (apparent V_{cmax}) or for g_i-corrected values (Table 13). Light driven electron flux (J_{max}) was significantly higher for “high Δ” for both,

	Mean (± s.d.) for the 2nd flush		Mean (± s.d.) for the 3rd flush		Statistics		
	"low Δ"	"high Δ"	"low Δ"	"high Δ"	low *vs* high	flush	Int.
gas exchange							
A_{sat}	**10.3 ± 1.1 (9)**	**14.2 ± 2.0 (8)**	**10.4 ± 2.2 (9)**	**15.5 ± 2.4 (9)**	*	-	-
g_{sat}	**0.12 ± 0.02 (9)**	**0.27 ± 0.06 (8)**	**0.13 ± 0.05 (9)**	**0.33 ± 0.09 (9)**	*	-	-
Apparent V_{cmax}	66.0 ± 15.0 (9)	71.7 ± 11.8 (8)	65.6 ± 8.8 (9)	74.4 ± 10.1 (9)	-	-	-
Apparent J_{max}	**161.2 ± 26.1 (8)**	**174.6 ± 31.3 (8)**	**155.6 ± 17.3 (9)**	**187.2 ± 26.2 (9)**	*	-	-
Corrected V_{cmax}	110.3 ± 18.9 (2)	116.6 ± 22.7 (8)	105.1 ± 26.8 (6)	144.8 ± 29.7 (9)	-	-	-
Corrected J_{max}	**169.4 ± 38.7 (2)**	**183.6 ± 34.0 (8)**	**164.4 ± 16.2 (6)**	**204.3 ± 32.4 (9)**	*	-	-
g_i	0.17 ± 0.01 (2)	0.19 ± 0.07 (8)	0.18 ± 0.06 (6)	0.18 ± 0.06 (9)	-	-	-
daily course							
W_{mean}	**114.8 ± 32.8 (12)**	**83.5 ± 29.5 (12)**	**111.3 ± 24.3 (12)**	**74.6 ± 25.7 (12)**	*	-	-
A_{mean}	**9.8 ± 1.7 (12)**	**10.2 ±2.0 (12)**	**9.7 ± 3.4 (12)**	**13.9 ± 2.6 (12)**	*	*	*
g_{mean}	**0.09 ± 0.03 (12)**	**0.14 ± 0.06 (12)**	**0.10 ± 0.05 (12)**	**0.22 ± 0.10 (12)**	*	*	*
A_{max}	**13.5 ± 2.7 (12)**	**15.1 ± 3.7 (12)**	**13.0 ± 4.1 (12)**	**18.1 ± 3.3 (12)**	*	-	-
g_{max}	**0.16 ± 0.05 (12)**	**0.24 ± 0.09 (12)**	**0.16 ± 0.06 (12)**	**0.35 ± 0.15 (12)**	*	*	-
α	**4.4 ± 2.5 (12)**	**11.5 ± 6.0 (10)**	**5.0 ± 2.5 (12)**	**11.1 ± 4.3 (11)**	*	-	-
structural traits							
N_{mass}	**34.1 ± 3.4 (12)**	**29.8 ± 4.8 (10)**	**36.6 ± 3.4 (12)**	**31.4±3.1 (12)**	*	*	-
N_{area}	3.0 ± 0.5 (12)	2.8 ± 0.5 (10)	3.5 ± 0.6 (12)	3.6 ± 0.6 (12)	-	*	-
Chl	**0.89 ± 0.13 (12)**	**0.78 ± 0.16 (12)**	**0.87 ± 0.19 (12)**	**0.77 ± 0.14 (12)**	*	-	-
TLT	140 ± 7 (12)	147 ± 10 (12)	148 ± 17 (12)	155 ± 12 (12)	-	*	-
UET	11.8 ± 0.6 (12)	11.6 ± 1.0 (12)	12.2 ± 1.2 (12)	12.1 ± 1.0 (12)	-	-	-
PMT	**55.7 ± 3.3 (12)**	**60.9 ± 5.0 (12)**	**51.1 ± 5.1 (12)**	**56.1 ± 5.8 (12)**	*	*	-
SMT	62.9 ± 4.9 (12)	65.4 ± 6.6 (12)	74.7 ± 10.6 (12)	76.6 ± 6.3 (12)	-	*	-
LET	9.5 ± 0.6 (12)	8.9 ± 0.4 (12)	9.8 ± 0.9 (12)	10.0 ± 0.6 (12)	-	*	*
Dens	0.57 ± 0.08 (12)	0.57 ± 0.07 (12)	0.63 ± 0.07 (12)	0.63 ± 0.04 (12)	-	*	-
LMA	79.6 ± 11.4 (12)	83.6 ± 9.2 (12)	92.2 ± 10.7 (12)	97.1 ± 7.4 (12)	-	*	-
SD	412 ± 46 (12)	461 ± 48 (12)	483 ± 97 (12)	531 ± 63 (12)	-	*	-
SD*	**412 ± 46 (12)**	**461 ± 48 (12)**	**462 ± 67 (11)**	**531 ± 63 (12)**	*	*	-

Table 13: Statistical analyses for traits measured at the leaf level. Significant differences at 95% level between the two phenotypes "low Δ" and "high Δ", flushes and extreme*flush interaction are indicated by "*". Values for traits with a significant extreme effect are in bold: A_{sat} (µmol m^{-2} s^{-1}): net CO_2 assimilation rate, and g_{sat} (mol m^{-2} s^{-1}): stomatal conductance for water vapour, both measured under ambient CO_2 and light saturation; V_{cmax} (µmol m^{-2} s^{-1}): maximum carboxylation rate of Rubisco; J_{max} (µmol m^{-2} s^{-1}): maximal electron transport rate; g_i (mol m^{-2} s^{-1}): mesophyll conductance to CO_2; W_{mean} (µmol mol^{-1}): average W_i, A_{mean} (µmol m^{-2} s^{-1}): average A and g_{mean} (mol m^{-2} s^{-1}): average g_s as computed from daily courses of leaf gas exchange; A_{max} (µmol m^{-2} s^{-1}): maximum A, g_{max} (mol m^{-2} s^{-1}): maximum g_s, both measured during daily courses of gas exchange; α (10^4 mol m^{-2} s^{-1}/unit of global irradiance): slope of the response of g_s to light determined with daily course of gas exchange; N_{mass} (mg g^{-1}): nitrogen content on a mass basis; N_{area} (g m^{-2}): nitrogen content on an area basis; Chl (g m^{-2}): chlorophyll content; TLT (µm): total leaf thickness; UET (µm): upper epidermis thickness; PMT (µm): palisade mesophyll thickness; SMT (µm): spongy mesophyll thickness; LET (µm): lower epidermis thickness; Dens (g cm^{-3}): foliar density; LMA (g m^{-2}): leaf mass-to-area ratio; SD (mm^{-2}): stomatal density; SD* : without outlier datapoint.

apparent and corrected values. This is in agreement with the lack of a significant difference for mesophyll conductance for CO_2 (g_i) between the phenotypes.

Diurnal courses of leaf gas exchange

The two phenotypes displayed significantly different diurnal courses of leaf gas exchange (A, g_s and W_i, Figure 23). The differences were obvious in the morning when the “high Δ” phenotype displayed much higher g_s than “low Δ”. In the afternoon, g_s decreased for “high Δ”, whereas it remained almost stable throughout the day for “low Δ” (Figure 23a). Net CO_2 assimilation was slightly larger in “high Δ” but the diurnal course of A was quite similar for the two phenotypes (Figure 23b). As a result, W_i was lower in "high Δ" throughout the day (Figure 23c).

Mean and maximal values for A, g_s and W_i (Table 13) were calculated from the diurnal time courses. Maximum as well as mean g_s and A were significantly higher for “high Δ” compared to “low Δ”. For A_{mean} and g_{mean} the difference was significantly higher for the third compared to the second flush. The difference in A was smaller compared to g_s and thus a significantly lower W_{mean} was detected for “high Δ” compared to “low Δ”. Relative differences between the two phenotypes, calculated from W_{mean}, were 37% and 49%, for the 2nd and the 3rd growth flushes, respectively. The response of gs to the increase in irradiance in the morning (α) was significantly higher for “high Δ” compared to “low Δ”.

Leaf structure

With the exception of Chlorophyll content (Chl) and upper epidermis thickness (UET), all structural leaf traits showed a significant flush effect, which was similar for both phenotypes (Table 13). Only for lower epidermis thickness (LET), the difference between phenotypes inverted between second and third flush. A significant difference between phenotypes was only detected for N_{mass}, Chl and palisade mesophyll thickness (PMT), with higher values for “high Δ” compared to “low Δ” for all three traits (Table 13).

No significant difference was detected between phenotypes for stomatal density. This was mainly due to one outlier datapoint of individual (101 bloc C) for flush 3 with very high SD (712 mm^{-2}; see also the high standard deviation for the “low Δ” mean for flush 3 in Table 13). When this outlier was removed, a significant difference was observed between phenotypes (SD* in Table 13), with a higher stomatal density for “low Δ“. Further, when flush 2 was analysed separately (analysis not presented), a significant difference was observed between phenotypes for SD.

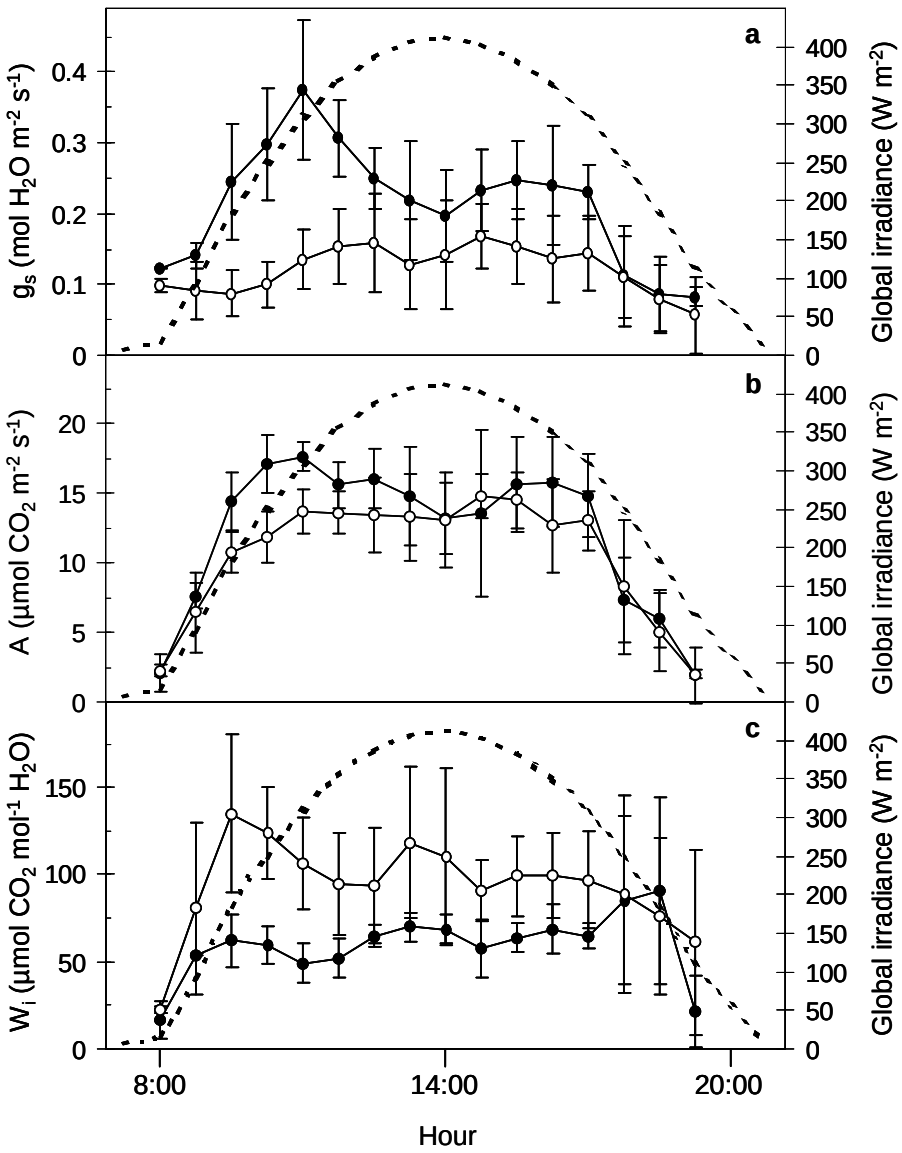


Figure 23: Example of one daily course of (a) stomatal conductance for water vapour (g_s), (b) net CO_2 assimilation rate (A) and (c) intrinsic water use efficiency (W_i) computed as the ratio A/g_s, in "low Δ" (open symbols) and "high Δ" individuals (closed symbols). Measurements were made during 31st July 2005 on leaves of the 3rd flush. Each point is the average for each phenoype ± standard deviation. The dashed line represents the daily course of global irradiance in the greenhouse.

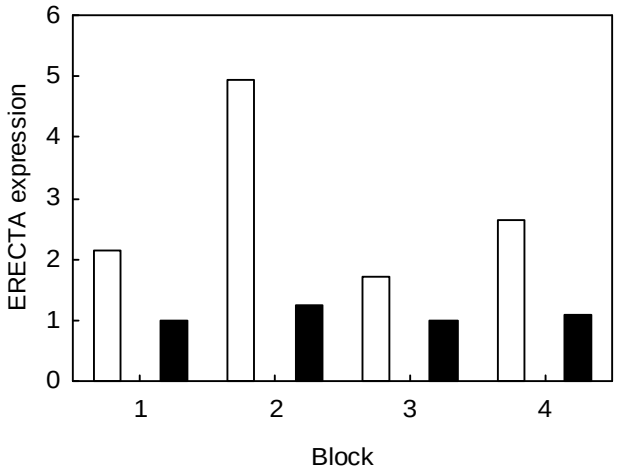


Figure 24: Leaf ERECTA transcript levels, expressed relative to expression of control gene, for "low Δ" (open bars) and "high Δ" (closed bars) phenotypes. For each extreme of each bloc (constituted therefore by one vegetative copy of each three genotypes for one extreme), ERECTA expression resulted from the analysis of a pool of several leaves per genotype.

Expression levels of the ERECTA gene

The expression of the ERECTA gene, relative to the control gene, was analysed for both phenotypes for all blocs separately. The same trend was observed for the four blocs (Figure 24) with a 1.78 to 4 times higher relative expression level of the ERECTA gene for “low Δ” compared to “high Δ”.

Discussion

In this study, we decomposed the complex trait "water-use efficiency" into its main components, and checked whether the ^{13}C isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) recorded from the ^{13}C content in dry matter was a valid estimator for the intra-specific genetic variability of this trait. The sampling of two phenotypes with high or low $\delta^{13}C$, using previously recorded data in a *Quercus robur* full-sib progeny (Brendel *et al.*, 2008), allowed to represent the variability within this progeny by a small number of individuals and therefore enabled a large number of measurements to document the phenotypic differences.

$\Delta^{13}C$ recorded in the different carbon pools (organic matter, wood and wood cellulose) differed significantly (2‰) between “low Δ” and “high Δ” phenotypes. This difference was stable across the carbon pools used and matched the results of a preliminary study with the same genotypes, but based on soluble sugars and starch in leaves, i.e., on pools with a faster turnover rate (Roussel *et al.*, submitted). These results taken together confirm the stability of the isotopic signature of the tested genotypes, and the tight genetic control over this signature. They confirm also that the signature is not blurred by post-photosynthetic discrimination that is known to occur during the synthesis of lignins or other compounds from photosynthetates (Bowling *et al.*, 2008). Furthermore they support the idea that the discrimination processes yielding such differences do not just display a transient expression during a given stage of development, but that they probably act over the whole life cycle of leaves as shown by the stability of the inter-phenotype differences among compounds with short (soluble sugars) and long (wood, starch, cellulose) turn-over times.

The data showed also that these differences in $\Delta^{13}C$ were closely matched by differences in W_i estimated from leaf gas exchange measurements under ambient CO_2 and saturating light, or from mean values (weighted by net CO_2 assimilation) recorded during diurnal cycles of leaf gas exchange. The two methods yielded rather close values for the "low Δ" phenotype, independently of the growth flush from which the leaves were sampled, and divergent values for the "high Δ" phenotype. The difference between phenotypes was around 50% for the first method, and 30-40% for the second one. This lies in the range of values expected from the $\Delta^{13}C$ values, and strongly supports the hypothesis that the variability of $\Delta^{13}C$ recorded in the full-sib family by Brendel *et al.*, (2008) was to a large extent due to the variability of W_i among the full-sibs. Nevertheless, at this stage it cannot be excluded that other processes, like mesophyll conductance to CO_2 (g_i) could also contribute to the observed variability of $\Delta^{13}C$. The overall $\Delta^{13}C$ during carbon assimilation is dependent on the CO_2 concentration at the sites

of carboxylation (C_c) and C_c is strongly dependent on g_i (Farquhar *et al.*1984) . However, no difference was found for g_i, as estimated from adjusting g_i to A-C_i curves concurrently to V_{cmax} and J_{max} (Ethier and Livingston 2004, Warren and Dreyer 2006). The adjusted values were around 0.18 mol m^{-2} s^{-1}, *i.e.*, in the same order of magnitude as stomatal conductance. Such values are in broad agreement with published values (Evans and von Caemmerer, 1995) and match those produced for oaks with a fluorescence-gas exchange technique (Roupsard *et al.*, 1996). The lack of difference between phenotypes, although one cannot conclude to a definitive dismissal of g_i as a contributor to diversity in $\Delta^{13}C$, nevertheless shows that this contribution is probably small. Additional measurements might be required to definitely support this point.

A clear confirmation that the observed differences in $\Delta^{13}C$ and in W_i were related to differences in transpiration efficiency (TE) was also provided. TE is an unambiguous estimate of water use efficiency integrated over a full growth season at whole-plant level. Such direct and unambiguous confirmations are rare, especially for forest tree species, and were produced for *Larix occidentalis* (Zhang and Marshall, 1994), *Populus davidiana* (Zhang *et al.*, 1995), maritime pine (Guehl *et al.*, 1996), an African acacia (Roupsard *et al.*, 1998) and a tropical pioneer tree (Cernusak *et al.*, 2007). In our study, the inter-phenotype difference in TE reached 16%, which is smaller than the estimates using $\Delta^{13}C$ and W_i. This might be due to the fact that the instantaneous measurements concentrated on sun leaves as well as clear, sunny days, whereas TE also integrates the gas exchange of shade leaves and of overcast or rainy days. Moreover, TE depends not only on W_i but also on the fraction of carbon lost by respiration, the fraction of water lost during non-photosynthetic events (nocturnal stomata opening, cuticular transpiration or soil evaporation), and vapour pressure deficit (Farquhar and Richards, 1984). In our study, the environmental effect was limited by the experimental design, as well as the use of several copies to calculate genotype means. Vapour pressure deficit was similar and cannot be the cause of inter-phenotype differences. Nevertheless, inter-phenotype variations in the fraction of carbon lost by respiration or water losses during night-time, cuticular and stem transpiration are conceivable. Differences in these traits may therefore lead to the observed differences between TE and either W_i or $\Delta^{13}C$, but this would require further confirmation.

Gas exchange measurements provided additional information about the processes involved in the intra- specific variability of W_i. Net assimilation rate (A) was higher in “high Δ”, which is counter intuitive with lower W_i. Indeed, higher stomatal conductance resulted in slightly increased A, solely due to smaller stomatal limitations of photosynthesis, and not due to higher photosynthetic capacity *per se*. Indeed V_{cmax} and g_i did not exhibit any differences, while maximum light driven electron flow (J_{max}) was smaller in « low Δ », possibly as a result of a down-regulation of the investments into thylacoid components due to permanent stomatal limitation of photosynthesis. Nevertheless, our data allowed to reach a firm conclusion: the two phenotypes did not differ in photosynthetic capacity, but in stomatal control of photosynthesis and W_i.

The difference found for stomatal conductance under controlled conditions was confirmed by *in situ* diurnal time courses: "low Δ" showed a lower maximum g_s compared to "high Δ". Within species genetic differences in diurnal time courses of gas exchange have already been shown for *Pseudotsuga menziesii* (Zhang *et al.*, 1993), where differences between varieties in W_i where largest in the middle of the afternoon. In our study, however, the difference in W_i was largest in the morning, which, other than related to the difference in g_{max}, could probably be due to the observed difference in stomatal behaviour during stomatal opening in the morning. As stomatal opening in the morning is due to increasing irradiance, differences observed between the phenotypes might be due to different sensitivities of the stomata to irradiance. However differences in stomatal sensitivity to relative humidity or temperature cannot be excluded.

The important role of stomatal control of water use was confirmed by differences in TE : the two phenotypes did not differ in biomass allocation or in transpiring leaf area (both were similar in the two phenotypes) , but in leaf specific water use. This result at whole plant scale strongly supports the major role of stomata in determining the differences in W_i and TE.

Variation in maximum stomatal conductance has been related theoretically to differences in stomatal density (Nobel, 1999), which has been observed for different poplar species (Reich, 1984), but this is not necessarily a common observation (Olivas-Garcia *et al.*, 2000). Here, when excluding one plant with very high values of stomatal density from the analysis, both growth flushes showed a higher stomatal density for the phenotype with higher stomatal conductances (maximum or mean values).

One of the gene products known to be involved in the regulation of stomatal density by inhibiting the differentiation of epidermal cells into guard cells is the gene ERECTA (Bergmann, 2006). It has also been linked to genetic differences in water use efficiency among clones of *Arabidopsis thaliana* (Masle *et al.*, 2005). Most of the studies on expression of ERECTA were done on mutants of *A. thaliana*, not providing any evidence that allelic or expressional diversity of this gene can be observed in natural populations. Here, we have shown an intraspecific diversity in the expression of this gene in mature leaves of a widespread forest tree species. The current understanding of the functioning of ERECTA (Bergmann, 2006) is that higher expression should result in lower stomatal density. This was observed in our study, where phenotypes with a higher expression of ERECTA showed lower stomatal density. The higher expression of this gene in extremes with higher water use efficiency is also in agreement with the study of Masle *et al.* (2005) made on mature leaves of *Arabidopsis* mutants.

Conclusions

The phenotypes, which had been selected on leaf $\Delta^{13}C$ data, effectively showed the expected differences in wood and cellulose $\delta^{13}C$, suggesting little perturbation of the signal recorded during carboxylation by post-photosynthetic discrimination. The study also showed that the diversity in $\Delta^{13}C$

recorded within this pedunculate oak family closely matched two independent estimates of water use efficiency: intrinsic water-use efficiency (W_i) and transpiration efficiency (TE). This strongly supports the use of $\Delta^{13}C$ as an efficient indicator of W_i for screening the genetic variability in this species. Moreover, our results suggest that there was no perturbation caused by a potential intra-specific variability of the parameters involved in the theoretical relations among these three estimates of water use efficiency, such as for example mesophyll conductance to CO_2. At a plant level, diversity in water use efficiency was rather related to consumption of water than to biomass production. This finding was corroborated on the leaf level, since the observed diversity in $\Delta^{13}C$ and W_i was linked to differences in stomatal conductance rather than in photosynthetic capacity. Differences in stomatal density as well as in stomatal dynamics might be causes for the observed diversity in stomatal conductance and will need to be investigated in more detail. The diversity in the expression of the gene ERECA has given a first indication on a supposed mechanisms causing diversity in stomatal density.

Acknowledgements

The authors are grateful to Claude Bréchet (UMR1137, INRA Nancy) for the $\delta^{13}C$ measurements, Nathalie Ningre and Didier LeThiec (UMR1137, INRA Nancy) for leaf microphotographs Patrick Gross (UMR1137, INRA Nancy) for greenhouse management, Jean-Marie Gioria (UMR1137, INRA Nancy) and Christophe Bailly (UEFL, INRA Nancy) for their technical assistance in greenhouse, and Béatrice Richard (UMR1137, INRA Nancy) for cellulose extraction. We also thank Evangelista Bertocchi (UMR BioGeCo, INRA Pierroton) for producing the rooted cuttings and Antoine Kremer (UMR BioGeCo, INRA Pierroton) for providing access to the pedunculate oak off-spring family. M. Roussel was supported by a PhD grant of the Ministry of Higher Education (France). This work was supported by a research grant from the region Lorraine (France) and by the European Union Network of Excellence EVOLTREE.

References

Barnes J, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison A. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32, 85-100.

Bates D, Maechler M, Dai B. 2008. Lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-26. http://lme4.r-forge.r-project.org/

Bergmann D. 2006. Stomatal development: from neighborly to global communication. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 478-483.

Bert D, Leavitt S, Dupouey J. 1997. Variations of wood $\delta^{13}C$ and water-use efficiency of *Abies alba* during the last century. *Ecology* 78, 1588-1596.

Bowling D, Pataki D, Randerson J. 2008. Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO_2 fluxes. *New Phytologist* 178, 240-240.

Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl J. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of $\delta^{13}C$ and ring width in maritime pine. *Plant, Cell and Environment* 25, 945-953.

Brendel O, Le Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodenes C, Kremer A, Guehl J. 2008. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Trees Genetics and Genomes* 4, 263-278.

Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi M, Barreneche T, Lauteri M, Villani F. 2004. Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* mill. *Plant Cell and Environment* 27, 1088-1101.

Cernusak L, Winter K, Aranda J, Turner B, Marshall J. 2007. Transpiration efficiency of a tropical pioneer tree (*Ficus insipida*) in relation to soil fertility. *Journal of Experimental Botany* 58, 3549-3566.

Condon A, Richards R, Rebetzke G, Farquhar G. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55, 2447-2460.

Cregg B, Olivas-Garcia J, Hennessey T. 2000. Provenance variation in carbon isotope discrimination of mature ponderosa pine trees at two locations in the great plains. *Canadian Journal of Forest Research* 30, 428-439.

Dreyer E, Leroux X, Montpied P, Daudet F, Masson F. 2001. Temperature response of leaf photosynthetic capacity in seedlings from seven temperate tree species. *Tree Physiology* 21, 223-232.

Duquesnay A, Breda N, Stievenard M, Dupouey J. 1998. Changes of tree-ring $\delta^{13}C$ and water-use efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) in north-eastern France during the past century. *Plant, Cell and Environment* 21, 565-572.

Ethier G, Livingston N. 2004. On the need to incorporate sensitivity to CO_2 transfer conductance into the Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model. *Plant, Cell and Environment* 27, 137-153.

Evans J, Sharkey T, Berry J, Farquhar G. 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 13, 281-292.

Evans J, Caemmerer v. S. 1996. Update on photosynthesis: carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology* 110, 339-346.

Farquhar G, von Caemmerer S, Berry J. 2001. Models of photosynthesis. *Plant Physiology* 125, 42-45.

Farquhar G, Ehleringer J, Hubick K. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 40, 503-537.

Farquhar G, Richards P. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11, 539-552.

Flexas J, Diaz-Espejo A, Berry J, Cifre J, Galmes J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M. 2007. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany* 58, 1533-1543.

Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espej A, Galmes J, Medrano H. 2008. Mesophyll conductance to CO_2: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment* 31, 602-621.

Grossnickle S, Fan S, Russell J. 2005. Variation in gas exchange and water use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees-Structure and Function* 19, 32-42.

Guehl J, Nguyen-Queyrens A, Loustau D, Ferhi A. 1996. Genetic and environmental determinants of water-use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. In: Bonnet-Masimbert M, Sandermanns H eds. *Eurosilva contribution to forest tree physiology*, Editions Colloques de l'INRA, Paris, 297-321.

Lauteri M, Scartazza A, Guido M, Brugnoli E. 1997. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology* 11, 675-683.

Le Provost G, Herrera R, Paiva J, Chaumeil P, Salin F, Plomion C. 2007. A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research* 40, 291-297.

Leavitt S, Danzer S. 1993. Method for batch processing small wood samples to holocellulose for stable-carbon isotope analysis. *Analytical Chemistry* 65, 87-89.

Livingston N, Guy R, Sun Z, Ethier G. 1999. The effects of nitrogen stress on the stable carbon isotope composition, productivity and water use efficiency of white spruce (*Picea glauca* (Moench) voss) seedlings. *Plant, Cell and Environment* 22, 281-289.

Loader N, Robertson I, Barker A, Switsur V, Waterhouse J. 1997. An improved technique for the batch processing of small wholewood samples to α-cellulose. *Chemical Geology* 136, 313-317.

Nobel P. 1999. Resistances and conductances - Transpiration. In: Nobel P. ed. *Physicochemical and environmental plant physiology*, Academic Press, 635 pages, 301-303.

Marino B, McElroy M. 1991. Isotopic composition of atmospheric CO_2 inferred from carbon in C4 plant cellulose. *Nature* 349, 127-131.

Masle J, Gilmore S, Farquhar G. 2005. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. N*ature* 436, 866-870.

Olivas-Garcia J, Cregg B, Hennessey T. 2000. Genotypic variation in carbon isotope discrimination and gas exchange of ponderosa pine seedlings under two levels of water stress. *Canadian Journal of Forest Research* 30, 1581-1590.

Paiva J, Garcés M, Alves A, Garnier-Géré P, Rodrigues J, Lalanne C, Porcon S, Le Provost G, Perez D, Brach J, Frigerio J, Claverol S, Barré A, Fevereiro P, Plomion C. 2008. Molecular and phenotypic profiling from the base to the crown in maritime pine wood forming tissue. *New Phytologist* 178, 283-301.

Ponton S, Dupouey J, Bréda N, Dreyer E. 2002. Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiology* 22, 413-422.

Ponton S, Dupouey J, Breda N, Feuillat F, Bodénès C, Dreyer E. 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant, Cell and Environment* 24, 861-868.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Rebetzke G, Richards R, Condon A, Farquhar G. 2006. Inheritance of carbon isotope discrimination in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica;*, 1-10.

Reich P. 1984. Leaf stomatal density and diffusive conductance in three amphistomatous hybrid poplar cultivars. *New Phytologist* 98, 231-239.

Roupsard O, Gross P, Dreyer E. 1996. Limitation of photosynthetic activity by CO_2 availability in the chloroplasts of oak leaves from different species and during drought. *Annales des Sciences Forestieres* 53, 243-254.

Roupsard O, Joly H, Dreyer E. 1998. Variability of initial growth, water-use efficiency and carbon isotope discrimination in seedlings of *Faidherbia albida* (Del.) A. Vhev., a multipurpose tree of semi-arid africa. provenance and drought effects. *Annales des Sciences Forestieres* 55, 329-348.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer2 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S eds. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*, Human Press, 365-386.

Saurer M, Siegwolf R, Schweingruber F. 2004. Carbon isotope discrimination indicates improving water-use efficiency of trees in northern Eurasia over the last 100 years. *Global Change Biology* 10, 2109-2120.

Scotti-Saintagne C, Bodenes C, Barreneche T, Bertocchi E, Plomion C, Kremer A. 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1648-1659.

Seibt U, Rajabi A, Griffiths H, Berry J. 2008. Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia* 155, 441-454.

Vandesompele J, De Peter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3 Research0034.

Warren C. 2008. Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO_2 transfer. *Journal of Experimental Biology* 59, 1475-1487.

Warren C, Adams M. 2006. Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. *Plant Cell and Environment* 29, 192-201.

Warren C, Dreyer E. Temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO_2: results from two independent approaches. *Journal of Experimental Botany* 57, 3057-3067.

Zhang J, Marshall J. 1994. Population differences in water-use efficiency of well-watered and water-stressed western larch seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 92-99.

Zhang J, Marshall J, Jaquish B. 1993. Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. *Oecologia* 93, 80-87.

Zhang X, Wu N, Li C. 2005. Physiological and growth responses of *Populus davidiana* ecotypes to different soil water contents. *Journal of Arid Environments* 60, 567-579.

I.5 Conclusions

Dans cette famille de chêne pédonculé, une forte variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau a été trouvée. L'analyse des différences entre génotypes des valeurs de discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$) a permis de montrer que ces différences étaient très stables quelles que soient les conditions environnementales. Ces résultats sont donc en accord avec les travaux de Torti (2005) et de Brendel *et al.* (2008) qui ont démontré le déterminisme génétique de $\Delta^{13}C$ dans cette famille à l'aide d'études de génétique quantitative. $\Delta^{13}C$ représente théoriquement une estimation de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) intégrée dans le temps et pondérée par l'assimilation. De par la relation qui lie W_i à l'efficience de transpiration (TE, intégrée dans le temps et à l'échelle de la plante entière), $\Delta^{13}C$ est aussi théoriquement corrélé à TE. Dans le cadre de ce travail, l'efficience d'utilisation de l'eau a été analysée à l'aide de ces trois méthodes. Les résultats relatifs à chacune de ces méthodes sont cohérents: l'estimation de W_i par $\Delta^{13}C$ était valide, de même que l'estimation de TE. Ces résultats ont donc montré que les différences entre génotypes observées en $\Delta^{13}C$ reflétaient des différences en W_i et même en TE. Ainsi, le déterminisme génétique décrit pour $\Delta^{13}C$ reflète un déterminisme génétique de W_i ou de TE.

La première étape du projet dans lequel s'inscrivait cette thèse consistait à trouver le(s) trait(s) qui contribuai(en)t le plus à la variabilité génétique intra-famille observée en conditions non-limitantes. D'après nos résultats, dans cette famille de chêne pédonculé, cette variabilité semble être fortement conditionnée par une variabilité de conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). En conditions non-limitantes, un génotype présentant une forte efficience d'utilisation de l'eau est ainsi caractérisé par une faible conductance stomatique, une faible assimilation, et une faible transpiration à l'échelle "plante entière", sans pour autant que la production de biomasse soit affectée.

Les deux études concernant les phénotypes extrêmes ont permis de décomposer plus finement la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau observée au sein de cette famille. Les génotypes du phénotype "N" ont été choisis sous l'hypothèse que l'assimilation nette de CO_2 expliquait la variabilité de $W_i/\Delta^{13}C$ observée. Cette hypothèse a été formulée suite à la colocalisation de QTL pour la teneur en azote, la chlorophylle et $\Delta^{13}C$ au niveau d'une même région génomique située sur le groupe de liaison 2m (Figure 8). Or, plusieurs éléments permettent de pencher en faveur d'un contrôle de W_i par la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s):

(i) Aucune différence d'assimilation nette de CO_2 (A) n'a pu être mise en évidence pour le phénotype "N" (chapitre I.4.2.1). Même si les résultats n'ont pas été présentés dans ce

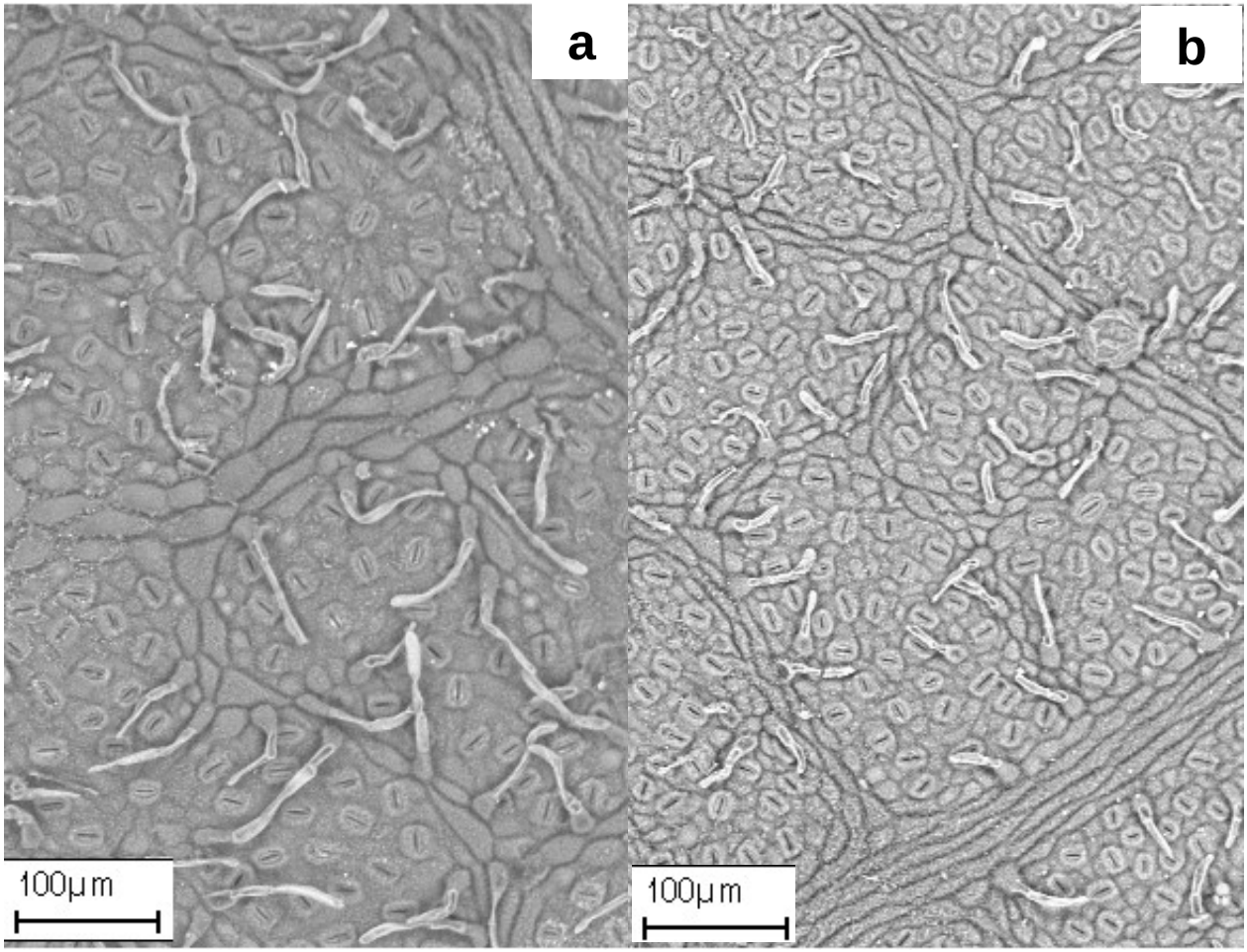


Figure 25 : Photographies de la surface abaxiale de deux extrêmes a) "low Δ" (caractérisé par une faible conductance stomatique), et b) "high Δ" (caractérisé par une forte conductance stomatique). Photographies réalisées par N. Ningre (UMR INRA-UHP EEF), à l'aide d'un microscope électronique à balayage.

manuscrit, le phénotype "N" a été à nouveau étudié pour les traits analysés dans le chapitre I.4.2.2. Les résultats sont identiques à ceux acquis dans le chapitre I.4.2.1: les extrêmes ne présentent aucune différence phénotypique pour l'ensemble des caractères examinés, quelle que soit l'échelle d'investigation.

(ii) Pour le phénotype "Δ", les différences entre extrêmes observées allaient à l'encontre d'un contrôle de W_i par A, puisqu'un fort W_i était associé à une faible assimilation nette de CO_2.

(iii) Le contrôle de g_s sur W_i s'exprimait aussi à l'échelle plante entière où aucune différence entre extrêmes n'a pu être détectée pour l'accumulation de biomasse, alors que la transpiration totale par unité de surface foliaire était plus faible pour les génotypes à forte efficience de transpiration (chapitre I.4.2.2).

(iii) Pour le phénotype "Δ", des différences significatives entre extrêmes ont été observées pour l'ensemble des trais relatifs à la conductance stomatique. Nous avons ainsi montré que l'extrême "low Δ" caractérisé par une faible g_s présentait une densité stomatique plus faible (selon la pousse étudiée) que l'extrême "high Δ" (chapitres I.4.2.1 et I.4.2.2) (Figure 25). Nous avons aussi montré que les génotypes étudiés présentaient une variabilité de réponse de g_s à l'intensité lumineuse et que cette variabilité était liée à une variabilité intra-spécifique de W_i (chapitre I.4.2.2). Ainsi, un génotype présentant une g_s élevée en conditions saturantes de lumière répondait plus fortement à l'augmentation de PAR. En annexe 1, nous avons montré pour sept génotypes de chêne pédonculé que la variabilité de g_s était aussi liée à une variabilité de réponse de g_s au déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (VPD). Les génotypes caractérisés par une forte g_s pour un faible VPD (<1.5kPa) étaient aussi ceux qui étaient les plus sensibles au VPD. Ces résultats confirmaient donc l'étude de Brendel *et al.* (2008) dans laquelle une variabilité de réponse de g_s au VPD a été observée dans cette famille de chêne pédonculé. En compilant les résultats du chapitre I.4.2.2 et de l'annexe 1, il semblerait donc que, dans cette famille de chêne pédonculé, un génotype caractérisé par une forte conductance stomatique en condition saturante de lumière et pour un VPD<1.5kPa présente une sensibilité de réponse à la lumière et au VPD plus importante qu'un génotype caractérisé par une faible g_s dans les mêmes conditions. Ce résultat n'est pas étonnant, puisque, les mécanismes contrôlant les mouvements des stomates en réponse à la lumière et au VPD sont communs (Grantz & Zeiger, 1986). De la même façon que dans notre étude, Grossnickle & Fan (1998) ont montré que la variabilité de réponse des stomates à la lumière était liée à une variabilité de

réponse des stomates au VPD chez des clones d'épinettes (*Picea glauca* (Moench) Voss x *Picea engelmannii* Parry ex Engelm.): le clone qui répondait le plus au VPD était aussi celui qui répondait le plus à la lumière.

Outre la caractérisation phénotypique de ces extrêmes, une approche génomique développée par l'UMR BioGeCo (INRA Bordeaux) a permis d'étudier les différences d'expression de gène candidat sur des échantillons de l'expérimentation de 2005. Le chapitre I.4.2.2 présente donc des données de génomique obtenus par G. LeProvost (UMR BioGeCo, Bordeaux) sur l'expression du gène ERECTA. Ce gène a été identifié chez *Arabidopsis* comme étant un élément important de régulation de l'efficience d'utilisation de l'eau (Masle *et al.*, 2005), puisqu'il affecte la coordination entre l'assimilation nette de CO_2 et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau. Son influence sur g_s se fait *via* le développement stomatique. En effet, lorsque ce gène est exprimé et que la protéine n'est pas modifiée dans sa séquence d'acides aminés, la densité stomatique et la conductance stomatique sont plus faibles (Masle e*t al.*, 2005; Bergmann, 2006). D'autre part, le produit de ce gène affecte l'assimilation nette de CO_2. Par comparaison aux mutants complémentés par le gène non muté, les mutants caractérisés par une absence de transcrits ou par la synthèse d'une protéine modifiée présentent une assimilation nette de CO_2 plus faible (alors que g_s est plus forte), parallèlement à des valeurs de V_{cmax} et de J_{max} (respectivement la vitesse maximale de carboxylation de la Rubisco et le flux maximal d'électrons) plus faibles. Au niveau anatomique, les mutants non complémentés présentent une désorganisation du mésophylle conduisant à une diminution des contacts cellulaires, et une déficience du nombre de cellules par unité de surface foliaire ce qui influence le volume d'espaces intercellulaires et peut donc agir sur les conductances internes au CO_2 en phase gazeuse.

Compte tenu de son effet sur l'efficience d'utilisation de l'eau chez *Arabidopsis*, et du fait que ce gène a des homologues chez de nombreuses espèces (riz, orge, peuplier, chêne pédonculé…), il constituait donc un candidat potentiel dans le cadre de cette étude sur la variabilité intraspécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau chez le chêne pédonculé. Ce gène s'exprime préférentiellement dans les méristèmes et les feuilles jeunes chez *Arabidopsis* (Masle *et al*., 2005). Cependant, travailler sur des feuilles jeunes pose deux problèmes. Le premier est que l'on ne connait pas l'âge des feuilles pour lequel l'expression de ce gène est maximale. Pour cela, il aurait fallu établir une cinétique d'expression en amont de cette expérimentation. Le deuxième problème vient du décalage d'apparition des feuilles entre individus, décalage pouvant aller de quelques jours à plusieurs semaines. Prélever des feuilles à un stade de maturité identique est donc difficile. Pour palier à ces problèmes, l'expression de ce gène a été analysée pour les génotypes de 2005 sur des feuilles matures, ceci permettant de disposer d'un matériel végétal au même stade de maturité, et de faire une récolte simultanée pour tous les individus.

Cette étude a permis de mettre en évidence des différences d'expression du gène ERECTA entre les deux extrêmes du phénotype "Δ", alors qu'aucune différence n'a été détectée pour le phénotype "N"

(résultats non présentés dans le chapitre I.4.2.2). L'expression de ce gène pour l'extrême "low Δ" présentant une forte efficience d'utilisation (fort W_i, fort TE ou faible $\Delta^{13}C$) est plus forte que pour l'extrême "high Δ". Dans le cadre de l'étude effectuée par Masle *et al.* (2005), l'efficience d'utilisation de l'eau était affectée suite à des mutations de la séquence du gène conduisant à l'absence d'expression ou à la synthèse de protéines modifiées. Contrairement à ces travaux, chez le chêne pédonculé, ce ne sont pas des altérations de la séquence du gène qui sont à l'origine des variations de W_i, mais c'est une différence d'expression de ce gène qui est liée à la variabilité naturelle entre génotypes. D'après nos connaissances, cette étude est la première à avoir démontré que la variabilité naturelle d'expression de ce gène pouvait être liée à une variabilité de W_i.

2ème partie: Estimation de la conductance stomatique par la composition isotopique en oxygène 18 de la matière organique foliaire et de l'eau foliaire

II.1 Introduction

Les variations de composition isotopique en oxygène ($^{18}O/^{16}O$) de l'eau et de la matière organique foliaires peuvent refléter des différences de conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) entre individus (lorsque la différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espace intercellulaires et l'atmosphère (ν) est constante). L'assimilation nette de CO_2 (A) n'a aucune influence sur la signature isotopique en ^{18}O de l'eau foliaire et de la matière organique foliaire, de ce fait, le signal ^{18}O peut être utilisé pour décomposer les variations de W_i, et permetre ainsi de déterminer la composante (A ou g_s) qui influence le plus W_i. En conditions non-limitantes de croissance, et dans la famille de chêne pédonculé présentée dans la partie précédente, la variabilité entre génotypes d'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) est liée à une variabilité de la conductance stomatique et de ses déterminants. L'objectif de cette partie est donc d'évaluer la possibilité d'utiliser l'approche ^{18}O pour estimer la conductance stomatique chez le chêne pédonculé. Pour y parvenir, nous avons mené deux expérimentations. La première consistait à analyser l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire et de la matière organique soluble foliaire et à relier ces signaux à la conductance stomatique. La deuxième expérimentation consistait à tester la méthode d'extraction des sucres solubles foliaires, précédemment utilisée lors de l'analyse de la composition isotopique en ^{13}C (chapitre I.4.2.1), dans le cadre de l'analyse de la signature en ^{18}O de ces composés foliaires. Cette deuxième expérimentation a été présentée sous la forme d'une publication.

Enrichissement de l'eau foliaire au niveau des sites d'évaporation ($\Delta^{18}O_e$) : $\Delta^{18}O_e = \varepsilon_k + \varepsilon^* + (\Delta^{18}O_v - \varepsilon_k)\, w_a/w_i$			
ε_k (fractionnement cinétique pour la diffusion de la vapeur d'eau à travers les stomates et la couche limite, ‰)	$=(32g_s^{-1}+21g_b^{-1})/(g_s^{-1}+g_b^{-1})$	g_s	conductance stomatique pour la vapeur d'eau (mol H_2O m^{-2} s^{-1})
		g_b	conductance de la couche limite pour la vapeur d'eau (mol H_2O m^{-2} s^{-1})
ε^* (fractionnement à l'équilibre causé par les changements de phase de l'eau liquide à l'eau vapeur, ‰)	$=[2.644 - 3.206\,(10^3/\theta) + 1{,}534\,(10^6/\theta^2)]\,10^{-3}$	θ	température (°C)
$\Delta^{18}O_v$ (enrichissement de la vapeur d'eau par rapport à la source, ‰)	$=\delta_v - \delta_s$	δ_v	composition isotopique de la vapeur d'eau atmosphérique (‰)
		δ_s	composition isotopique de la source (‰)
w_i (fraction molaire de vapeur d'eau dans les espaces intercellulaires, mmol mol^{-1})	$=6.1078*\exp((17.27*\theta)/(273.2+\theta))*10^3/P$	P	pression (mbar)
w_a (fraction molaire de vapeur d'eau dans l'atmosphère, mmol mol^{-1})	$=w_i*HR/100$	HR	humidité relative (%)
Enrichissement de l'eau foliaire totale ($\Delta^{18}O_L$): $\Delta^{18}O_L = \Delta^{18}O_e\,(1-e^{-\wp})/\wp$			
$\wp$ (nombre de Péclet)	$= (g_s \nu\, L)/(CD)$	ν	déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (mmol mol^{-1})
		L	distance effective du trajet entre les sites d'évaporation et les veines (m)
		C	concentration molaire de l'eau (= 55.5 mol m^{-3})
		D	diffusivité de H_2O^{18} dans l'eau (= 119 10^{-9} $e^{(637/(T-137))}$, où T est la température en °K)
Enrichissement de la matière organique soluble ($\Delta^{18}O_{MOS}$): $\Delta^{18}O_{MOS} = \Delta^{18}O_L + \varepsilon_{wc}$			
ε_{wc} (fractionnement associé à l'enrichissement en ^{18}O des molécules organiques portant des fonctions carbonyles par rapport à l'eau dans laquelle ces molécules ont été synthétisées, ‰)			

Tableau 14: Rappels des équations du modèle d'enrichissement de l'eau au niveau des sites d'évaporation ($\Delta^{18}O_e$), de l'eau foliaire totale ($\Delta^{18}O_L$), et de la matière organique soluble foliaire ($\Delta^{18}O_{MOS}$).

II.2 Relation entre conductance stomatique et composition en ^{18}O de l'eau foliaire et de la matière organique soluble foliaire

II.2.1 Introduction

Lorsque les conditions environnementales sont appropriées (aucune variation du déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère, en conditions d'équilibre et lorsque le signal de la source est connu et constant), la conductance stomatique est indirectement liée à l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire ou de la matière organique (Encadré 4). L'enrichissement en ^{18}O ($\Delta^{18}O$) est défini comme la différence entre la composition isotopique de l'échantillon ($\delta^{18}O$) et la composition isotopique de la source d'eau (δ_s). Les équations des modèles d'enrichissement de l'eau foliaire et de la matière organique sont rappelées dans le tableau 14. Jusqu'à présent, aucune étude n'a décrit l'utilisation de cette technique chez le chêne pédonculé. Nous avons donc testé s'il était possible de combiner les outils isotopiques (^{18}O et ^{13}C) afin d'analyser l'influence de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) sur l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque.

Pour ce faire, les arbres ont été placés en phytotron, en conditions contrôlées pour atténuer les variations des conditions climatiques, et notamment du déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère. Dans ces conditions, les variations de l'enrichissement de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$) ou de la matière organique soluble foliaire ($\Delta^{18}O_{MOS}$) par rapport à la source (ici l'eau d'arrosage) ne sont théoriquement dues qu'aux variations de g_s. De plus, les arbres étant mis dans des conditions relativement constantes de température mais surtout de lumière, la conductance stomatique est censée être maximale (en conditions non-limitantes d'apport en eau) tout au long de la journée et ne pas subir de cycles diurnes. De ce fait, dans de telles conditions, l'état d'équilibre doit être atteint, ce qui permet de vérifier les relations théoriques à l'aide d'un modèle, somme toute, relativement simple (cf Encadré 4, Tableau 14).

Pour répondre aux objectifs fixés, il fallait pouvoir travailler sur des individus présentant une gamme de conductance stomatique étendue. Cependant, cette expérimentation en phytotron imposait de travailler sur un nombre relativement réduit d'individus. N'ayant à notre disposition qu'une vingtaine de génotypes (n'appartenant pas aux phénotypes extrêmes), il était difficile d'espérer une forte variabilité génétique entre individus. De ce fait, pour augmenter la variabilité de conductance stomatique, différents niveaux de contraintes hydriques édaphiques ont été réalisés. Ainsi, quatre groupes, de cinq arbres chacun, ont été constitués. Deux de ces groupes ont été arrosés à capacité au champ, alors que les deux autres ont subi deux contraintes hydriques différentes, de sorte à obtenir un stress modéré et un stress fort définis par rapport à l'expérimentation présentée en annexe 2.

Cette expérimentation avait plusieurs objectifs:

(i) vérifier que la variabilité de g_s causée par les différents niveaux de contraintes hydriques se reflétaient dans l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$)

(ii) analyser les relations entre g_s et $\Delta^{18}O_{MOS}/\Delta^{18}O_L$

(iii) vérifier la validité de la double approche isotopique (^{13}C et ^{18}O) pour analyser l'influence de g_s sur W_i chez le chêne pédonculé.

II.2.2 Matériel & Méthodes

II.2.2.1 Matériel végétal et conditions de culture

Vingt boutures de chêne pédonculé provenant de la famille F1 de plein-frères ont été utilisées dans cette étude. Chacune de ces boutures représentait un génotype distinct. Les boutures ont été préparées par l'UMR BioGeCo (INRA Pierroton) en 2003, puis ont été transportées à Nancy en décembre 2005. Elles ont ensuite été transférées dans des pots de 10L, contenant un mélange tourbe/sable (1/1, v/v) et placées en serre. Les chênes ont été régulièrement fertilisés jusqu'en juillet 2007 (engrais à libération lente (Nutricote T 100 13-13-13, NPK) et calcaire magnésien (amendement calcique) à raison de 4,5 g L^{-1} et 0,2 g L^{-1}, respectivement).

En juillet 2007, les pots ont été déplacés en phytotron pour cinq jours (une journée d'acclimatation et quatre journées de mesure). Les 20 plants ont été répartis de façon à former quatre groupes de cinq plants chacun. Chaque journée de mesure correspondait à l'étude d'un de ces groupes. Deux de ces groupes (10 plants en tout) ont été arrosés à capacité au champ (C1 et C2) alors que les deux autres ont été soumis à deux niveaux de sécheresse: modéré (groupe S1) et fort (groupe S2). Les niveaux de sécheresse ont été définis par rapport à l'étude décrite dans l'annexe 2. Nous avions alors déterminé les diminutions relatives (plants stressés par rapport à plants témoins) de conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) au cours d'un dessèchement progressif du sol, chez le chêne pédonculé. Cette étude nous a permis de relier la quantité d'eau qui se trouvait dans les pots (différence entre poids à capacité au champ et poids sec), l'humidité volumique mesurée dans ces mêmes pots et g_s. Les niveaux de contraintes hydriques utilisés dans ce travail ont donc été fixés *a priori* pour avoir une diminution relative de g_s de 40% environ pour le traitement S1 et de 80% environ pour le traitement S2, par rapport aux traitements à capacité au champ, ce qui correspond à des humidités volumiques de 15 et 9% respectivement (annexe 2). Nous avons ensuite calculé quel était le poids de pot qui correspondait à ces humidités volumiques. A capacité au champ, les pots pesaient 10620±60 g (moyenne ± écart-type). Le premier niveau de contrainte a été déterminé de façon à ce que les cinq pots S1 atteignent et restent à un poids de 9000g (ce qui doit correspondre *a priori* à une humidité volumique de 15%). Pour le deuxième niveau de contrainte hydrique, les pots n'ont pas été arrosés jusqu'à atteindre un

Tableau 15: Moyennes (± écart-type), pour chaque traitement (C1 et C2: capacité au champ; S1 et S2: sécheresse édaphique), des variables relatives à la contrainte hydrique (HV: humidité volumique du sol), et aux conditions climatiques mesurées dans le phytotron ou lors des mesures d'échanges gazeux à l'aide de la Licor 6200 (HR: humidité relative; T: température; ν: déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère; CO_2: concentration en CO_2; Qntm: flux de photons dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement actives). Les moyennes ont été établies sur la période de jour, soit de 8h00 à 20h00.

	C1	C2	S1	S2
variable édaphique				
HV (%)	37.0±2.6	34.8±3.6	15.4±3.6	11.4±2.2
variables climatiques: phytotron				
HR (%)	59.5±9.8	55.2±7.8	55.5±7.0	55.5±7.7
θ (°C)	25.2±1.8	25.1±2.2	26.1±2.4	24.9±2.4
ν (mmol mol^{-1})	13.3±3.6	14.5±3.3	15.5±3.3	14.3±3.3
variables climatiques: Licor 6200				
HR (%)	59.5±8.3	53.8±7.8	54.0±7.4	52.0±6.9
θ (°C)	27.3±2.3	28.0±2.1	27.6±2.6	27.4±2.3
ν (mmol mol^{-1})	15.1±3.5	17.8±3.9	17.5±4.1	18.0±3.9
CO_2 (mmol mol^{-1})	527±28	515±35	542±51	551±45
Qntm (µmol photons m^{-2} s^{-1})	809±212	792±261	765±243	703±226

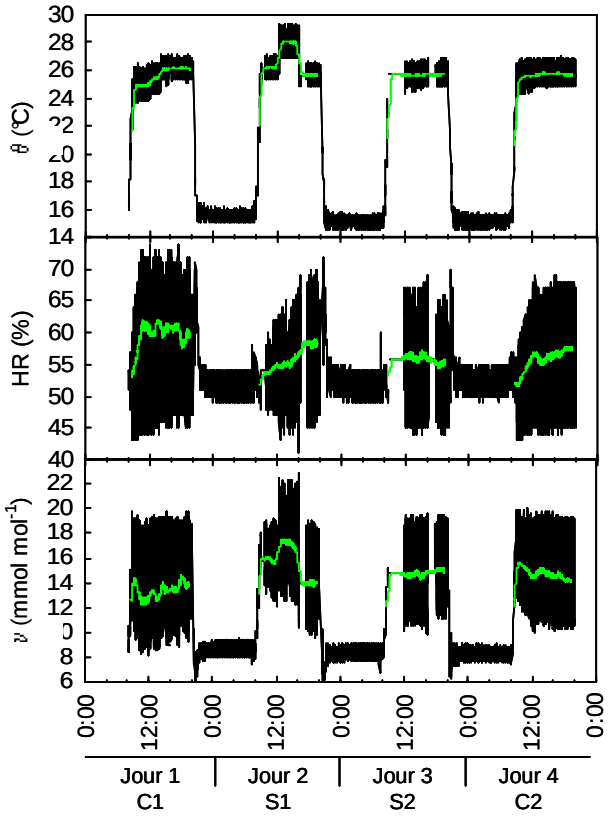


Figure 26: Evolution journalière, dans le phytotron, de la température (θ), de l'humidité relative (HR) et du déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν). Les courbes en noir représentent les données brutes. Les courbes en vert représentent les moyennes des valeurs comprises dans l'intervalle [t-35; t+35], avec t la valeur à l'instant t.
Chaque jour, 5 plants de chaque traitement (C1 et C2: capacité au champ, S1 et S2: conditions limitantes d'apport en eau) ont été étudiés.

	$\theta_{Li-6200}$	θ_p	θ_{p35}	$HR_{Li-6200}$	HR_p	HR_{p35}	$\nu_{Li-6200}$	ν_p	ν_{p35}
$\theta_{Li-6200}$	*								
θ_p	0.67	*							
θ_{p35}	0.71	0.94	*						
$HR_{Li-6200}$		0.37	0.34	*					
HR_p			0.18	-0.38	*				
HR_{p35}	0.42	0.48	0.52	0.43	0.35	*			
$\nu_{Li-6200}$	0.54			-0.80	0.43		*		
ν_p	0.28	0.60	0.43	0.52	-0.79		-0.27	*	
ν_{p35}	0.57	0.84	0.87				0.23	0.49	*

Tableau 16: Matrice de corrélations entre la température (θ), l'humidité relative (HR), le déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (ν, calculé à partir de θ et HR) enregistrées (ou calculées) par l'appareil de mesure des échanges gazeux (Li-6200) et dans le phytotron (p). Pour les données enregistrées dans le phytotron, les moyennes des valeurs comprises dans l'intervalle [t-35; t+35], avec t la valeur à l'instant t ont été calculées (p35). Seules les corrélations significatives ($p<0.05$) ont été notées.

poids de 8600g (HV de 9% *a priori*) puis ont été arrosés en conséquence pour maintenir ce poids. La contrainte hydrique des traitements S1 et S2 a débuté deux jours avant leur transfert en phytotron. Les plants ont été arrosés avec de l'eau osmosée. Les pots ont été couverts de plastique pour limiter l'évaporation d'eau.

L'humidité volumique (HV, %) a été mesurée sur 15 cm de sol (TDR, Time Domain Reflectometry, Trase TDR-systems, Soil moisture Equipment Corp.). Les mesures d'humidité volumique ont été réalisées tous les matins, sur l'ensemble des pots du traitement étudié au cours de la journée et avant le début des mesures. Le sol des plants maintenus à capacité au champ présentait une humidité volumique de 35-38% (Tableau 15), ce qui est en accord avec les données de l'annexe 2. L'humidité volumique du sol des plants sous la contrainte hydrique S1 était d'environ 15%, et correspondait donc à l'humidité volumique fixée *a priori*. Par contre, l'humidité volumique moyenne observée pour le traitement S2 était supérieure (11%) à celle définie *a priori* (i.e. 9%) (Tableau 15). Pour une telle humidité volumique, la diminution relative de g_s a été estimée à 60% d'après les résultats de l'annexe 2.

La chambre climatique était équipée d'un plateau rotatif permettant d'homogénéiser les conditions de milieu, en particulier l'éclairement. La photopériode et la température ont été fixées pour suivre des cycles jour/nuit avec 12h30 de jour (de 8h à 20h30) à 25°C et avec une intensité lumineuse de 1200 µmol m^{-2} s^{-1}. La nuit, la température a été fixée à 15°C. La température (θ, °C) et l'humidité relative (HR, %) ont été enregistrées toutes les minutes pendant les quatre jours de mesure (Figure 26). Les variations journalières de déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (ν, mmol mol^{-1}, figure 26) ont été calculées selon la relation:

$$\nu = \frac{6.1078 * Exp^{\frac{17.27*\theta}{237.2+\theta}} - 6.1078 * Exp^{\frac{17.27*\theta}{237.2+\theta}} * \frac{HR}{100}}{P} * 10^3$$

où P est la pression en mbar.

Compte tenu des importantes variations journalières observées (Figure 26), la valeur de ν à l'instant "t" a été moyennée en fonction des "n" données bornant cette valeur (moyenne des valeurs comprises dans l'intervalle [t-n; t+n]). Seules les données obtenues pour n=35 (notées p35) sont présentées dans ce manuscrit (Figure 26). L'humidité relative et la température ont aussi été enregistrées par l'appareil utilisé pour la mesure des échanges gazeux (LiCor 6200, LiCor, Lincoln, USA) et ont permis de calculer ν. Les corrélations pour ces différentes mesures sont présentées dans le tableau 16. Les données relevées dans le phytotron et non moyennées corrèlent peu avec les données de LiCor 6200 (Tableau 16) et ont donc été laissées de côté. Tous les calculs relatifs à la modélisation de l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire présentés dans ce chapitre ont été effectués à la fois avec les données climatiques fournies par la LiCor 6200 et par les systèmes d'enregistrement du phytotron (p35). Cependant, seuls ceux utilisant les données p35 sont présentés dans ce manuscrit.

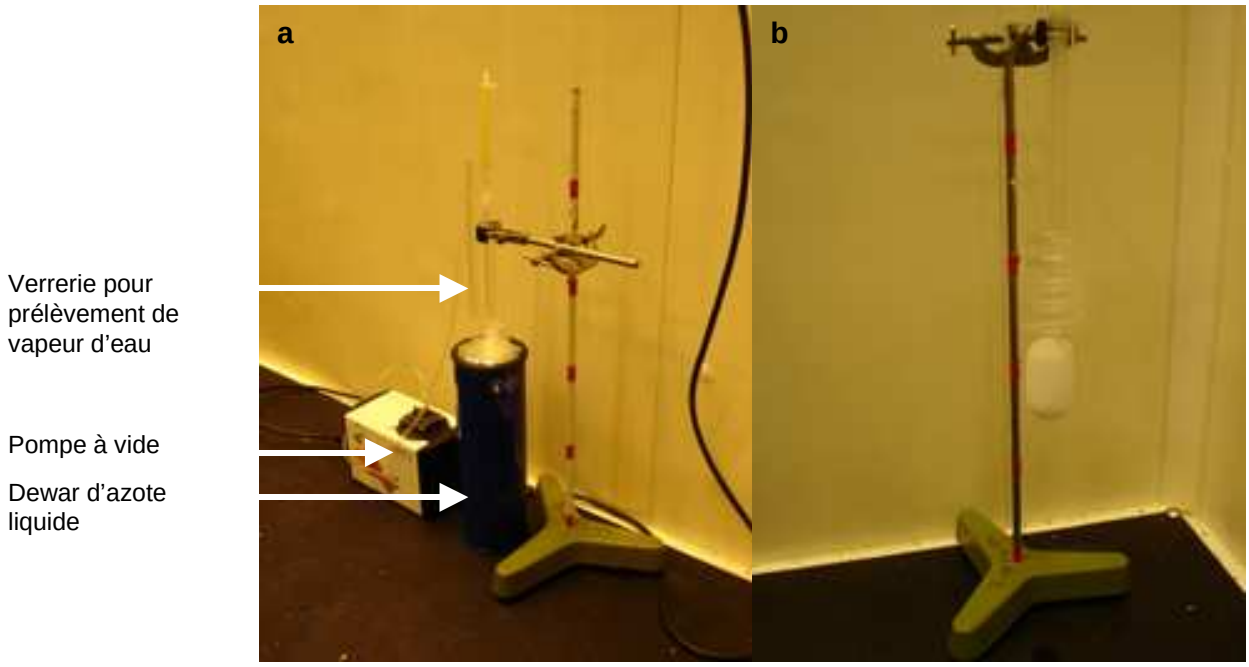


Figure 27: (a) Système de prélèvement de vapeur d'eau et (b) verrerie dans laquelle se concentre la vapeur d'eau.

Figure 28: Ligne cryogénique d'extraction d'eau à partir de sol ou de feuilles, d'après West *et al.* (2006). L'eau est évaporée de l'échantillon mis sous vide, et plongé dans un bain-marie (65°C). L'eau est ensuite condensée dans un tube collecteur plongé dans un Dewar contenant un mélange d'alcool et d'azote liquide (-40°C). Avant chaque extraction, le tube contenant l'échantillon est plongé dans l'azote liquide et est mis sous vide pour permettre de piéger la vapeur d'eau contenue dans le tube et condensée sur les parois. Toutes les extractions d'eau ont été effectuées par C. Hossann (UMR INRA-UHP EEF). Photographie prise par C. Bréchet (UMR INRA-UHP EEF).

Outre ces problèmes d'oscillation, certaines tendances entre journées de mesure ont été observées. Ainsi, le jour de l'étude des plants appartenant au traitement C1, l'humidité relative était plus forte et ν plus faible, quelles que soient les données utilisées (LiCor 6200, phytotron), alors que θ est resté stable pour les quatre jours de mesure (Tableau 15). Le contrôle environnemental de cette expérience n'a donc pas été optimal.

II.2.2.2 Prélèvement de vapeur d'eau atmosphérique, d'eau d'arrosage et d'eau du sol

Trois échantillons de vapeur d'eau atmosphérique ont été collectés tous les jours (entre 8h et 10h30 pour le premier, entre 12h et 14h pour le second et entre 18h et 20h pour le dernier) par condensation cryogénique. Pour ce faire, une pompe à vide permettait de faire circuler l'air de la chambre climatique à travers un serpentin en verre dont la partie inférieure était plongée dans de l'azote liquide (Figure 27). Avant de plonger le serpentin dans l'azote liquide, l'air était pompé pendant une dizaine de minutes afin de purger le système. Puis le serpentin était abaissé dans le Dewar d'azote liquide. La vapeur d'eau se refroidissait alors progressivement puis se congelait dans la partie inférieure du serpentin affleurant l'azote liquide (permettant de rester à une température telle que le CO_2 n'est pas congelé – 70°C, température mesurée en cours d'expérimentation-). Au bout de 30 à 60 mn, la verrerie était mise à température ambiante pour que la vapeur d'eau transformée en glace devienne liquide. Le volume de vapeur d'eau atmosphérique prélevé était alors de quelques ml (2ml maximum).

Deux à trois échantillons de 2ml d'eau d'arrosage ont été prélevés chaque jour.

Chaque soir, le sol de deux pots du traitement étudié dans la journée a été carotté. Le carottage a été réalisé à l'aide d'un emporte pièce d'un diamètre de 4 cm environ sur les 10 premiers cm de sol, le système racinaire des arbres empêchant d'aller au-delà. L'eau a ensuite été extraite par distillation cryogénique sous vide (Figure 28) par C. Hossann (UMR INRA-UHP EEF). Le volume d'eau moyen obtenu était de 1.9 à 2.5ml pour les traitements C1, C2 et S1 et de 0.8ml pour le traitement S2.

Tous les échantillons d'eau (extraite du sol, vapeur d'eau et eau d'arrosage) ont ensuite été stockés à -20°C avant l'analyse de leur composition isotopique en ^{18}O (**δ_{sol}, δ_v** et **δ_s,** respectivement, en **‰**).

II.2.2.3 Cinétiques d'échanges gazeux

Sept feuilles matures par arbre ont été utilisées pour les mesures d'échanges gazeux. Toutes ces feuilles étaient placées sur la tige principale, entre 1.2 et 1.5 m au-dessus du collet (soit 1.4 et 1.7m au-dessus du sol). Les échanges gazeux (assimilation nette de CO_2 (**A, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}**) et conductance

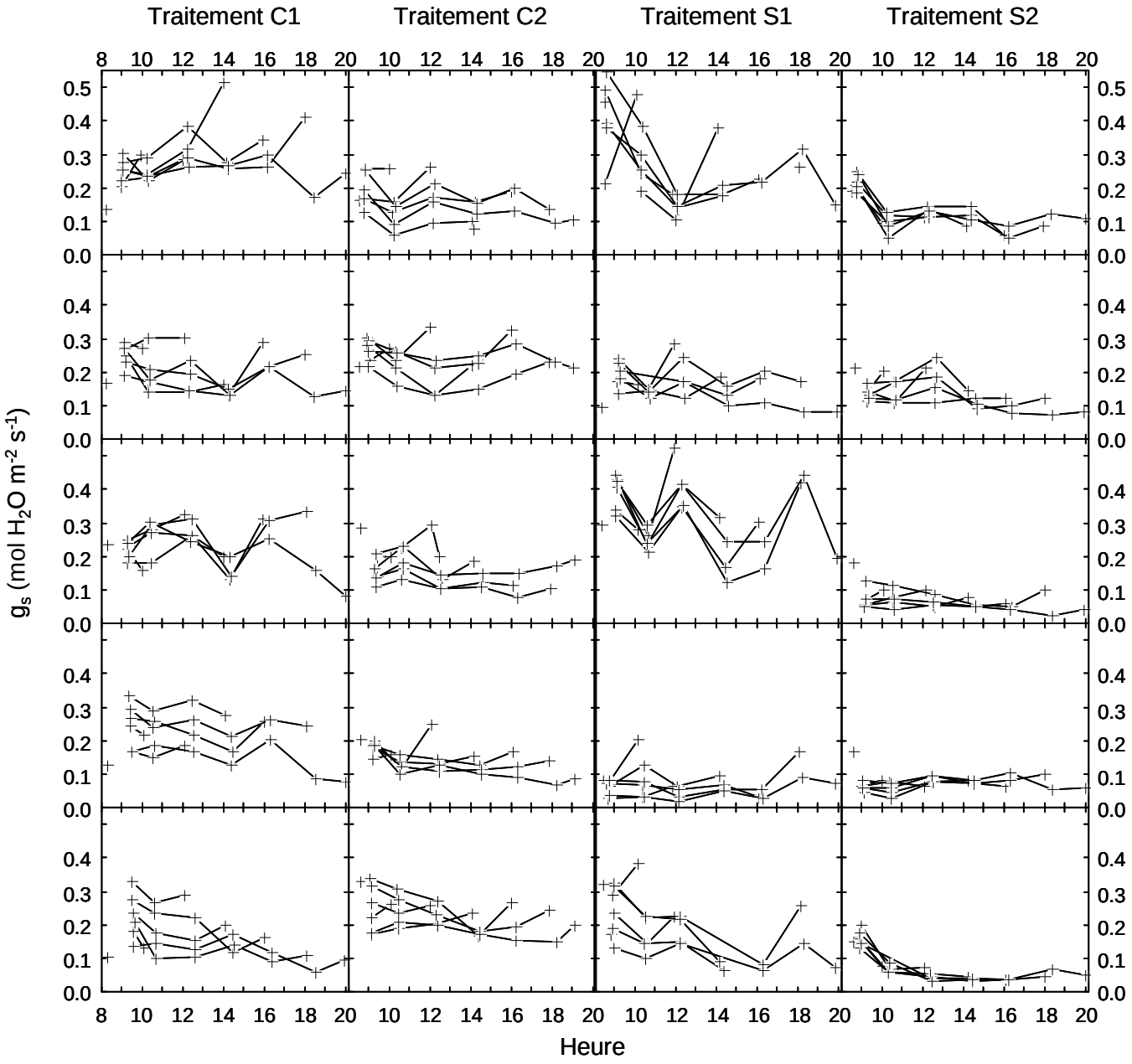


Figure 29: Evolution de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) pour chaque individu de chaque traitement (C1 et C2 correspondent aux plants maintenus à capacité au champ, S1 correspond à une sécheresse moyenne, et S2 à une sécheresse forte). Pour chaque individu, sept feuilles ont été mesurées. Après chaque point de cinétique, une feuille a été prélevée, de sorte que le septième point ne comportait plus qu'une seule feuille.

stomatique pour la vapeur d'eau (**g_s, mol H_2O m^{-2} s^{-1}**)) ont été mesurés à l'aide d'un système portable LiCor 6200 (LiCor, Lincoln, USA). L'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (**W_i, µmol CO_2 mol^{-1} H_2O**) a été calculée en utilisant le rapport de A sur g_s. Le calcul de A et de g_s nécessite de connaître la surface foliaire introduite dans la chambre de mesure. Pour ce faire, sur cinq feuilles par arbre, autres que celles utilisées pour les échanges gazeux et représentant une large gamme de surface, la longueur et la largeur ainsi que la surface déterminée à l'aide d'un planimètre Delta T (Delta T devices, Cambridge, UK) ont été mesurées. Une relation a été établie entre le produit longueur*largeur et la surface foliaire mesurée pour chaque arbre étudié ($p<0.05$; R^2 compris entre 80 et 99%). Toutes ces relations ont ensuite permis d'estimer la surface foliaire des feuilles utilisées pour les mesures d'échanges gazeux à partir de simples mesures de longueur et largeur, non destructrices.

Sept points de mesure d'échanges gazeux ont été effectués pour chaque traitement: un point toutes les deux heures de 8h à 20h. A chaque point, l'ensemble des feuilles d'un même plant était mesuré, à la suite de quoi l'une d'entre elles était prélevée. Pour la dernière mesure (vers 20h), il ne restait donc plus qu'une feuille sur les sept présentes initialement. Sur cette dernière feuille, sept mesures d'échanges gazeux ont donc été effectuées (Figure 29).

Pour établir les corrélations avec la signature isotopique en ^{18}O de l'eau foliaire et de la matière organique soluble, différentes valeurs de A, g_s et W_i ont été utilisées: les valeurs précédant immédiatement le prélèvement des feuilles (notées **A**, **g**, **W**), mais aussi les moyennes des 2 à 7 valeurs précédant le prélèvement de la feuille (notées $\mathbf{A_{moy\ j}}$, $\mathbf{g_{moy\ j}}$, $\mathbf{W_{moy\ j}}$ avec j le nombre de mesures moyennées, j varie donc de 2 à 7). Les valeurs de A, de g et de W (obtenues juste avant le prélèvement des feuilles) ont ensuite été moyennées par traitement pour chaque point de mesure ($\mathbf{A_{moy}}$, $\mathbf{g_{moy}}$, $\mathbf{W_{moy}}$ respectivement). Des moyennes pour chaque individu de chaque traitement ont aussi été déterminées ($\mathbf{A_{ind}}$, $\mathbf{g_{ind}}$, $\mathbf{W_{ind}}$ respectivement).

II.2.2.4 Extraction de l'eau foliaire et du jus foliaire

Après chaque série de mesure d'échanges gazeux, une feuille était récoltée et mise dans un exetainer (hermétique) immédiatement plongé dans de l'azote liquide puis stocké à –20°C afin d'extraire ultérieurement l'eau foliaire. L'extraction de l'eau foliaire a été faite sous vide par distillation cryogénique (West *et al.*, 2006; Figure 28), par les soins de C. Hossann (UMR INRA-UHP EEF). La quantité d'eau extraite était en moyenne de 0.72±0.35ml. L'eau foliaire a ensuite été stockée à –20°C jusqu'à l'analyse de sa composition isotopique en ^{18}O (**δ_L, ‰**).
Avant et après extraction de l'eau, les feuilles ont été pesées de sorte à déterminer leur poids frais (PF) et leur poids sec (PS). Ces deux mesures ont permis de calculer le contenu en eau relatif des feuilles (**LWC**=(PF-PS)/PS**, %**).

Pour chaque arbre, les feuilles récoltées à 8h et 18h ont été découpées en deux (le long de la veine principale) avec une lame de rasoir. Une moitié a été utilisée pour l'extraction d'eau foliaire comme décrit précédemment; l'autre moitié a été destinée à l'extraction de la matière organique soluble. Pour ce faire, les morceaux de feuilles ont été placés dans des seringues de 1 ml, immédiatement congelées dans l'azote liquide puis stockées à –20°C. Les feuilles, une fois décongelées ont été pressées de sorte à en extraire le jus foliaire. Ce jus foliaire (76±44 mg), contenant de l'eau et de la matière organique soluble a ensuite été séché sous vide pendant 24 heures environ. Le culot ainsi obtenu (13±8 mg) a été utilisé pour analyser la composition isotopique en ^{18}O et en ^{13}C de la matière organique soluble (**$\delta^{18}O_{MOS}$, $\delta^{13}C_{MOS}$ ‰**).

II.2.2.5 Analyse de la composition en oxygène 18 et en carbone 13

Les analyses de la composition en ^{18}O de la matière organique soluble ont été effectuées sur 0.3 à 0.4 mg de matière. Pour l'eau, la prise d'essai était de 0.2µl. Dans la mesure du possible, trois répétitions de chaque échantillon ont été analysées pour l'eau et la matière organique soluble.

Toutes les analyses de composition en ^{18}O ont été réalisées par C. Bréchet (UMR INRA-UHP EEF) à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique (GV Instruments, Angleterre) couplé à un Euro-Pyr-OH (Eurovector, Italie) pour l'analyse de l'eau et à un analyseur élémentaire EuroEA (Eurovector, Italie) pour l'analyse de la matière organique. L'analyse du signal isotopique de l'ensemble des échantillons (eau et matière organique) se fait par pyrolyse: formation de CO à haute temperature 1230°C, en absence d'oxygène et en présence de carbone vitreux.

Les analyses de la composition en ^{13}C ont été réalisées par C. Hossann (UMR INRA-UHP EEF) sur un mg de matière organique à l'aide d'un analyseur élémentaire carbone-azote (Na 1500 Carlo Erba, Italie) couplé à un spectromètre de masse isotopique (Thermo Finnigan Delta S, Allemagne) par combustion sous oxygène.

Les compositions isotopiques en ^{18}O et ^{13}C sont notées en delta (respectivement, $\delta^{18}O$ et $\delta^{13}C$, ‰) et déterminés selon l'équation suivante: $\delta^{18}O=(Rs-Rb).1000/Rb$, où Rs correspond au rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ ou $^{13}C/^{12}C$, respectivement, de l'échantillon, et Rb correspond au rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ ou $^{13}C/^{12}C$ du standard (VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) et Pee Dee Belemnite, respectivement).

II.2.2.6 Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA Version 7.1 (StatSoft, Inc. 2005).

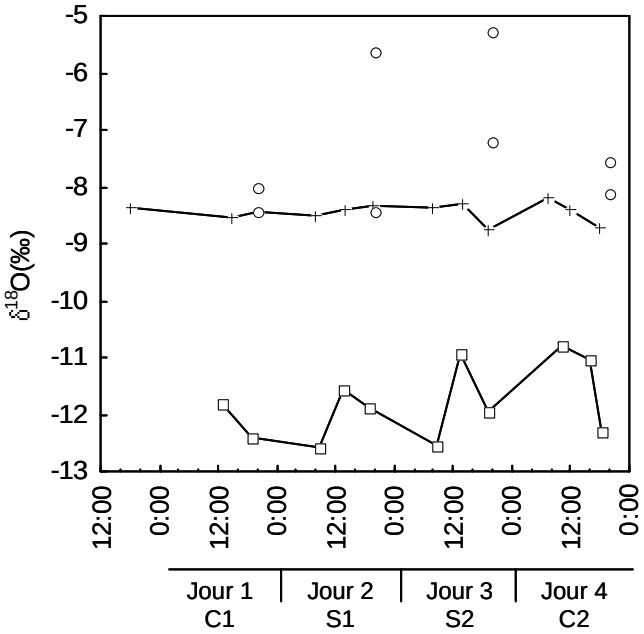


Figure 30: Composition isotopique en ^{18}O ($\delta^{18}O$) de l'eau extraite du sol (○; 2 pots par journée de mesure), de la vapeur d'eau atmosphérique (□) et de l'eau d'arrosage (+). C1 et C2 correspondent aux traitements à capacité au champ; S1 et S2 correspondent aux deux conditions limitantes d'apport en eau.

Les comparaisons entre séries de mesure et entre traitements ont été réalisées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) sur, respectivement, l'ensemble du jeu de données et les moyennes calculées par plant et par traitement. Un test de Levene d'homogénéité des variances a permis de compléter cette analyse. Les différences entre traitements ont ensuite été testées en utilisant un test HSD de Tukey.
Les corrélations et les régressions ont été effectuées sur les jeux de données obtenues pour chaque feuille de chaque plant ou sur les moyennes par plant et par traitement. Les régressions entre les traits ont été déterminées sur la base des moyennes géométriques (ou régression de type II) (Sokal & Rohlf, 2000).
Les ajustements ont été réalisés à l'aide de l'option "Estimation non-linéaire" du module "Modèles linéaires/non-linéaires avancés".
Toutes les analyses ont été considérées significatives pour $p<0.05$.

II.2.3 Résultats et discussion

II.2.3.1 Composition isotopique en ^{18}O de l'eau d'arrosage, de la vapeur d'eau atmosphérique et du sol

La signature en ^{18}O de l'eau d'arrosage (ou eau source, δ_s) était très stable tout au long de l'expérimentation (-8.44±0.17‰; Figure 30). La signature de la vapeur d'eau atmosphérique (δ_v), moins stable que δ_s entre et pendant les différentes journées de mesure, était en moyenne de -11.80±0.65‰ (Figure 30). La différence entre δ_v et δ_s a permis de déterminer $\Delta^{18}O_v$ qui représente l'enrichissement de la vapeur d'eau atmosphérique par rapport à la source. En moyenne, $\Delta^{18}O_v$ était de -3.66±0.42‰ le jour 1 (traitement C1), -3.56±0.52‰ le jour 2 (traitement S1), -3.37±0.82‰ le jour 3 (traitement S2) et -2.93±0.81‰ le jour 4 (traitement C2). La composition isotopique en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique est une composante importante du modèle d'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire. Dans la plupart des études (Cernusak *et al.*, 2002; Brandes *et al.*, 2007; Sullivan & Welker, 2007…), la valeur de $\Delta^{18}O_V$ est estimée à $-\varepsilon^*$ (avec ε^* le fractionnement à l'équilibre causé par les changements de phase de l'eau liquide à l'eau vapeur): la vapeur d'eau est considérée comme étant en équilibre isotopique avec la source ($\delta_V=\delta_s-\varepsilon^*$). Cette équation n'est vraie que lorsque les conditions environnementales sont homogènes. A 25°C, ε^*=9.1‰, et donc $\Delta^{18}O_V$=-9.1‰. La valeur moyenne observée dans cette étude est donc supérieure de 6‰. Dans la chambre climatique, la régulation de l'humidité relative se fait par brumisation à ultrasons et l'eau utilisée est issue de la même source que l'eau d'arrosage (C. Bailly, communcation personnelle). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle $\Delta^{18}O_V=-\varepsilon^*$ est ici inappropriée. Cependant, lors des calculs utilisant le modèle d'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire (Tableau 14), l'utilisation de valeurs de $\Delta^{18}O_v$ proches de -3‰ a surestimé l'ensemble des paramètres relatifs à ce modèle par rapport aux données expérimentales. Lors du prélèvement de

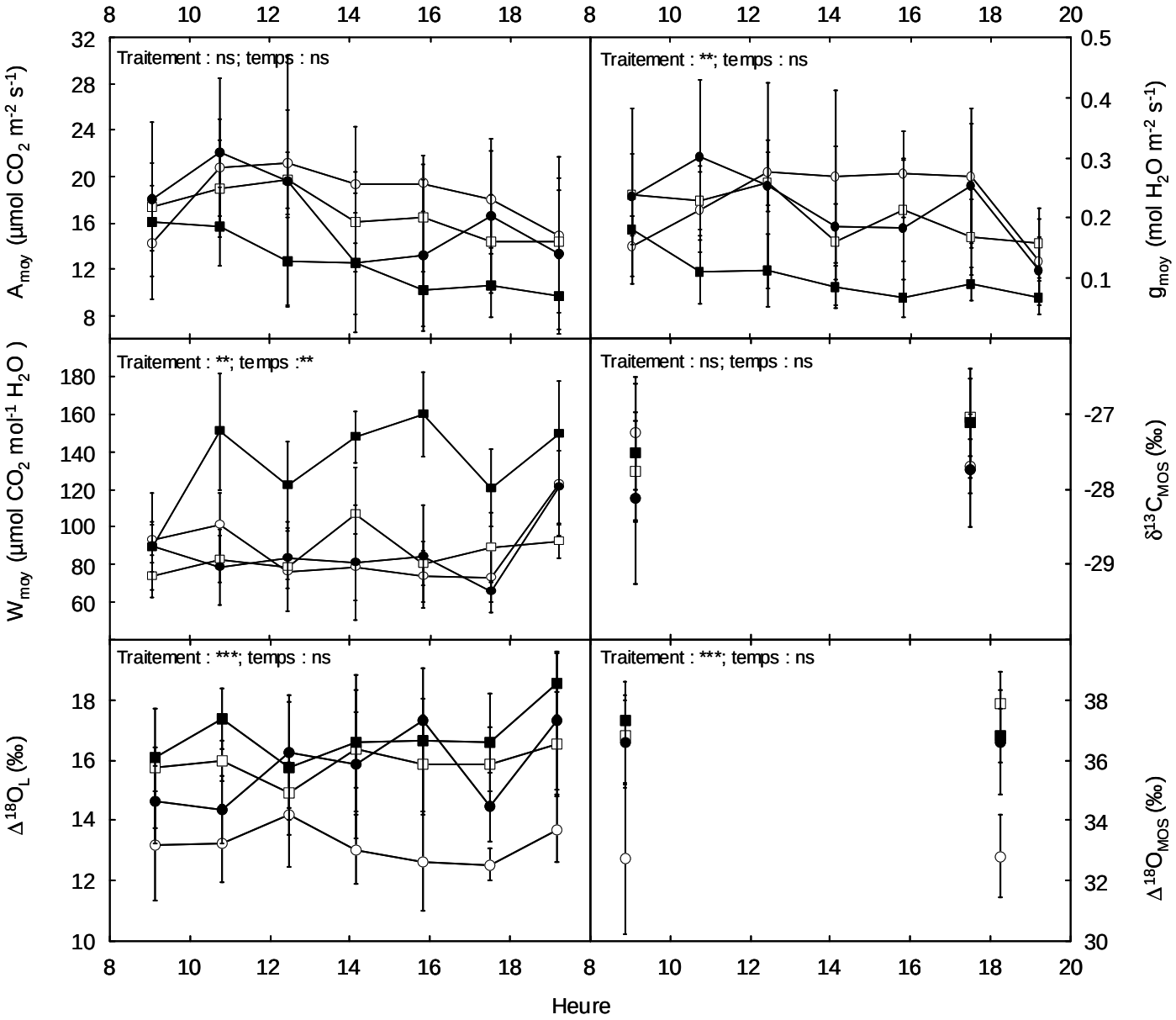


Figure 31: Cinétiques journalières pour les traits mesurés (conductance stomatique pour la vapeur d'eau, g_{moy}; assimilation nette de CO_2, A_{moy}; efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque, W_{moy}; composition isotopique en ^{13}C de la matière organique soluble foliaire, $\delta^{13}C_{MOS}$; enrichissements en ^{18}O de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$) et de la matière organique soluble foliaire ($\Delta^{18}O_{MOS}$) par rapport à la source) en fonction des traitements. Les symboles vides sont associés aux traitements à capacité au champ (C1:○; C2:□), alors que les symboles pleins représentent les deux traitements avec contraintes hydriques (S1:●; S2:■). Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de chaque traitement pour chaque point de mesure.
L'effet traitement a été testé à l'aide d'une ANOVA sur les moyennes par individus. L'effet "temps" a été testé à l'aide d'une ANOVA sur l'ensemble des données obtenues pour chaque individu. Les effets traitement et temps significatifs sont symbolisés par des étoiles : ***: $p<0.001$; **: $p<0.01$; *: $p<0.05$; ns : non significatif. Un test de Levene a permis de vérifier l'homogénéité des variances pour toutes les variables ($p>0.05$).

vapeur d'eau, du CO_2 et de l'O_2 peuvent aussi être piégés. Or, comme le montre la figure 7, le CO_2 et l'O_2 ont des signaux très différents et très largement supérieurs à l'eau. La présence de ces molécules peut donc fausser la composition isotopique en ^{18}O observée. Il aurait peut-être fallu utiliser non pas de l'azote liquide pur, mais un mélange azote liquide-carboglace ou éthanol. De tels mélanges présentent des températures plus élevées et évitent de congeler le CO_2 et l'O_2. Quoi qu'il en soit, même si l'hypothèse selon laquelle $\Delta^{18}O_V=-\varepsilon^*$ était inadaptée aux conditions expérimentales de cette étude, $\Delta^{18}O_V$ a été considéré comme égal à $-\varepsilon^*$ pour l'ensemble des calculs effectués.

Théoriquement, il n'existe pas de discrimination lors du prélèvement d'eau par les racines. L'eau du sol doit donc avoir une signature proche de δ_s. Dans cette étude, la signature isotopique en ^{18}O du sol (δ_{sol}) était très variable en fonction des traitements, et il existait une variation inter-pot du signal relativement forte pour les traitements stressés (S1 et S2), alors que les traitements à capacité au champ (C1 et C2) montraient des valeurs relativement similaires (-8.03±0.36‰, moyenne±écart-type sur l'ensemble des prélèvements des deux jours correspondants) et proches de δ_s (Figure 30). Même si de l'eau était ajoutée toutes les deux heures afin de réajuster le poids des pots, et malgré la couverture des pots par des plastiques, des phénomènes d'évaporation ont pu se produire, conduisant à un enrichissement de l'eau du sol. En conséquence de cet enrichissement du sol, un enrichissement en $H_2{}^{18}O$ de l'eau circulant dans le xylème jusqu'aux sites d'évaporation est à envisager, mais nous n'avons aucune données pour le confirmer. La valeur de δ_S utilisée dans les calculs d'enrichissement en ^{18}O de l'eau ($\Delta^{18}O_L$) et de la matière organique soluble ($\Delta^{18}O_{MOS}$) foliaires risque donc de biaiser les données des traitements S1 et S2.

II.2.3.2 Effets de la contrainte hydrique sur les traits mesurés

Des différences significatives de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{moy}) ont été relevées entre traitements ($p<0.05$, Figure 31). Le traitement S2 (stress fort) se différenciait très nettement des autres par des valeurs de g_{moy} significativement plus faibles. Pour le traitement S2, la conductance stomatique moyennée pour l'ensemble des individus représentait 60% des moyennes calculées pour les traitements à capacité au champ (C1 et C2). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus en annexe 2 pour une humidité volumique de 11%. Le traitement S1, censé conduire à une diminution de 40% environ de la conductance stomatique, n'a pas vraiment apporté le résultat escompté: quel que soit le trait analysé, aucune différence n'a été mise en évidence entre ce traitement et le traitement C2 (ANOVA, test post-hoc HSD de Tukey). L'absence d'effet du traitement S1 peut être liée à une forte variabilité inter-pot d'humidité volumique par rapport aux autres traitements (Tableau 15).

Aucune différence entre traitements d'assimilation nette de CO_2 (A) n'a été détectée, alors que l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) était significativement plus élevée pour le traitement S2 (Figure 31). Aucun effet du traitement sur le contenu en eau des feuilles ($p>0.05$) n'a été observé, ce qui confirme donc les résultats de l'annexe 2 selon lesquels la contrainte hydrique édaphique n'agit sur le contenu relatif en eau des feuilles que pour des humidités volumiques très faibles (Figure 2 de l'annexe 2).

L'eau foliaire était enrichie par rapport à la source (eau d'arrosage). Cet enrichissement ($\Delta^{18}O_L$), variant entre 10 et 20‰ (Figure 31), correspond aux valeurs trouvées dans la littérature (Cernusak *et al.*, 2005; Barnard *et al.*, 2007). Un effet du traitement sur $\Delta^{18}O_L$ a été observé (Figure 31). Cet effet n'était toutefois pas celui attendu, puisque seul le traitement C1 se différenciait significativement des trois autres par des valeurs de $\Delta^{18}O_L$ plus faibles. Pour la journée de mesure correspondant à ce traitement, le déficit de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère (ν) était significativement inférieur (Tableau 15; en moyenne 1.35 mmol mol^{-1} de différence, et jusqu'à 3.1 mmol mol^{-1} de différence maximale entre les journées correspondant aux traitements C1 et C2). Nous avons donc recalculé d'après l'équation théorique (Tableau 14) la différence de $\Delta^{18}O_L$ censée être observée entre les traitements C1 et C2 pour g_s=0.2 mol m^{-2} s^{-1}, θ=25.2°C, L=0.025m et $\Delta^{18}O_V$=-9.1‰. D'après ces calculs, le traitement C1 doit présenter des valeurs de $\Delta^{18}O_L$ plus faibles de 1.3‰ (pour une différence moyenne de ν) à 2.9‰ (pour une différence maximale de ν) par rapport au traitement C2. La moyenne de $\Delta^{18}O_L$ pour le traitement C1 était de 13.2±0.6‰ contre 15.9±0.8‰ pour le traitement C2, ce qui correspond donc à une différence de 2.7‰, et est en adéquation avec les calculs précédents. Compte tenu des différences observées entre les journées de mesure pour les conditions environnementales et de leurs répercussions sur les valeurs de $\Delta^{18}O_L$ entre le traitement C1 et les autres traitements, le traitement C1 a été ensuite éliminé de certaines analyses.

Puisque la fermeture stomatique est d'autant plus marquée que le stress hydrique est important, alors, en théorie, l'eau foliaire devrait donc être plus enrichie en ^{18}O pour le traitement S2. En moyenne, le traitement S2 présentait des valeurs de $\Delta^{18}O_L$ (16.7±1.1‰) supérieures de 1‰ environ par rapport aux moyennes calculées pour les traitements C2 (15.9±0.8‰) et S1 (15.6±0.7‰). Mais aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements C2, S1 et S2 (Figure 31). En moyenne, les traitements C2 et S1 présentaient une conductance stomatique respectivement de 0.18±0.04 mol m^{-2} s^{-1} et 0.20±0.10 mol m^{-2} s^{-1}, alors que la moyenne obtenue pour le traitement S2 était de 0.10±0.03 mol m^{-2} s^{-1}. En utilisant ces moyennes de g_s, alors, une différence de $\Delta^{18}O_L$ d'environ 0.9‰ doit être théoriquement observée (pour θ=25.4°C, ν=14.8 mmol mol^{-1}, L=0.025m et $\Delta^{18}O_V$=-9.1‰). Compte tenu de la variabilité observée (écart-type compris entre 0.7 et 1.1‰ pour les moyennes de $\Delta^{18}O_L$), il

n'est donc pas aberrant de ne pas avoir trouvé d'augmentation significative de $\Delta^{18}O_L$ pour le traitement S2.

La contrainte hydrique étant de très courte durée, et les échanges gazeux étant des mesures instantanées, travailler sur des fractions telles que la matière organique totale ou la cellulose, aurait été inadapté. Nous avons donc étudié la signature isotopique en ^{18}O de la matière organique soluble, facile à extraire, et représentant théoriquement une intégration à court terme de W_i. Ce choix repose sur le fait que la matière organique foliaire soluble est composée en majorité de sucre, ce qui a été conforté dans notre étude par des mesures de pourcentages de N, C, O et de compositions isotopiques en ^{13}C et ^{18}O. En moyenne, les pourcentages d'azote étaient faibles (0.67±0.30%), avec une variabilité toutefois assez importante, alors que pour de la matière organique totale foliaire, ce pourcentage se situe autour de 3.1±0.4% (moyenne±écart-type obtenue pour le chêne pédonculé sur l'ensemble des expérimentations menées de 2004 à 2006). Un tel pourcentage d'azote correspond à 10% environ d'acides aminés dans le mélange. Le pourcentage de carbone des échantillons de matière organique soluble était, quant à lui, de 37.9±1.2% (valeurs inférieures aux valeurs théoriques de glucose/fructose (40%) et de saccharose (42%)). Au cours de ma thèse, quelles que soient les analyses effectuées sur des sucres solubles foliaires extraits, le pourcentage de carbone était toujours inférieur au pourcentage théorique et avait des valeurs proches de celles observées dans cette étude. Dans cette étude, le pourcentage d'oxygène était de 53.6±1.2% (analyses faites sur 86 échantillons), et significativement supérieur au pourcentage théorique (51.5%) calculé sur la base de 80% de saccharose (Picon *et al.*, 1997) dans un extrait de sucre pur. La présence de sucres anhydres est certainement à exclure puisqu'alors les pourcentages d'O auraient été plus faibles et les pourcentages de C plus élevés.
La composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}C_{MOS}$) des échantillons de matière organique soluble (–27.3 à -27.9‰) était de l'ordre des valeurs observées pour des sucres solubles extraits à partir de feuilles de chênes pédonculé de cette même famille de plein-frères (-27.0±1.1‰ pour l'étude présentée dans le chapitre I.4.2.1, et -27.5±2.4‰ pour les données relatives au chapitre II.3). La matière organique soluble était enrichie en ^{18}O par rapport à la source de 30 à 40‰ (Figure 31). Ces valeurs sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature pour de la matière organique soluble foliaire (Gessler *et al.*, 2007) ou prélevée dans le phloème (Keitel *et al.*, 2003; Cernusak *et al.*, 2005; Barnard *et al.*, 2007; Brandes *et al.*, 2007…). De plus, la composition isotopique en ^{18}O moyenne (sans le traitement C1), $\delta^{18}O_{MOS}$= 28.6±1.3‰, était proche des valeurs obtenues sur les sucres solubles foliaires après extraction (cf chapitre II.3, où $\delta^{18}O$=29‰). Toutes ces analyses concourent à la conclusion que ces extraits contenaient majoritairement des sucres solubles, même si la présence d'autres molécules (acides aminés, acides organiques, et tanins) n'est pas à exclure. Une analyse HPLC sur ces échantillons est prévue afin de déterminer la quantité de sucres contenus dans ces extraits.

Aucun effet traitement n'a été noté sur les valeurs de $\delta^{13}C_{MOS}$ (Figure 31), en particulier pour le traitement S2, pour lequel W_i était significativement plus élevé. Ces résultats vont à l'encontre des travaux de Peuke *et al.* (2006) selon lesquels la signature isotopique en ^{13}C de la fraction soluble foliaire est très sensible à la contrainte hydrique. Ils observent en effet une augmentation significative du signal isotopique (environ 1‰) chez des provenances de hêtre soumises à une sécheresse édaphique. Cependant, le stress imposé dans l'étude de Peuke *et al.* (2006) est plus fort que celui de notre étude.

De la même façon que pour $\Delta^{18}O_L$, un effet traitement a pu être observé pour $\Delta^{18}O_{MOS}$. Le traitement C1 présentait, en moyenne, des valeurs de $\Delta^{18}O_{MOS}$ plus faibles (de 4‰ environ) que les autres traitements. Toutefois, contrairement à $\Delta^{18}O_L$, les moyennes de $\Delta^{18}O_{MOS}$ des traitements C2, S1 et S2 étaient très proches (respectivement 37.4±1.2‰, 36.6±1.5‰ et 37.1±0.8‰).

II.2.3.3 Stabilité des mesures au cours de la journée

En phytotron, les conditions environnementales fixées ont inhibé les rythmes circadiens d'échanges gazeux, puisque les consignes ont été établies de sorte à maintenir une intensité lumineuse, une température et une humidité relative constantes pendant la période de jour. L'analyse de l'effet "temps" (basé sur les moyennes par traitement et par point de mesure, Figure 31) montre que les valeurs moyennes pour chaque trait étaient relativement stables tout au long de la journée. Quelques profils de variation sont toutefois remarquables. Tout d'abord W_{moy} augmentait tout au long de la journée. Cette augmentation était liée à une diminution de g_{moy} (effet "temps" significatif à 10%), alors que A_{moy} était plus stable. Nous n'avons observé aucun effet "temps" ni sur la composition isotopique en ^{13}C et ^{18}O de la matière organique soluble, ni sur $\Delta^{18}O_L$. L'absence d'effet "temps" est relativement surprenante, notamment pour les variables g_{moy}, $\Delta^{18}O_L$ et $\Delta^{18}O_{MOS}$. En effet, à partir de 8h, les conditions climatiques de la chambre climatique était modifiée (allumage des lampes, et modification des consignes de température). Pour que les conditions climatiques (température) atteignent la consigne fixée, une heure environ était nécessaire. La première mesure de conductance stomatique aurait donc dû être plus faible. De plus, étant donné que, la nuit, les stomates sont censés se fermer, un enrichissement en ^{18}O de l'eau mais aussi de la matière organique plus important était attendu en début de journée. Ceci laisse donc supposer que les stomates étaient ouverts pendant la nuit, comme l'ont montré des travaux récents pour différentes espèces ligneuses (Barbour *et al.*, 2005).

Le fait d'installer les plants en phytotron permettait, en théorie, un contrôle optimal des conditions climatiques, ce qui n'a pas été le cas. Une différence relativement faible de ν entre journées de mesure s'est traduite par des variations de $\Delta^{18}O_L$ importante (2.7‰), et beaucoup plus marquée que celles observées en réponse à la contrainte hydrique (1‰). Cependant, même

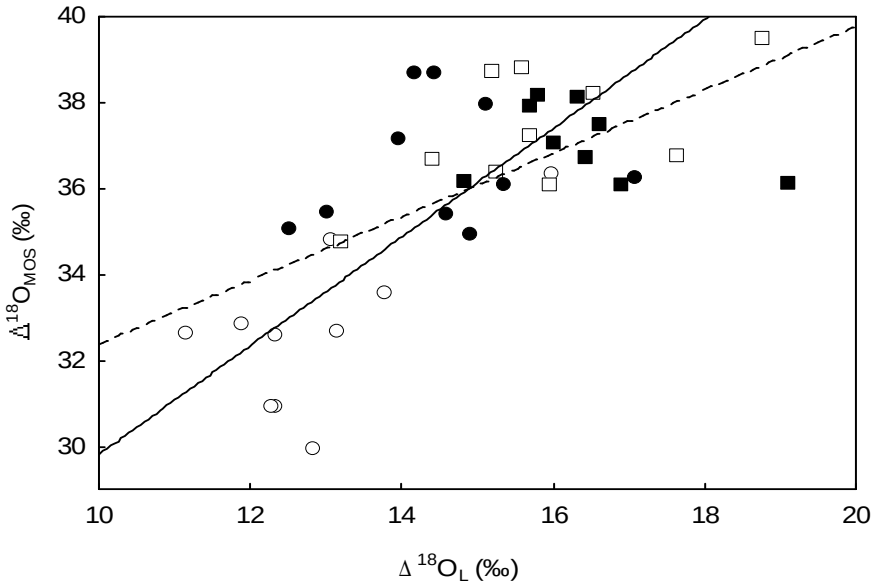


Figure 32: Relation entre l'enrichissement en ^{18}O de la matière organique soluble ($\Delta^{18}O_{MOS}$) par rapport à la source et l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$) par rapport à la source. Les symboles vides sont associés aux traitements à capacité au champ (C1:○; C2:□), alors que les symboles pleins représentent les deux traitements avec contraintes hydriques (S1:●; S2:■). Chaque point représente une feuille. La droite en trait plein représente l'ajustement linéaire obtenu sur les données: $\Delta^{18}O_{MOS}= 1.3*\Delta^{18}O_L+17.2$ ($R^2=0.48$; $p<0.001$). La droite en pointillés a pour équation: $\Delta^{18}O_{MOS}= 0.7*\Delta^{18}O_L+25$ ($R^2=0.47$; $p<0.05$).

si l'effet escompté des différents niveaux de contraintes hydriques n'a pas été atteint, une variabilité importante a pu être créée pour l'ensemble des traits mesurés (traitement C1, exclus): g_s: 0.04-0.46 mol CO_2 m^{-2} s^{-1}; A: 5-33 µmol H_2O m^{-2} s^{-1}; W_i: 47-230 µmol CO_2 mol^{-1} H_2O; $\delta^{13}C_{MOS}$: –29.5 - –26.2‰; $\Delta^{18}O_L$: 12 à 20‰; $\Delta^{18}O_{MOS}$: 35-40‰. Enfin, malgré les oscillations des variables climatiques (Figure 26), peu de variations journalières pour les différents traits mesurés ont été mises en évidence (Figure 31), ceci permettant par la suite l'utilisation d'un modèle à l'équilibre pour décrire les variations de $\Delta^{18}O_L$ et $\Delta^{18}O_{MOS}$ en fonction des données climatiques et de la conductance stomatique.

II.2.3.4 Enrichissement en ^{18}O de la matière organique par rapport à l'eau foliaire

Pour certaines feuilles (récoltées à 8h et à 18h), une double analyse a été menée: $\Delta^{18}O_L$ sur une moitié de feuille, et $\Delta^{18}O_{MOS}$ sur l'autre. Une relation a été mise en évidence entre ces deux paramètres, tous traitements confondus:

$\Delta^{18}O_{MOS}=1.3*\Delta^{18}O_L+17.2$ ($R^2=0.48$; $p<0.001$; Figure 32).

L'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire explique 48% de la variation de l'enrichissement en ^{18}O de la matière organique soluble (Figure 32). Le pourcentage de variation expliquée est très inférieur à celui observé par Gessler *et al.* (2007) (93%). Le modèle reliant l'enrichissement de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$) à celui de la matière organique ($\Delta^{18}O_{MOS}$) fait apparaître le facteur ε_{wc} (ordonnée à l'origine, Tableau 14). Ce facteur représente le fractionnement associé à l'enrichissement en ^{18}O des molécules organiques portant des fonctions carbonyles par rapport à l'eau dans laquelle ces molécules ont été synthétisées. Dans cette étude, la matière organique soluble était enrichie de 17.2‰ par rapport à l'eau foliaire, valeur inférieure au fractionnement théorique ε_{wc}, compris entre 25 et 30‰ (Sternberg & DeNiro, 1983; Cernusak *et al.*, 2005; Barnard *et al.*, 2007; Gessler *et al.*, 2007). Toutefois, en fixant ε_{wc} à 25‰, nous avons obtenu une relation significative ($p<0.05$), où $\Delta^{18}O_L$ explique 47% de la variabilité de $\Delta^{18}O_{MOS}$ (Figure 32).

Ces divergences de ε_{wc} et de R^2 peuvent être attribuées à: (i) la présence de molécules organiques autres que les sucres dont l'enrichissement en ^{18}O est plus faible et dont la présence est variable entre les échantillons; (ii) un rechargement en eau des échantillons, malgré les précautions prises, lors de leur transfert dans les capsules avant analyse (la signature en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique du laboratoire étant de –13‰ environ, une réhydratation des échantillons peut conduire à une diminution du signal isotopique en ^{18}O); (iii) des variations rapides de $\Delta^{18}O_L$ en réponse aux fluctuations environnementales (Figure 26), contrairement à $\Delta^{18}O_{MOS}$ qui ne se trouve en équilibre isotopique que plusieurs heures plus tard (Barbour *et al.*, 2000a; Barnard *et al.*, 2007; Gessler *et al.*, 2007).

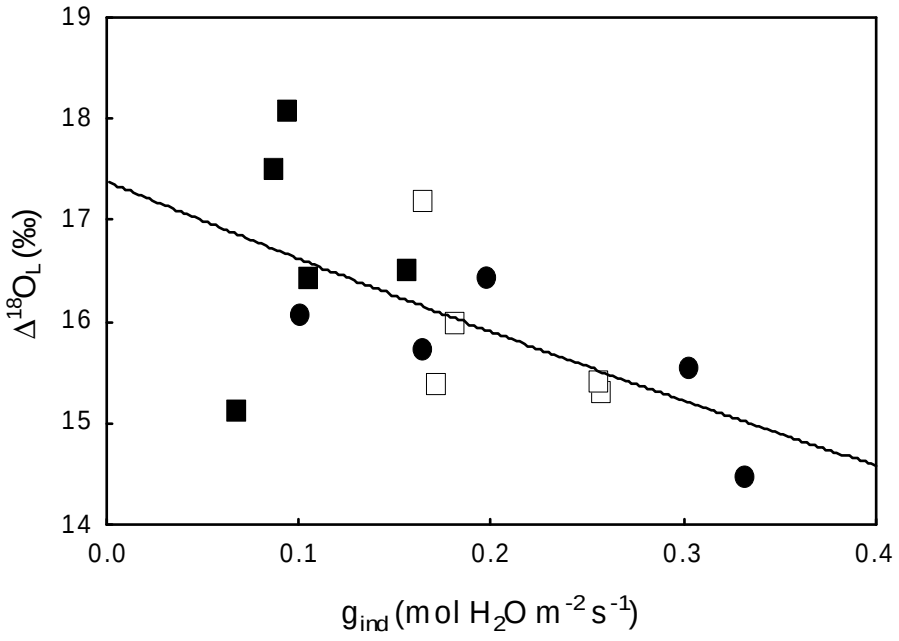


Figure 33: Relation entre l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire par rapport à la source ($\Delta^{18}O_L$) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{ind}). Chaque point représente la moyenne calculée pour chaque individu de chaque traitement (traitement C1 exclus). Les symboles correspondent aux différents traitements: C2 (capacité au champ):□, S1 (contrainte hydrique modérée):●; S2 (contrainte hydrique forte): ■. La courbe en trait plein représente l'ajustement: $\Delta^{18}O_L=(1.1*17.4/g_{ind})*(1-Exp(-g_{ind}/1.1))$ ($R^2=0.35$).

	$\Delta^{18}O_L$						
	8h	**10h**	**12h**	**14h**	**16h**	**18h**	**20h**
g-8h	**-0.59****	-0.48*	-0.28	-0.01	-0.02	-0.45*	-0.46
g-10h		-0.51*	-0.34	-0.17	-0.06	-0.25	-0.58*
g-12h			-0.34	-0.10	-0.17	-0.34	-0.44
g-14h				-0.36	-0.30	-0.35	**-0.66****
g-16h					-0.25	-0.19	**-0.61****
g-18h						**-0.53****	**-0.69****
g-20h							**-0.78****
$g_{moy\ 2}$		**-0.55****	-0.36	-0.27	-0.29	-0.44	**-0.76****
$g_{moy\ 3}$			-0.35	-0.26	-0.25	-0.44	**-0.73****
$g_{moy\ 4}$				-0.20	-0.20	-0.43	**-0.72****
$g_{moy\ 5}$					-0.15	-0.39	**-0.67****
$g_{moy\ 6}$						-0.41	**-0.66****
$g_{moy\ 7}$							**-0.63****

Tableau 17: Coefficients de corrélation de Pearson pour l'analyse bivariée des corrélations entre l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire par rapport à la source ($\Delta^{18}O_L$) déterminé pour l'ensemble des feuilles récoltées à 8h, 10h,… 20h et les différents g_s au cours de la journée (mesurés à 8h, 10h, …, 20h), ainsi que les moyennes de g_s pour les deux ($g_{moy\ 2}$), trois ($g_{moy\ 3}$), quatre ($g_{moy\ 4}$), cinq ($g_{moy\ 5}$), six ($g_{moy\ 6}$), et sept ($g_{moy\ 7}$) dernières mesures avant récolte. Les corrélations significatives à 5% sont notées en gras et symbolisées par **; les corrélations significatives à 10% sont notées par: *. Pour l'ensemble des analyses, n est compris entre 12 et 15 (n=15 correspond à 5 feuilles (une feuille par individu) récoltées pour chaque point de cinétique et pour chaque traitement (C2, S1 et S2)).

II.2.3.5 Relations entre l'enrichissement en ^{18}O de la matière organique, de l'eau foliaire et la conductance stomatique

Lorsque les variations de E sont causées par g_s, alors une relation négative est censée être observée entre E et $\Delta^{18}O_L$ et donc entre g_s et $\Delta^{18}O_L$ (Tableau 3 et Figure 6 de l'encadré 4). Dans cette étude, la conductance stomatique (g_s) et la transpiration (E) étaient positivement corrélées (R^2 de 96%), alors qu'aucune corrélation entre E et ν n'a été observée ($p>0.05$). Ainsi, conformément à la théorie (Encadré 4), une relation négative entre g_s et $\Delta^{18}O_L$ a été mise en évidence (Figure 33). L'équation théorique $\Delta^{18}O_L=\Delta^{18}O_e\,(1-e^{-\wp})/\wp$ (Tableau 14) a été modifiée de sorte à mettre en évidence la relation entre g_s et $\Delta^{18}O_L$:

$$\Delta^{18}O_L = \frac{\beta}{g_s}\ \Delta^{18}O_e\ (1-\exp^{-\frac{g_s}{\beta}}) \qquad \textbf{(Eqn 11)}$$

où "β" (en mol $m^{-2}s^{-1}$) représente le rapport: $CD/\nu L$ avec C la concentration molaire de l'eau et D la diffusivité de H_2O^{18}.

L'ajustement de ce modèle donne un R^2 relativement faible (35%) entre $\Delta^{18}O_L$ et g_{ind} (Figure 33), soulignant ainsi que 65% de la variabilité de $\Delta^{18}O_L$ n'est pas expliquée par g_s. Cette variabilité peut avoir été causée par: (i) les phénomènes d'évaporation qui ont conduit à un enrichissement de l'eau du sol. En effet, nous avons pu constater que la signature en ^{18}O du sol variait entre les pots pour les traitements S1 et S2. La valeur de δ_S utilisée dans le calcul de $\Delta^{18}O_L$ est donc certainement erronée pour les individus des traitements S1 et S2. (ii) La variabilité a aussi pu être créée par les fluctuations des conditions environnementales (Figure 28) et notamment de ν. Le modèle à l'équilibre n'était donc pas forcément approprié à notre jeu de données.

Cet ajustement a aussi permis d'estimer les différents paramètres: $\Delta^{18}O_e$ (enrichissement en ^{18}O de l'eau située au niveau des sites d'évaporation), L (distance effective du trajet entre les sites d'évaporation et les veines) et $\wp$ (nombre de Péclet) chez le chêne pédonculé (Tableau 14). Connaissant C, ν et D, le paramètre L a pu être calculé à partir de la valeur de "β". L'ajustement observé était: $\Delta^{18}O_L=(1.1*17.4/g_{ind})*(1-Exp(-g_{ind}/1.1))$, d'où: $\Delta^{18}O_e$= 17.4‰. Pour β=1.1, alors L=2.1cm (pour ν=14.8 mmol mol^{-1} et θ=25.4°C). Cette valeur de L est en accord avec les données de la littérature. En effet, plusieurs études ont montré que L était compris entre 0.4 et 16.6 cm (Wang *et al.*, 1998b; Barbour & Farquhar, 2000; Barbour *et al.*, 2000a; Keitel *et al.*, 2003; Cernusak *et al.*, 2005; Brandes *et al.*, 2007). Compte tenu de la gamme de variation de g_s (entre 0.07 et 0.33 mol m^{-2} s^{-1}), le nombre de Péclet ($\wp=g_s*1/\beta$) varie respectivement entre 0.06 et 0.3, ce qui est inférieur aux valeurs présentées par Wang *et al.* (1998b) pour le genre *Quercus* (0.45, 0.54) ou pour les arbres décidus (moyenne de 0.59±0.20).

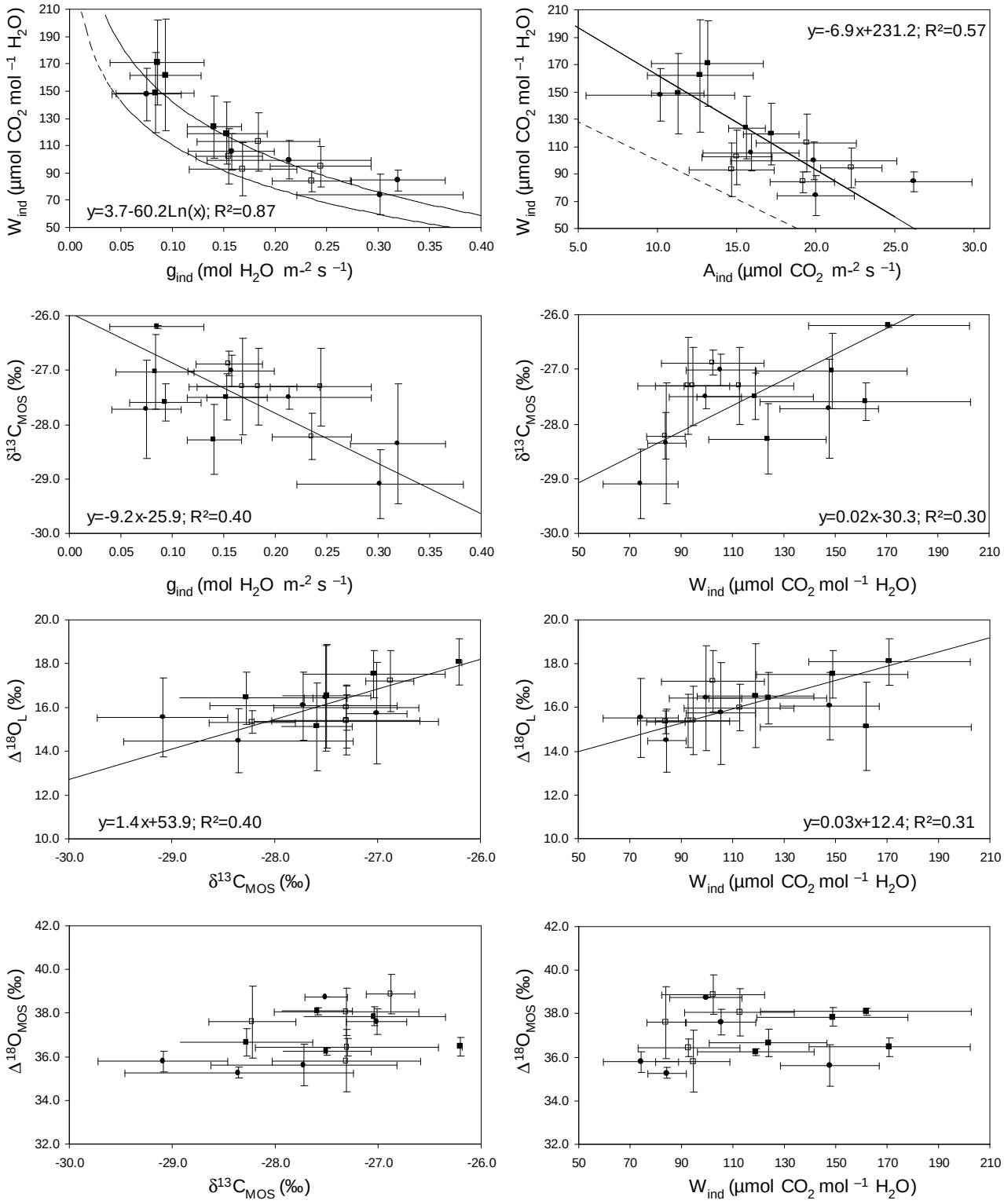


Figure 34: Relations entre la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{ind}), l'assimilation nette de CO_2 (A_{ind}), l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_{ind}), la composition isotopique en ^{13}C de la matière organique soluble foliaire ($\delta^{13}C_{MOS}$) et les enrichissements en ^{18}O par rapport à la source d'eau de l'eau foliaire ($\Delta^{18}O_L$) et de la matière organique soluble ($\Delta^{18}O_{MOS}$). Chaque point représente la moyenne (±l'écart-type) pour chaque individu de chaque traitement. Les symboles vides sont associés aux traitements à capacité au champ (C1:○; C2:□), alors que les symboles pleins représentent les deux traitements avec contraintes hydriques (S1:●; S2:■). Les équations des régressions (en traits continus) significatives ($p<0.05$) et les R^2 correspondants sont indiqués dans chaque graphique. Les courbes et droites en pointillés représentent les régressions "consensus" obtenues dans la partie précédente de ce manuscrit, et d'équations: $W_{sat}=-5.6*A_{sat}+155.9$ ($R^2=0.42$, $p<0.001$); $W_{sat}=-46.1*Ln(g_{sat})+4.3$ ($R^2=0.79$, $p<0.001$).

Excepté pour la première feuille de chaque arbre récoltée en début de journée, nous disposions de 2 à 7 mesures de g_s par feuille avant récolte. Des corrélations ont ainsi pu être établies entre les valeurs de $\Delta^{18}O_L$ et ces différentes mesures de g_s ainsi que les moyennes de g_s sur les 2 à 7 dernières mesures (Tableau 17). Selon les séries de feuilles observées (série définie selon l'heure de prélèvement), $\Delta^{18}O_L$ et la conductance stomatique n'étaient pas corrélés. Seules les premières, sixièmes et septièmes séries de feuilles récoltées (respectivement à 8h, 18 et 20h) montrent des corrélations significatives entre $\Delta^{18}O_L$ et g_s, avec des R^2 allant jusqu'à 61%. Si toutefois, les valeurs de $\Delta^{18}O_L$ n'étaient pas corrélées avec l'ensemble des mesures et moyennes de g_s, nous nous attendions à ce que $\Delta^{18}O_L$ soit corrélée avec la mesure de g_s précédant directement le prélèvement de la feuille, ce qui n'est pas le cas.
L'enrichissement en ^{18}O de la matière organique soluble ($\Delta^{18}O_{MOS}$) était censé fournir une intégration temporelle plus importante de la conductance stomatique (Keitel *et al.*, 2003). Nous nous attendions donc à des R^2, pour les relations $\Delta^{18}O_{MOS}$ *vs* g_s supérieurs à ceux observés entre $\Delta^{18}O_L$ et g_s. Cependant, au niveau individuel, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre g_{ind} et $\Delta^{18}O_{MOS}$. De même, aucune corrélation significative n'a été observée entre $\Delta^{18}O_{MOS}$ et l'ensemble des mesures (g-8h, g-10h…, g-18h) et moyennes de g_s ($g_{moy\ 2}$, …$g_{moy\ 6}$) (données non montrées).

Les variations de g_s, au niveau individuel, n'expliquent que 35% de la variabilité de $\Delta^{18}O_L$. Malgré cette forte imprécision, le modèle théorique reliant $\Delta^{18}O_L$ et g_s s'ajuste sur nos données expérimentales. Les valeurs des paramètres du modèle d'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire trouvées dans cette étude sont conformes aux valeurs trouvées dans d'autres études. L'analyse de la signature en ^{18}O de la matière organique soluble n'a pas permis d'affiner les relations avec la conductance stomatique, alors qu'elle aurait dû permettre une meilleure estimation de celle-ci.

II.2.3.6 Validité de la double approche isotopique

La théorie prédit que lorsque la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau est causée par la conductance stomatique, une relation positive entre $\delta^{13}C$ et $\Delta^{18}O$ (et négative entre $\Delta^{13}C$ et $\Delta^{18}O$) doit être observée (relation 2 du tableau 4). Pour valider cette double approche isotopique, les corrélations ont été établies sur les moyennes individuelles et sans le traitement C1. Dans cette étude, la variabilité de g_s expliquait 87% de la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i) (Figure 34). Les relations entre g_{ind} ou A_{ind} et W_{ind} étaient négatives (Figure 34), et comparables aux relations globales présentées sur la figure 16 (chapitre I.4.1). Le décalage entre les régressions obtenues dans cette étude et les régressions globales (Figure 34) sont surtout dues à l'utilisation de deux appareils de mesure d'échanges gazeux différents, un tel décalage ayant déjà été remarqué pour l'expérimentation sur les phénotypes extrêmes de 2005 (données non montrées). Conformément aux résultats montrés

dans la partie précédente de ce manuscrit, la relation entre $\delta^{13}C_{MOS}$ et g_{ind} était négative, alors qu'elle est positive entre $\delta^{13}C_{MOS}$ et W_{ind} (Figure 34). Enfin, les corrélations entre $\Delta^{18}O_L$ et $W_{ind}/\delta^{13}C_{MOS}$ étaient positives et significatives. Ces corrélations sont donc en accord avec la relation 2 du tableau 4. Aucune corrélation n'a toutefois été détectée entre $\Delta^{18}O_{MOS}$ et $W_{ind}/\delta^{13}C_{MOS}$, ce qui est cohérent avec l'absence de corrélation entre $\Delta^{18}O_{MOS}$ et g_s.

Dans cette étude, la variabilité de W_i était liée à une variabilité de g_s créée par différents niveaux de contrainte hydrique. Dans une telle situation, nous avons pu montrer que la double approche isotopique permettait de révéler la contribution de g_s sur W_i. Utiliser cette double approche isotopique dans le cadre d'études sur la variabilité entre génotypes chez le chêne pédonculé peut donc être envisagé.

II.2.4 Conclusions

Dans cette étude, une variabilité importante des valeurs de $\Delta^{18}O_L$ a été observée. Une grande part de cette variabilité a certainement été causée par des problèmes techniques liés au fonctionnement des phytotrons. Cependant, même si la part de la variabilité observée des valeurs de $\Delta^{18}O_L$ due aux différents niveaux de stress était beaucoup plus faible, une relation négative a été obtenue entre $\Delta^{18}O_L$ et g_s laissant espérer l'utilisation de l'outil isotopique ^{18}O comme estimateur de g_s chez le chêne pédonculé, mais seulement en conditions contrôlées.

Puisque l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire se transmet à la matière organique foliaire, celle-ci doit pouvoir être utilisée comme estimateur de g_s. Une fois que ce point sera amélioré (cf ci-dessous), une des perspectives à moyen terme est d'analyser la précision avec laquelle l'enrichissement en ^{18}O de la matière organique foliaire peut être utilisé comme intégrateur de la conductance stomatique et sur quelle période. Une expérimentation telle que celle qui a été présentée dans ce manuscrit ne permet pas de répondre à cette question, puisque les conditions environnementales étaient totalement artificielles (dans le but de limiter les variations de conductance stomatique au cours de la journée). Il faudrait donc faire une expérimentation où les variables environnementales (photopériode, température et humidité relative) présenteraient un rythme circadien.

Cette étude nous a aussi permis d'estimer les valeurs des facteurs L, $\wp$ et $\Delta^{18}O_e$ pour le chêne pédonculé, valeurs qui sont en accord avec les données de la littérature. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un modèle à l'équilibre pour décrire les variations de $\Delta^{18}O_L$ en réponse à la conductance stomatique et estimer ces facteurs. Ce modèle semble convenir (Figure 33), mais pourrait éventuellement être affiné par l'utilisation d'un modèle "dynamique", compte tenu des variations environnementales observées. Un des objectifs de ce travail était aussi de vérifier si ces paramètres

variaient en réponse à la contrainte hydrique. Cependant, les différences de g_s entre traitements n'étaient pas assez fortes pour permettre d'observer des différences de $\Delta^{18}O_L$/ $\Delta^{18}O_{MOS}$, et donc de ces paramètres. Enfin, nous avons pu montrer que la double approche isotopique pouvait s'appliquer chez le chêne pédonculé lorsque la variabilité de g_s, W_i, $\delta^{13}C$, et $\Delta^{18}O$ était causée par les conditions environnementales, ce qui nous permet d'envisager de l'utiliser lorsque la variabilité est d'ordre génétique.

Toutefois, plusieurs points de ce travail sont à éclaircir. Tout d'abord, nous avons observé que l'utilisation de la valeur d'enrichissement en ^{18}O de la vapeur d'eau ($\Delta^{18}O_V$) calculée à partir de prélèvement de vapeur d'eau atmosphérique entraînait une surestimation de l'ensemble des paramètres du modèle. L'explication la plus probable est que du CO_2 et de l'O_2 sont piégés en même temps que la vapeur d'eau, ce qui a pour effet d'augmenter le signal en ^{18}O. Or, cette valeur est une composante essentielle dans la détermination de l'enrichissement en ^{18}O de l'eau foliaire. Au lieu d'utiliser de l'azote liquide pur, il semblerait que l'utilisation de mélanges azote liquide-carboglace/éthanol soit plus appropriée. Outre les techniques de piégeage de la vapeur d'eau, comme celle utilisée dans cette étude, il existe d'autres méthodes pour accéder à la composition isotopique en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique (Barbour, 2007). Helliker & Griffiths (2007) ont ainsi proposé d'exploiter la relation entre la signature en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique et celle de l'eau foliaire d'une Broméliacées (*Tillandsia usneoides*). Etant donné que le signal isotopique de l'eau foliaire se reflète ensuite dans celui de la matière organique, l'analyse d'échantillons foliaires de cette mousse permet d'accéder à la signature en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique.

Dans ce travail, un enrichissement en ^{18}O de l'eau du sol a été observé, alors que les pots avaient été couverts par des plastiques. La valeur de la composition isotopique de la source que nous avons donc utilisée (δ_S) est certainement biaisée. D'autre part, seulement deux échantillons de sol appartenant à deux pots par traitement ont été analysés, ce qui, compte tenu des résultats, est insuffisant.

Enfin, l'enrichissement en ^{18}O de la matière organique soluble ($\Delta^{18}O_{MOS}$) n'a pas amené les résultats escomptés. En effet, nous avions émis l'hypothèse que l'analyse du signal isotopique en ^{18}O de la matière organique soluble permettrait d'estimer une composition isotopique en ^{18}O de l'eau foliaire moyennée pour un certain temps et ainsi d'accéder à une conductance stomatique intégrée sur cette période. Or, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre $\Delta^{18}O_{MOS}$ et g_s dans cette étude, alors qu'il en existait entre g_s et $\Delta^{18}O_L$ ou $\delta^{13}C_{MOS}$. L'analyse de la matière organique soluble foliaire est donc à améliorer. Dans la plupart des études, l'estimation de la composition isotopique en ^{18}O du saccharose se fait préférentiellement par l'analyse de la signature isotopique en ^{18}O de la matière organique du phloème (prélèvements non destructifs). De plus, d'après Barbour *et al.* (2000a), les changements des conditions évaporatives au moment du prélèvement des feuilles peuvent modifier le signal isotopique, et nous pouvons supposer qu'il en est de même lors du stockage des échantillons. En effet, même si

toutes les précautions ont été prises pour limiter les phénomènes d'évaporation lors de la conservation des échantillons (sachets fermés hermétiquement), une analyse immédiate de la matière organique soluble foliaire aurait peut-être été plus judicieuse. D'autres causes de variabilité sont aussi à prendre en compte: le rechargement en vapeur d'eau des échantillons, ainsi que l'hétérogénéité de leur composition biochimique. Dans le chapitre suivant, nous avons donc testé si l'extraction des sucres solubles foliaires, fournissant alors des échantillons plus homogènes, pouvait être envisagée pour accéder à leur signature isotopique en ^{18}O.

II.3 Analyse de la composition isotopique en ^{18}O des sucres solubles foliaires

La majorité des études travaillant sur la signature isotopique en ^{18}O de la matière organique utilise la cellulose extraite des feuilles ou des tiges (Wang *et al.*, 1998b; Barbour & Farquhar, 2000; Cernusak *et al.*, 2005), la matière organique totale (Cernusak *et al.*, 2005; Gessler *et al.*, 2007) ou la matière organique soluble (Barnard *et al.*, 2007; Gessler *et al.*, 2007). Aucune étude jusqu'à présent ne s'est intéressée à la signature isotopique des sucres solubles foliaires purifiés, puisque leur signal est estimé à l'aide de l'analyse de la signature en ^{18}O de la matière organique soluble. L'extraction des sucres solubles foliaires nécessitent le contact de la matière organique soluble avec un milieu aqueux, et ceci quelle que soit la méthode d'extraction utilisée (eau, éthanol, méthanol-chloroforme-eau et toutes leurs variantes). Compte tenu de la propension des molécules organiques à échanger leurs oxygènes avec l'eau du milieu, est-il envisageable de travailler sur des sucres solubles foliaires purs dont l'obtention est tributaire d'une extraction en milieu aqueux? Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'effet de la technique d'extraction sur la signature isotopique en ^{18}O de sucres purs et de sucres extraits de feuille de chêne pédonculé. Ces résultats ont été présentés sous la forme d'une publication.

Extraction of leaf soluble sugars for oxygen and carbon isotope analysis

Authors

Magali Roussel*, Claude Bréchet*, Caroline Guilmette**, Jean-Marc Guehl* & Oliver Brendel*[1]

*UMR 1137 INRA - UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières – Centre INRA Nancy, 54280 Champenoux.

**UPR 2300 CNRS - INPL (ENSG) - CRPG-CNRS, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy.

[1]Corresponding author: Oliver BRENDEL; INRA Nancy, F-54280 CHAMPENOUX; Phone: +33 (0)3 83 39 41 00; fax: +33 (0)3 83 39 40 22; brendel@nancy.inra.fr

Number of Tables and Figures: 4 Tables and 4 Figures.

Abstract

The operating procedure for extraction of leaf soluble sugars with methanol-chloroform-water from Dickson & Larson (1975) required different steps using water. Our initial hypothesis was that this water was able to exchange some oxygen atoms with the soluble sugars, thus altering their oxygen isotope signature ($\delta^{18}O_S$). Therefore the objective of this study was to test the influence of the water used for the extraction on $\delta^{18}O_S$. To achieve this, two experiments have been made using water with different $\delta^{18}O$ scanning a range of values from –20‰ to +10‰. In the first experiment, extractions have been carried out on pure sugars (glucose, fructose and sucrose) allowing to compare their oxygen isotope signature before and after extraction. All these three sugars were lighter after than before extraction, but no effect of the ^{18}O signature of the water used for the extraction has been highlighted. Moreover, a high variability in the percentages of carbon and oxygen of the extract has been found, which would imply the presence of water molecules that modify $\delta^{18}O_S$ values.

The second experiment consisted in extracting soluble sugars from leaf organic matter of four siblings of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) characterized with distinct carbon isotope composition of leaf soluble sugars ($\delta^{13}C_{LS}$). The effet of the ^{18}O signature of the water used for the extraction on the ^{18}O signature of leaf soluble sugars ($\delta^{18}O_{LS}$) was not obvious for all the siblings and no relationship was observed between $\delta^{13}C_{LS}$ and $\delta^{18}O_{LS}$.

To conclude, this method was shown to be inapplicable for analysis of ^{18}O signature of leaf soluble sugars introducing a large variability in $\delta^{18}O_S$.

Keywords

carbon isotope composition, leaf soluble sugars, methanol-chloroform-water extraction, oxygen isotope composition, pedunculate oak.

List of abbreviations

$\delta^{18}O_S$: oxygen isotope composition of pure sugar; $\delta^{18}O_{LS}$: oxygen isotope composition of leaf soluble sugar; $\delta^{13}C_S$: carbon isotope composition of pure sugar; $\delta^{13}C_{LS}$: carbon isotope composition of leaf soluble sugar; %O: percentage of oxygen; %C: percentage of carbon; %N: percentage of nitrogen.

Introduction

Evaporative enrichment in ^{18}O of leaf water relative to soil water has first been shown by Gonfiantini *et al.* (1965). At isotopic steady state, this enrichment can be related to leaf stomatal conductance through the so-called Peclet effect (Farquhar & Lloyd, 1993). Further, through isotope exchange (see Barbour, 2007), the isotope enrichment of leaf water is transferred to organic molecules, which thus are thought to reflect a photosynthesis-weighted average of diurnal variation in leaf water enrichment. At a leaf level, oxygen isotope composition ($\delta^{18}O$) has mainly been estimated on water (Cernusak *et al.*, 2002), bulk material (Jäggi *et al.*, 2003; Sheshshayee *et al.*, 2005), total soluble organic matter (Barnard *et al.*, 2007) or extracted cellulose (Wang *et al.*, 1998; Barbour & Farquhar, 2000). However, to our knowledge, no study on the ^{18}O signature of extracted leaf soluble sugars has been published up to date.

To measure the oxygen isotope signature ($\delta^{18}O$) of leaf sugars, they need to be extracted from the total leaf material. After Barnard *et al.* (2007), water soluble extracts from leaves contain other water soluble organic matter than carbohydrates with a different $\delta^{18}O$. Thus these extracts need to be further purified. Extraction of soluble sugars from leaves can be done with different kinds of solvents: water (Xu *et al.*, 2004), ethanol (Brugnoli *et al.*, 1988; Gleixner *et al.*, 1998; Chow & Landhäusser, 2004) or a mixture of methanol, chloroform and water (Wanek *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2002). All of these solvents contain oxygen and are therefore prone to exchange with the sugars, influencing their ^{18}O isotope signature. The exchanges of oxygen between soluble sugars and water are known to be localized at the carbonyl group (Goto & Titani, 1941), whereas the oxygen atoms of the alcohol groups are theoretically not exchangeable. Therefore one fifth of the oxygen in glucose can exchange. If there is exchange of oxygen atoms between water and carbohydrates during the extraction, then the water used for different series of extractions or laboratories would introduce a general shift on the oxygen isotope signal measured and thus introduce a bias.

The objective of our study was to test if the oxygen isotope signature of sugars is modified during extraction and particularly if the isotope signature of the water used during extraction has a noticeable influence. To achieve this, we investigated the effect of water with different $\delta^{18}O$, from –20‰ to +10 ‰, during the extraction procedure on pure sugars and leaf soluble sugars. The extraction method is the one described by Dickson & Larson (1975), using methanol-chloroform-water extraction mixture. This method is used to extract leaf sugars for carbon isotope analysis (Wanek *et al.*, 2001; Göttlicher *et al.*, 2006). The first part of this work was to verify if the known oxygen isotope signature of pure sugars (glucose, fructose, sucrose) would be changed by the extraction procedure, and if a detected change was related to the ^{18}O isotope composition of the water used. To validate the method further,

Water	Abbreviations	$\delta^{18}O_W$ (‰)
Snow	S2	-19.1
Snow	S1	-17.2
Distilled water	D2	-9.8
Distilled water	D1	-9.2
Evaporated distilled water (1/2)	$E2_A$	0.3
Evaporated distilled water	E1	4.8
Evaporated distilled water (1/4)	$E2_B$	9.6

Table 18: ^{18}O isotope composition of water solvent.

sugars were also extracted from leaves of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). These extractions allow: (i) to verify if exchanges are in the same order for pure sugars or for leaf extracts (ii) to assess the stomatal control on water use efficiency for pedunculate oak, through measurements of the carbon isotope composition, an estimator of water use efficiency, and the oxygen isotope composition of leaf soluble sugars.

Material and Methods

Water

We have used seven different types of water in the range of natural abundances of $\delta^{18}O$: snow with two different signatures (S1 and S2) that were collected in winter 2005 and filtered at 10 µm; distilled water with two different signatures (D1 and D2) and evaporated distilled water with three different signatures (E1, $E2_A$ and $E2_B$). Evaporated water E1 was a mix between several evaporated samples of distilled water D1 after heating them at 65°C from 12 to 50 hours. Evaporated water $E2_A$ and $E2_B$ were obtained from distilled water (D2) that was heating for 45h and 94 hours respectively at 50°C. Each of these types of water was used to prepare the different solutions for the soluble sugar extraction. For one extraction all the steps using water were done with the same type of water. The different types of water used showed ^{18}O isotope composition ($\delta^{18}O_W$) from –20‰ to +10‰ (Table 18).

Plant and chemicals

Pure soluble sugars used were anhydrous glucose (Sigma-Aldricht), fructose (Prolabo) and sucrose (Prolabo).

Soluble sugars were extracted from leaf organic matter of four two-year-old cuttings of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) (Qr1, Qr2, Qr3, Qr4) growing in 10L containers (peat sand mixture 1/1 v/v) in a greenhouse near Nancy (north eastern France). A complete fertilization (4.5 g L^{-1} of slow-release fertiliser Nutricote T100; N, P, K; 13,13,13 + trace elements and 0.2 g L^{-1} of lime) was provided. Plants grew in non-limiting conditions of water supply and temperature, with ambient CO_2 concentration, and under natural photoperiod. Four to eight mature and fully exposed leaves were harvested in June for Qr1 and Qr2, and in September for Qr3 and Qr4, between 15:00 and 16:00 (TU) after a sunny day. Leaves were then oven-dried (50°C) for 72h and ground to a fine powder using a ball mill.

Soluble sugar extraction

The method of extraction was adapted from Dickson & Larson (1975) and described in Roussel *et al.* (submitted) with some modifications. There are four main steps in the protocol: extraction, purification, vacuum-drying and freeze-drying. Extraction was carried out using 50 mg of pure sugars or organic powder with 3 ml of a three-part mixture of methanol/water/chloroform (12:5:3, v/v/v), then 3 ml of a mixture methanol-chloroform (v/v) and 1.8 ml of water, and at least 0.75 µl of methanol 60%. The pellet was rehydrated with 0.3 ml of water and vortexed. Soluble sugars were then separated from the aqueous extract through a multilayer extraction column, consisting of (i) PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone, Sigma-Aldrich, Germany) to retain phenols and tannins; (ii) Dowex -50 *(H^+)* resin (Sigma-Aldrich, Germany) used for separation of amino acids from organic acids and sugars and (iii) Amberlite IRA-402 (Cl^-) resin (Sigma-Aldrich, Germany) used for separation of organic acids from sugars. Resins have to be under water for preservation during storage. Thus several samples of resins were made, each of them with a different type of water (Table 18). The eluate was reduced in a vacuum concentration system (speed vac, Heto). As the pellet after being dried was viscous, it could not be easily transferred into a silver capsule for mass spectrometric analysis. Thus, water was added in order to obtain a solution of known concentration (about 0.45 mg of soluble sugars in 10µl of water), which was transferred in silver capsules (3 capsules e.g. repeats, for the same extraction) and freeze-dried for 24h before isotope analysis.

Oxygen isotope composition

The ^{18}O signatures of waters used in this experiment were analyzed using the classical CO_2 equilibration method of Epstein & Mayeda (1953). One cm^3 of water was equilibrated with CO_2 at 700 mbar and 25°C until the isotope exchange reaction reach an equilibrium. Then CO_2 was extracted, separated from water vapor and analyzed offline by dual inlet (DI) with an isotope ratio mass spectrometer Isoprime (GV Instruments, Manchester, United Kingdom). The overall analytical reproducibility is ± 0.2‰.

0.5 mg of sugars were used to measure oxygen isotope composition with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer Isoprime (GV Instruments, Manchester, United Kingdom) coupled to an elemental analyser EA 3028 (EuroVector, Milan, Italy).

Values of oxygen-18 are reported in delta (δ, ‰). The sample value is expressed relative to international standard SMOW (Standard Mean Ocean Water).

$\delta^{18}O=(R_s-R_b)/R_b.1000$

where R_s and R_b refer to the $^{18}O/^{16}O$ ratio in the sample and in the SMOW standard, respectively.

$\delta^{13}C_S$ (‰)			%C				%N		$\delta^{18}O_S$ (‰)	%O			
NE	Extract.	E	Theor.	NE	Extract.	E	NE	Extract.	NE	Theor.	NE	Extract.	E
-11.5	-11.5±0.1	-	40.0	39.8	35.9±0.6	*	0.04	0.04±0.02	30.1±0.3	53.3	53.3±0.2	54.8±1.7	*
-25.3	-25.4±0.1	-	40.0	39.7	36.2±1.2	*	0.02	0.05±0.02	28.5±0.2	53.3	53.2±0.1	54.4±0.8	*
-25.3	-25.2±0.1	*	42.1	41.9	37.9±1.1	*	0.02	0.04±0.02	29.4±0.2	51.5	51.3±0.2	50.9±1.3	-

Table 19: ^{13}C and ^{18}O isotope compositions (respectively $\delta^{13}C_S$ and $\delta^{18}O_S$), percentages of carbon (%C), nitrogen (%N) and oxygen (%O) for non extracted (NE) and extracted (Extract.) sugars. Theoretical values are noted in the column Theor. Data are averages ± SD of three to five extractions. The effect of extraction (E) on $\delta^{13}C_S$, $\delta^{18}O_S$, %C and %O was noted with a star when it was significant at 5% and with "-" when it was non significant.

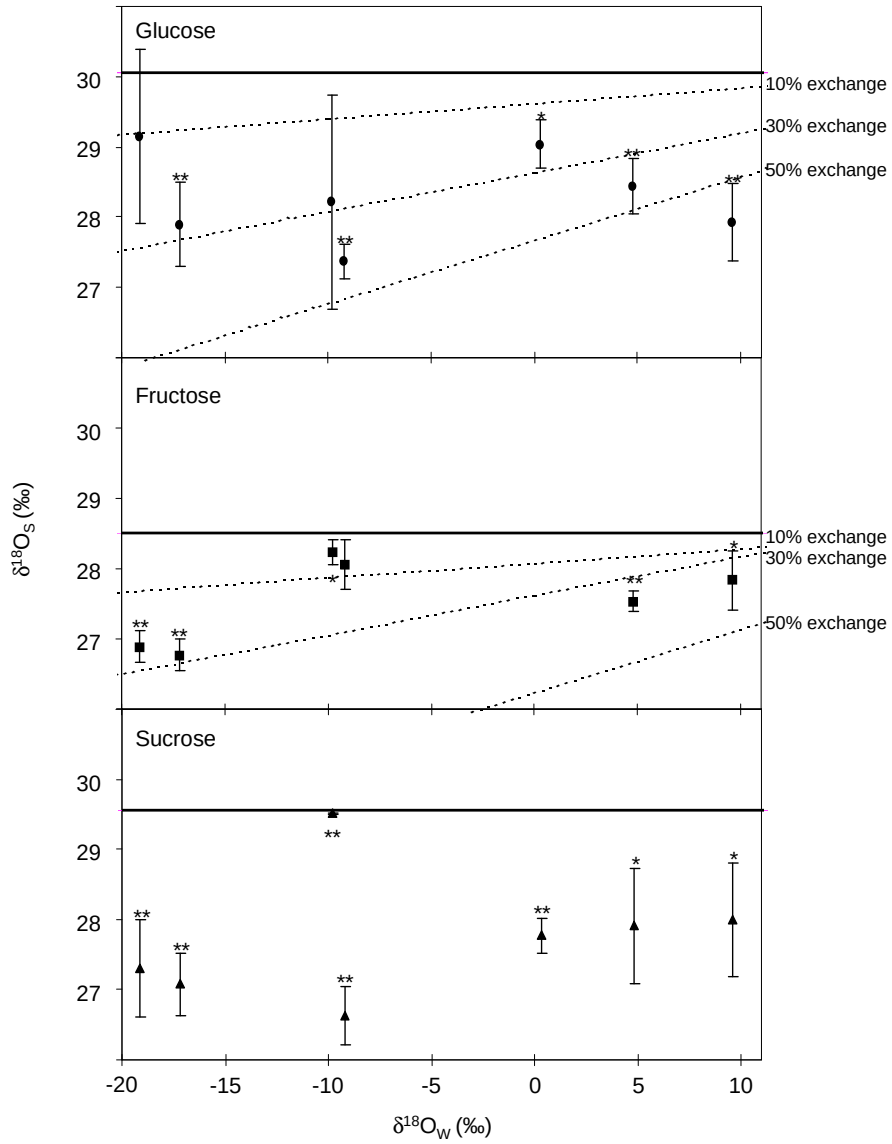


Figure 35: Isotope composition in ^{18}O of extracted pure sugars ($\delta^{18}O_S$): glucose, fructose, and sucrose depending on the signature of the water ($\delta^{18}O_W$, ‰) used for extractions. Data are averages ± SD. The solid line represents the $\delta^{18}O$ mean value of non extracted sugars. Stars indicate significant differences (*: at 10%, **: at 5%) between $\delta^{18}O_S$ of extracted and non extracted sugars. Dashed lines represent theoretical regressions for 10, 30 or 50% of oxygen exchange between water and sugars.

Carbon and nitrogen percentages and carbon isotope composition

One mg of soluble extracted sugars (pure sugars as well as leaf sugars) was used to determine the carbon isotope composition ($\delta^{13}C$) and the nitrogen and carbon concentration with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S; Thermo Finnigan, Bremen Germany) coupled to an elemental analyser (Na 1500 Carlo Erba, Italy) for carbon and nitrogen content on a mass basis. The relative abundance of ^{13}C (‰) was expressed as:

$\delta^{13}C=(R_s-R_b)/R_b.1000$

where R_s and R_b refer to the $^{13}C/^{12}C$ ratio in the sample and in the Pee Dee Belemnite standard, respectively.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using STATISTICA Version 7.1 (StatSoft, Inc. 2005) and effects were considered significant at $p<0.05$.

Comparisons between extracted and non extracted sugars for percentages of O, C and N and $\delta^{13}C$ were performed using difference tests between mean value (for all the extractions) for extracted sugars *versus* standard value, i.e. non extracted value.

Comparisons between extracted and non extracted sugars for oxygen isotope composition was performed using difference tests between mean value for extracted sugars *versus* standard value, i.e. non extracted value for each extraction with a different type of water.

Results

Comparisons of isotope and atom composition of pure soluble sugars before and after extraction using different types of water

Values of oxygen and carbon isotope compositions ($\delta^{18}O_S$ and $\delta^{13}C_S$, respectively), percentages of oxygen, nitrogen and carbon of pure and extracted sugars are shown in Table 19. For non extracted sugars, percentages of oxygen and carbon were close to the theoretical values. For extracted and non extracted sugars, the %N was close to the detection limit. For extracted sugars, percentages of oxygen and carbon are variable and differ from theoretical values as well as values obtained from non extracted sugars. Percentages of carbon were significantly lower for all sugars. Percentages of oxygen were significantly higher for glucose and fructose compared to non extracted sugars, whereas no difference was obtained between extracted and non extracted sucrose (Table 19). The ^{13}C isotope composition of the extracts was not significantly different from the non extracted sugar values, except

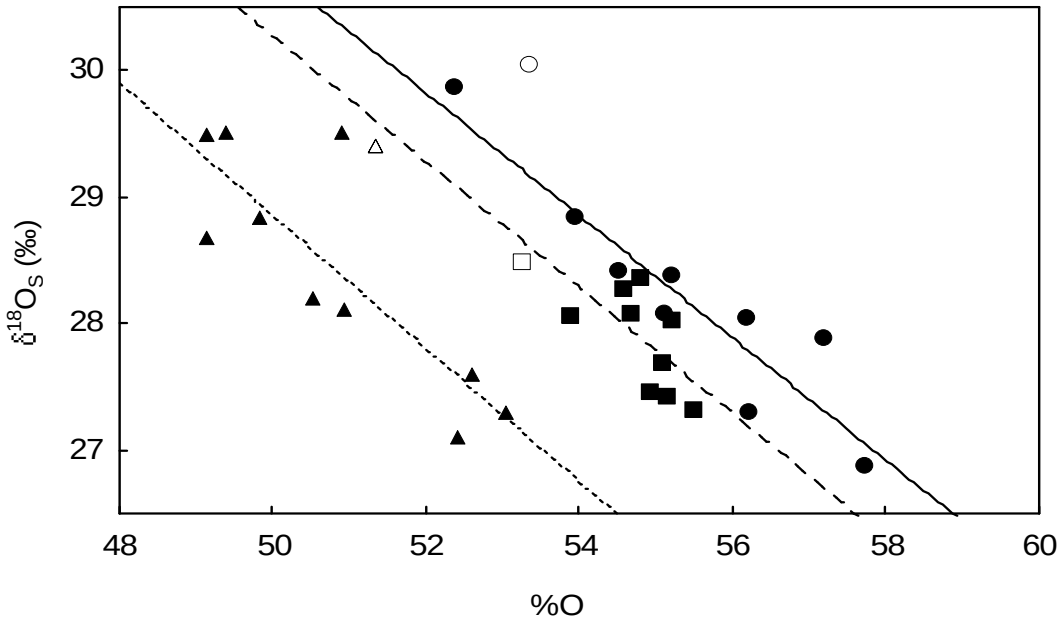


Figure 36: Relationships between the oxygen isotope composition of pure sugar ($\delta^{18}O_S$) and the oxygen percentage (%O). Open and closed symbols represent respectively non extracted and extracted sugars. For glucose (circles), the regression equation is : $\delta^{18}O_S$= 54.9-0.48*%O (R^2=0.86; $p<0.05$; solid line). For fructose (squares), the regression equation is : $\delta^{18}O_S$= 55.1-0.50*%O (R^2=0.35; $p<0.10$; dashed line). For sucrose (triangles), the regression equation is : $\delta^{18}O_S$= 55.1-0.52*%O (R^2=0.70; $p<0.05$; dotted line).

	$\delta^{13}C_{LS}$ (‰)	%C	%N	$\delta^{18}O_{LS}$ (‰)	%O
Qr1	-28.3±0.1	37.8±1.1	0.20±0.03	30.1	
Qr2	-30.8±0.1	39.8±1.1	0.23±0.05	29.0	
Qr3	-26.2±0.1	36.1±0.8	0.19±0.03	28.3	46.2±2.3
Qr4	-24.5±0.3	36.6±1.1	0.26±0.05	28.6	44.6±1.1

Table 20: ^{13}C and ^{18}O isotope compositions (respectively $\delta^{13}C_{LS}$ and $\delta^{18}O_{LS}$), percentages of carbon (%C), nitrogen (%N) and oxygen (%O) for leaf soluble sugars. Data are averages ± SD of three to five extractions.

for sucrose (Table 19), however the difference between non extracted and extracted sugars of 0.08‰ is under the precision of mass spectrometry (0.15‰).

Whatever the type of water used for the extraction, extracted sugars were always depleted in ^{18}O compared to non-extracted sugars by 0.1 up to 3.2‰ (values observed for glucose) (Figure 35). The extraction introduced a large variability in the ^{18}O signature compared to the signature of non-extracted sugars (for which the standard deviation is around 0.2 ‰, Table 18). Therefore, the comparisons between $\delta^{18}O$ means for extracted sugars and $\delta^{18}O$ values of non extracted sugars for each type of water was not always significant (Figure 35).

We have calculated the relationship between $\delta^{18}O_S$ and $\delta^{18}O_w$ expected for 10, 30, 50% of oxygen exchange between water and sugars (Figure 35). Assuming that 1/6th of oxygen atom in hexose is completely exchanged with water (with an oxygen isotope composition of $\delta^{18}O_w$), after mass balance procedure, the sugar will change to:

$(5*\delta^{18}O_{S\text{-}NE}+1*\ \delta^{18}O_w)/6 = \delta^{18}O_{S\text{-}100}$‰

with $\delta^{18}O_{S\text{-}NE}$ the signature in ^{18}O of non extracted sugars and $\delta^{18}O_{S\text{-}100}$ the signature in ^{18}O of extracted sugars if all the hexose molecules (100%) have exchanged their oxygen. Then, for a proportion *x* of hexose molecules that have exchanged, the $\delta^{18}O$ is therefore:

$(1\text{-}x)*\ \delta^{18}O_{S\text{-}NE} + x*\ \delta^{18}O_{S\text{-}100} = \delta^{18}O_{S\text{-}ext}$

with $\delta^{18}O_{S\text{-}ext}$ the signature in ^{18}O of extracted sugars for *x*% of hexose that have exchanged their oxygen. However, no significant relationship was detected between $\delta^{18}O_W$ and $\delta^{18}O_S$ for all sugars (Figure 35; $p>0.05$). Moreover relative differences between sugars (non extracted glucose is the most enriched whereas non extracted sucrose is the lighter) were not conserved for the different extractions (Figure 35). Nevertheless, strong negative relationships between the percentage of oxygen and $\delta^{18}O_S$ have been observed (Pearson's coefficient from –0.59 to –0.93 and $p<0.05$ for glucose and sucrose and $p<0.10$ for fructose, Figure 36).

Isotope and atom compositions of leaf soluble sugars

Some residual nitrogen was found in leaf soluble sugar extracts (Table 20). This means that amino acid are present in the extract. Taking into account an average of each atom (C, H, N, O, S) for amino acids, we have found that our leaf soluble sugar extracts were contamined with 3% of amino acid. The carbon percentage of extracted leaf soluble sugars was included between 36 and 40% (Table 20). The range of carbon isotope composition of soluble sugars ($\delta^{13}C_{LS}$) was large 5.3‰, and the repeatability was high within extractions of a same individuals as shown by the standard deviation in the table 20. According to a non-parametric test of Kruskall-Wallis, differences of $\delta^{13}C_{LS}$ between individuals were significant. The percentage of oxygen was only analysed on two individuals and gave values around

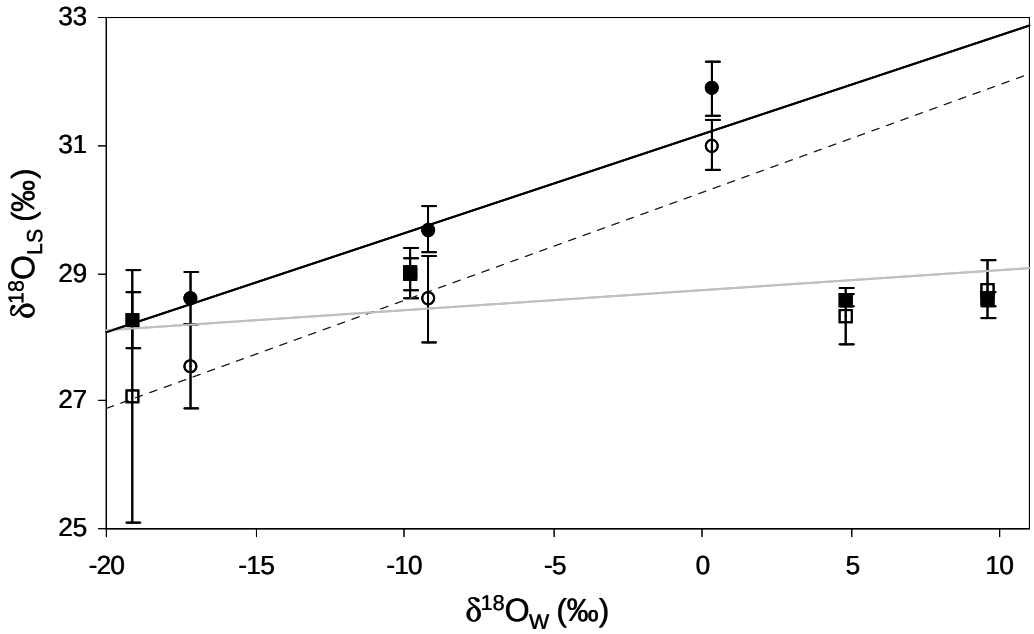


Figure 37: Isotope composition in ^{18}O of extracted leaf soluble sugars ($\delta^{18}O_{LS}$) depending on the signature of the water ($\delta^{18}O_W$, ‰) used for extractions. Data are averages ± SD for each individuals: Qr1: ●, Qr2: ○, Qr3: □, Qr4: ■. For Qr1, the regression equation is : $\delta^{18}O_{LS}$= 31.2-0.16*$\delta^{18}O_W$ (R^2=0.93; p<0.001; solid black line). For Qr2, the regression equation is : $\delta^{18}O_{LS}$= 30.3-0.17*$\delta^{18}O_W$ (R^2=0.88; p<0.001; dashed line). For Qr4, the regression equation is: $\delta^{18}O_{LS}$= 28.7-0.03*$\delta^{18}O_W$ (R^2=0.40; p<0.05; thin line). No significant relation at 5% for Qr3 has been highlighted.

45%. The percentage of oxygen was not correlated with the oxygen isotope composition of extracted soluble sugars ($\delta^{18}O_{LS}$).

$\delta^{18}O_{LS}$ average values were included between 27.1 and 31.9‰ for all the extractions and the overall individuals. Differences in ^{18}O signature were significant between Qr1 and Qr2 and the differences between their respective $\delta^{18}O_{LS}$ were conserved and similar for all extractions (Figure 37). The difference between Qr3 and Qr4 was not significant, and no clear trend was observed with $\delta^{18}O_W$. With a covariance analysis (separate slopes models) including the individual as a qualitative variable and $\delta^{18}O_W$ as a quantitative variable, we have shown significant effects ($p<0.001$) on $\delta^{18}O_{LS}$ for the variable individual and for the interaction individual*$\delta^{18}O_W$. These findings imply significant differences among slopes of the relationships between $\delta^{18}O_{LS}$ and $\delta^{18}O_W$. With this model, $\delta^{18}O_{LS}$ averages for each individual have been estimated (Table 20) and no correlation has been observed between these means and $\delta^{13}C_{LS}$ values ($R=-0.50$; $p=0.50$).

Discussion

Comparison of isotope and atom compositions of pure soluble sugars before and after extraction

In aqueous solution, monosaccharides are present in six different forms that are in equilibrium. For glucose, these forms are: the open-chain form with the free aldehyde function, the hydrated aldehyde (gem-diol), two pyranose forms, and two furanose forms (Maple & Allerhand, 1987). The hydration process during which oxygen exchange can occur is on the open-chain form (free aldehyde or ketone functions).

The oxygen exchange rate depends on the proportion of mole fraction of open-chain species present in the aqueous medium (Wertz *et al.*, 1981). However these forms generally don't exceed 1.5% at equilibrium for monosaccharides at 25°C and for a pH of 7 (Mega *et al.*, 1990; Cortes *et al.*, 1991). Therefore, the rate of oxygen exchange at 25°C is slow (Risley & Van Etten, 1982). According to Risley & Van Etten (1982) this is due to the relative stability of the ring forms of the sugars. The percentage of open chain at equilibrium compared to the tautomeric forms is dependent on the type of sugar molecule: for fructose, it is 0.8% (Mega *et al.*, 1990), whereas for glucose, it is $2.8*10^{-3}$% (Hayward & Angyal, 1977). Therefore the oxygen exchange between water and fructose is higher than with glucose (Mega *et al.*, 1990). Sucrose is a disaccharide composed of one molecule of glucose and one molecule of fructose. It is a non-reducing sugar that has no open-chain form: neither of the rings is able to open, which should make oxygen exchange reactions theoretically impossible. Nevertheless, in the present study, we have observed a depletion in the ^{18}O signature of sucrose, as well as for the other hexoses (glucose and fructose). Thus, these depletions can not be related to oxygen exchanges with the solvents of the extraction. This finding is supported by the fact that no correlation has been observed

		%C	%O
sugar	anhydrous hexose	40	53
	monohydrate hexose	36	57
	dihydrate hexose	33	59
	pentahydrate hexose	26	65
	anhydrous sucrose	42	51
	monohydrate sucrose	40	53
	dihydrate sucrose	38	55
	pentahydrate sucrose	33	59
amino acid		32-65	16-48
organic acid	(monocarboxylic acid with short carbon chain, monoacid as pyruvate, diacid as succinate, triacid as citrate)	19-67	19-76
tannin	gallic acid, ellagic acid, gallotannin, ellagitannin	49-56	42-47

Table 21: Percentages of oxygen (%O) and carbon (%C) of molecules that may be found in leaf soluble sugar extracts.

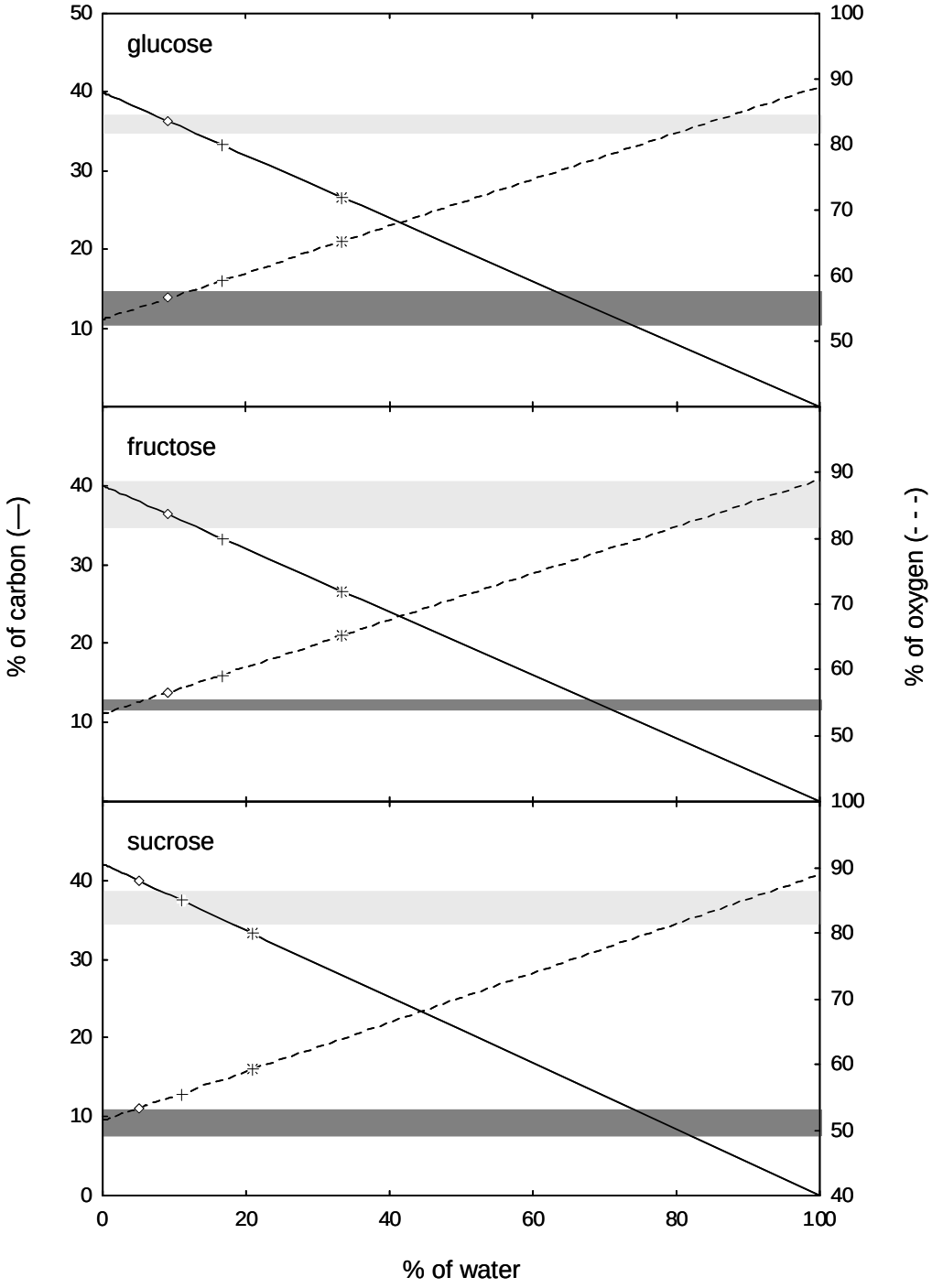


Figure 38: Relationships between the percentages of carbon and oxygen calculted for the extract *versus* the content of water (from 0% (dry sugars) to 100% of water). The grey areas represent the range of values found for the percentage of carbon (light-coloured) and for the percentage of oxygen (dark-coloured) for each sugar extraction. ◊: if 100% of sugar molecules of the extract are monohydrates; +: if 100% of sugar molecules of the extract are dihydrates; ✳: if 100% of sugar molecules of the extract are pentahydrates.

between the ^{18}O composition of hexoses ($\delta^{18}O_S$) and the ^{18}O isotope composition of water ($\delta^{18}O_W$) (Figure 36).

^{13}C isotope composition ($\delta^{13}C_S$) was used as an indicator of a potential contamination of the sugars during the extraction procedure. A potential contamination could arise in particular from the resins that contain carbon polymer. However, as no difference has been observed before and after extraction, no molecule containing carbon has polluted the extract. As carbon molecules often bring oxygen atoms, the oxygen isotope composition ($\delta^{18}O_S$) is not perturbed by such a contamination. Even if the $\delta^{13}C_S$ of extracted sugars has not changed, this is not the case for the carbon and oxygen percentages which are highly variable among the overall extractions (see standard deviation in Table 19). The average of carbon percentage for the three sugars was lower than the theoretical percentage or the percentage observed for the non extracted sugars, whereas the percentage of oxygen was higher for extracted glucose and frutose and similar for extracted sucrose compared to non extracted sugars.

A lower percentage of carbon and a higher percentage of oxygen are explained by adding water molecules to the extract. As the samples used for %O and %C determinations were distinct (two different mass spectrometers), these two variables could not be related. However, the %C and %O determined in the extracts has been related to the percentage of water needed to have these observed ranges of values (Figure 38). From this analysis, we could expect the presence of around 10% of water in our samples. The water molecules can have two sources. First, freeze-drying may have been partial and heterogeneous among capsules. This implies that sugars conserved molecules of water solvent, but in a "non-equivalent fashion". In this case, the analysis of $\delta^{18}O$ of extracted sugars ($\delta^{18}O_S$) may reflect the $\delta^{18}O$ of the water solvent ($\delta^{18}O_W$). However, no correlation between $\delta^{18}O_S$ and $\delta^{18}O_W$ has been observed. Thus water can be conserved but this is not the factor that determines the ^{18}O signature of the sugars. A second source of water can be assigned to water vapor. Indeed sugar molecules are highly hygroscopic. As atmospheric water vapour is depleted in ^{18}O ($\delta^{18}O_V$=-13.3‰: value obtained from atmospheric sample in the lab), a higher presence of water vapor in the samples would decrease $\delta^{18}O_S$ and thus result in the observed negative correlation between the percentage of oxygen and $\delta^{18}O_S$ (Figure 36). From $\delta^{18}O_S$ for each extraction and $\delta^{18}O_V$, the percentage of water presents in each extract has been recalculated with a mass balance procedure, i.e.:

$$\delta^{18}O_{S\text{-}NE}*(1-x) + \delta^{18}O_V*x=\delta^{18}O_{S\text{-}E}$$

with $\delta^{18}O_{S\text{-}NE}$ the signature in ^{18}O of non extracted sugars, $\delta^{18}O_{S\text{-}E}$ the signature in ^{18}O determined for extracted sugars, and x the proportion of water molecules present in the extract.

This calculation leads to a proportion of water molecules included between 0 and 8% for all the extractions and the three sugars. This proportion is in accordance with the proportion previously found with %C and %O. Therefore, if exchanges of oxygen occur during the extraction, this phenomenon is partly hidden by the association with "external" water molecules. With this experiment, we may

conclude that the hygroscopic properties of sugars (i.e. their ability to attract water molecules) are the source of the variability in the ^{18}O signature.

Isotope and atom compositions of leaf soluble sugars

The percentage of nitrogen found in the extracts implied the presence of molecules such as amino-acid. Therefore, amino-acid may not be completely retained by the resins and the same phenomenon can be hypothesized for organic acid. Moreover, oak leaves contain high quantity of tannin and polyphenol that are not completely retained by the PVPP as indicated by the yellow coloration of the final extract. All of these molecules have different %C and %O (see Table 21 for examples) compared to sugars. The presence of those molecules in leaf sugar extracts could explain why the observed %C and %O are lower than expected. Indeed, since the percentage of oxygen for monosaccharide and disaccharide is 53.3% and 51.5% respectively and as for pedunculate oak, sucrose represents about 80% of leaf soluble carbohydrates (Picon *et al.*, 1997), therefore we expected that the percentage of oxygen would be close to 51.5%. In the same way, carbon percentage was expected to be close to 41.6% supposing that extract is mainly composed of sucrose. All these observations imply that the extract does not exclusively contain soluble sugars. However $\delta^{13}C_{LS}$ is in the range of values expected for leaf soluble sugars (Brugnoli & Farquhar, 2000) and are in good agreement with values found for pedunculate oak by Picon *et al.* (1997) (-31 to –28‰) or by Roussel *et al.* (submitted) (-28.9 to -24.7‰).

Moreover, the oxygen isotope composition of extracted leaf soluble sugars ($\delta^{18}O_{LS}$) was included between 27.5 to 31.9 ‰, which was in agreement with the review of Schmidt *et al.* (2001) where the ^{18}O composition of carbohydrates in plants varied from 28 to 36‰. However, our values are a little bit lower than values obtained for leaf or phloem organic soluble matter (between 25 and 40‰) used as a proxy for $\delta^{18}O$ of sucrose (Keitel *et al.*, 2003; Barnard *et al.*, 2007).

Contrary to pure sugars, relationships between $\delta^{18}O_W$ and $\delta^{18}O_{LS}$ were observed but not for all the individuals, whereas no correlation was reported between $\delta^{18}O_{LS}$ and the percentage of oxygen. The mix of leaf soluble sugars with other molecules may have decreased the hygroscopic properties of the extract. Therefore, this allows to highlight ^{18}O exchanges between sugars and water of extraction (as found for individuals Qr1, Qr2 and Qr4). However the magnitude of these exchanges are not reproduced between the two different campaigns of extractions (the first using Qr1 and Qr2 organic matter, and the second using Qr3 and Qr4 organic matter), and this phenomenon is not well understood yet.

The different trees for which leaves were harvested for $\delta^{18}O_{LS}$ represented a range of carbon isotope composition of soluble sugars (Table 20), indicating a large range of water use efficiency. For these trees it has been shown (Roussel *et al.*, submitted) that the variation in water use efficiency is largely

due to variation in stomatal conductance for water vapor (g_s) and a positive relationship between $\delta^{13}C$ of leaf soluble sugars and g_s has been obtained. According to Farquhar *et al.* (2007), when trees are in the same environmental conditions, at lower g_s, the average leaf water $\delta^{18}O$ would be expected to be more enriched than at greater g_s. As organic matter is expected to reflect the signature of the water where it is produced, a higher signature in ^{18}O of leaf soluble sugars would reflect a lower g_s. In this study, differences in $\delta^{13}C_{LS}$ were not reflected in $\delta^{18}O_{LS}$ values and no relationship was observed between $\delta^{13}C_{LS}$ and $\delta^{18}O_{LS}$. Therefore, the analysis of $\delta^{18}O_{LS}$ as a tool to dissociate stomatal conductance and photosynthetic capacity from water-use-efficiency and thus carbon isotope composition is not convincing.

Conclusions

To our knowledge, few data concern the analysis of soluble sugars extracted from leaves. In this paper, we have shown that the use of pure sugars to test the extraction procedure is not relevant since their hygroscopic properties may hide ^{18}O exchanges between sugars and water of extraction. For leaf extracted sugars, ^{18}O exchanges are more obvious. However, we need other experimentations to confirm this process. One objective of this work was to study the possibilility to use ^{18}O composition of leaf soluble sugars to dissociate the effect of assimilation of CO_2 from stomatal conductance for water vapor on water use efficiency. At this stage of the experiment, the variability between individuals found for leaf sugar ^{13}C composition was not reflected in sugar ^{18}O composition.

References

Barbour M, Farquhar G. 2000. Relative humidity- and ABA-induced variation in carbon and oxygen isotope ratios of cotton leaves. *Plant, Cell and Environment* **23**, 473-485.

Barbour M. 2007. Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Functional Plant Biology* **34**, 83-94.

Barnard R, Salmon Y, Kodama N, Sörger K, Holst J, Rennenberg H, Gessler A, Buchmann N. 2007. Evaporative enrichment and time lags between $\delta^{18}O$ of leaf water and organic pools in a pine stands. *Plant, Cell and Environment* **30**, 539-550.

Brugnoli E, Hubick K, von Caemmerer S, Wong SC, Farquhar G. 1988. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C_3 plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiology* **88**, 1418-1424.

Brugnoli E, Farquhar G. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: *Photosynthesis: physiology and metabolism*. eds. Leegood R, Sharkey T, von Caemmerer S. Kluwer Academic Publishers. pp. 399-434.

Cernusak L, Pate J, Farquhar G. 2002. Diurnal variation in the stable isotope composition of water and dry matter in fruiting *Lupinus angustifolius* under field conditions. *Plant, Cell and Environment* **25**, 893-907.

Chow P, Landhäusser S. 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology* **24**, 1129-1136.

Cortes S, Mega T, Van Etten R. 1991. The ^{18}O shift in ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. 14. Kinetics of oxygen exchange at the anomeric carbon of D-ribose and D-2-deoxyribose. *The Journal of Organic Chemistry* **56**, 943-947.

Dickson RE, Larson PR. 1975. Incorporation of ^{14}C-photosynthate into major chemical fractions of source and sink leaves of cottonwood. *Plant Physiology* **56**, 185-193.

Epstein S, Mayeda T. 1953. Variation of $\delta^{18}O$ content in waters from natural sources. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **4**, 213–214.

Farquhar G, Lloyd J. 1993. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In: *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water relations*. eds. Ehleringer J, Hall A, Farquhar G. Academic Press, San Diego. pp. 47-70.

Farquhar G, Cernusak L, Barnes B. 2007. Heavy water fractionation during transpiration. *Plant Physiology* **143**, 11-18.

Gleixner G, Scrimgeour C, Schmidt H, Viola R. 1998. Stable isotope distribution in the major metabolites of source and sink organs of *Solanum tuberosum* L.: a powerful tool in the study of metabolic partitioning in intact plants. *Planta* **207**, 241-245.

Gomez L, Rubio E, Augé M. 2002. A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 360-369.

Gonfiantini R, Gratziu S, Tongiorgi E. 1965. Oxygen isotopic composition of water in leaves. In: *Isotopes and Radiation in Soil-Plant Nutrition Studies. Technical Report Series N° 206*. Vienna: International Atomic Energy Commission. p. 405–410.

Goto K, Titani T. 1941. Untersuchungen der chemischen Eigenschaften der Kohlen hydrate mit Hilfe des schweren Sauerstoffs. I. Austauschreaktion der Sauerstoffatome zwischen einigen Monosen und Wasser (Auszug). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **16**, 172-177.

Göttlicher S, Knohl A, Wanek W, Buchmann N, Richter A. 2006. Short-term changes in carbon isotope composition of soluble carbohydrates and starch: from canopy leaves to the root system. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**, 653-660.

Hayward L, Angyal S. 1977. A symmetry rule for the circular dichroism of reducing sugars, and the proportion of carbonyl forms in aqueous solutions thereof. *Carbohydrate Research* **53**, 13-20.

Jäggi M, Saurer M, Fuhrer J, Siegwolg R. 2003. Seasonality of $\delta^{18}O$ in needles and wood of *Picea abies*. *New Phytologist* **158**, 51-59.

Keitel C, Adams M, Holst T, Matzarakis A, Mayer H, Rennenberg H, Gessler A. 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant, Cell and Environment* **26**, 1157-1168.

Maple S, Allerhand A. 1987. Detailed tautomeric equilibrium of aqueous D-glucose. Observation of six tautomers by ultrahigh resolution carbon-13 NMR. *Journal of the American Chemical Society* **109**, 3168-3169.

Mega TL, Cortes S, Van Etten RL. 1990. The O-18 isotope shift in C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. 13. Oxygen-exchange at the anomeric carbon of D-glucose, D-mannose, and D-fructose. *The Journal of Organic Chemistry* **55,** 522-528.

Picon C, Ferhi A, Guehl J. 1997. Concentration and $\delta^{13}C$ of leaf carbohydrates in relation to gas exchange in *Quercus robur* under elevated CO_2 and drought. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1547-1556.

Risley JM, Van Etten RL. 1982. Kinetics of oxygen exchange at the anomeric carbon atom of D-Glucose and D-erythrose using the O-18 isotope effect in C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **21**, 6360-6365.

Roussel M, Le Thiec D, Montpied P, Ningre N, Guehl J, Brendel O. Diversity of water use efficiency in a *Quercus robur* family: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest Science* submitted.

Schmidt H, Werner R, Rossmann A. 2001. ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry* **58**, 9-32.

Sheshshayee M, Bindumadhava H, Ramesh R, Prasad T, Lakshminarayana M, Udayakumar M. 2005. Oxygen isotope enrichment (Delta O-18) as a measure of time-averaged transpiration rate. *Journal of Experimental Botany* **56**, 3033-3039.

Wanek W, Heintel S, Richter A. 2001. Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 1136-1140.

Wang X, Yakir D, Avishai M. 1998. Non-climatic variations in the oxygen isotopic compositions of plants. *Global Change Biology* **4**, 835-849.

Wertz P, Garver J, Anderson L. 1981. Anatomy of a complex mutarotation. Kinetics of tautomerization of a-D-galactopyranose and, 8-D-galactopyranose in water. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 3916-3922.

Xu C, Lin G, Griffin K, Sambrotto R. 2004. Leaf respiratory CO_2 is ^{13}C-enriched relative to leaf organic components in five species of C_3 plants. *New Phytologist* **163**, 499-505.

II.4 Conclusions

L'objectif principal de cette partie était de vérifier si l'outil isotopique ^{18}O pouvait être utilisé comme estimateur de g_s afin de dissocier les composantes photosynthétique et transpiratoire de W_i. La double approche isotopique ($^{13}C/^{18}O$) a été validée lorsque la variabilité de la conductance stomatique était créée par les conditions environnementales. Une analyse, actuellement en cours, sur les 54 génotypes de chêne pédonculé étudiés au cours de 2006 permettra de valider cette approche lorsque la variabilité n'est plus environnementale mais génotypique.

L'utilisation de la matière organique soluble, en tant qu'estimateur de la conductance stomatique, reste à perfectionner (conditions de prélèvement, de conservation… des échantillons). Cependant, l'utilisation de matière organique soluble semble être plus appropriée que l'analyse de sucres solubles extraits. En effet, l'obtention de matière organique soluble ne nécessite pas d'étapes d'extractions, ce qui permet donc un gain de temps considérable, et n'introduit pas de biais *via* les étapes d'extractions sur la signature en ^{18}O. De plus, si de futures expérimentations permettent de montrer que la signature en ^{18}O de la matière organique soluble foliaire représente une estimation intégrée dans le temps de la conductance stomatique, il s'agira alors d'un outil très intéressant pour analyser un grand nombre d'individus en un temps relativement court. Cette approche pourra alors être utilisée dans le cadre d'étude de génétique quantitative.

Conclusions/Perspectives

Cette thèse s'inscrivait dans un projet combinant deux approches: écophysiologique et génomique afin de comprendre les mécanismes physiologiques et génomiques sous-jacent à la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau chez le chêne pédonculé. Ma thèse ne portait que sur l'approche écophysiologique. Elle a permis d'apporter les premières conclusions relatives à la première étape de ce projet, à savoir déterminer les causes physiologiques et /ou anatomiques de la variabilité observée en conditions non-limitantes. Pour ce faire, de nombreux traits foliaires physiologiques (capacité photosynthétique, conductance stomatique…) et structuraux (anatomie foliaire), mais aussi des traits "plante entière" (productivité…) liés à l'efficience d'utilisation de l'eau ont été analysés. De tous ces traits, la conductance stomatique et ses composantes (anatomiques ou réponse à l'environnement) est celui qui contribue le plus à la variabilité génétique intra-famille observée. Cette première étape comportait aussi une étude consistant à vérifier la validité de la double approche isotopique ($^{13}C/^{18}O$) afin de décomposer des différences d'efficience d'utilisation de l'eau en composantes photosynthétiques et transpiratoires. Les travaux relatifs à cette étude ont donné des résultats encourageants, mais de nombreuses améliorations sont encore à apporter.

Bien que les travaux présentés dans ce manuscrit donnent des pistes quant à ce qui détermine la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau au sein de cette famille de chêne pédonculé, ils ne permettent pas d'assigner de fonctions précises aux régions génomiques liées à la variabilité de $\Delta^{13}C$ détectées par Torti (2005) et Brendel *et al.* (2008) (Figure 8). En effet, les génotypes constituant les phénotypes extrêmes comportent des combinaisons d'allèles de différentes régions génomiques qui vont en faveur d'une forte ou d'une faible efficience d'utilisation de l'eau. Une façon d'étudier une région spécifique du génome et de constater son implication sur la détermination du phénotype est l'utilisation de mutants ou de lignées particulières pour la région d'intérêt. Chez les arbres, mis à part chez le peuplier, ce genre d'étude n'est pas possible (temps de génération trop importants). Cependant, au cours de ma thèse, nous avons utilisé une autre alternative concernant le choix de 54 génotypes, et pour lesquels seules quelques données ont été montrées dans ce manuscrit. Pour étudier l'impact de certaines de ces régions sur le phénotype, le choix de ces génotypes s'est porté sur les données génotypiques acquises pour l'établissement de la carte génétique: ces génotypes ont été sélectionnés de façon à former des groupes d'individus se distinguant uniquement par une région précise du génome. Deux régions génomiques présentaient un fort intérêt. La première est située sur le groupe de liaison 11m. Sur cette région plusieurs QTLs liés à la variabilité de $\Delta^{13}C$ pour différentes années et conditions sont colocalisés (Figure 8). La deuxième est située sur le groupe de liaison 2m. Sur cette région des QTLs liés à la variabilité de $\Delta^{13}C$ et des capacités photosynthétiques (estimées *via* l'azote et la chlorophylle foliaire) colocalisent (Figure 8). La détection de QTL revient à associer l'allèle d'un ou plusieurs marqueurs et la valeur phénotypique d'un trait. Les marqueurs utilisés pour établir une carte

génétique ont deux allèles possibles: s'ils sont détectés, ils sont notés "+", sinon, ils sont notés "-". Si un QTL lié à la variabilité d'un trait est détecté dans une région génomique, cela signifie que l'allèle + (ou -, selon les cas) est associé à une forte valeur phénotypique du trait, et inversement. L'exploitation des données de cartographie génétique sur toute la famille a ainsi permis de définir des ensembles de génotypes présentant la combinaison allélique adéquate au niveau de la région d'intérêt. Parmi ces génotypes, seuls 15 ont été retenus. Cet ensemble de 15 génotypes présentait soit les allèles "+", soit les allèles"–" pour les marqueurs flanquant la région d'intérêt. Pour le reste du génome, nous avons fait en sorte qu'il soit le plus hétérogène possible. Ainsi, l'objectif était de comparer les moyennes phénotypiques de l'ensemble des génotypes "+" à celles de l'ensemble des génotypes "-" pour ressortir les différences liées à la région sélectionnée. Cette étude était donc basée sur un QTL à effet fort: un seul allèle en faveur d'une efficience haute ou basse. De ce fait les traits, pour lesquels des différences auraient été trouvées entre ensemble de génotypes "+" et ensemble de génotypes "-", auraient pu être reliés à la région génomique d'intérêt. Compte tenu d'une forte hétérogénéité de taille des plants et de conditions lumineuses peu favorables, cette étude n'a pas pu être menée à bien. Toutefois, pour les génotypes choisis sur la base des marqueurs flanquant la région d'intérêt située sur le groupe de liaison 11m, nous avons trouvé que l'ensemble de génotypes "-" avait des valeurs moyennes de $\Delta^{13}C$ ($p<0.05$) et de conductance stomatique ($p<0.10$) supérieures à l'ensemble de génotypes "+". Ce résultat était donc cohérent avec le fait que les allèles "+" des marqueurs flanquant la région d'intérêt située sur le groupe de liaison 11m sont associés à une forte efficience d'utilisation de l'eau. Ils confirment aussi les résultats présentés dans la première partie de ce manuscrit: l'implication de la conductance stomatique dans la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau en conditions non-limitantes. Enfin, ces résultats nous permettent de conclure que la région 11m influence l'efficience d'utilisation de l'eau *via* la conductance stomatique. Il semblerait donc que cette région contienne des gènes impliqués dans la variabilité de la conductance stomatique au sein de cette famille de chêne pédonculé.

La deuxième étape consistait à caractériser le comportement individuel de génotypes de cette famille en conditions de sécheresse édaphique dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes d'acclimatation à ces conditions environnementales. Cette étape a été entamée au cours de ma thèse. Une première expérimentation, présentée en annexe (annexe 2) a tout d'abord permis de décrire la réponse de la conductance stomatique à un dessèchement progressif du sol d'une population d'individus. Les résultats de cette expérience ont ensuite été utilisés pour définir des niveaux de contrainte hydrique à appliquer afin d'obtenir une réduction précise de la conductance stomatique, notamment en 2006 sur les 54 génotypes. Mais les résultats ne sont pas concluants du fait des conditions météorologiques (luminosité). D'autre part, les arbres étant très grands, le stress a été très mal maîtrisé avec de grandes variations journalières du contenu en eau du sol. Une des perspectives à court terme est donc de refaire cette expérimentation.

En parallèle de cette approche écophysiologique, des études de génomique sont actuellement en cours. Ces travaux ont pour objectif d'identifier les transcrits différentiellement exprimés entre les phénotypes extrêmes, mais aussi entre les groupes de génotypes étudiés lors de ma deuxième année de thèse, en 2006. Ces banques différentielles permettront de fournir des gènes candidats. La mise en commun des résultats écophysiologiques et génomiques permettra de mieux comprendre la variabilité des stratégies au sein de cette famille de chêne pédonculé en condition optimale, mais aussi en conditions de stress hydrique. Une deuxième façon d'obtenir des gènes candidats est d'étudier l'expression de gènes reconnus comme influençant le trait d'intérêt chez d'autres espèces. Ceci a en partie été abordé dans ce manuscrit avec l'étude de l'expression d'ERECTA pour laquelle nous avons mis en évidence une corrélation positive entre les variabilités naturelles de l'efficience d'utilisation de l'eau et de l'expression de ce gène.

Les traits les plus pertinents (écophysiologiques mais aussi gènes candidats), identifiés au cours des étapes précédentes, pourront alors être mesurés sur la famille complète de façon à les cartographier et à analyser les co-localisations avec les QTL précédemment détectés (Torti, 2005; Brendel *et al.*, 2008). L'étude de ces co-localisations permettra d'avancer vers une interprétation fonctionnelle de la variabilité génétique de l'efficience d'utilisation de l'eau.

Une grande variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau a ainsi pu être démontrée au niveau intra-famille. Les travaux de Ponton (2002) ont montré que cette variabilité existait aussi au sein de populations naturelles de chêne pédonculé. L'objectif à plus long terme est donc de savoir si ce qui a été observé au sein de cette famille de chêne pédonculé est extrapolable à n'importe quelle population de chêne pédonculé. L'approche isotopique ($^{13}C/^{18}O$) fournit un outil pointu de comparaison de l'efficience d'utilisation de l'eau, entre génotypes, sous conditions environnementales similaires. Dans la mesure où des liens entre comportement écophysiologique en conditions non-limitantes, en conditions limitantes et génomique peuvent être établis, le comportement écophysiologique d'un chêne pédonculé et son devenir pourrait être déduit à partir d'une "simple" analyse isotopique. Des implications importantes de l'utilisation de cet outil isotopique pourraient alors apparaître dans le cadre de la gestion et de la sélection de génotypes de chêne pédonculé moins sensibles aux épisodes de sécheresse.

Références

Aasamaa K, Sõber A, Rahi M. 2001. Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 765-774.

Ackerly D, Dudley S, Sultan S, Schmitt J, Coleman J, Linder C, Sandquist D, Geber M, Evans A, Dawson T, Lachowicz M. 2000. The evolution of plant ecophysiological traits: Recent advances and future directions. *Bioscience* **50**, 979-995.

Badeck F, Tcherkez G, Nogués S, Piel C, Ghashghaie J. 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs—a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 1381-1391.

Barbour M, Farquhar G. 2000. Relative humidity- and ABA-induced variation in carbon and oxygen isotope ratios of cotton leaves. *Plant, Cell and Environment* **23**, 473-485.

Barbour M, Schurr U, Henry B, Wong S, Farquhar G. 2000a. Variation in the oxygen isotope ratio of phloem sap sucrose from castor bean. Evidence in support of the Peclet effect. *Plant Physiology* **123**, 671-679.

Barbour M, Fischer R, Sayre K, Farquhar G. 2000b. Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 625-637.

Barbour M, Farquhar G. 2003. Do pathways of water movement and leaf anatomical dimensions allow development of gradients in $H_2{}^{18}O$ between veins and the sites of evaporation within leaves? *Plant, Cell and Environment* **27**, 107-121.

Barbour M, Cernusak L, Whitehead D, Griffin K, Turnbull M, Tissue D, Farquhar G. 2005. Nocturnal stomatal conductance and implications for modelling delta O-18 of leaf-respired CO_2 in temperate tree species. *Functional Plant Biology* **32**, 1107-1121.

Barbour M. 2007. Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Functional Plant Biology* **34**, 83-94.

Barnard R, Salmon Y, Kodama N, Sörger K, Holst J, Rennenberg H, Gessler A, Buchmann N. 2007. Evaporative enrichment and time lags between $\delta^{18}O$ of leaf water and organic pools in a pine stands. *Plant, Cell and Environment* **30**, 539-550.

Becker M, Levy G. 1983. Le dépérissement du chêne. Les causes écologiques. Exemple de la Forêt de Tronçais et premières conclusions. *Revue Forestière Française* **35**, 341-356.

Benowicz A, El-Kassaby Y. 1999. Genetic variation in mountain hemlock (*Tsuga mertensiana* Bong.): quantitative and adaptive attributes. *Forest Ecology and Management* **123**, 205-215.

Benowicz A, Guy R, El-Kassaby Y. 2000. Geographic pattern of genetic variation in photosynthetic capacity and growth in two hardwood species from British Columbia. *Oecologia* **123**, 168-174.

Bergmann D. 2006. Stomatal development: from neighborly to global communication. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 478-783.

Blatt MR. 2000. Ca^{2+} signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 196-204.

Bottinga Y, Craig H. 1969. Oxygen isotope fractionation between CO_2 and water, and the isotopic composition of marine atmospheric CO_2. *Earth and Planetary Science Letters* **5**, 285–295.

Bowling D, Pataki D, Randerson J. 2008. Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO_2 fluxes. *New Phytologist* **178**, 24-40.

Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD. 1997. CO_2 and water vapour exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology* **100**, 1051-1053.

Brandes E, Kodama N, Whittaker K, Weston C, Rennenberg H, Keitel C, Adams M, Gessler A. 2006. Short-term variation in the isotopic composition of organic matter allocated from the leaves to the stem of *Pinus sylvestris* – effects of photosynthetic and post-photosynthetic carbon isotope fractionation. *Global Change Biology* **12**, 1922-1939.

Brandes E, Wenninger J, Koeniger P, Schindler D, Rennenberg H, Leibundgut C, Mayer H, Gessler A. 2007. Assessing environmental and physiological controls over water relations in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stand through analyses of stable isotope composition of water and organic matter. *Plant, Cell and Environment* **30**, 113-127.

Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl J. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of $\delta^{13}C$ and ring width in maritime pine. *Plant, Cell and Environment* **25**, 945-953.

Brendel O, Le Thiec D, Saintagne C, Kremer A, Guehl J. 2008. Detection of quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 263-278.

Brugnoli E, Hubick K, von Caemmerer S, Wong SC, Farquhar G. 1988. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C_3 plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiology* **88**, 1418-1424.

Brugnoli E, Farquhar G. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: *Photosynthesis: physiology and metabolism*. eds. Leegood R, Sharkey T, von Caemmerer S. Kluwer Academic Publishers. pp. 399-434.

Bruschi P, Vendramin G, Bussotti, F: Grossoni, P. 2003a. Morphological and molecular diversity among italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* **91**, 707-716.

Bruschi P, Grossoni P, Bussoti F. 2003b. Within- and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations. *Trees* **17**, 164-172.

Cappa C, Hendricks M, DePaulo D, Cohen R. 2003. Isotopic fractionation of water during evaporation. *Journal of Geophysical Research* **108**, 4525–4534.

Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi M, Barreneche T, Lauteri M, Villani F. 2004. Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1088-1101.

Cernusak L, Pate J, Farquhar G. 2002. Diurnal variation in the stable isotope composition of water and dry matter in fruiting *Lupinus angustifolius* under field conditions. *Plant, Cell and Environment* **25**, 893-907.

Cernusak L, Wong S, Farquhar G. 2003a. Oxygen isotope composition of phloem sap in relation to leaf water in *Ricinus communis*. *Functional Plant Biology* **30**, 1059-1070.

Cernusak L, Arthur D, Pate J, Farquhar G. 2003b. Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiology* **131**, 1544-1554.

Cernusak L, Farquhar G, Pate J. 2005. Environmental and physiological controls over oxygen and carbon isotope composition of Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* **25**, 129-146.

Cernusak L, Aranda J, Marshall J, Winter K. 2007a. Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytologist* **173**, 294-305.

Cernusak L, Winter K, Aranda J, Turner B, Marshall J. 2007b. Transpiration efficiency of a tropical pioneer tree (*Ficus insipida*) in relation to soil fertility. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3549–3566.

Cowan IR. 1977. Stomatal behaviour and environment. *Advances in Botanical Research* **4**, 117-228.

Cowan IR, Farquhar GD. 1977. Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment: Stomatal function in the regulation of gas exchange. *In Symposium of the Society of Experimental Botany*. Jennings DH (Ed). Cambridge University Press, Cambridge. **31**, 471-505.

Craig H, Gordon L. 1965. Deuterium and oxygen-18 variations in the ocean and the marine atmosphere. In: *Proceedings of a Conference on Stable Isotopes in Oceanographic Studies and Paleotemperatures*. eds. Tongiorgi E. Lischi and Figli, Pisa, Italy. pp. 9-130.

Cregg B, Olivas-Garcia J, Hennessey T. 2000. Provenance variation in carbon isotope discrimination of mature ponderosa pine trees at two locations in the Great Plains. *Canadian Journal of Forest Research* **30**, 428-439.

Cuntz M, Ogée J, Farquhar G, Peylin P, Cernusak L. 2007. Modeling advection and diffusion of water isotopologues in leaves. *Plant, Cell and Environment* **30**, 892–909.

Damesin C, Rambal S, Joffre R. 1998. Seasonal and annual changes in leaf $\delta^{13}C$ in two co-occuring Mediterranean oaks: relations to leaf growth and drought progression. *Functional Ecology* **12**, 778-785.

Dawson T. 1993. Hydraulic lift and water use by plants: implications for water balance, performance and plant–plant interactions. *Oecologia* **95**, 565–574.

DeLucia E, Whitehead D, Clearwater M. 2003. The relative limitation of photosynthesis by mesophyll conductance in co-occuring species in a temperate rainforest dominated by the conifer *Dacrydium cupressinum*. *Functional Plant Biology* **30**, 1197-1204.

de Vienne D. 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA Editions. 204 p.

Dickson RE, Larson PR. 1975. Incorporation of ^{14}C-photosynthate into major chemical fractions of source and sink leaves of cottonwood. *Plant Physiology* **56**, 185-193.

Dongmann G, Nürnberg H, Förstel H, Wagener K. 1974. On the enrichment of $H_2{}^{18}O$ in the leaves of transpiring plants. *Radiation and Environmental Biophysics* **11**, 41-52.

Duranceau M, Ghashghaie J, Brugnoli E. 2001. Carbon Isotope discrimination during photosynthesis and dark respiration in intact leaves of *Nicotiana sylvestris*: comparison between wild type and mitochondrial mutant plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 65–71.

Ehleringer J. 1993. Carbon and water relations in desert plants: an isotopic perspective. In: *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations.* eds Ehleringer J, Hall A, Farquhar G. Academic Press, San Diego. pp. 155-172.

Ehleringer J, Cerling T. 1995. Atmospheric CO_2 and the ratio of intercellular to ambient CO_2 concentrations in plants. *Tree Physiology* **15**, 105-111.

Eisinger W, Swartz TE, Bogomolni RA, Taiz L. 2000. The ultraviolet action spectrum for stomatal opening in broad bean. *Plant Physiology* **122**, 99-105.

Eun SO, Lee YS. 1997. Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiology* **115**, 1491-1498.

Eun SO, Bae SH, Lee Y. 2001. Cortical actin filaments in guard cells respond differently to abscisic acid in wild-type and abi1-1 mutant Arabidopsis. *Planta* **212**, 466-469.

Evans J, Sharkey T, Berry J, Farquhar G. 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**, 281-292.

Evans J. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C_3 plants. *Oecologia* **78**, 9-19.

Evans J. 1999. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO_2 between chloroplasts. *New Phytologist* **143**, 93-104.

Faivre B. 2004. Variabilité intra et interspécifique de caractères fonctionnels chez les chênes sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) et pédonculé (*Q. robur* L.) : lien avec la répartition spatiale des individus. Rapport de DEA Université Henri Poincaré - Nancy I. 32 p.

Fan S, Grossnickle S, Sutton B. 1997. Relationships between gas exchange adaptation of Sitka x interior spruce genotypes and ribosomal DNA markers. *Tree Physiology* **17**, 115-123.

Fan S, Grossnickle S, Sutton B. 1999. Relationships between gas exchange and carbon isotope discrimination of Sitka x interior spruce introgressive genotypes and ribosomal DNA markers. *Tree Physiology* **19**, 689-694.

Farquhar G. 1980. Carbon isotope discrimination by plants and the ratio of intercellular and atmospheric CO_2 concentrations. In: *Carbon Dioxide and Climate: Australian research*. ed. Pearman GI. Australian Academy of Science, Canberra. pp. 105-110.

Farquhar G, von Caemmerer S, Berry J. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. *Planta* **149**, 78-90.

Farquhar G, O'Leary M, Berry J. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **10**, 205-226.

Farquhar G, Sharkey T. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 317-345.

Farquhar G, Richards R. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**, 539-552.

Farquhar G, Hubick K, Condon A, Richards R. 1988. Carbon isotope fractionation and plant water use efficiency. In: *Ecological Studies 68. Stable Isotopes in Ecological Research*. eds. Rundel P, Ehleringer J, Nagy K. New-York: Springer-Verlag. pp. 21-40.

Farquhar G, Ehleringer J, Hubick K. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 503-537.

Farquhar G, Lloyd J. 1993. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In: *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water relations*. eds Ehleringer J, Hall A, Farquhar G. Academic Press, San Diego. pp. 47-70.

Farquhar G, Barbour M, Henry B. 1998. Interpretation of oxygen isotope composition of leaf material. In: *Stable isotopes - Integration of biological, ecological, and geochemical processes*. ed. Griffiths H. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. pp. 27-62.

Farquhar G, Gan K. 2003. On the progressive enrichment of the oxygen isotopic composition of water along a leaf (Reprinted from Plant, Cell and Environment, vol 26, pg 801-819, 2003). *Plant, Cell and Environment* **26**, 1579-1597.

Farquhar G, Cernusak L. 2005. On the isotopic composition of leaf water in the non-steady state. *Functional Plant Biology* **32**, 293-303.

Field C, Mooney H. 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: *On the Economy of Plant Form and Function*. ed. Givnish TJ. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 25-55.

Flanagan L, Johnsen K. 1995. Genetic variation in carbon isotope discrimination and its relationship to growth under field conditions in full-sib families of *Picea mariana*. *Canadian Journal of Forest Research* **25**, 39-47.

Franks P, Farquhar G. 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiology* **143**, 78-87.

Gan K, Wong S, Yong J, Farquhar G. 2002. O-18 spatial patterns of vein xylem water, leaf water, and dry matter in cotton leaves. *Plant Physiology* **130**, 1008-1021.

Gessler A, Peuke A, Keitel C, Farquhar G. 2007. Oxygen isotope enrichment of organic matter in *Ricinus communis* during the diel course and as affected by assimilate transport. *New Phytologist* **174**, 600-613.

Ghashghaie J, Duranceau M, Badeck FW, Cornic G, Adeline MT, Deleens E. 2001. $\delta^{13}C$ of CO_2 respired in the dark in relation to $\delta^{13}C$ of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant, Cell and Environment* **24**, 505–515.

Ghashghaie J, Badeck F, Lanigan G, Nogués S, Tcherkez G, Deléens E, Cornic G, Griffiths H. 2003. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C_3 plants. *Phytochemistry Reviews* **2**, 145-161.

Grantz D, Zeiger E. 1986. Stomatal responses to light and leaf-air water vapor pressure difference show similar kinetics in sugarcane and soybean. *Plant Physiology* **81**, 865-868.

Grieu P, Guehl JM, Aussenac G. 1988. The effect of soil and atmospheric drought on photosynthesis and stomatal control of gas exchange in three coniferous species. *Physiologia Plantarum* **73**, 97-104.

Grossnickle S, Fan S. 1998. Genetic variation in summer gas exchange patterns of interior spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss x *Picea engelmannii* Parry ex Engelm.). *Canadian Journal of Forest Research* **28**, 831-840.

Grossnickle S, Fan S, Russell J. 2005. Variation in gas exchange and water use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees – Structure and Function* **19**, 32-42.

Guehl J, Picon C, Aussenac G, Gross P. 1994. Interactive effects of elevated CO_2 and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiology* **14**, 707-724.

Guehl J, NGuyen-Queyrens A, Loustau D, Ferhi A. 1995a. Genetic and environmental determinants of water-use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. In: *Eurosilva: Contribution to Forest Tree Physiology*. eds. Sandermann H, Bonnet-Masimbert M. INRA Editions Les Colloques 76. pp. 298-321.

Guehl J, Fort C, Ferhi A. 1995b. Differential response of leaf conductance, carbon isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak. *New Phytologist* **131**, 149-157.

Guehl J, Domenach A, Bereau M, Barigah T, Casabianca H, Ferhi A, Garbaye J. 1998. Functional diversity in an Amazonian rainforest of French Guyana: a dual isotope approach ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$). *Oecologia* **116**, 316-330.

Guehl J, Bonal D, Ferhi A, Barigah T, Farquhar G, Granier A. 2004. Community-level diversity of carbon-water relations in rainforest trees. In: *Ecology and Management of a Neotropical Rainforest*

(Lessons drawn for Paracou, a long-term experimental research site in French Guiana). eds. Gourlet-Fleury S, Guehl J, Laroussinie O. Elsevier SAS. Chapter 2. pp. 75-94.

Gur A, Semel Y, Cahaner A, Zamir D. 2004. Real time QTL of complex phenotypes in tomato interspecific introgression lines. *Trends in Plant Science* **9**, 107-109.

Harlow B, Marshall J, Robinson A. 2006. A multi-species comparison of ^{13}C from whole wood, extractive-free wood and holocellulose. *Tree Physiology* **26**, 767-774.

Helliker B, Griffiths H. 2007. Toward a plant-based proxy for the isotope ratio of atmospheric water vapour. *Global Change Biology* **13**, 723-733.

Hetherington AM. 2001. Guard Cell Signaling. *Cell* **107**, 711–714.

Hoch G, Richter A, Körner C. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* **26**, 1067-1081.

Holtum J, Winter K. 2005. Carbon isotope composition of canopy leaves in a tropical forest in Panama throughout a seasonal cycle. *Trees – Structure and Function* **19**, 545-551.

Homann U, Thiel G. 1999. Unitary exocytotic and endocytotic events in guard-cell protoplasts during osmotically driven volume changes. *Febs Letters* **460**, 495-499.

Jäggi M, Saurer M, Fuhrer J, Siegwolf R. 2002. The relationship between the stable carbon isotope composition of needle bulk material, starch, and tree rings in *Picea abies*. *Oecologia* **131**, 325-332.

Johnsen K, Flanagan L, Huber D, Major J. 1999. Genetic variation in growth, carbon isotope discrimination, and foliar N concentration in *Picea mariana*: analyses from a half-diallel mating design using field-grown trees. *Canadian Journal of Forest Research* **29**, 1727-1735.

Kearns EV, Assmann SM. 1993. The guard cell-environment connection. *Plant Physiology* **102**, 711-715.

Keitel C, Adams M, Holst T, Matzarakis A, Mayer H, Rennenberg H, Gessler A. 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant, Cell and Environment* **26**, 1157-1168.

Kleinschmit J. 1993. Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Annales des Sciences Forestières* **50**, 166-185.

Kremer A, Petit R. 1993. Gene diversity in natural populations of oak species. *Annales des Sciences Forestières* **50**, 186-203.

Kump L. 2002. Reducing uncertainty about carbon dioxide as a climate driver. *Nature* **419**, 188–190.

Kundu S, Tigerstedt P. 1999. Variation in net photosynthesis, stomatal characteristics, leaf area and whole-plant phytomass production among ten provenances of neem (*Azadirachta indica*). *Tree Physiology* **19**, 47-52.

Ivlev AA, Bykova NV, Igamberdiev AU. 1996. Fractionation of carbon (C-13/C-12) isotopes in glycine decarboxylase reaction. *Febs Letters* **386**, 174–176.

Lauteri M, Scartazza A, Guido M, Brugnoli E. 1997. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology* **11**, 675-683.

Lauteri M, Pliura A, Monteverdi M, Brugnoli E, Villani F, Eriksson G. 2004. Genetic variation in carbon isotope discrimination in six European populations of *Castanea sativa* Mill. originating from contrasting localities. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 1286-1296.

Law B, Falge E, Gu L, Baldocchi D, Bakwin P, Berbigier P, Davis K, Dolman A, Falk M, Fuentes J, Goldstein A, Granier A, Grelle A, Hollinger D, Janssens I, Jarvis P, Jensen N, Katul G, Mahli Y, Matteucci G, Myers T, Monson R, Munger W, Oechel W, Olson R, Pilegaard K, Paw U, Thorgeirsson H, Valentini R, Verma S, Vesala T, Wilson K, Wofsy S. 2002. Environmental controls over carbon dioxide and water vapor exchange of terrestrial vegetation. *Agricultural and Forest Meteorology* **113**, 97-120.

Leavitt S, Danzer S. 1993. Method for batch processing small wood samples to holocellulose for stable-carbon isotope analysis. *Analytical Chemistry* **65**, 87-89.

Lebourgeois F, Granier A, Bréda N. 2001. Une analyse des changements climatiques régionaux en France entre 1956 et 1997. Réflexions en terme de conséquences pour les écosystèmes forestiers. *Annals of Forest Science* **58**, 733-754.

Lemichez E, Wu Y, Sanchez JP, Mettouchi A, Mathur J, Chua NH. 2001. Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes & Development* **15**, 1808–1816.

Li C. 2000. Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiologia Plantarum* **108**, 134-139.

Li C, Wang K. 2003. Differences in drought responses of three contrasting *Eucalyptus microtheca* F. Muell. populations. *Forest Ecology and Management* **179**, 377-385.

Lin G, Ehleringer JR. 1997. Carbon isotopic fractionation does not occur during dark respiration of C-3 and C-4 plants. *Plant Physiology* **114**, 191–194.

Loader N, Robertson I, Barker A, Switsur V, Waterhouse J. 1997. An improved technique for the batch processing of small wholewood samples to α-cellulose. *Chemical* **136**, 313-317.

Loomis R. 1997. On the utility of nitrogen in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 13378-13379.

Loreto F, Delfine S, Di Marco G. 1999. Estimation of photorespiratory carbon dioxide recycling during photosynthesis. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 733–736.

Lu P, Outlaw WH Jr, Smith BG, Freed GA. 1997. A new mechanism for the regulation of stomatal aperture size in intact leaves. *Plant Physiology* **11**, 109-118.

MacFarlane C, Adams M, White D. 2004. Productivity, carbon isotope discrimination and leaf traits of trees of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to water avaibility. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1515-1524.

Marino B, McElroy M. 1991. Isotopic composition of atmospheric CO_2 inferred from carbon in C_4 plant cellulose. *Nature* **349**, 127-131.

Masle J, Gilmore S, Farquhar G. 2005. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* **436**, 866-870.

Matzner S, Rice K, Richards J. 2001. Factors affecting the relationship between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in blue oak (*Quercus douglasii*). *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 49-56.

Monclus R, Dreyer E, Delmotte F, Villar M, Delay D, Boudouresque E, Petit J, Marron N, Bréchet C, Brignolas F. 2005. Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytologist* **167**, 53-62.

Monclus R, Dreyer E, Villar M, Delmotte F, Delay D, Petit J, Barbaroux C, Le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F. 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytologist* **169**, 765-777.

Mott, KA. 1988. Do stomata respond to CO_2 concentrations other than intercellular. *Plant Physiology* **86**, 200-203.

Niinemets U, Tenhunen J. 1997. A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant, Cell and Environment* **20**, 845-866.

Niinemets Ü. 1999. Research review. Components of leaf dry mass per area – thickness and density- alter leaf photosynthetic capacity in reverse direction in woody plants. *New Phytologist* **144**, 35-47.

Nobel P. 1999. Resistances and conductances – Transpiration. In: *Physicochemical and Environmental Plant Physiology. 2nd Edition*. ed. Academic Press, San Diego. pp. 301-303.

Ogée J, Cuntz M, Peylin P, Bariac T. 2007. Non-steady-state, non-uniform transpiration rate and leaf anatomy effects on the progressive stable isotope enrichment of leaf water along monocot leaves. *Plant, Cell and Environment* **30**, 367-387.

Olbrich B, Le Roux D, Poulter A, Bond W, Stock W. 1993. Variation in water use efficiency and ^{13}C levels in *Eucalyptus grandis* clones. *Journal of Hydrology* **150**, 615-633.

Osorio J, Pereira J. 1994. Genotypic differences in water use efficiency and ^{13}C discrimination in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* **14**, 871-882.

Palmroth S, Berninger F, Nikinmaa E, Lloyd J, Pulkkinen P, Hari P. 1999. Structural adaptation rather than water conservation was observed in Scots pine over a range of wet to dry climates. *Oecologia* **121**, 302-309.

Pearce D, Millard S, Bray D, Rood S. 2006. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree Physiology* **26**, 211-218.

Peuke A, Gessler A, Rennenberg H. 2006. The effect of drought on C and N stable isotopes in different fractions of leaves, stems and roots of sensitive and tolerant beech ecotypes. *Plant, Cell and Environment* **29**, 823-835.

Picon C. 1996. Effets combinés d'un doublement de la concentration en CO2 de l'air et de sécheresses édaphiques sur la croissance et l'efficience d'utilisation de l'eau de *Quercus petraea*, *Quercus robur* et *Pinus pinaster*. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I. 106 p.

Picon C, Guehl J, Ferhi A. 1996a. Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (*Pinus pinaster*) and a drought-tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO_2 concentrations. *Plant, Cell and Environment* **19**, 182-190.

Picon C, Guehl J, Aussenac G. 1996b. Growth dynamics, transpiration and water use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO_2 and drought. *Annales des Sciences Forestières* **53**, 431-446.

Picon C, Ferhi A, Guehl J. 1997. Concentration and $\delta^{13}C$ of leaf carbohydrates in relation to gas exchange in *Quercus robur* under elevated CO_2 and drought. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1547-1556.

Ponton S, Dupouey J, Breda N, Dreyer E. 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant, Cell and Environment* **24**, 861-868.

Ponton S. 2002. Analyse de l'efficience d'utilisation de 'eau des chênes pédonculé (*Quercus robur* L.) et sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). Relation avec les dépérissements des chênaies. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I. 47 p.

Ponton S, Dupouey J, Breda N, Dreyer E. 2002. Comparison of water use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiology* **22**, 413-422.

Prasolova N, Xu Z, Lundkvist K, Farquhar G, Dieters M, Walker S, Saffigna P. 2003. Genetic variation in foliar carbon isotope composition in relation to tree growth and foliar nitrogen concentration in clones of the F-1 hybrid between slash pine and Caribbean pine. *Forest Ecology and Management* **172**, 145-160.

Rajasakeran LR, Blake TJ. 1999. New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* **18**, 175–181.

Reich P, Ellsworth D, Walters M, Vose J, Gresham C, Volin J, Bowman W. 1999. Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* **80**, 1955-1969.

Reich P, Ellsworth D, Walters M. 1998. Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Functional Ecology* **12**, 948-958.

Richards R, Rebetzke G, Condon A, van Herwaarden A. 2002. Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Science* **42**, 111-121.

Riederer M, Schreiber L. 2001. Protecting against water lost: analysis of the barriers properties of plant cuticle. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2023-2032.

Ripullone F, Lauteri M, Grassi G, Amato M, Borghetti M. 2004. Variation in nitrogen supply changes water-use efficiency of *Pseudotsuga menziesii* and *Populus* × *euroamericana*; a comparison of three approaches to determine water-use efficiency. *Tree Physiology* **24**, 671-679.

Roupsard O, Joly H, Dreyer E. 1998. Variability of initial growth, water-use efficiency and carbon isotope discrimination in seedlings of *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev., a multipurpose tree of semi-arid Africa. Provenance and drought effect. *Annals of Forest Science* **55**, 329-348.

Rowland D. 2001. Diversity in physiological and morphological characteristics of four cottonwood (*Populus deltoides* var. wislizenii) populations in New Mexico: evidence for a genetic component of variation. *Canadian Journal of Forest Research* **31**, 845-853.

Sandquist DR, Ehleringer, JR. 2003. Carbon isotope discrimination differences within and between contrasting populations of *Encelia farinosa* raised under common-environment conditions. *Oecologia* **134**, 463-470.

Samuel D, Silver B. 1965. Oxygen isotope exchange reactions of organic compounds. *Advances in Physical Organic Chemistry* **3**, 1885-1895.

Schmidt H, Werner R, Rossmann A. 2001. ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry* **58**, 9-32.

Sharkey TD, Raschke K. 1981. Effect of light quality on stomatal opening in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* **68**, 1170-1174.

Silim S, Guy R, Patterson T, Livingston N. 2001. Plasticity in water-use efficiency of *Picea sitchensis*, *P. glauca* and their natural hybrids. *Oecologia* **128**, 317-325.

Sokal R, Rohlf F. 2000. In: *Biometry. 3rd edition*. W.H. Freeman and Company, New York. p. 887.

Sternberg L, DeNiro M. 1983. Bio-geochemical implications of the isotopic equilibrium fractionation factor between oxygen atom of acetone and water. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **47**, 2271-2274.

Sternberg L, DeNiro M, Savidge R. 1986. Oxygen isotope exchange between metabolites and water during biochemical reactions leading to cellulose synthesis. *Plant Physiology* **82**, 423-427.

Sternberg L, Anderson W, Morrisson K. 2003. Separating soil and leaf water ^{18}O isotopic signals in plant stem cellulose. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 2561-2566.

Sullivan P, Welker J. 2007. Variation in leaf physiology of Salix arctica within and across ecosystems in the High Artic: test of dual isotope ($\Delta^{13}C$ and $\Delta^{18}O$) conceptual model. *Oecologia* **151**, 372-386.

Sun Z, Livingston N, Guy R, Ethier G. 1996. Stable carbon istopes as indicators of increased water use efficiency and productivity in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings. *Plant, Cell and Environment* **19**, 887-894.

Tanksley S. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* **27**, 205-233.

Terashima I, Miyazawa S, Hanba Y. 2001. Why are sun leaves thicker thans shade leaves? - Consideration based on analyses of CO_2 diffusion in the leaf. *Journal of Plant Research* **114**, 93-105.

Tognetti R, Michelozzi M, Giovannelli A. 1997. Geographical variation in water relations, hydraulic architecture and terpene composition of Aleppo pine seedlings from Italian provenances. *Tree Physiology* **17**, 241-250.

Torti X. 2005. Variabilité génétique de la réponse du métabolisme carboné du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) à des teneurs croissantes en CO_2. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I. 130 p.

Wang J, Hawkins C, Letchford T. 1998a. Photosynthesis, water and nitrogen use efficiencies of four paper birch (*Betula papyrifera*) populations grown under different soil moisture and nutrient regimes. *Forest Ecology and Management* **112**, 233-244.

Wang X, Yakir D, Avishai M. 1998b. Non-climatic variations in the oxygen isotopic compositions of plants. *Global Change Biology* **4**, 835-849.

Warren C, Adams M. 2006. Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* **29**, 192-201.

West A, Patrickson S, Ehleringer J. 2006. Water extraction times for plant and soil materials used in stable isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**, 1317-1321.

Xu Z, Saffigna P, Farquhar G, Simpson J, Haines R, Walker S, Osborne D, Guinto D. 2000. Carbon isotope discrimination and oxygen isotope composition in clones of the F-1 hybrid between slash pine and Caribbean pine in relation to tree growth, water-use efficiency and foliar nutrient concentration. *Tree Physiology* **20**, 1209-1217.

Xu CY, Lin GH, Griffin KL, Sambrotto RN. 2004. Leaf respiratory CO_2 is ^{13}C-enriched relative to leaf organic components in five species of C-3 plants. *New Phytologist* **163**, 499–505.

Yang W, Murthy R, King P, Topa M. 2002. Diurnal changes in gas exchange and carbon partitioning in needles of fast- and slow-growing families of loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree Physiology* **22**, 489-498.

Yakir D, DeNiro MJ, Ephrath JE. 1990. Effects of water stress on oxygen, hydrogen and carbon isotope ratios in two species of cotton plants. *Plant, Cell and Environment* **13,** 949-955.

Zhang J, Marshall J, Jaquish B. 1993. Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. A common garden experiment. *Oecologia* **93**, 80-87.

Zhang J, Fins L, Marshall J. 1994. Stable carbon isotope discrimination, photosynthetic gas exchange, and growth differences among western larch families. *Tree Physiology* **14**, 531-539.

Zhang J, Marshall J. 1995. Variation in carbon isotope discrimination and photosynthetic gas exchange among populations of *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus ponderosa* in different environments. *Functional Ecology* **9**, 402-412.

Zhang J, Marshall J, Fins L. 1996. Correlated population differences in dry matter accumulation, allocation, and water-use efficiency in three sympatric conifer species. *Forest Science* **42**, 242-249.

Zhang X, Zang R, Li C. 2004. Population differences in physiological and morphological adaptations of Populus davidiana seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Science* **166**, 791-797.

von Caemmerer S. 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Publishing, Australia. 165 p.

Annexe 1: Réponse de la conductance stomatique au VPD chez le chêne pédonculé

Introduction

Les travaux de Brendel *et al.* (2008) ont montré qu'il existait une forte variabilité intraspécifique de réponse de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) au déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (VPD), dans la famille de chêne pédonculé étudiée dans ce manuscrit. Un QTL (Quantitative Trait Loci) de la réponse de g_s au VPD a été trouvé sur le groupe de liaison 9m, indiquant une variabilité génétique pour ce caractère. Ce QTL colocalisait avec un QTL lié à la variabilité d'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque estimée par la discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}C$). Cette observation indiquerait qu'une partie de la variabilité en $\Delta^{13}C$ observée au sein de cette famille pourrait être liée à une variabilité de réponse de g_s au VPD. Cependant, cette étude ayant été faite sur le terrain, il est difficile de dissocier l'impact du VPD d'autres facteurs régulant g_s (sécheresse édaphique, température, lumière…). Il est donc intéressant d'étudier dans cette famille de chêne pédonculé la variabilité intraspécifique de réponse de g_s au VPD, sans que les autres facteurs environnementaux n'interviennent dans la régulation du comportement stomatique (i.e., conditions non-limitantes d'apport en eau, de température…).

La conductance stomatique diminue en réponse à l'augmentation de VPD (Monteith, 1995). Cette fermeture stomatique évite une déshydratation de la feuille provoquée par une demande évaporative trop importante. Il existe plusieurs hypothèses concernant les mécanismes sous-jacents à une telle régulation (cf Franks *et al.*, 1997): (i) effet ″feed-back″ de la transpiration (i.e, conductance stomatique*VPD) sur la conductance stomatique: la transpiration augmente du fait d'une demande évaporative plus forte, ce qui conduit à une chute du potentiel hydrique des cellules de garde entraînant leur plasmolyse et donc la fermeture des stomates; (ii) effet ″feedforward″: les cellules de garde perçoivent directement les variations de VPD (sans que le statut hydrique de la feuille soit affecté) mais les mécanismes à la base d'une telle régulation sont encore inconnus à ce jour.

En principe, la réponse de g_s au VPD suit une relation sigmoïdale. Cette relation présente deux parties: (i) pour de faibles VPD, g_s est stable et maximal (g_{max}), (ii) à partir d'un certain seuil de VPD, g_s diminue jusqu'à atteindre une valeur minimum (proche de 0). Chez le chêne pédonculé, Brendel *et al.* (2008) ont observé une fermeture des stomates à partir d'un VPD de 2 kPa, et une fermeture complète pour un VPD de 5 kPa. Dans la littérature, divers ajustements (pour revue: Oren *et al.*, 1999) sont utilisés pour décrire la deuxième partie de la relation g_s *vs* VPD (i.e., zone de diminution de g_s en réponse à l'augmentation du VPD), et dépendent de la gamme de VPD utilisée. Ils peuvent être logarithmiques (Grossnickle *et al.*, 2005), exponentiels (Grossnickle & Fan, 1998) ou linéaires

(Holscher *et al*., 2006). Compte tenu de cette multitude de relations, il est difficile de se focaliser sur un paramètre commun décrivant la réponse de g_s au VPD. Par exemple, Holscher *et al.* (2006) et Brendel *et al*. (2008) utilisent la pente de la régression linéaire entre g_s et VPD pour décrire, respectivement, une variabilité inter- et intra-spécifique. Cependant, ce paramètre n'est pas applicable pour des relations de types logarithmique et exponentielle. Pour des relations de type logarithmiques, Oren *et al.* (1999) ont utilisé le facteur m (cf encart Figure 1) qui quantifie la sensibilité des stomates au VPD, pour décrire les différences de réponse de g_s au VPD en inter- et intra spécifique. Ce facteur renseigne sur la cinétique de diminution de g_s en réponse au VPD et sa valeur est d'autant plus élevée que la diminution de g_s est forte lorsque le VPD augmente. Oren *et al.* (1999) ont aussi montré que ce facteur est fortement corrélé à la conductance stomatique mesurée pour un faible VPD (g_{max}). Ainsi, un individu/une espèce caractérisé(e) par un g_{max} élevé aura une fermeture stomatique plus importante qu'un individu caractérisé par un g_{max} faible. D'un point de vue expérimental, la détermination de ce facteur nécessite la réalisation d'une cinétique de diminution de g_s pour une gamme de VPD étendue. Nous avons donc cherché dans la littérature d'autres indices de sensibilité des stomates au VPD, présentant une forte variabilité inter- ou intra-spécifique, mais plus faciles à déterminer. Franks & Farquhar (1999) ont ainsi proposé le facteur ϕ qui correspond au rapport de la conductance stomatique observée pour un VPD de 2kPa (g_2) sur la conductance stomatique observée pour un VPD de 1kPa (g_1). ϕ varie entre 0 (lorsque les stomates se ferment complètement en réponse à l'augmentation de VPD: g_2=0), et 1 (si aucun changement de conductance stomatique n'est observé entre 1 et 2 kPa: g_1=g_2).

Les trois objectifs de ce travail sur la réponse de g_s au VPD chez le chêne pédonculé étaient les suivants:

- *(i)* confirmer l'existence d'une variabilité entre génotypes de réponse de g_s au VPD
- *(ii)* analyser la variabilité entre génotypes des indices de réponse de g_s au VPD issus de la littérature
- *(iii)* relier la variabilité entre génotypes de ces indices et de g_s/W_i

Matériel & Méthodes

Matériel végétal et conditions de culture

Sept boutures (*Quercus robur* L.) issues de la famille F1 de plein-frère de chêne pédonculé étudiée dans ce manuscrit ont été utilisées, chacun de ces plants représentant un génotype distinct (118, 136, 173, 178, 186, 214, 348). Les boutures ont été produites par l'UMR BioGeCo (INRA Pierroton, Bordeaux) puis transportées à l'INRA de Nancy où elles ont été transférées dans des pots de 10L

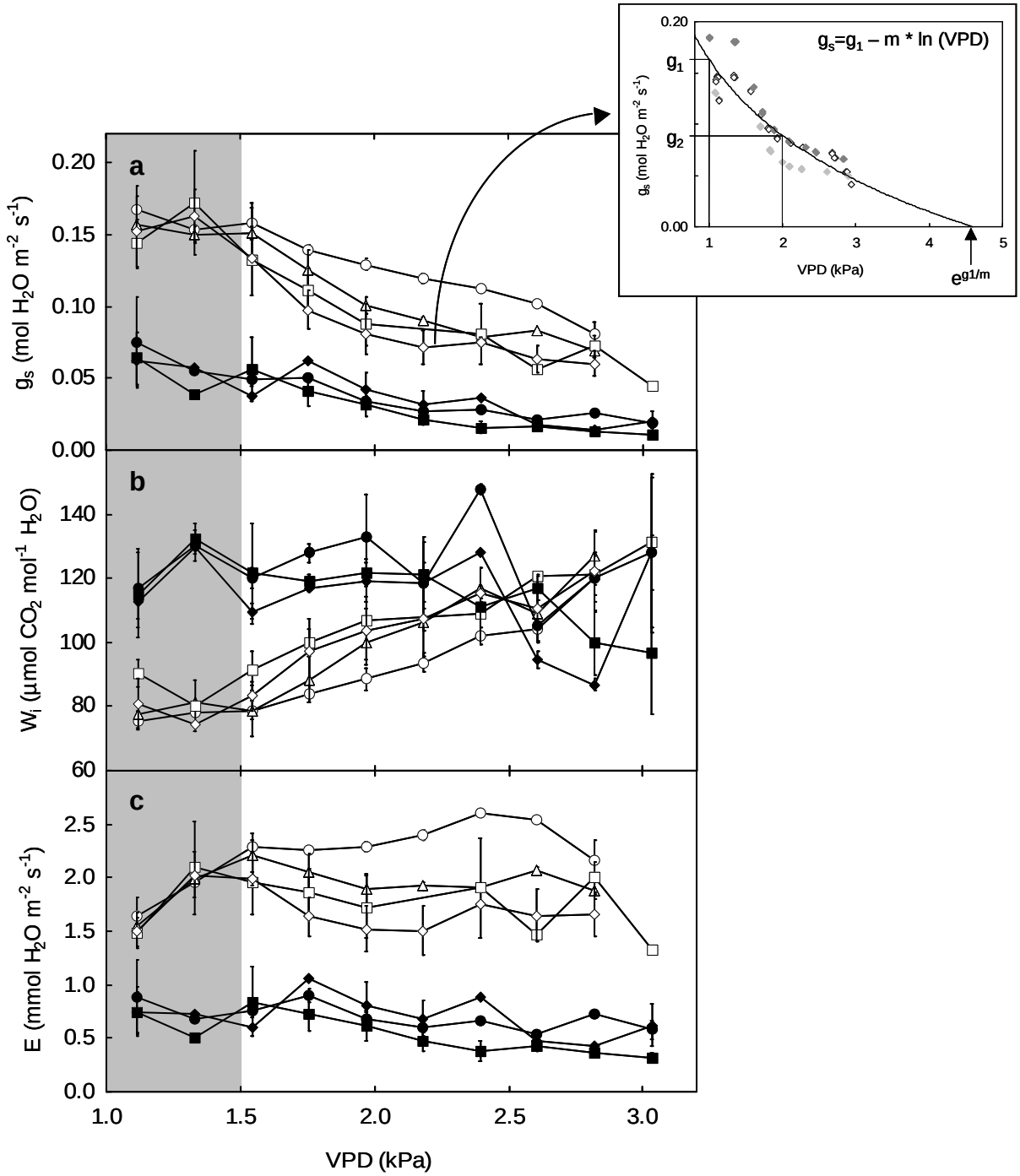


Figure 1: Evolution de: (a) la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), (b) l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i), et (c) la transpiration (E) en fonction du déficit de pression de vapeur d'eau (VPD) pour sept génotypes de chêne pédonculé (■, génotype 178; ●, génotype 186; ◆, génotype 214; ○, génotype 118; △, génotype 136; □, génotype 173; ◇, génotype 348). Les symboles pleins et vides sont associés aux génotypes des groupes 1 (g_s faible pour des VPD<1.5kPa) et 2 (g_s fort pour des VPD<1.5kPa), respectivement. Chaque point représente la moyenne (± l'écart-type) déterminée sur l'ensemble des feuilles d'un même génotype. La zone grisée (VPD inférieur à 1.5 kPa) représente la partie pour laquelle les valeurs de g_s sont maximales et stables (g_{max}).
L'encart représente l'ajustement logarithmique déterminé entre g_s et VPD pour le génotype 348. Chaque symbole correspond aux mesures effectuées sur une feuille de ce génotype. g_1 : g_s pour un VPD de 1 kPa ; g_2 : g_s pour un VPD de 2 kPa; m : facteur de sensibilité des stomates au VPD selon Oren *et al.* (1999); $e^{g1/m}$: valeur de VPD pour laquelle la conductance stomatique est nulle

contenant un mélange tourbe/sable (1/1, v/v). Les chênes ont été fertilisés avec de l'engrais à libération lente (Nutricote T 100 13-13-13, NPK) et avec du calcaire magnésien (amendement calcique) à raison de 4,5 g L^{-1} et 0,2 g L^{-1} respectivement. Les plants ont été cultivés en serre (conditions contrôlées de température, arrosage à capacité au champ, photopériode naturelle, concentration ambiante de CO_2).

Réponse de la conductance stomatique au déficit de pression de vapeur d'eau (VPD)

Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'un système ouvert de mesures d'échanges gazeux LiCor 6400 (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE). Les conditions de température, de flux de photon dans le PAR (Photosynthetic Active Radiation) et de flux d'air dans la chambre de mesure ont été fixées à 25°C, 1200 µmol m^{-2} s^{-1} et 300 µmol s^{-1} respectivement. Les mesures ont été effectuées pour une fraction molaire de CO_2 ambiante: 378±12µmol m^{-2} s^{-1} (moyenne ± écart-type). Pour chaque feuille, avant chaque début de mesure, une période d'activation de la photosynthèse était nécessaire. Cette période (de 40 mn environ) était variable entre génotypes mais aussi entre feuilles d'un même génotype.

Les courbes de réponse de la conductance stomatique au VPD ont été effectuées sur 3 à 4 feuilles de lumière par génotype, matures au moment de la mesure. Pour établir une courbe de réponse de la conductance stomatique au VPD, la vapeur d'eau a été progressivement piégée grâce à de la driérite de façon à avoir 6 à 10 paliers de VPD par feuille entre 1kPa et 3.0 kPa de VPD environ (maximum atteint avec cet appareil). A chaque palier, 3 mesures consécutives d'assimilation nette de CO_2 (A), de conductance stomatique (g_s), de transpiration (E) ont été effectuées. Le rapport A/g_s nous a ensuite permis de calculer l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i).
Les courbes de réponse de g_s au VPD étaient de type logarithmique (encart Figure 1) et ont permis de calculer les facteurs ϕ (rapport des conductances stomatiques observées pour des VPD de 2 et 1 kPa; Franks & Farquhar, 1999) et m (Oren *et al.*, 1999).

Pour chaque feuille de chaque génotype, les courbes de réponse de g_s au VPD ont été standardisées afin de s'affranchir des conductances stomatiques maximum (g_{max}) et minimum (g_{min}). g_{max} et g_{min} représentent les deux conductances stomatiques extrêmes pour la gamme de VPD utilisée. Ceci nous a permis de déterminer, pour chaque palier de VPD, la diminution relative de conductance stomatique (g_{rel}) correspondante:

$$g_{rel} = \frac{g - g_{min}}{g_{max} - g_{min}}$$

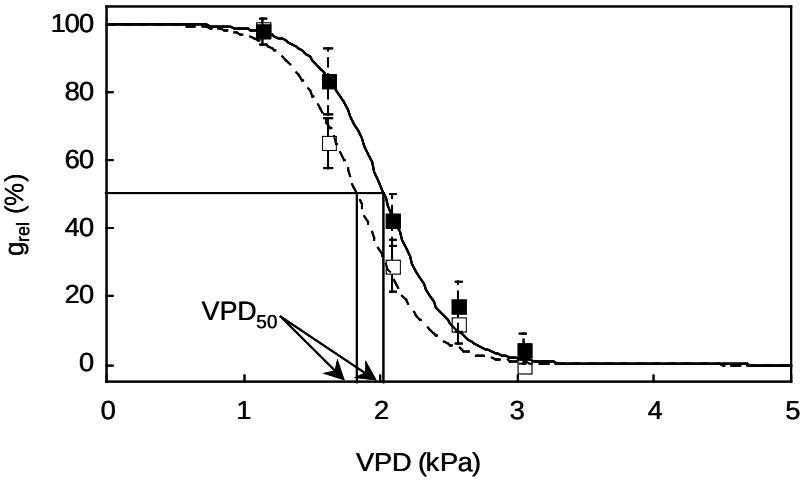


Figure 2: Relation entre la diminution relative de conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_{rel}) et le déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (VPD) pour les deux groupes de génotypes (■: groupe 1 (génotypes caractérisés par un g_{max} faible, cf Figure 1); □: groupe 2 (génotypes caractérisés par un g_{max} fort, cf Figure 1)). Chaque point représente la moyenne (± l'écart-type) des valeurs de g_{rel} pour chaque groupe en fonction du VPD. Pour le groupe 1 (—), l'ajustement sigmoïdal a pour équation: g_{rel}=100-[100/(1+exp(-4.1*VPD+8.3))], R^2=0.88; pour le groupe 2 (- -), l'ajustement sigmoïdal a pour équation : g_{rel}=100-[100/(1+exp(-4.1*VPD+7.5))], R^2=0.89.

où g est la valeur de conductance stomatique au palier de VPD considéré.

Les courbes obtenues sont des sigmoïdes (Figure 2), variant entre 100 ($g=g_{max}$) et 0% ($g=g_{min}$), dont l'équation est la suivante:

$$g_{rel}=100-\frac{100}{1+\exp^{(-a*VPD+b)}}$$

où a et b sont les paramètres de l'équation à déterminer.

A partir des équations de chaque courbe (et donc chaque feuille de chaque génotype), le VPD pour lequel g_{rel} = 50% (et donc le VPD pour lequel la conductance stomatique a diminué de 50%) a été calculé:

$VPD_{50}=b/a$.

Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA Version 7.1 (StatSoft, Inc. 2005).

L'effet génotype a été testé à l'aide d'une ANOVA. Un test de Levene d'homogénéité des variances a permis de compléter cette analyse. Les différences entre traitements ont ensuite été testées en utilisant le test HSD de Tukey.

Les corrélations et les régressions ont été effectuées sur les moyennes par génotype. Les régressions entre les traits ont été déterminées sur la base des moyennes géométriques (ou régression de type II) (Sokal & Rohlf, 2000).

Les ajustements sigmoïdaux ont été réalisés à l'aide de l'option "Estimation non-linéaire" du module "Modèles linéaires/non-linéaires avancés".

Toutes les analyses ont été considérées significatives pour $p<0.05$.

Résultats & Discussion

Evolution des échanges gazeux en réponse au VPD

Quel que soit le génotype, la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s) diminuait en réponse à l'augmentation de déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (VPD) (Figure 1a). De tels comportements de g_s ont été décrits chez le chêne pédonculé (Morecroft & Roberts, 1999), et d'autres espèces de chênes (Mediavilla & Escudero, 2003). Dans notre étude, la diminution de g_s se faisait en deux phases, plus ou moins prononcées selon les génotypes (Figure 1a). Pour VPD<1.5 kPa, g_s restait constant. A partir de ce seuil, g_s diminuait selon un ajustement de type logarithmique.

Génotype		n	Trait					
			g_{max}	$W_{1.5}$	m	$e^{g1/m}$	ϕ	VPD_{50}
Groupe 1	178	4	0.06±0.02 [a]	120±16 [a]	0.06±0.02 [ab]	3.6±0.5 [a]	0.45±0.05 [a]	2.0±0.2
	186	3	0.05±0.00 [a]	129±4 [a]	0.04±0.00 [ab]	4.8±0.2 [a]	0.56±0.01 [ab]	2.0±0.0
	214	3	0.06±0.02 [a]	119±10 [a]	0.05±0.01 [ab]	4.8±0.9 [a]	0.55±0.05 [ab]	2.0±0.3
Groupe 2	118	3	0.17±0.02 [b]	75±3 [b]	0.09±0.01 [bc]	8.5±1.8 [b]	0.67±0.03 [c]	1.7
	136	3	0.18±0.04 [b]	71±11 [b]	0.12±0.03 [c]	5.2±0.9 [a]	0.58±0.05 [bc]	1.8±0.0
	173	3	0.15±0.02 [b]	89±6 [b]	0.09±0.02 [bc]	5.9±1.5 [ab]	0.60±0.06 [bc]	1.9±0.1
	348	3	0.15±0.03 [b]	80±10 [b]	0.11±0.02 [bc]	4.7±0.5 [a]	0.55±0.03 [ab]	1.7±0.0
Effet génotype			p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	ns

Tableau 1: Moyennes (±écart-type) pour chaque génotype des traits mesurés ou estimés: conductance stomatique pour la vapeur d'eau et efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque définie pour un VPD inférieur à 1.5kPa (respectivement g_{max} et $W_{1.5}$), indices de sensibilité aux stomates (m et ϕ) et valeur de VPD pour laquelle la conductance stomatique est nulle ($e^{g1/m}$) calculés à partir d'ajustements logarithmiques, et valeur de VPD pour 50% de fermeture stomatique (VPD_{50}) déterminée à partir des courbes standardisées de réponse de g_s au VPD. L'effet "génotype" a été testé à l'aide d'une ANOVA et l'homogénéité des variances a été vérifiée par un test de Levene. Pour un trait donné, deux lettres différentes indiquent une différence statistique significative ($p<0.05$; test HSD de Tukey, n différent).

D'après la figure 1a, deux groupes d'individus à comportement similaire ont pu être mis en évidence. Le premier groupe (génotypes 178, 186 et 214) présentaient des conductances stomatiques (g_{max} définie pour VPD<1.5kPa), significativement plus faibles pour de faibles VPD mais aussi sur l'ensemble de la gamme de VPD utilisée, par rapport aux génotypes constituant le deuxième groupe (118, 136, 173 et 348) (Tableau 1). La diminution de g_s en réponse au VPD était plus forte pour les génotypes du groupe 2 que pour ceux du premier groupe (courbes non parallèles, Figure 1a). Il semblerait donc qu'il existe une variabilité de réponse des stomates au VPD pour les sept génotypes de cette étude, comme l'ont montré les travaux de Brendel *et al.* (2008) sur cette même famille de chêne pédonculé. Une telle variabilité a aussi été mise en évidence sur d'autres ligneux: *Thuja plicata* Donn (Grossnickle *et al.*, 2005), *Picea glauca* x *P. engelmannii* (Grossnickle & Fan, 1998).

L'évolution de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i, rapport de A sur g_s) en réponse à l'augmentation de VPD était variable selon les génotypes (Figure 1b): pour les génotypes du groupe 1 (faible g_{max}), W_i restait constante sur toute la gamme de VPD, alors que pour les génotypes du groupe 2 (fort g_{max}), W_i augmentait en réponse à l'augmentation de VPD. Pour de faibles VPD (VPD<1.5kPa), W_i (alors notée $W_{1.5}$) était significativement plus faible pour les génotypes du groupe 2 (Tableau 1). Pour de forts VPD (VPD>2.5kPa), cette tendance s'inversait et W_i était plus élevé pour les génotypes du groupe 2 (Figure 1b). Cette observation implique donc une diminution de g_s en réponse au VPD proportionnellement plus importante pour les génotypes du groupe 2.

La transpiration (E) restait stable en réponse à l'augmentation de VPD, quel que soit le groupe (Figure 1c). Ces résultats confirment donc les assertions de Franks & Farquhar (1999) selon lesquelles pour les arbres des forêts tempérées la réduction de g_s en réponse au VPD est telle que la transpiration est maintenue constante (régulation par « feed-back » de la transpiration (Franks *et al.*, 1997)).

Indices de sensibilité des stomates au VPD

A partir de 1.5 kPa, la diminution de g_s au VPD suivait une relation de type logarithmique (encart Figure 1). A partir de ces ajustements, différents paramètres ont été déterminés (encart Figure 1): l'indice ϕ (rapport des conductances stomatiques observées pour des VPD de 2 et 1 kPa; Franks & Farquhar, 1999), le facteur m qui décrit la cinétique de diminution de g_s en réponse à l'augmentation du VPD (Oren *et al.*, 1999), ainsi que la valeur de VPD pour laquelle la conductance stomatique est nulle ($e^{g1/m;}$ Oren *et al.*, 1999)).

Dans notre étude, ϕ était compris entre 0.45 et 0.67 (Tableau 1). Ces valeurs sont en accord avec les travaux de Franks & Farquhar (1999) qui ont montré que, pour les arbres des forêts tempérées, cet

indice était proche de 0.5, caractérisant ainsi des espèces sensibles au VPD. Nous avons trouvé des différences significatives entre génotypes pour cet indice (Tableau 1). Cependant, ces différences ne sont pas fonction du groupe de génotype défini sur la base des valeurs de g_{max}.

Cet indice signifie donc que pour un VPD de 2kPa, la conductance stomatique est diminuée de 50% environ par rapport à g_{max}. Cependant, le calcul de cet indice dépend fortement de la valeur seuil de VPD pour laquelle g_s commence à diminuer. Ce seuil peut être variable en fonction des études. Ainsi, dans cette étude, nous avons défini un seuil de 1.5kPa, alors que Brendel *et al.* (2008) notent ce seuil à 2 kPa pour la même famille de chêne pédonculé. Ainsi, le calcul de ϕ, dans le cadre de l'étude de Brendel *et al.* (2008) n'aurait renseigné en aucune façon sur la sensibilité des stomates au VPD, puisque la conductance stomatique était maintenue constante jusqu'à 2kPa (d'où ϕ=1). De ce fait, ϕ ne paraît pas être un indice adéquat pour l'analyse de la variabilité intra-spécifique de la sensibilité des stomates au VPD et a donc été éliminé pour la suite de cette étude.

Les valeurs du facteur m étaient comprises entre 0.04 et 0.12 mol m^{-2} s^{-1} ln $(kPa)^{-1}$ (Tableau 1). Selon Oren *et al.* (1999), pour différentes espèces du genre *Quercus*, m est compris entre 0.01 et 0.11 mol m^{-2} s^{-1} Ln $(kPa)^{-1}$. Cette gamme, obtenue en inter-spécifique est donc similaire à la gamme de valeurs que nous avons obtenues en intra-spécifique pour plusieurs génotypes de chêne pédonculé. Des différences significatives entre génotypes pour ce facteur ont pu être mises en évidence (Tableau 1).

Enfin, la valeur de VPD pour laquelle g_s est nulle ($e^{g1/m}$) était comprise entre 3.6 et 8.5 kPa. La plupart des génotypes de cette étude présentait une valeur de $e^{g1/m}$ proche de 5kPa (Tableau 1), ce qui correspond à la valeur trouvée par Brendel *et al.* (2008) sur cette même famille de chêne pédonculé, mais aussi à la gamme observée par Oren *et al.* (1999) pour différentes espèces du genre *Quercus* (entre 3 et 6kPa). Excepté le génotype 118 pour lequel $e^{g1/m}$ est très élevé, aucune différence entre génotypes de ce trait n'a été mise en évidence (Tableau 1). Cependant, ces valeurs $e^{g1/m}$ sont approximatives, puisque nous n'avons pas de données au-delà de 3kPa pour les confirmer. Il semblerait d'ailleurs que l'ajustement logarithmique ne soit pas toujours adapté à nos données. Cette observation prévaut principalement pour les génotypes du groupe 2 (fort g_{max}) pour lesquels g_s atteint un plateau pour des VPD>2kPa. Au-delà de ce VPD, nous avons donc défini une conductance stomatique minimale (g_{min}). Les courbes de réponse de g_s au VPD ont ensuite été standardisées entre 0 et 100% (Figure 2) pour s'affranchir des différences de g_{max}, mais aussi de conductance stomatique minimum (pour un VPD>2kPa) entre génotypes. A partir de ces courbes, nous avons calculé la valeur de VPD correspondant à une fermeture stomatique de 50% (VPD_{50}). La valeur moyenne de VPD_{50}, tous génotypes confondus, est de 1.9±0.2kPa et aucune différence entre génotypes n'a été détectée (Tableau 1).

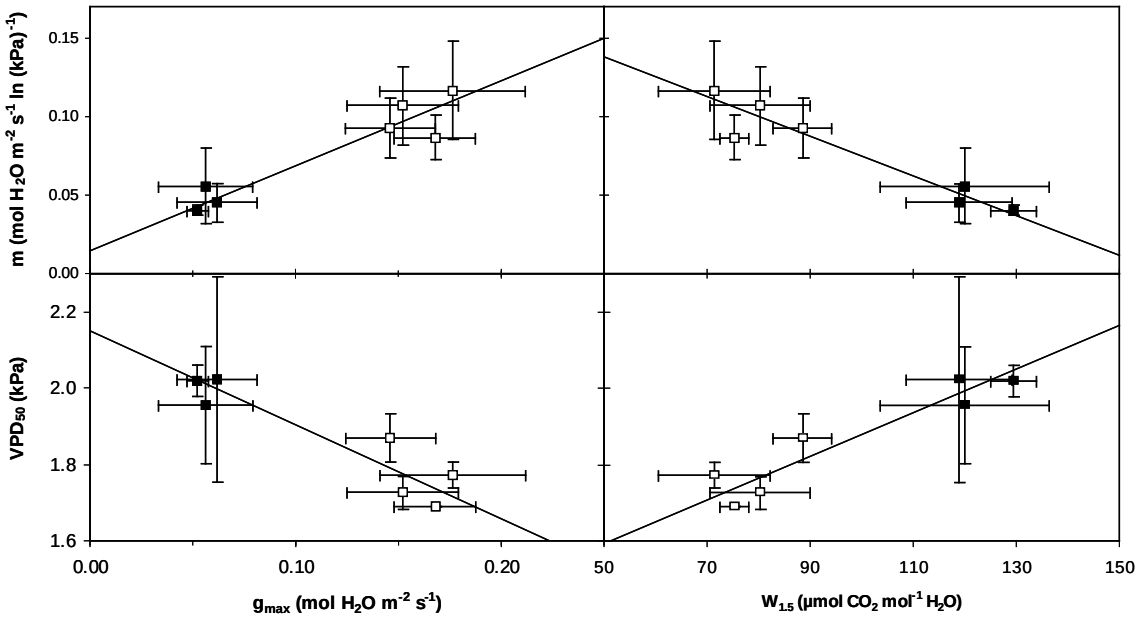


Figure 3: Relations entre la conductance stomatique pour la vapeur d'eau maximale (g_{max}) ou l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque ($W_{1.5}$) observée pour des valeurs de VPD inférieures à 1.5 kPa, l'indice de sensibilité des stomates au VPD (m), et le facteur VPD_{50} (valeur de VPD pour 50% de fermeture stomatique) déterminé après standardisation des courbes de réponse de g_s au VPD. Chaque point représente la moyenne (± écart-type) pour chaque génotype (■: génotypes du groupe 1; □: génotypes du groupe 2). Les équations des ajustements linéaires sont les suivantes : $m=0.54*g_{max}+0.01$ ($R^2=0.89$; $p<0.001$); $m=-0.001*W_{1.5}+0.20$ ($R^2=0.90$; $p<0.001$); $VPD_{50}=-2.46*g_{max}+2.15$ ($R^2=0.85$; $p<0.01$); $VPD_{50}=0.006*W_{1.5}+1.31$ ($R^2=0.88$; $p<0.01$).

Corrélations entre ces indices et g_s/W_i

Conformément à ce que nous avons montré tout au long de ce manuscrit, dans cette étude la variabilité entre génotypes de $W_{1.5}$ (calculée pour un VPD inférieur à 1.5 kPa) était négativement corrélée (R^2=0.98; p<0.001) à la variabilité entre génotypes de g_{max} (mesurée pour un VPD inférieur à 1.5 kPa). Nous avons ensuite établi des corrélations entre $W_{1.5}$ et g_{max} et les indices m et VPD_{50} afin de voir si la variabilité entre génotypes de $g_{max}/W_{1.5}$ pouvait être liée à une variabilité entre génotypes de ces facteurs.

Pour ces sept génotypes de chêne pédonculé, une corrélation positive (R^2=0.89, p=0.001) entre g_{max} et l'indice m a pu être observée. La relation établie en intra- et inter-spécifique par Oren *et al.* (1999) ($m = 0.6*g_s$) se vérifie aussi dans cette étude ($m=0.54*g_{max}+0.01$). Compte tenu de la corrélation existant entre g_{max} et $W_{1.5}$, le facteur m est négativement corrélé à $W_{1.5}$ (R^2=0.90, p<0.001). En d'autres termes, un génotype caractérisé par un g_{max} élevé (et donc $W_{1.5}$ faible) présentera une diminution de g_s plus marquée en réponse à l'augmentation du VPD qu'un génotype caractérisé par un g_{max} faible (et donc $W_{1.5}$ fort). Cette association (faible g_s/faible m/fort W_i) a aussi été observé pour des populations de *Thuja plicata* (Grossnickle *et al.*, 2005).

Malgré l'absence de différences entre génotypes pour le facteur VPD_{50}, une corrélation négative a été observée entre ce facteur et g_{max} (R^2=0.85; p<0.01), alors qu'une corrélation positive a été mise en évidence entre VPD_{50} et $W_{1.5}$ (R^2=0.88; p<0.01) (Figure 3). Ainsi, les génotypes du groupe 2 (g_{max} fort) avaient une fermeture stomatique plus rapide que les génotypes du groupe 1 (Figure 2). Ce facteur permet donc d'appuyer les résultats trouvés pour l'indice m: il existe une variabilité entre ces génotypes de chêne pédonculé de réponse des stomates au VPD qui se traduit de la façon suivante: la sensibilité des stomates au VPD sera plus importante (m élevé, VPD_{50} plus faible) pour un génotype caractérisé par un g_{max} élevé (et donc un faible $W_{1.5}$).

Conclusions

Ce travail, bien que ne comptant que sept génotypes de chêne pédonculé, montrent que des différences de réponse des stomates au VPD peuvent aussi être détectées au sein de cette famille. Les génotypes présentant une conductance stomatique plus élevée pour un VPD faible (inférieur à 1.5 kPa) ont une fermeture stomatique plus importante en réponse à l'augmentation de VPD. Cette observation se base sur l'utilisation de deux facteurs: l'indice m caractérisant la cinétique de diminution de g_s en réponse au VPD, et le seuil de VPD induisant 50% de fermeture stomatique (VPD_{50}).

Pour mieux appréhender la variabilité de réponse de g_s au VPD, il serait intéressant de faire une expérimentation en conditions totalement contrôlées, où différents traitements de VPD seraient appliqués en étendant la gamme de VPD de 0 à 5kPa. Ainsi, plutôt que de faire varier rapidement les conditions de VPD sur 6 cm² de feuille, l'ensemble du plant serait alors exposé à des conditions constantes entre traitrements. Ce type d'expérimentation permettrait aussi de vérifier les ajustements utilisés.

Références

Brendel O, Le Thiec D, Saintagne C, Kremer A, Guehl J. 2008. Detection of quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 263-278.

Franks P, Cowan I, Farquhar G. 1997. The apparent feedforward response of stomata to air vapour pressure deficit: Information revealed by different experimental procedures with two rainforest trees. *Plant, Cell and Environment* **20**, 142-145.

Franks P, Farquhar G. 1999. A relationship between humidity response, growth form and photosynthetic operating point in C-3 plants. *Plant, Cell and Environment* **22**, 1337-1349.

Grossnickle S, Fan S. 1998. Genetic variation in summer gas exchange patterns of interior spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss x *Picea engelmannii* Parry ex Engelm.). *Canadian Journal of Forest Research* **28**, 831-840.

Grossnickle S, Fan S, Russell J. 2005. Variation in gas exchange and water use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees – Structure and Function* **19**, 32-42.

Holscher D, Leuschner C, Bohman K, Hagemeier M, Juhrbandt J, Tjitrosemito S. 2006. Leaf gas exchange of trees in old-growth and young secondary forest stands in Sulawesi, Indonesia. *Trees – Structure and Function* **20**, 278-285.

Mediavilla S, Escudero A. 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiology* **23**, 987-996.

Monteith J. 1995. A reinterpretation if stomatal responses to humidity. *Plant, Cell and Environment* **18**, 357-364.

Morecroft M, Roberts J. 1999. Photosynthesis and stomatal conductance of mature canopy oak (*Quercus robur*) and sycamore (*Acer pseudoplatanus*) trees throughout the growing season. *Functional Ecology* **13**, 332-342.

Oren R, Sperry J, Katul G, Pataki D, Ewers B, Phillips N, Schäfer K. 1999. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant, Cell and Environment* **22**, 1515-1526.

Sokal R, Rohlf F. 2000. In: *Biometry. 3rd edition*. W.H. Freeman and Company, New York. p. 887.

Annexe 2: Water status and stomatal closure responses of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) rooted cuttings to water stress

Roussel M, Lederle M, Bogeat-Triboulot MB, Dreyer E, Guehl JM and Brendel O

Abstract

Several experiments study the intraspecific variability of plants under stress in forecast of global change. To study drought, the level of water stress has to be strong enough to observe stomata closure but not too strong otherwise stomata close completely. In order to observe intraspecific variability within a pedunculate oak family under water stress, we have done the present study to define the level of water constraint to apply in order to observe 50% of stomatal closure. One-year old rooted cuttings of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) were grown in pots in greenhouse and with non-limitant fertilisation conditions. Half of the trees constituted the well-watered group and were watered daily to field capacity whereas the others belonging to the stressed group were submitted to an imposed drought by withholding watering during 24 days. The decrease of water content in the soil was measured thanks to two approaches: (i) a retrospective study of the soil relative extractable water (REW) and (ii) the volumetric humidity (VH) measured regularly during the experimental period. A daily follow-up of the transpiration of the entire plant and measurement of stomatal conductance showed that these parameters are affected since high value of REW or VH and have been found to decrease with water stress in a logarithmic fashion. A 50% relative decrease of stomatal conductance or daily total plant transpiration for stressed plants compared to control treatment was found for a VH of 13.1% and 14.4% respectively and a REW of 37.6% and 41.8% respectively. Predawn leaf water potentials and relative water content were found to be poor estimates of the water stress detected by the plants since they maintain high values until severe drought (VH of 7.6% and REW of 20.8%). An analysis of the osmotic potential at full turgor on one day for which stress was moderate showed that it was significantly lower in stressed trees, and we found an osmotic adjustment of 0.2 MPa. This osmotic adjustment may be one reason to explain the maintaining of the leaf water status. Thus pedunculate oak rooted cuttings showed an early closure of stomata in response of low water stress while the water status of the plant is little altered until large level of stress.

Keywords: drought, pedunculate oak, relative stomatal closure, water status.

Abbreviations: g_s: stomatal conductance for water vapor (mol H_2O m^{-2} s^{-1}); REW: soil relative extractable water (%); RWC: foliar relative water content; T: daily total plant transpiration (g H_2O); VH: soil volumetric humidity (%); Ψ_π: leaf osmotic potential at full turgor (MPa); Ψ_p: predawn leaf water potential (MPa).

Introduction

With the expected increase of drought events in response to climate global changes (Salinger, 2005), studies have focused on the understanding of the intraspecific variability observed among forest trees and more precisely on the faculty of the different genotypes within a same species to modify their behaviour face to different stress (Aspelmeier & Leuschner, 2004). To study drought acclimation using potted seedlings, the level of stress needs to be defined and verified. The main objective of the present work was to relate the level of drought stress to stomatal closure. The produced data could be used in further studies to precisely define the level of drought stress needed to cause a definite level of stomatal closure.

Several experimental procedures to produce and qualify a drought stress for potted seedlings are found in the literature. For some studies, water supply is completely withheld during the experiment (Picon *et al.*, 1996), whereas others maintain one defined level of water deficit (Aspelmeier & Leuschner, 2004) or fix several drought levels (Xiongwen, 2002; Zhang *et al.*, 2005) and watered in consequence. In studies where one or more levels have been fixed, the applied level of drought is fairly diverse as well as the experimental procedure. For example Picon *et al.* (1996) watered their stressed pedunculate oak in order to provide 40% of the average amount of water used by the well-watered plants. Gulías *et al.* (2002) used two levels of water stress (moderate and severe) which are based on the soil water deficits causing 50% and 75% respectively of decrease in maximum stomatal conductance. The two parameters mainly used to verify the soil water deficit are the relative extractable soil water content (REW) and the volumetric humidity (VH). The first one is a destructible method often used in field to follow a water stress, whereas the latter is a non destructible method widely used in pots or field experiments (Thomas & Gausling, 2000; Gieger & Thomas, 2005). For example, Aspelmeier & Leuschner (2004) fixed their water stress to 50% VH of the water content at field capacity for an experiment on *Betula pendula*.

In experiments where levels of drought are fixed, this level is difficult to define since (i) the drought level has not to be too strong to avoid a complete closure of stomata and hence reduce intra-experiment (species, family etc) variability and (ii) if the stress is not strong enough, then no or little water deficit related stomatal closure will be observed. Indeed it appears from studies that have correlated plant gas exchange and particularly transpiration with the soil relative extractable water (REW) that there are two sections in the relationship (Irvine *et al.*, 1998; Sinclair *et al.*, 2005). The first part showed that transpiration is independent of the decrease of REW up to a threshold from which it decreased very swiftly. According to Bréda *et al.* (1995), and for trees, independently of species or forest soil type, a REW value of 40% is often cited as a threshold below which transpiration decreased. Study of Sinclair *et al.* (2005) showed that this threshold is included between 26% and 37% among woody species cultivated in pots. However stomatal conductance might be too reduced at low

level of stress (Bréda *et al.*, 1993) and decrease in a linear or logarithmic fashions with the decrease in soil water content as shown by Xu *et al.* (2006) for three grass species.

In the present work we have investigated the responses of pedunculate oak rooted cuttings in response to soil drying while withholding water supply in order to have a dynamic follow-up of the drought effect. The first objective of this study, in perspective of further works, was to define a level of water stress to apply in order to provide 50% of stomatal closure measured either by stomatal conductance or transpiration quantifying by weighting. Another goal of this study was to assess the time-course of different parameters generally used to verify the water deficit. At the soil level REW and VH were used to follow the soil drying, whereas at the leaf level the parameters the most often used to describe the water status of a plant are the leaf relative water content (RWC), the leaf osmotic potential at full turgor (Ψ_π) or the predawn leaf water potential (Ψ_p) which is expected to be in equilibrium with the "wettest" soil water potential assessed by roots (Aussenac *et al.*, 1984). The more negative is Ψ_p, the more water-stressed are the trees. The comparison of the time courses of these parameters will give some indication of their suitability to follow the water deficit in drought experiments with potted trees.

Material & Methods

Plant material and growth conditions

24 one-year old rooted cuttings of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) were provided by INRA Pierroton and then transferred to a greenhouse near Nancy (north eastern France) in December 2005. Later they were transplanted to 10 L containers with a peat and sand mixture (1/1, v/v). A complete fertilization (4.5 g L^{-1} of delayed-release Nutricote T100; N,P,K; 13,13,13 + trace elements and 0.2 g L^{-1} of of lime was given to provide non limiting nutrition conditions over all the experimental period.

Cuttings were randomly distributed on a table in a greenhouse. Soil surface of each pot was covered with transparent plastic canvas to prevent evaporation from soil.

Twelve of the 24 rooted cuttings were grouped to constitute the control treatment and watered daily to field capacity. The twelve others rooted cuttings set up the stress treatment. This experiment began on July 12th (day 0) and ended on August 11th (day 30). From day 0 to day 6 all the trees were watered daily at field capacity. For one week before day 0, trees were watered in the evening until water percolated. The next morning, trees were weighted and weight of pots were ajusted with wet soil to make weight at field capacity homogeneous between the overall trees. From day 6 until the end of experiment (day 30), water supply was withheld for the stressed trees.

Soil water content

Water stress was followed with two techniques. Determination of water content in soil may be either non destructible with a TDR (Time Domain Reflectometry, Trase TDR-systems, Soilmoisture Equipment Corp.) at 15cm depth three to five times per week (VH, %) or destructible thanks to determination of the soil relative extractable water (REW, %). REW was determined retrospectively using equation:

REW=daily extractable water/soil extractable water at field capacity.

Daily extractable water was calculated as the difference between pot weight at day *i* and pot weight at the wilting permanent point (see below for the determination of the wilting point).

Soil extractable water at field capacity was calculated as the difference between pot weight at field capacity (determined from the six first days of the experiment) and pot weight at the wilting permanent point.

REW and VH were strongly correlated (REW= 3.1*VH-2.6; $r=0.96$, $p<0.001$, $n=258$).

Plant water relations

Daily transpiration for each plant was obtained through daily weighting at about 16:00 (TU). Daily total plant transpiration (T, g) was then calculated by subtracting pot weight on two consecutive days.

For twelve days during the experiment stomatal conductance (g_s, µmol m^{-2} s^{-1}) was measured on two fully expanded leaves per tree using a porometer (Li-Cor 1600, USA.). Three to five points per days were made between 7:30 and 13:30 TU. In further analyses the average of these three to five points per day and per individuals were used.

Predawn water potential (Ψ_p, MPa) was measured for four days (1, 9, 15 and 23) with a Scholander pressure chamber (Scholander *et al.*, 1965) on small mature twigs. For each date three to four rooted cuttings were used for the control treatment while four to eleven trees for the stress treatment. We could not use all of the plants for each date because our plants were small and we could not harvest too many leaves.

The analysis of relative water content (RWC) and osmotic potential (Ψ_π, MPa) was performed one time during the experiment in order to have the largest range of responses: from well-watered to highly stressed. As the time-course of VH showed that the stressed trees began to have a significantly lower water content since day 7, we have chosen day 21 to have a substantial stress enough for stressed trees. On the morning of day 21, two leaves of each plant were harvested and immediately weighted (fresh weight, FW). Then the petioles were submerged in deionised water and kept at 4°C in

darkness for 24h for full rehydratation. Surface water was then rapidly removed from the leaves and the petiole and weighted to have turgid weight (TW). Leaves were then oven-dried at 50°C for 48h and weighted (dry weight, DW).

RWC (%) = (FW - DW)/(TW - DW) 100

On the morning of day 21, two other leaves were harvested to determine the osmotic potential (Ψ_{π}), and then immediately weighted. One of these two leaves was placed in a 1 mL syringe, freezed in liquid nitrogen and then stored at –20°C for further analyses of osmotic potential at actual turgor ($\Psi_{\pi a'}$). The second one was fully rehydrated as described previously for RWC, weighted, and placed in 1 mL syringe for osmotic potential at full turgor ($\Psi_{\pi f}$). After measurement of osmotic potential using a Wescor 5500 vapor pressure osmometer (Wescor, Inc., Logan, Ut), leaves were dried at 50°C for 48h and weighted. From the leaf used for $\Psi_{\pi f}$ we can assess another measurement of RWC' and calculated osmotic potential ($\Psi_{\pi a''}$) as described in Nguyen-Queyrens *et al.* (2002):

$\Psi_{\pi a''} = (\Psi_{\pi f} *100)/RWC'$

As osmotic potential at actual turgor ($\Psi_{\pi a'}$) and osmotic potential derived from full turgor ($\Psi_{\pi a''}$) are not significantly different (test-t for dependent samples with p=0.08) and significantly positively correlated (r=0.89, p<0.001), we have only used $\Psi_{\pi a''}$ thereafter called Ψ_{π}. Osmotic adjustment was defined as the difference between the average Ψ_{π} for stressed and well-watered trees.

Wilting point determination and supplementary data

After this experiment, stressed trees were conserved for further analyses especially measurement of wilting point, because at the end of the experiment trees were not yet at this point. Plastic canvases were removed to accelerate the decrease of soil water content. During this period before wilting point additional measurements of VH (nearly everyday), and one Ψ_p and RWC were done to assess their values for important level of drought. This supplementary data allowed drawing the relationship between water status and soil water content parameter (only VH).

Statistical analyses

For RWC and Ψ_{π}, one-way analysis of variance (ANOVA) or Mann-Whitney Ranked Sum Test (U test) when variance homogeneity (analysed with a Levene test) was not observed were used to assess the significance of treatment effects using STATISTICA software Version 7.1 (StatSoft, Inc. 2005). For VH, the difference between control and stressed plants was tested as described above for each date.

Daily total plant transpiration and stomatal conductance were analysed in terms of relative value for stress treatment compared to control treatment. To achieve this, for each date of measurement, an

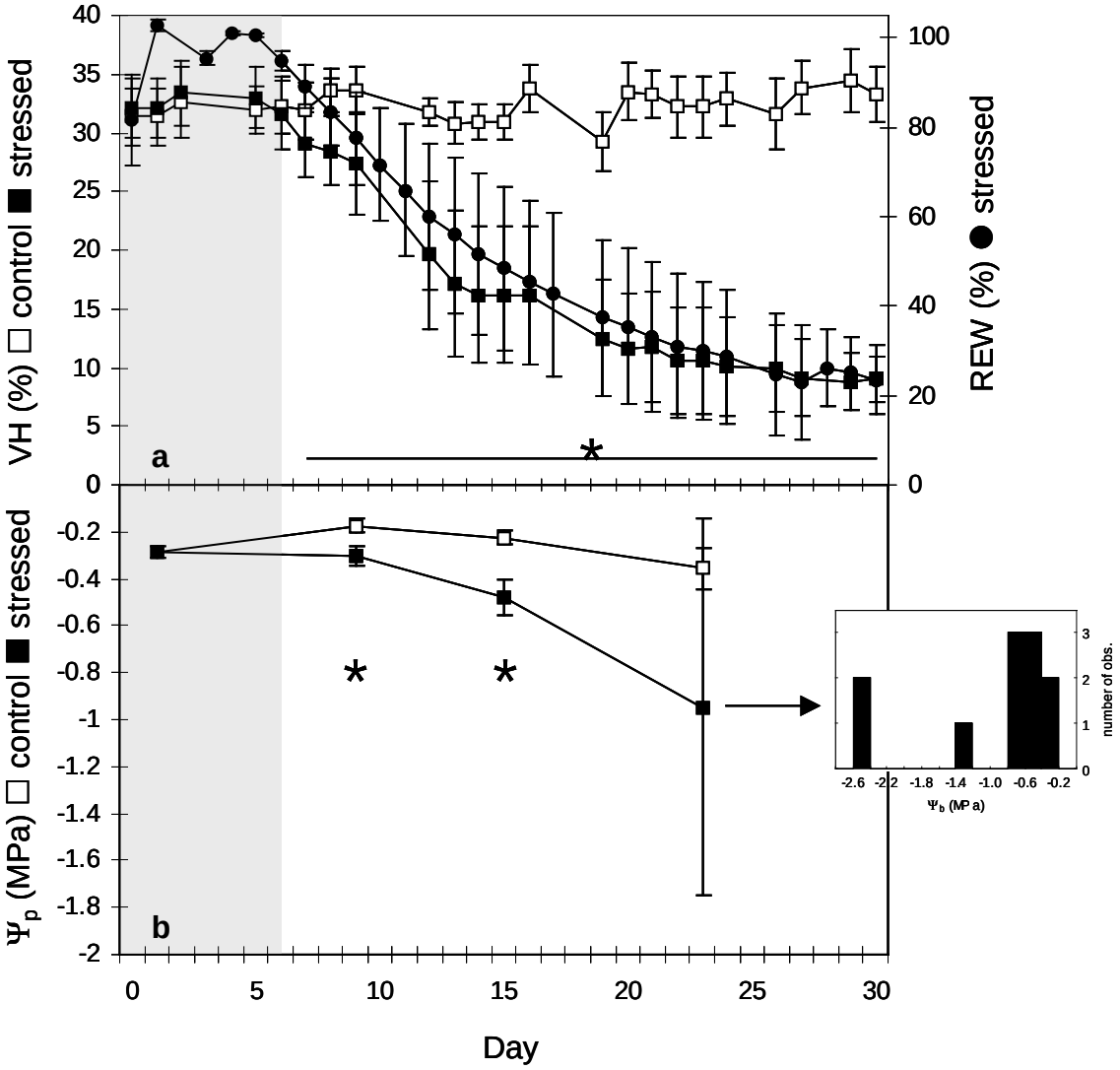


Figure 1: (a) Evolution of soil relative extractable water (REW, circle), and soil volumetric humidity (VH, squares) for control trees (open symbol) and stressed trees (closed symbols). Data are averages (± standard deviation) of the twelve trees of each treatment.
(b) Evolution of leaf predawn water potential (Ψ_p) for control trees (open symbol) and stressed trees (closed symbols). Each point represents the average (±standard deviation) for each date and treatment. The grey area represents the time when all the 24 trees were maintained at field capacity. The insert represents the distribution of predawn leaf water potential for the day 23.
Stars indicate dates with significant differences at 5% between the two treatments.

average for these traits for each treatment was calculated. Then, the difference between control and stressed treatment has been reported to the value of control treatment. Thus, a relative value of 0% implies that g_s or T are similar for both treatments, whereas a relative value of 100% indicates that stomata of stressed trees are completely closed.
For all analysis, the significance level was fixed at 5%.

Results

Soil and plant water status

Figure 1 shows temporally modification of soil volumetric humidity (VH), soil relative extractable water (REW) and predawn leaf water potential (Ψ_p). At field capacity VH was 32.3±2.5%. At the wilting point VH was 4.4±0.3% for this kind of soil mixture. For the control treatment, VH was maintained between 30 and 35% whereas for stress treatment soil moisture declined gradually from the beginning of drought (day 6) to day 30 where it was 9.0±1.9% (Figure 1a). REW decreased from 100% to 23.5±7.7% at day 30 (Figure 1a). Within the control treatment values of Ψ_p fluctuated between –0.18±0.03 MPa and –0.36±0.09 MPa (Figure 1b). Among stress treatment inter-individual variability was large, especially for the last date of measurement, day 23 (Figure 1b). The insert in figure 1b showed that the standard deviation was large because of the heterogeneousness of the water stress between the pots at this date.
Relationship between VH and Ψ_p (Figure 2) showed that Ψ_p was maintained to high values (less negative) until strong levels of drought (below 7.6% of VH and 20.8% of REW) where Ψ_p decreased strongly.
Relative leaf water content (RWC) was significantly different between stress and control treatments (p=0.02) at day 21. Though RWC for stress treatment was lower, values were still relatively high (RWC=92%). Moreover additional data showed that, similar to Ψ_p, RWC was maintained to high values and then declined rapidly for VH below 7.6% (Figure 2). Thus the decrease of RWC matched closely with the decrease of Ψ_p (Figure 2). Osmotic potential at full turgor (Ψ_π) was significantly higher (p=0.01 derived from a non-parametric test) for control treatment (-1.51±0.13) than stress treatment (-1.72±0.28) and osmotic adjustment represented an average of 0.2 MPa (differences between the average of control trees and the average of stressed trees). Similar to Ψ_p, Ψ_π of the stressed treatment showed a high variance due to the heterogeneousness of the water stress between the pots.

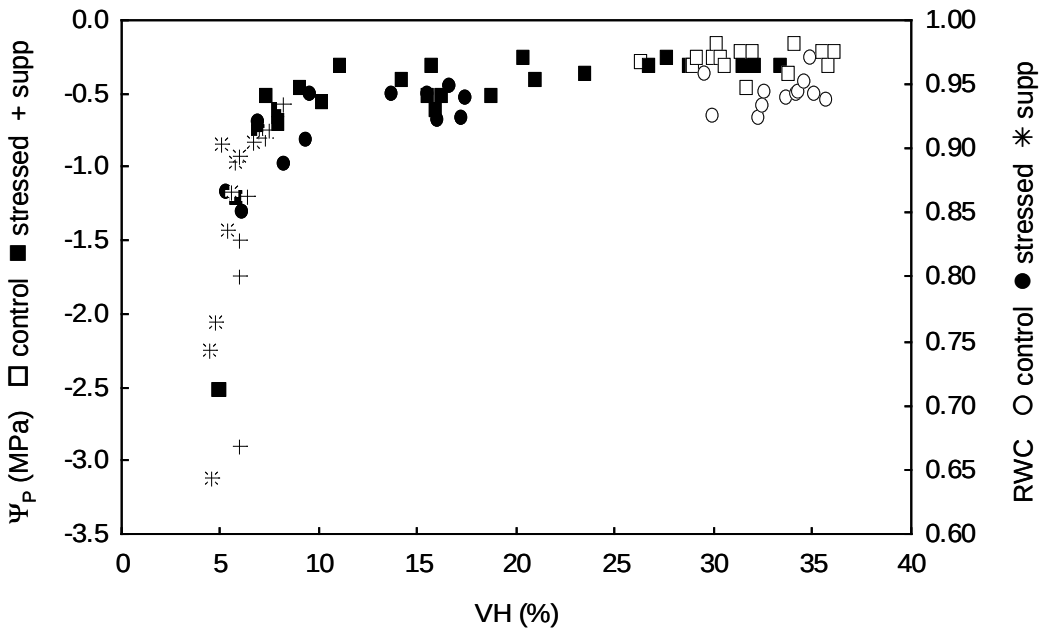


Figure 2: Leaf predawn water potential (Ψ_p) and leaf relative water content (RWC) *vs* soil volumetric humidity (VH). Open squares, closed squares and symbol "+" represent respectively control, stressed and supplementary Ψ_p data; open circles, closed circles and symbol "✳" represent respectively control, stressed and supplementary RWC data. Each point is an individual value measured for one date.

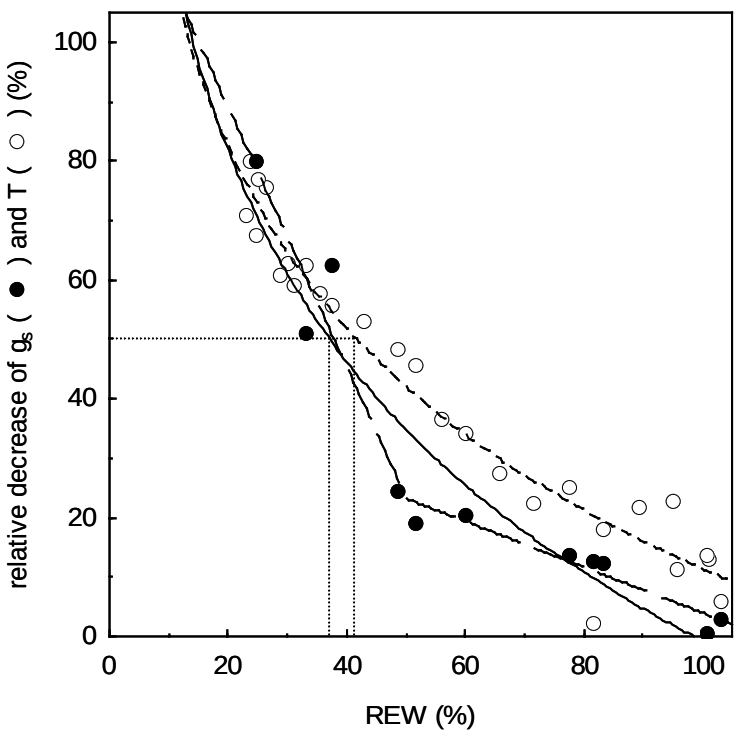


Figure 3: Relative decreases of stomatal conductance for water vapor (g_s, closed circles) and daily total plant transpiration (T, open circles) of stressed treatment compared to control treatment *vs* soil relative extractable water (REW).
Equations of regressions are: g_s=-51*log(REW)+236, R^2=0.90, solid line; T=-44*log(REW)+215, R^2=0.95, dashed line. A second relation has be drawn for g_s *vs* REW (— —), in which two segments have been determined: for REW<50%: g_s=-2.2*REW-133; for REW>50%: g_s=-0.4*REW+42. The values of REW obtained for a 50% of decrease of g_s or T are shown with the two dotted lines.

Plant water relations during drought

Relative decrease of daily total plant transpiration (T) and stomatal conductance for water vapor (g_s) for stressed treatment compared to control trees responded logarithmically to REW (Figure 3) or VH (data not shown). Relative decrease of stomatal conductance seemed to evolve in two phases (Figure 3). First g_s decreased slowly (0% to 25% compared to the control treatment) between 100% and 50% of REW (or between 33.4% and 17.1% of VH) whereas for stronger levels of drought (REW<50%) relative stomatal conductance declined strongly until 80%. This pattern was less pronounced for T (Figure 3). 50% of stomatal closure was reported for nearly similar level of stress for both T and g_s: REW was 41.8% (or VH was 14.4%) and 37.6% (or VH 13.1%), respectively.

Discussion

Stomatal conductance and daily total plant transpiration decreased in response to soil drying as observed in several studies on pedunculate oak (Vivin *et al.*, 1993; Picon *et al.*, 1996; Triboulot *et al.*, 1996; Čater & Batič, 2006). Many experiments showed a two-phases relationship between soil relative extractable water (REW) and canopy conductance, transpiration, or stomatal conductance for water vapor (g_s) (Irvine *et al.*, 1998; Sinclair *et al.*, 2005; Bréda *et al.*, 2006): first gas exchange decreased slowly until a threshold of available soil water and then linearly with the water content (Sinclair, 2005). For oak controversial results have been found. Bréda (1994) showed a linear relationship between g_s and REW for adult pedunculate oak trees grown in a natural stand, whereas Bréda *et al.* (1995) found a two-phases relationship. Thomas & Gausling (2000) did not find any difference in stomatal conductance between stressed and control pedunculate oak seedlings for a moderate water stress, which is in agreement with a two-phases relationship. The threshold often cited for trees in literature was a REW 40% or minus for field experiment or pots (Bréda *et al.*, 1995; Sinclair *et al.*, 2005). Though in the present study, a breaking point at 50% of REW has been defined, this threshold did not clearly appear. Indeed, our data set is not important enough to well describe what happened around and below this threshold (Figure 3). Moreover this pattern is not found for the relationship between daily total plant transpiration (T) and REW, for which we have a higher number of observations. Thus, the logarithmic relationship between REW and g_s or T, we have then reported in this study, seemed to fit the best. Therefore our study highlighted an early stomatal closure in response to drought. However our results could be biaised by the fact that we did not take into account the different soil kinetics of drying out: the stressed rooted cuttings with the fastest soil drying have attained a REW of 20% on day 15, whereas the slowest one attained a REW of 38% on day 30. Thus

the values of REW (or soil volumetric humidity, VH) taken for 50% of stomatal closure reflected in g_s, as well as in T, would be cautiously used.

The second aim of this work was to define soil and plant variables allowing to follow a stress in order to use it in later studies. REW can not be used as a continuous indicator to verify the level of stress to reach because this is a destructible method and only a retrospective study allowed to access to these data. Nevertheless this study confirmed a close relationship between REW (that integrate the entire volume of the soil in the pot) and VH (that is only influenced by the first 15th cm of soil in the pot). We showed that 50% of VH reported to VH at field capacity reflected a REW of 50%. Thus VH is an useful indicator of the applied water constraints.

Several studies on the effect of drought used the predawn leaf water potential (Ψ_p) to define the plant water status. For pedunculate oak, Bréda *et al.* (1995) found that Ψ_p was insensitive to variations of REW above 40%. In our study the threshold of VH below which Ψ_p declined sharply was as low as 7.6% which corresponds to a REW of 20.8%. Opposite to stomatal closure that is sensitive to the driest area of the soil, Ψ_p only reflected the wettest zone of the soil in contact with the root system (Aussenac *et al.*, 1984) and did not estimate correctly the capacity of a plant to recover water from the soil (Cruiziat *et al.*, 2002). In pots, rooted cuttings of pedunculate oak maintained their leaf water content until high water stress (Figure 2). Indeed, despite significant Ψ_P differences between the two treatments, these differences are relatively low between stressed and control treatments (0.6MPa at the maximum and late in the experiment) and Ψ_P did not show a clear tendency to decrease when it was plotted against VH until high degree of stress (Figure 2). Stomata closed whereas Ψ_p did not show large differences between stress and control treatment. This phenomenon is widely observed among pedunculate oak studies (Picon *et al.*, 1996; Fort *et al.*, 1997). Stomatal closure may be influenced by the hydraulic and non hydraulic pathway. The hydraulic pathway implies that stomata close in response of reduction of the water status. The non-hydraulic pathway involves different processes reviewed in Davies *et al.* (2002) where the most well-known is the release of abscisic acid (ABA) by roots in response to soil drying and transport to leaves where it promotes stomatal closure. Nevertheless studies on pedunculate oak did not provide evidences of any role of ABA in sensing drought stress (Triboulot *et al.*, 1996; Fort *et al.*, 1997). The present study showed that rooted cuttings were able to sense increase in tension in soil since they closed their stomata very early in the drought without large modification of the water status. Thus non-hydraulic pathway might operates since very low level of stress. Nevertheless, hydraulic aspect do not have to be eliminated because although there were weak, significant difference between stressed and control trees have been shown for Ψ_p since day 9.

The leaf relative water content (RWC) followed a similar pattern than Ψ_p (Figure 2). The maintenance of the water status may be in particular assured with the osmotic adjustment that occurs in leaves and

oak species can avoid development of negative potentials too, through osmotic adjustment (Thomas & Gausling, 2000). Indeed, osmotic potential in leaves decreases with increasing water stress to prevent loss of water and so on prevent stopping of essential physiological functions as stomatal opening. This process is possible thanks to synthesis of products like LEA (Late embryogenesis proteins), amino acids or sugars that increase leaf keeping back of water (for a review, see Ingram & Bartels, 1996). Studies that have worked on the osmotic adjustment in pedunculate oak gave divergent results. Thomas & Gausling (2000) found an osmotic adjustment around 0.4MPa, whereas Vivin *et al.* (1996) found no decrease of the leaf osmotic potential (Ψ_π) in response to drought. According to Babu *et al.* (1999) the employed method to assess osmotic adjustment have a large influence on results. Moreover, differences found between studies for osmotic adjustment depends on the quickness with which the stress is set. Indeed, Collet & Guehl (1997) showed that a slower development of stress induce a higher osmotic adjustment for sessile oak (*Q. petraea*). In the present study we have found an osmotic adjustment of 0.2MPa. But it is not very obvious if the osmotic adjustment played an important role in the maintain of the water status. We can wonder if the osmotic adjustment was low because there was no important decrease in RWC and thus no request to synthesize molecules that could maintain it, or if the stress was too quick to observe an important adjustment, or if there was no decrease in RWC because there was a beginning of osmotic adjustment. In the late case we would expect higher tension, i.e. Ψ_p more negative. As it is not the case, the last assertion may not be considered with more interest. Thus, this study showed that in terms of plant water status parameters, Ψ_p or RWC are poor estimates of the water stress detected by the plants.

Conclusions

This study showed that in the case of artificial drought in pots and for rooted cuttings of pedunculate oak, daily total plant transpiration and stomatal conductance for water vapor reacted very quickly while the water status of leaves is little altered until large level of stress. Thus, transpiration or stomatal conductance integrate and reflect the whole effects of water stress, as observed by Medrano *et al.* (2002), whereas leaf relative water content and leaf osmotic potential are not good indicators in our context to follow drought.

References

Aspelmeier S, Leuschner C. 2004. Genotypic variation in drought response of silver birch (*Betula pendula*): leaf water status and carbon gain. *Tree Physiology* **24**, 517-528.

Aussenac G, Granier A, Ibrahim M. 1984. Inluence du dessèchement du sol sur le fonctionnement hydrique et la croissance du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Acta Oecologica* **5**, 241-253.

Babu R, Pathan M, Blum A, Nguyen H. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Science* **39**, 150-158.

Bréda N, Cochard H, Dreyer E, Granier A. 1993. Water transfer in a mature oak stand (*Quercus petraea*): seasonal evolution and effects of a severe drought. *Canadian Journal of Forest Research* **23**, 1136-1143.

Bréda N. 1994. Analyse du fonctionnement hydrique des chênes sessile (*Quercus petraea*) et pédonculé (*Quercus robur*) en conditions naturelles; effet des facteurs du milieu et de l'éclaircie. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I, 59p.

Bréda N, Granier A, Barataud F, Moyne C. 1995. Soil water dynamics in an oak stand. I. Soil moisture, water potentials and water uptake by roots. *Plant and Soil* **172**, 17-27.

Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E. 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science* **63**, 625-644.

Čater M, Batič F. 2006. Groundwater and light conditions as factors in the survival of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) seedlings. *European Journal of Forest research* **125**, 419-426.

Collet C, Guehl J. 1997. Osmotic adjustment in sessile oak seedlings in response to drought. *Annals of Forest Science* **54**, 389-394.

Cruiziat P, Cochard H, Améglio T. 2002. Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science* **59**, 723-752.

Davies W, Wilkinson S, Loveys B. 2002. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist* **153**, 449-460.

Fort C, Fauveau M, Muller F, Label P, Granier A, Dreyer E. 1997. Stomatal conductance, growth and root signalling in young oak seedlings subjected to partial soil drying. *Tree Physiology* **17**, 281-289.

Gieger T, Thomas F. 2005. Differential response of two Central-European oak species to single and combined stress factors. *Trees – Structure and Function* **19**, 607-618.

Gulías J, Flexas J, Abadía A, Medrano H. 2002. Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of *Rhamnus ludovici-salvatoris*, an endemic Balearic species. *Tree Physiology* **22**, 687-697.

Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydratation tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377-403.

Irvine J, Perks M, Magnani F, Grace J. 1998. The response of *Pinus sylvestris* to drought: stomatal control of transpiration and hydraulic conductance. *Tree Physiology* **18**, 393-402.

Variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau dans une famille de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.): causes physiologiques et/ou anatomiques

Résumé: Le chêne pédonculé est une espèce présentant une forte variabilité intra-spécifique d'efficience d'utilisation de l'eau (WUE) dont le déterminisme génétique a été démontré. WUE est un caractère complexe qui, à l'échelle foliaire, est défini par le rapport entre le taux d'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s). Ce rapport - estimé par la composition isotopique en ^{13}C de la matière organique ($\delta^{13}C$)- est influencé par une multitude de facteurs physiologiques et structuraux qui conditionnent A (quantité de chlorophylle, épaisseur des différents tissus…) et g_s (densité stomatique…). La comparaison pour ces traits foliaires de génotypes issus d'une même famille de plein-frères de chêne pédonculé, en conditions non-limitantes, a permis de montrer que la variabilité de WUE, dans cette famille, était surtout liée à g_s et non aux capacités photosynthétiques. Pour approfondir ce travail, une étude a été menée sur la possibilité d'utiliser les variations de composition isotopique en oxygène ($^{16}O/^{18}O$) de l'eau foliaire et de la matière organique foliaire pour décomposer des différences d'efficience d'utilisation de l'eau en composantes photosynthétiques et transpiratoires. Les résultats de cette étude laissent envisager la possibilité d'utiliser l'outil isotopique ^{18}O comme estimateur de g_s chez le chêne pédonculé, mais seulement en conditions contrôlées, et après améliorations des techniques d'extractions de la matière organique.

Mots-clefs: chêne pédonculé – efficience d'utilisation de l'eau – échanges gazeux foliaires - discrimination isotopique du carbone – enrichissement en ^{18}O – variabilité intra-spécifique

Abstract: Pedunculate oak is a species that shows a large intraspecific variability of water-use efficiency (WUE). The genetic determinism of WUE in this species has been demonstrated. WUE is a complex trait which is defined at a leaf level as the ratio of net CO_2 assimilation rate (A) on stomatal conductance for water vapor (g_s). This ratio – estimated with carbon isotope composition of organic matter ($\delta^{13}C$) – is therefore influenced by numerous physiological or anatomical traits that influence A (chlorophyll content, thickness of leaf tissue) or g_s (stomatal density…). The comparison of genotypes belonging to a same full-sib family of pedunculate oak, in non-limiting conditions, for these foliar traits has shown that the variability of WUE in this family was linked to the variability of g_s instead of photosynthetic capacity. To go further, a study has been done on the possibility to use the variations of the isotope composition of oxygen ($^{16}O/^{18}O$) of leaf water and leaf organic matter to decompose the differences in water-use efficiency in its photosynthetic and transpiratory components. The results of this study has shown that the ^{18}O signature coulb be used as a proxy for g_s for pedunculate oak, but only in controlled conditions, and after amelioration of organic matter extraction procedures.

Keywords: pedunculate oak – water-use efficiency – leaf gas exchange – carbon isotope discrimination – ^{18}O enrichment - intraspecific variability

Medrano H, Escalona J, Bota J, Gulías J, Flexas J. 2002. Regulation of photosynthesis of C_3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* **89**, 895-905.

Nguyen-Queyrens A, Costa P, Loustau D, Plomion C. 2002. Osmotic adjustment in *Pinus pinaster* cuttings in response to a soil drying cycle. *Annals of Forest Science* **59**, 795-799.

Picon C, Guehl J, Aussenac G. 1996. Growth dynamics, transpiration and water use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO_2 and drought. *Annales des Sciences Forestières* **53**, 431-446.

Salinger S. 2005. Increasing climate variability and change: reducing the vulnerability. *Climatic Change* **70**, 1-3.

Scholander P, Hammel H, Bradstreet E, Hemmingsen E. 1965. Sap Pressure in Vascular Plants. *Science* **148**, 339-346.

Sinclair T. 2005. Theoretical analysis of soil and plant traits influencing daily plant water flux on drying soils. *Agronomy Journal* **97**, 1148-1152.

Sinclair T, Holbrook N, Zwieniecki M. 2005. Daily transpiration rates of woody species on drying soil. *Tree Physiology* **25**, 1469-1472.

Thomas F, Gausling T. 2000. Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Annals of Forest Science* **57**, 325-333.

Triboulot M, Fauveau M, Bréda N, Label P, Dreyer E. 1996. Stomatal conductance and xylem-sap abscissic acid (ABA) in adult oak trees during a gradually imposed drought. *Annals of Forest Science* **53**, 207-220.

Vivin P, Aussenac G, Lévy G. 1993. Differences in drought resistance among 3 deciduous oak species grown in large boxes. *Annales des Sciences Forestières* **50**, 221-233.

Vivin P, Guehl J, Clément A, Aussenac G. 1996. The effects of elevated CO_2 and water stress on whole plant CO_2 exchange, carbon allocation and osmoregulation in oak seedlings. *Annals of Forest Science* **53**, 447-459.

Xiongwen C. 2002. Change of water vapor exchange properties of 3 species under drought. *Journal of Arid Environments* **51**, 423-435.

Xu B, Li F, Shan L, Ma Y, Ichizen N, Huang J. 2006. Gas exchange, biomass partition, and water relationships of three grass seedlings under water stress. *Weed Biology and Management* **6**, 79-88.

Zhang X, Wu N, Li C. 2005. Physiological and growth responses of *Populus davidiana* ecotypes to different soil water contents. *Journal of Arid Environments* **60**, 567–579.