

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures UPRES
EA 1207 INRA USC1328 « Arbres et Réponses aux Contraintes
Hydriques et Environnementales »

THÈSE présentée par :
Sylvain CHAMAILLARD

soutenue le : 30 juin 2011

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Physiologie et Biologie des Organismes – Populations – Interactions

**Efficiences d'utilisation de l'eau chez le
peuplier noir (*Populus nigra* L.) :
variabilité et plasticité en réponse aux
variations de l'environnement**

THÈSE dirigée par :

Franck BRIGNOLAS

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Daniel LAFFRAY

Professeur, Université de Paris-Est Créteil

François LEFÈVRE

Directeur de Recherche, INRA d'Avignon

JURY :

Oliver BRENDEL

Chargé de Recherche, INRA de Nancy

Franck BRIGNOLAS

Professeur, Université d'Orléans

Claire DAMESIN

Professeur, Université de Paris-Sud Orsay – Présidente du jury

Daniel LAFFRAY

Professeur, Université de Paris-Est Créteil

François LEFÈVRE

Directeur de Recherche, INRA d'Avignon

Marc VILLAR

Chargé de Recherche, INRA d'Orléans

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures UPRES
EA 1207 INRA USC1328 « Arbres et Réponses aux Contraintes
Hydriques et Environnementales »

THÈSE présentée par :
Sylvain CHAMAILLARD

soutenue le : 30 juin 2011

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Physiologie et Biologie des Organismes – Populations – Interactions

**Efficiences d'utilisation de l'eau chez le
peuplier noir (*Populus nigra* L.) :
variabilité et plasticité en réponse aux
variations de l'environnement**

THÈSE dirigée par :

Franck BRIGNOLAS

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Daniel LAFFRAY

François LEFÈVRE

Professeur, Université de Paris-Est Créteil

Directeur de Recherche, INRA d'Avignon

JURY :

Oliver BRENDEL

Franck BRIGNOLAS

Claire DAMESIN

Daniel LAFFRAY

François LEFÈVRE

Marc VILLAR

Chargé de Recherche, INRA de Nancy

Professeur, Université d'Orléans

Professeur, Université de Paris-Sud Orsay - Présidente du jury

Professeur, Université de Paris-Est Créteil

Directeur de Recherche, INRA d'Avignon

Chargé de Recherche, INRA d'Orléans

Remerciements

Si j'en suis aujourd'hui à rédiger les remerciements de ma thèse, c'est que la fin de l'aventure est proche, et « quelle belle aventure ! » (clin d'œil à mon ami Régis). Les lignes qui vont suivre seront certainement les lignes les plus lues de ma thèse et certainement les plus dures à écrire... Je profite de cette partie pour dire un mot simple de la langue française « MERCI », mot qu'il est si difficile d'entendre ou de prononcer dans le monde de la recherche. Toutefois, je dérogerai à cet état de fait en remerciant toutes les personnes qui ont contribué à leur manière à ce travail.

*Comme tous remerciements qui se respectent et donc de façon très académique (certainement une déformation professionnelle), je commencerai par remercier les directeurs de laboratoire et/ou d'unité qui m'ont permis d'effectuer mes stages d'étude et ce travail de thèse : Messieurs **Jean-Charles Bastien**, **Franck Brignolas**, **Francis M. Delmotte**, **Dominique King** et **Gilles Pilate**. Je remercierai ensuite les membres du jury, **Daniel Laffray**, **François Lefèvre**, **Oliver Brendel** et **Claire Damesin** pour avoir lu mon manuscrit, pour être venu juger mon travail et pour m'avoir « cuisiné » lors de ma soutenance pour finir comme il se doit une thèse. J'aimerais également remercier les financeurs (la Région Centre, l'Agence Nationale de la Recherche, l'Etablissement Public Loire et le programme Européen EVOLTRÉE) qui ont rendu ce travail possible. Enfin d'une façon très protocolaire, je terminerai ce préambule en remerciant mon directeur de thèse **Franck Brignolas** et mes co-encadrants **Marc Villar** et **Cécile Vincent-Barbaroux**.*

Après ce préambule (très académique et peu croustillant pour les gens qui liront ces remerciements), j'aimerais remercier les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, d'écrire une page de ma vie à l'encre indélébile et de partager une histoire humaine formidable remplie de moments inoubliables. Je commencerai par remercier mes amis de galère qui m'ont appris à nager dans les eaux troubles et tumultueuses de la recherche; mes amis, l'aventure n'aurait certainement pas été la même sans VOUS.

~

Franck BRIGNOLAS (dit la Brignole)

Je commencerai par toi Franck, non pas parce que tu es mon directeur de thèse et/ou le directeur du laboratoire, mais parce que tu as été la pièce maitresse de ce travail. MERCI car ce travail n'aurait pas été le même sans toi et je pèse mes mots... Je ne réussirai certainement pas à exprimer tout le respect que j'ai pour toi; toutefois, merci de m'avoir porté au sommet des diplômes universitaires, d'avoir cru en moi, d'avoir pris de ton temps pour m'expliquer l'écophysio (malgré ton emploi du temps de ministre), d'avoir corrigé mes rédactions les plus farfelues, merci pour ton soutien sans failles (surtout dans les moments difficiles et il y en a eu...) et surtout Merci de m'avoir supporté car ce n'était pas gagné vu nos « foutus » caractères (des mauvaises langues diront que tu es soupe au lait, d'autres que je pourrais aussi me féliciter de t'avoir supporté pendant ces quelques années...). Je n'oublierai pas les cafés du matin (souvent payé par Stéphane, Régis ou moi d'ailleurs), les parties de boules (où on te malmenait avec Damien et Régis mais où on te laissait gagner... hé oui tu étais chef), les apéros à refaire le monde, les nombreux restos (que tu nous as souvent payé), les discussions dans ton bureau, dans ta voiture, les repas du midi à l'INRA, les petites phrases dont tu as le secret pour mettre la pression ... et j'en passe (on en a passé des heures ensemble). Aujourd'hui je suis sûr d'une chose, tu es un grand scientifique, un grand formateur, un battant et surtout un mec super (qui n'aime pas les éloges alors désolé pour ces quelques phrases); tu resteras pour moi un exemple en écophysio, en Sciences, en encadrement et en enseignement. Merci du fond du cœur chef.

Marc VILLAR (dit Marco le héron)

Je ne vais pas être très original mais merci d'avoir embarqué dans le bateau, d'avoir pris la barre avec Franck, d'avoir hissé la grande voile pour mettre le cap sur les semis et l'in situ. Marc, cette thèse aurait été bien différente sans toi. Tu m'as fait parcourir l'Europe (Italie, Belgique, Autriche...), la France (Loire-Atlantique, Drôme, Pyrénées-Orientales...), découvrir des lieux magnifiques (la Loire, Paglia, Nohèdes, le Danube...), rencontrer des personnes exceptionnelles (dont je tairai les noms tellement la liste serait longue), partager des moments inoubliables (ballades en canoë, récolte, repas en mission, bières au Shannon pub... et j'en passe; d'ailleurs Marc il reste une énigme non élucidée « Comment a-t-on trouvé ton numéro de portable pour nous prévenir que mon portefeuille était retrouvé ? » Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour le temps que tu as passé avec moi sur le terrain, pour m'avoir fait partager tes expéditions, pour m'avoir permis de travailler hors de la pépinière, pour m'avoir fait confiance en me confiant une partie de ton bébé « le peuplier noir » et surtout MERCI pour ton optimisme, ton soutien, ta bonne humeur et tes qualités humaines indiscutablement exceptionnelles. Nous avons passé tellement de temps ensemble à discuter à l'INRA, en voiture, en train, en avion, qu'il va m'être difficile de tout raconter tellement de flashes me passent par la tête lorsque

je repense à tout cela. Marc, je te remercie pour les cafés du matin à refaire le monde, les multiples discussions au cours de ces années sur le peuplier noir, la Loire, les voyages et tout le reste. Merci pour ta gentillesse et pour ces 4 années formidables... Je ne peux terminer ce paragraphe sans te poser cette question, c'est quand même fou qu'on ait travaillé sur ce peuplier noir alors qu'il a les pieds dans l'eau, non ? Merci pour tout Marc.

Régis FICHOT (dit Dr Ficote ou encore Tic ou Tac on ne sait toujours pas)

Il va m'être difficile de te dire en quelques phrases combien tu as été important durant ces 4 années... Je n'aurai certainement pas assez de mots et pas assez de lignes pour exprimer toute la gratitude et tout le respect que j'ai pour toi. Tu es un exemple de rigueur, de pugnacité, de gentillesse, d'humilité, de savoir vivre... Je n'exagère pas en disant que tu es mon frère de thèse, mon ami, mon compagnon de galère (ce qui nous a valu l'appellation Tic et Tac); sans toi l'aventure aurait été terriblement différente. On a galéré, on a travaillé, on en a chié mais qu'est ce que l'on a pu délirer, rigoler, s'amuser. On a lié une complicité comme j'en ai rarement vécu ... (des mauvaises langues diront qu'on aurait pu se pacser... ils ne sont pas si loin de la vérité vu le temps qu'on a passé et qu'on passe encore ensemble). Je voulais te dire que ce fût un réel plaisir de travailler avec toi et que je n'oublierai pas ces années exceptionnelles... Je ne pourrai pas oublier l'emballage des feuilles dans la cellophane en pleine nuit à la lampe frontale, les potentiels de base, les fous rires sur la parcelle POPSEC, les délires dans le bureau, les prélèvements pour la manip phytotron un samedi matin (désolé Tam)... je n'oublierai pas non plus la semaine au Jesium (et surtout le resto à Toulon), tous nos délires en dehors du boulot, les citations dont on a le secret, les babys, les soccers (tu resteras le défenseur des vieilles biques), les pétanques, les restos, les apéros, les tennis ... et j'en passe. Un très très grand MERCI qui vient du fond du cœur pour ton soutien inégalable et pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Alors Régis dis moi on se marie quand ? Bon vent mon pote.

Cécile VINCENT-BARBAROUX

Cela fait longtemps que l'on travaille ensemble... depuis le master 1; nous voilà 5 ans plus tard toujours à travailler sur le peuplier. Je ne pensais pas quand j'ai frappé à ton bureau en master 1 que je finirai en thèse sur ce foutu peuplier. Je voulais te remercier pour cela car c'est en parti grâce à toi que j'ai mis un pied dans le monde de la recherche et que j'en suis là aujourd'hui. Je tenais également à te remercier pour ton soutien, pour le temps que tu as passé sur cette thèse, pour les multiples réunions auxquelles tu as apporté ta vision de terrain, pour le temps que tu as passé à lire mes travaux, pour m'avoir aidé à préparer mes présentations orales. Cécile, merci de m'avoir fait une petite place dans ton bureau pendant plus de 3 ans, merci pour ta vision écologique et pour l'énergie que tu as pu mettre pour me permettre de travailler hors de la pépinière d'Orléans...

~

Je voudrais maintenant remercier les personnes qui m'ont aidé et qui ont permis de rendre ce travail agréable (ou le moins dur possible cela dépend de comment on voit la chose...).

Merci à **Nicolas CHENAULT** (dit Nicochen), pour avoir partagé ces 3 ans de thèse avec moi sur le peuplier noir. Je tenais à te remercier pour ta bonne humeur, ton soutien du début à la fin, ta gentillesse, pour m'avoir reboosté pendant la phase de rédaction, pour m'avoir aidé pour la biblio et les abréviations ... mais surtout merci pour les apéros (en me donnant des bières moisis...), les délires, les pétanques, pour m'avoir permis de te mettre des grandes roustes à fifa, pour m'avoir fait découvrir le karaoké, pour les parties de soccer, les babys, pour m'avoir montré tes talents de tennisman... enfin merci pour tout, Merci mon vieux NICO...

Merci à **Romain VALLADE** (dit Romichal), pour m'avoir donné un coup de main pendant mes manips... mais surtout merci pour avoir partagé le bureau avec Régis et moi (on a bien rigolé) pour les nombreuses discussions que l'on a pu avoir, pour les apéros, les soccers, le voyage à Marseille et j'en passe... Merci Romichal et bonne chance pour la fin de ta thèse...

Merci à **Julien TOILLON** (dit ti doudou), pour ta gentillesse et ton soutien ... Julien tu n'as pas eu de chance tu es arrivé à la fin de ma thèse... désolé de t'avoir fait stressé et de t'avoir soulé avec mon plan de thèse, mes questions... en tout cas merci pour ton soutien lors de ces dernières semaines, je n'oublierai pas les tables des figures, les relectures de manuscrit, les impressions foireuses, le café du 1^{er} mai, les bonbons, les marches en pépinière et surtout tes phrases qui ne veulent rien dire vu que tu dis le début dans ta tête... Merci ti doudou et bon courage pour la fin...

Merci à **Isabelle le Jan, Jean-Michel Petit et Didier Delay** (la dream team biomasse) pour les mesures de biomasse dans le froid sous la serre plastique (vous en avez pas marre ?). Merci à tous les trois pour votre réactivité, votre disponibilité et votre gentillesse. Jean-Michel, merci également pour votre soutien et pour votre aide lors de la manip phytotron.

Merci à **Stéphane Maury** (Papa Betterave) et ses petits (**Alain Delaunay, Claire Hébrard, Clément Lafon –Placette, Marie-Véronique Trap-Gentil**). Merci Stéphane d'avoir partagé durant les derniers mois de ma thèse ton bureau, pour les nombreuses discussions que l'on a eu (on sait à l'heure où l'on rentre dans ton bureau mais jamais à quelle heure on va en sortir...) et surtout merci pour ton soutien et ta gentillesse.

Merci aux membres du LBLGC qui ont toujours eu un petit mot gentil, une petite attention envers moi depuis que je suis au laboratoire - **Muriel Feinard-Duranceau** (pour ta bonne humeur et ton soutien), **Lucie Bertheau** (pour les discussions dans ton bureau), **Sabine Carpin** (pour ta gentillesse et de m'avoir écouté pendant des heures raconter des conneries dans ton bureau), **Françoise Chefdor, Christiane Depierreux, Daniel Auguin** (pour les figures de Tree Physiolo), **Ludovic Bonhomme** (pour m'avoir aidé sur les stats), **Bruno Vincent** (pour les délires et les cafés), **Sylvain Bourgerie, Thomas Durand, François Héricourt** (pour les squashes), **Domenico Morabito** (Dom merci pour ta gentillesse), **Stéphanie Bankhead-Dronnet, Sophie Pointeau, François Lieutier, Aurélien Salle, Jean Claude Vala** (pour tes petites histoires qui donnent la joie de vivre), **Laurent Jean Alphonse** (pour son aide administrative). Je n'oublierai pas d'avoir une pensée pour ceux qui nous ont quittés trop tôt **Romain Monclus** et **Gilles Moreau**..

Merci aux membres de l'INRA - **Catherine Bastien** (pour ses nombreux conseils et tout le temps qu'elle m'a accordé pour répondre à mes questions), **Jean-Charles Bastien** (pour sa joie de vivre et sa gentillesse), **Ludovic Pasquier** (pour sa bonne humeur, sa grande gentillesse, son soutien. Merci Ludo pour les croissants le week-end de Pâques...), **Michel Valance, Jean-Paul Charpentier, Alain Valadon, Vincent Segura, Jean Gaurvin, José Almeida** (pour leur bonne humeur et leur gentillesse), **Patrick Poursat** et **Jacky Despras** (pour leur soutien technique), **Jean-Léandre Hatton** et **Guy Chanteloup** (pour leur aide en informatique), **Franck Rogeon** (pour sa réactivité à la documentation. Hé Franck pourquoi il y a autant d'églises à Orléans ? tu n'as toujours pas répondu à cette question de Régis et moi), **Patricia Montes** (pour son soutien administratif), **Nicolas Marron, Erwin Dreyer, Didier le Thiec** (pour leur gentillesse, leur conseil, leur intérêt pour mes travaux et leur aide lors de mon séjour à Nancy) et **Pierre Montpied** (pour m'avoir fait découvrir les joies de la Licor mais surtout pour sa gentillesse et pour son invitation chez lui pour un repas mémorable).

Merci également aux jeunes que j'ai croisé ou qui sont passés dans le bureau... - **Pascal** (le rugbyman qui devient défenseur de foot dans la team de rêve des vieilles biques), **Hamza** (pour sa joie de vivre), **Maxime** (le vieux zèbre), **Virgil, Thibault** et **Maxime** (pour leur aide très précieuse lors des prélèvements et analyses des semis en Loire), **Jean-Baptiste** (pour toutes les pesées et les longueurs de racines) **Antoine** (t'es pris), **Agathe** (pour nous avoir vendu du rêve avec Régis), **Marjolaine** (pour sa gentillesse), **Kevin** (super kékette merci pour les babys et les parties de foot), **Justine** (juste une tite goutte, la relève du peuplier noir), **Pénélope, Solène, Estelle, Elodie, Géraldine, Johann** (pour nous avoir montré le baby), **Redouane, Claire, Wassim, Fernanda, Anne-Sophie, Alexandre, Baptiste** et **Brice**.

~

Je terminerai ces remerciements par ceux sans qui je n'aurais pas pu en arriver là, tellement leur soutien, leur aide, leur amour m'a été précieux (je vous ai pourtant soulé avec ce peuplier matin, midi et soir...)

Merci à mes amis et mes proches

Magalie, merci pour ton soutien depuis que je suis tout petit et pour tout ce que l'on a partagé ensemble.

Teddy, que dire mon pote depuis le temps que l'on se connaît ; ton soutien a toujours été sans failles, je te remercie du fond du cœur... merci également à ta moitié que j'ai du souler avec mes histoires de peuplier... Merci TED.

Augustin, ah mon petit poulet, les bords de Loire n'avaient pas de secret pour toi sauf ce foutu peuplier noir. Maintenant tu le connais aussi bien que moi et tu pourrais en parler aussi bien que moi... Augustin merci du fond du cœur pour tout ce que tu as pu faire pour moi depuis que l'on se connaît, pour ton soutien, ta gentillesse. Merci mon ti poulet.

Florian, merci mon ami pour Canal + ca m'a sauvé la vie ces petites soirées de foot.

Robin, merci pour les soirées mémorables au soccer.

Merci à mes amis de lycée : **Mathilde, Pierrot, Chevreuil, Manu, Fred, Sam, Dedess, Pierre-Vincent**.

Danick et **Elo**, merci pour votre soutien pendant ces derniers mois, pour les apéros et pour votre gentillesse.

~

Merci à ma famille

Papa, Maman, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi (et je pèse mes mots...), pour vos sacrifices pour que j'en arrive aujourd'hui à la rédaction de ces remerciements, pour votre soutien même si vous ne compreniez pas toujours ce que je faisais et tout simplement merci pour votre amour et tout ce que je ne peux écrire ici...

Merci à **mes Mamies** qui ont toujours cru en moi, qui m'ont toujours soutenu au sens large du terme et sans qui je ne serais pas qui je suis aujourd'hui.

Merci à ma **Tante Danielle** et à **André** pour leur soutien, leur gentillesse et tous les bons moments que l'on a partagés ensemble.

Damien, merci fréro pour ton soutien sans failles, pour tous les moments que l'on a pu passer tous les deux à discuter, pour les soccers (tu resteras surement le plus fort de cette équipe des vieilles biques). Merci pour les babys, les pétanques, les apéros, merci d'avoir toujours eu un mot pour me remonter le moral ou pour me donner la force de continuer et d'avancer dans mon travail comme dans ma vie, je suis fier de toi et fier d'être ton frère...

Nolwenn, il va m'être difficile de dire combien tu as été la clé de voute de ma réussite... surtout dans les derniers mois difficiles. Tu m'as soutenu, rassuré, encouragé, motivé, fait positif et surtout aimé... Nolwenn ma chérie merci pour tout ce que tu fais pour moi, merci de remplir mon quotidien et ma vie de bonheur et merci pour tout ce que je ne peux écrire ici...

Merci également à **Ma belle-famille**, pour sa gentillesse et sa bonne humeur; merci de m'avoir changé les idées pendant les moments difficiles; je me dois également de vous remercier pour les apéros, les tennis et pour m'avoir fait découvrir un sport plus intelligent que mon sport de prédilection. Merci à vous tous...

Merci également à **Pep's** et **Geckoune**, mes deux petits amis qui m'ont permis de penser à autre chose dans les moments difficiles...

~

Merci à tous les gens que j'ai pu croiser au cours de ces 4 années et à tous ceux que j'ai pu oublier...

Enfin, j'aurai une pensée très émue pour tous ceux que la vie n'a pas permis de lire ces quelques lignes...

A ma famille et ceux qui nous ont quitté

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	9
LISTE DES ENCADRES, TABLEAUX ET FIGURES.....	13
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION GENERALE.....	21
1.Le peuplier.....	23
2.Le peuplier noir, espèce emblématique de la ripisylve.....	26
2.1 Peuplier noir et ripisylve.....	26
2.2 Biologie et cycle de régénération.....	28
3.Menaces avérées et stratégies de conservation.....	30
4.Modifications climatiques et menaces additionnelles.....	32
5.Objectifs de la thèse et stratégie expérimentale.....	33
CHAPITRE 1 ETAT DE L'ART SUR L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU CHEZ LE PEUPLIER.....	35
L'efficacité d'utilisation de l'eau : un caractère clé pour la régénération et le potentiel adaptatif du peuplier noir en réponse aux modifications du climat ?.....	37
1. Définitions.....	37
2. La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$) comme une estimation indirecte et intégrée de l'efficacité d'utilisation de l'eau.....	37
3. Variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ au sein du genre <i>Populus</i>	41
CHAPITRE 2 VARIABILITE DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU CHEZ DES SEMIS DE <i>POPULUS NIGRA</i> L.....	45
Introduction.....	47

CHAPITRE 2.1 VARIABILITE DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU CHEZ DES SEMIS DE <i>POPULUS NIGRA</i> L. : APPROCHE <i>EX SITU</i>.....	49
Présentation synthétique de l'article.....	51
Article : Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination among <i>Populus nigra</i> L. seedlings and relationship with leaf survival under elevated temperature.....	53
 CHAPITRE 2.2 VARIABILITE DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU CHEZ DES SEMIS DE <i>POPULUS NIGRA</i> L. : APPROCHE <i>IN SITU</i>.....	85
1. Introduction.....	87
2. Matériel et méthodes.....	88
2.1 Présentation des sites d'étude.....	88
2.2 Stratégie d'échantillonnage.....	89
2.3 Variables mesurées.....	90
2.4 Analyses statistiques.....	92
3. Résultats.....	93
4. Discussion.....	100
4.1 Variabilité et plasticité de $\Delta^{13}\text{C}$ en fonction de la densité.....	101
4.2 Variabilité et plasticité de $\Delta^{13}\text{C}$ en fonction de l'âge.....	102
Conclusions et transition.....	105
 CHAPITRE 3 VARIABILITE DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU CHEZ TROIS POPULATIONS DE <i>POPULUS NIGRA</i> L. INSTALLEES EN PEPINIERE.....	107
Présentation synthétique de l'article.....	109
Article : Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three <i>Populus nigra</i> L. populations.....	111

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	145
1. Synthèse des travaux.....	147
1.1 Variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau.....	147
1.2 Plasticité phénotypique de l'efficience d'utilisation de l'eau	148
1.3 Liens entre efficience d'utilisation de l'eau, croissance et survie.....	151
1.4 Bilan des apports scientifiques.....	153
2. Limites et Perspectives de l'étude.....	154
2.1 Quelles sont les bases physiologiques, structurales et fonctionnelles à l'origine de la variabilité de WUE chez <i>P. nigra</i> ?.....	154
2.2 Existe-t-il de la variabilité pour la thermotolérance chez <i>P. nigra</i> ?.....	154
2.3 Existe-t-il une structuration géographique de la variabilité de WUE chez <i>P. nigra</i> et quels pourraient être les facteurs à l'origine ?.....	157
2.4 Vers l'étude des facteurs pouvant limiter l'établissement de <i>P. nigra</i>	157
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	159
VALORISATION DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES.....	183

LISTES DES ENCADRES, TABLEAUX ET FIGURES

Liste des encadrés

~

Encadré IG1. La ripisylve: habitat du peuplier noir.....	27
Encadré 1.1. La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$).....	38
Encadré 1.2. Relation entre efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i) et discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$).....	39

Liste des tableaux

~

Tableau 2.1.1. Location, coordinates and climatic data of the two provenance sites.....	58
Tableau 2.1.2. F values of the ANOVAs for bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰), specific leaf area (SLA , $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$), leaf carbon content (C_M , $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and leaf nitrogen content (N_M , $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).....	65
Tableau 2.1.3. Linear regressions (Pearson's correlation coefficients) between specific leaf area (SLA , $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$), leaf carbon content (C_M , $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), leaf nitrogen content (N_M , $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and height (Height, cm).....	68
Tableau 2.2.1. Récapitulatif des sites d'étude, des années et des dates de collecte, de la stratégie d'échantillonnage et des variables mesurées.....	89
Tableau 3.1. Geo-climatic data for the three <i>P. nigra</i> populations.....	116
Tableau 3.2. ANOVA results for pair-wise comparisons between plots.....	124
Tableau 3.3. Relative percentages of variance components in each plot and for each trait.....	125
Tableau 3.4. Broad-sense heritability $\pm$ standard error ($H^2_{\text{individual}} \pm \text{SE}$) and coefficient of genetic variation (CV_G , %) calculated for each trait, each population in each plot.....	126
Tableau 3.5. Spearman's rank coefficients calculated from genotypic means of each population.....	127

Tableau S3.1. Linear correlations (Pearson's correlation coefficients) between variables computed at the genotypic level for each population in each plot.....	129
---	------------

Liste des figures

~

Figure IG1. Aire de distribution du peuplier noir (<i>Populus nigra</i> L.) en France.....	24
Figure IG2. Aire de distribution potentielle du peuplier noir (<i>Populus nigra</i> L.) tirée d'EUFORGEN 2009.....	26
Figure IG3. Cycle de régénération du peuplier noir. Les deux étapes limitantes sont présentées en rouge.....	29
Figure 2.1.1. Box plots on individual seedlings values for (a) bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$), (b) specific leaf area (SLA), (c) leaf carbon content (C_M), (d) leaf nitrogen content (N_M) and (e) seedlings' height (Height).....	66
Figure 2.1.2. Relationships between bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) and specific leaf area [SLA (a, e, i)], leaf carbon content [C_M (b, f, j)], leaf nitrogen content [N_M (c, g, k)] and height [Height (d, h, l)].....	68
Figure 2.1.3. Relationship between bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) and leaf survival in response to elevated temperature.....	69
Figure 2.2.1. Densité de semis par quadrat (m^{-2}) à Paglia (a), Mareau-aux-Prés (b) et Arrault (c).....	93
Figure 2.2.2. Boîtes à moustache pour $\Delta^{13}\text{C}$ (a-c) et relations $\Delta^{13}\text{C}$ -densité de semis (d-f) représentées par site et par date.....	94
Figure 2.2.3. Boîtes à moustache pour $\Delta^{13}\text{C}$ pour les semis de l'année (08) et les cohortes âgées de un an (07) et deux ans (06) en juin (blanc) et en septembre (gris) à Paglia.....	95
Figure 2.2.4. Boîtes à moustache pour les teneurs massiques en azote (N_M) et en carbone (C_M) (a-d) et relations avec la densité de semis (e-h) représentées par site et par date.....	96
Figure 2.2.5. Relations entre la longueur de la tige (L_{tige}) et de la densité de semis (a), et entre la longueur de la racine (L_{racine}) et de la densité de semis (b) à Mareau-aux-Prés.....	97
Figure 2.2.6. Relations entre la longueur de la tige (L_{tige}), la longueur de la racine (L_{racine}) et $\Delta^{13}\text{C}$ à Mareau-aux-Prés en juin et en septembre.....	98

Figure 2.2.7. Relations entre la longueur de la tige ($L_{t\text{ige}}$) et $\Delta^{13}\text{C}$ pour les cohortes âgées de un an et de deux ans à Paglia.....	98
Figure 2.2.8. Relations entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la teneur massique en azote (N_M) à Mareau-aux-Prés en juin (a) et en septembre (b) ainsi qu'à Arrault en juin (c).....	99
Figure S3.1. Summer time course of pre-dawn leaf water potential (Ψ_{pd} , MPa, circles) and daily rainfall precipitations (mm, vertical bars) in Orléans.....	119
Figure 3.1. Box plots of genotypic means for each trait in each plot.....	123
Figure 3.2. Relationship between bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰) and annual shoot fresh mass (Biom_F , g) for each population (NOH circles, RAM triangles and SPM squares) in each plot.....	128
Figure P1. Relation entre la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰) mesurée en condition non limitante [(a) : $\Delta^{13}\text{C}_{t2\ 25}$; (b) : $\Delta^{13}\text{C}_{\text{ORLWW}}$] et la différence de $\Delta^{13}\text{C}$ calculée entre la condition non limitante et la condition de contrainte [(a) : $\Delta^{13}\text{C}_{t2\ 25} - \Delta^{13}\text{C}_{t2\ 43}$; (b) : $\Delta^{13}\text{C}_{\text{ORLWW}} - \Delta^{13}\text{C}_{\text{ORLWD}}$].....	150
Figure P2. Histogramme montrant la température critique du photosystème II (°C) sur les huit génotypes dans les deux conditions de température 25°C (blanc) et 35°C (noir).....	156

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

δ	Composition isotopique
$\Delta^{13}\text{C}$	Discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13
σ^2_{G}	Variance génotypique
σ^2_{e}	Variance résiduelle
Ψ_{pd}	Potentiel hydrique foliaire de base
μ	Moyenne
a	Coefficient de fractionnement isotopique lors de la diffusion du CO_2 au travers des stomates
A	Assimilation nette de CO_2 par unité de surface
ADI	Indice d'aridité (' <i>Annual Dryness Index</i> ')
AGPF	Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières
ANOVA	Analyse de variance (' <i>ANalysis Of Variance</i> ')
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ARCHE	Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales
b	Coefficient de fractionnement isotopique lors du processus de carboxylation par la RuBisCO
Biom_F	Biomasse aérienne fraîche
^{12}C	Carbone 12
^{13}C	Carbone 13
C_3	Plantes à métabolisme photosynthétique en C_3
c_a	Fraction molaire de CO_2 dans l'atmosphère
<i>ca.</i>	<i>circa</i>
c_i	Fraction molaire de CO_2 dans les cavités sous-stomatiques
C_M	Teneur massique en carbone
CNR	Consiglio Nazionale delle Ricerche
CO_2	Dioxyde de carbone
CPER	Contrat de Projets Etat-Région
CRGF	Commission nationale des Ressources Génétiques Forestières
<i>cv.</i>	Cultivar
CV_G	Coefficient de variation génétique
E	Taux de transpiration foliaire
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i>
EC	European Commission
ELEV	Altitude (' <i>Elevation</i> ')
ES	Erreur Standard (= SE : ' <i>Standard Error</i> ')
EU	European Union
EUFORGEN	EUropean FORest GENetic resources network
EVOLTREE	Network of Excellence: EVOLution of TREES as drivers of terrestrial biodiversity
F_1	Descendant de 1 ^{ère} génération
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

FFD	Nombre de jours où la température est supérieure à 0°C (<i>'Frost-Free Days'</i>)
g_{CO_2}	Conductance stomatique au CO ₂
g_s	Conductance stomatique de la feuille à la vapeur d'eau
GIEC	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (= IPCC : <i>'Intergovernmental Panel on Climate Change'</i>)
GMN	Guémené-Penfao (Loire-Atlantique)
H^2	Héritabilité
H₂O	Eau
I	Irradiance
<i>i.e.</i>	<i>id est</i>
IBAF	Instituto di Biologia Agroambientale e Forestale
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IFR	Institut Fédératif de Recherche
IPC	International Poplar Commission
IRMS	Spectrométrie de masse isotopique (<i>'Isotope Ratio Mass Spectrometer'</i>)
J_{max}	Flux maximal d'électron
LBLGC	Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures
Ln	Logarithme népérien
L_{racine}	Longueur de racine
L_{tige}	Longueur de tige
LAT	Latitude
LON	Longitude
MAP	Précipitation annuelle moyenne (<i>'Mean Annual Precipitation'</i>)
MASP	Précipitation moyenne sur les mois d'été (<i>'Mean Annual Summer Precipitation'</i>)
MAST	Température moyenne sur les mois d'été (<i>'Mean Annual Summer Temperature'</i>)
MAT	Température annuelle moyenne (<i>'Mean Annual Temperature'</i>)
n	Nombre d'individus
N_M	Teneur massique en azote
NOH	Nohèdes (Pyrénées-Orientales)
NPK	Proportion en azote, phosphore, potassium dans l'engrais
ORL_{wd}	Orléans en condition hydrique limitante (<i>Water Deficit</i>)
ORL_{ww}	Orléans en condition hydrique non limitante (<i>Well-Watered</i>)
PDB	Standard Pee Dee Belemnite
PLECO	Research group of PLant and vegetation ECOlogy
RAM	Ramières (Drôme)
r_p	Coefficient de corrélation de Pearson
r_s	Coefficient de corrélation de Spearman
$R_{\text{échantillon}}$	Ratio ¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂ de l'échantillon
R_{standard}	Ratio ¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂ du standard
REML	Méthode de maximum de vraisemblance (<i>'REstricted Maximum Likelihood'</i>)

RH	Humidité relative (<i>‘Relative Humidity’</i>)
RuBisCO	RibUlose 1,5 Bisphosphate Carboxylase Oxygénase
s	DéviatiOn standard
SCRI	Scottish Crop Research Institute
SDI	Indice d’aridité (<i>‘Summer Dryness Index’</i>)
SLA	Surface foliaire massique
SPM	St-Pryvé St-Mesmin (Loiret)
spp.	Sous-espèce
SSR	Short Sequence Repeats
T	Température
UFR	Unité de Formation et de Recherche
UHP	Université Henri Poincaré, Nancy 1
UMR	Unité Mixte de Recherche
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
UPRES-EA	Unité PROpre Enseignement Supérieur – Equipe d’Accueil
UR	Unité de Recherche
USC	Unité Sous Contrat
V_{cm}	Vitesse maximale de carboxylation
v/v	Volume/volume
VPD	Déficit de pression de vapeur d’eau (<i>‘Vapour Pressure Deficit’</i>)
vs.	<i>versus</i>
WUE	EfficiencE d’utilisation de l’eau (<i>‘Water-Use Efficiency’</i>)
WUE_i	EfficiencE intrinsèque d’utilisation de l’eau
WUE_{inst}	EfficiencE instantanée d’utilisation de l’eau
WUE_p	EfficiencE d’utilisation de l’eau à l’échelle de la plante entière

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

1. Le peuplier

Les peupliers sont des Angiospermes Eucotylédones pérennes appartenant à la famille des Salicacées. Cette famille se divise en deux genres : le genre *Salix* qui regroupe plus de 350 espèces de saules et d'osiers et le genre *Populus* qui regroupe une trentaine d'espèces de peupliers réparties en 6 sections botaniques (*Abaso*, *Aigeiros*, *Leuroides*, *Populus*, *Tacamahaca* et *Turanga*) sur la base de critères morphologiques et écologiques (Dickmann & Kuzovkina 2008). Les phénomènes d'hybridations interspécifiques sont communs entre espèces d'une même section botanique, mais aussi possibles entre certaines espèces de sections différentes ; notamment celles des sections *Aigeiros*, *Tacamahaca* et *Leuroides* (Cagelli & Lefèvre 1995). Certains croisements sont toutefois impossibles comme *Populus alba* L. × *Populus nigra* L., d'autres sont unidirectionnels comme *Populus deltoides* Bart. ex Marsh. (♀) × *P. nigra* (♂) ou *Populus tremuloides* Mich. (♀) × *P. nigra* (♂) ou encore *Populus balsamifera* L. (♀) × *P. nigra* (♂).

L'aire naturelle du genre *Populus* couvre la quasi-totalité de l'hémisphère Nord. Aucun peuplier ne pousse à l'état spontané dans l'hémisphère Sud bien qu'il soit planté par l'Homme dans certaines régions de l'Argentine, du Chili et de l'Australie (Dickmann & Kuzovkina 2008). Le peuplier est une essence de pleine lumière qui se trouve essentiellement aux abords des cours d'eau et dans les zones humides, voire dans les vallées et plaines alluviales temporairement inondées. Quelques espèces comme *Populus euphratica* Oliv. et *Populus pruinosa* Schrenk de la section *Turanga* sont toutefois parfaitement adaptées aux conditions désertiques de par leur comportement phréatophyte.

En France, le peuplier fait partie intégrante du paysage et est présent au sein de deux 'compartiments' bien distincts.

a. Le 'compartiment cultivé' rassemble les espèces dédiées à la production de bois et celles à vocation ornementale comme *P. nigra* var. *italica* (peuplier d'Italie), facilement reconnaissable à sa silhouette fastigiée (Zsuffa 1974, Li 1996). La majorité des plantations sur le territoire français repose sur le déploiement d'un faible nombre de cultivars issus de l'hybridation interspécifique, sélectionnés essentiellement sur des critères de performance au champ (vigueur, résistance aux maladies, qualité du bois...) et pour la plupart issus de deux croisements, soit un croisement entre deux espèces nord-américaines (*P. deltoides* × *Populus trichocarpa* Torr. & Gray ; peupliers interaméricains), soit un croisement entre une espèce nord-américaine et une espèce eurasiatique (*P. deltoides* (♀) × *P. nigra* (♂) ; peupliers

euraméricains). La France est un acteur mondial majeur de la culture du peuplier avec 22 millions de m³ de bois sur pied et 1,5 millions de m³ de bois récolté par an. La France dispose des surfaces les plus importantes en Europe dédiées à cette sylviculture avec plus de 235 000 ha (Dickmann & Kuzovkina 2008).

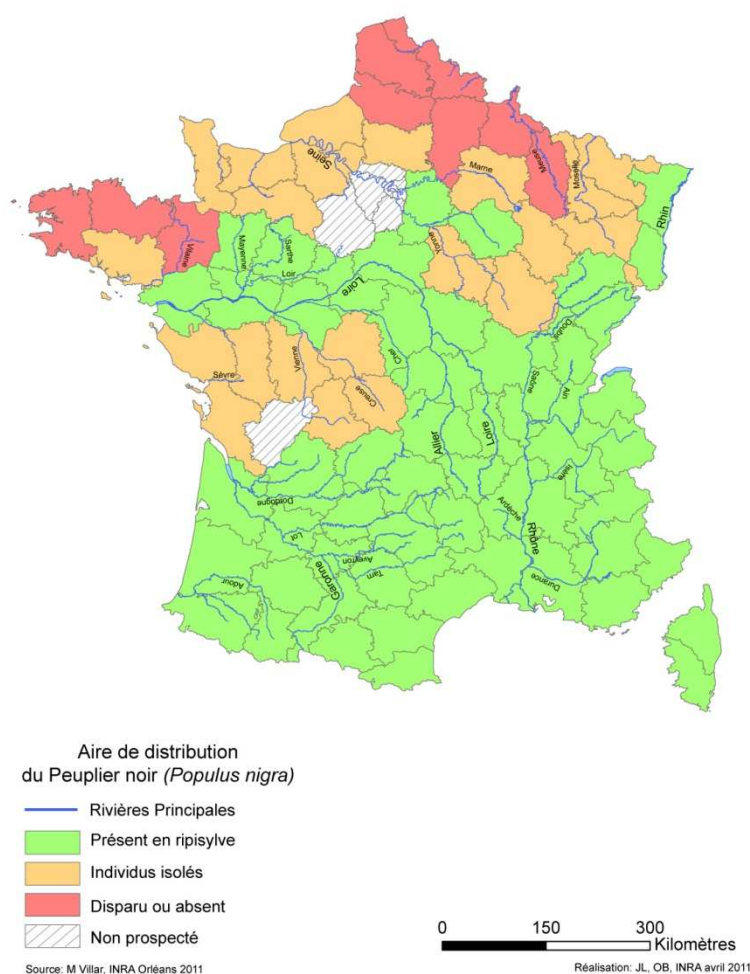


Figure IG1. Aire de distribution du peuplier noir (*Populus nigra* L.) en France.

b. Le '*compartiment sauvage*' inclut les espèces pures autochtones présentes à l'état spontané. Trois sont présentes en France : le peuplier blanc (*P. alba*), le peuplier tremble (*Populus tremula* L.) et le peuplier noir (*P. nigra*). Le peuplier blanc est un arbre de bord de cours d'eau, trouvé principalement dans les vallées méditerranéennes mais également dans le couloir rhodanien et le long du Rhin. Le peuplier tremble est un peuplier de type forestier présent dans la majorité de nos massifs. Le peuplier noir est parmi les trois, l'espèce la plus représentée sur notre territoire (**Fig. IG1**). Cette espèce d'importance centrale dans les programmes d'amélioration et de sélection des hybrides euraméricains, est également une espèce dominante et emblématique des cours d'eau français.

2. Le peuplier noir, espèce emblématique de la ripisylve

2.1. Peuplier noir et ripisylve

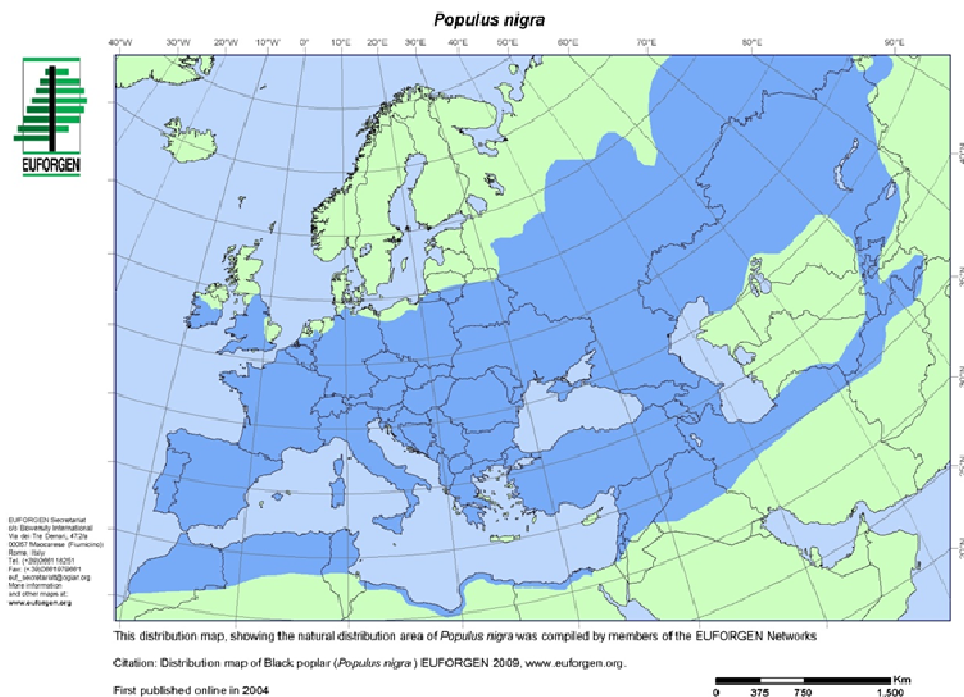


Figure IG2. Aire de distribution potentielle du peuplier noir (*Populus nigra* L.) tirée d'EUFORGEN 2009.

L'aire de distribution potentielle du peuplier noir s'étend de l'Europe de l'Ouest à l'extrémité Ouest de la Chine en passant par une étroite frange Nord-Africaine (**Fig. IG2**). *P. nigra* est l'espèce dominante de la ripisylve (**Encadré IG1**) et contribue fortement à la biodiversité remarquable que l'on peut rencontrer dans ces zones (**Encadré IG1**). *P. nigra* est également reconnu pour son rôle épurateur important dans l'amélioration de la qualité des eaux, notamment grâce à un système racinaire très développé qui joue le rôle de filtre naturel en piégeant certains polluants comme les phosphates et les nitrates d'origines agricole ou urbaine. Selon l'importance de la ripisylve (notamment sa largeur), la fonction épuratrice peut représenter de 37% à 100% de réduction de la charge en azote (Ruffinoni *et al.* 2003). En plus de ce rôle épurateur, le système racinaire du peuplier noir est un facteur déterminant dans la cohésion et la fixation des matériaux alluvionnaires. Ce complexe 'alluvions-système racinaire' est indispensable pour la protection et le maintien des berges vis-à-vis de l'érosion et donc crucial pour le maintien de la ripisylve (Brinkman 1974, Foussadier 2003, Rodrigues *et al.* 2007).

Encadré IG1 : La ripisylve: habitat du peuplier noir

Trait d'union entre l'eau et la terre, les formations végétales riveraines des cours d'eau communément appelées 'ripisylve' méritent d'être définies. D'un point de vue étymologique, « ripisylve » vient du latin '*ripa*' qui signifie rive et de '*sylva*' qui signifie forêt. Elle est composée de trois strates : herbacée, arbustive et arborescente, toutes inféodées à ce milieu humide particulier. La ripisylve présente de nombreux intérêts, notamment :

- ✓ Sur le plan écologique, la biodiversité rencontrée au sein de cet habitat singulier est exceptionnelle. Une multitude d'espèces à la fois faunistique et floristique y est inféodée. De nombreuses espèces y trouvent des conditions optimales pour s'y reproduire, s'y nourrir et s'y réfugier. La ripisylve sert aussi de corridor de migration pour la faune sauvage.
- ✓ Sur le plan économique, grâce à la présence de l'eau et des sols d'origine alluviale, les bords de cours d'eau sont des territoires très productifs. En plus du peuplier, les espèces ligneuses telles que le noyer, les érables, les frênes ou autres merisiers sont des colonisateurs potentiels, portant ainsi ce milieu vers une forte valeur économique. Cet espace peut également être considéré comme un réservoir génétique qui pourrait être susceptible de fournir des génotypes adaptés aux conditions locales telles que le sol ou le climat. Les ripisylves sont également reconnues économiquement intéressantes pour leur prévention face aux inondations (frein vis-à-vis des écoulements d'eau et des pics de crues).
- ✓ Sur le plan social, sûrement le plus méconnu, la ripisylve fait partie intégrante du patrimoine paysager des zones humides. Les paysages liés à l'eau sont parmi les plus attractifs, et ceci est directement lié à la présence de l'eau mais aussi de la végétation. La ripisylve participe activement à la qualité du cadre de vie.

Malgré l'importance que la ripisylve peut avoir, le constat est inquiétant. La ripisylve constitue le milieu naturel le plus menacé en France et en Europe. Dans ce contexte, 80% des rives de la Loire ont été classées en zone Natura2000 et 200 km de Loire ont été inscrits au titre des paysages culturels vivants sur la Liste du patrimoine mondial établie par l'UNESCO.

2.2. Biologie et cycle de régénération

Le peuplier noir est une espèce longévive, dioïque¹, fonctionnant en méta-population² et atteignant la maturité sexuelle à partir de 5-6 ans (Zsuffa 1974). Chez les arbres dits ‘anémogames’ comme le peuplier noir, le pollen est produit en grande quantité puis transporté par le vent jusqu’aux fleurs femelles au cours des mois de mars et avril. La distance parcourue par le pollen est difficile à évaluer, mais elle peut atteindre vraisemblablement plusieurs centaines de mètres voire plusieurs kilomètres (Rathmacher *et al.* 2010).

Six à huit semaines après fécondation débute la dissémination des graines qui selon la littérature ne constitue pas un facteur limitant pour le recrutement de l’espèce (Bessey 1904, Engstrom 1948, Walker *et al.* 1986, Virginillo *et al.* 1991, Van Splunder *et al.* 1995). Les fruits, des capsules ovoïdes à deux valves, libèrent les graines entourées d’un coton hydrophobe de fin avril à mi-juillet (Zsuffa 1974), ce dernier permettant une meilleure dispersion par le vent et une meilleure flottabilité lorsque la graine tombe sur les cours d’eau. A ce jour, la part respective du transport réalisé par le vent ou par l’eau est difficile à quantifier, tant elle dépend d’une multitude de facteurs climatiques (direction et force du vent), géomorphologiques (topographie et largeur du cours d’eau), hydrologiques (vitesse d’écoulement du cours d’eau) ou encore écologiques (densité de peupliers au sein de la ripisylve, hauteur des arbres, volume du houppier).

Le succès de la germination est lié à la concordance temporelle entre la dispersion des graines et l’existence de sites favorables mis à nus par les crues (substrats humides et sans végétation concurrente) (Noble 1979, Mc Bride & Strahan 1984, Bradley & Smith 1986, Walker *et al.* 1986, Van Splunder *et al.* 1995, Shafroth *et al.* 1998). Les graines ne peuvent en effet germer que sur des sédiments frais, mobilisés par la dynamique fluviale pendant les crues et apparaissant suite à l’abaissement du niveau de la nappe au printemps. Cette étape de germination, allant de quelques heures à quelques jours, intervient de mai à juillet selon la phénologie de libération des graines des individus femelles. Cette période clé a été qualifiée de fenêtre de recrutement (« recruitment box », Mahoney & Rood 1998).

¹ Espèce dont les fleurs mâles et les fleurs femelles sont portées par des individus différents

² Ensemble de populations locales liées par des flux des gènes

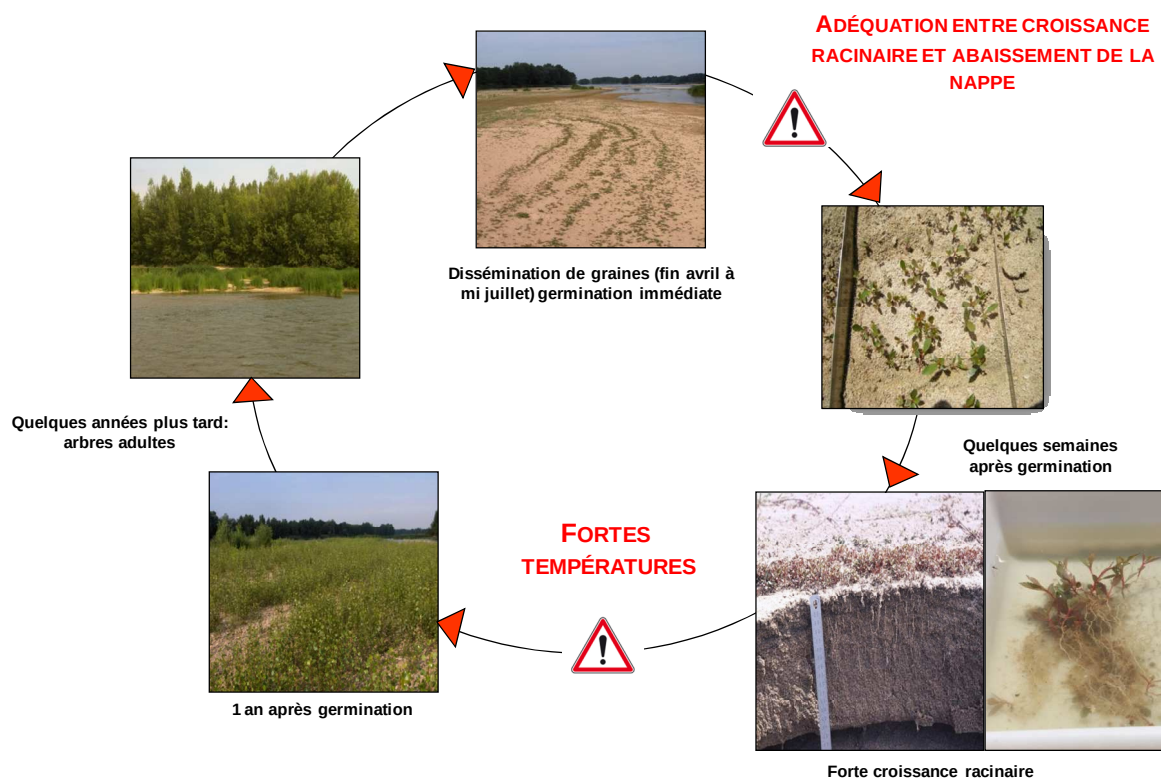


Figure IG3. Cycle de régénération du peuplier noir. Les deux étapes limitantes sont présentées en rouge.

La survie des jeunes semis après germination est étroitement dépendante de l'adéquation entre croissance racinaire et fluctuation du niveau de la nappe (Van Splunder *et al.* 1995, Barsoum & Hughes 1998, Guilloy-Froget *et al.* 2002, Rood *et al.* 2003, Stella & Batlles 2010) (**Fig. IG3**). Par conséquent, durant les premières semaines d'installation, le développement du système racinaire est généralement favorisé au détriment du développement de la partie aérienne (**Fig. IG3**) (Mahoney & Rood 1991, Virginillo *et al.* 1991, Segelquist *et al.* 1993, Guilloy-Froget *et al.* 2002, Stella & Battles 2010). A titre d'exemple, sur un site de Loire un mois après la germination, la partie racinaire centrale peut atteindre 9 cm alors que la pousse végétative n'est que de 2 à 3 cm (*cf.* **Chapitre 2.2**). Par ailleurs, les semis sont confrontés au passage de la période estivale accompagnée de fortes températures et d'une demande évaporative importante (**Fig. IG3**); dans les cas les plus extrêmes, des épisodes de sécheresses marqués peuvent se surajouter. De nombreux auteurs s'accordent à penser que la survie des semis lors de la première année constitue l'une des étapes les plus critiques pour le succès de l'installation (Cook 1979, McBride & Strahan 1984, Lee *et al.* 1991, Virginillo *et al.* 1991, Sacchi & Price 1992, Segelquist *et al.* 1993, Johnson 1994, Shafroth *et al.* 1995, Van Splunder *et al.* 1995, Rood *et al.* 1998, 2003, Stella & Batlles 2010).

Quelques années après l'installation, les individus atteignent leur maturité sexuelle et le cycle de régénération naturelle est ainsi perpétué (**Fig. IG3**). Si le principal mode de reproduction du peuplier noir est sexué et s'effectue suivant le modèle présenté ci-dessus, il est quand même important de souligner que le peuplier noir présente également un mode de multiplication végétative par l'intermédiaire de bouturage de rameaux et/ou par drageonnage de racines.

3. Menaces avérées et stratégies de conservation

Etant inféodé à la ripisylve, le peuplier noir n'échappe pas aux menaces que subit son habitat. Malgré son importance, la ripisylve est l'un des milieux naturels les plus menacés en France et en Europe (Heinze 1997, Lefèvre *et al.* 1998). Le peuplier noir est soumis à deux menaces majeures.

La première menace que subit le peuplier noir est d'ordre écologique et correspond à l'altération, la fragmentation et la réduction de son habitat engendrées par le développement de l'agriculture et des activités humaines (Dynesius & Nilsson 1994, Naiman *et al.* 2005). Les barrages hydroélectriques, les endiguements et chenalisations, l'extraction intensive de matériaux dans le lit mineur des rivières (avant 1994) ainsi que l'augmentation du prélèvement d'eau notamment pour l'irrigation des zones agricoles ont modifié le régime hydrologique des rivières et perturbé les cycles naturels d'érosion et de sédimentation (Pautou 1983, Dynesius & Nilsson 1994, Bravard *et al.* 1997, Scott *et al.* 1997, Rood *et al.* 1999, Nilsson & Berggren 2000, Steiger *et al.* 2001). Ces changements ont abouti à une réduction des surfaces favorables à la régénération (Rood & Mahoney 1990, Rood *et al.* 1995, Stromberg *et al.* 1996, Friedman *et al.* 1998, Johnson 1998, Scott *et al.* 2000). A titre d'exemple, dans le Nord-Ouest de l'Europe la régénération du peuplier noir a pratiquement disparu des grands fleuves comme le Rhin ou le Danube (Lefèvre *et al.* 1998). En France, le Rhin, le Rhône et la Seine constituent les zones les moins favorables à la régénération due à la canalisation de ces fleuves (Piégay *et al.* 2003, Schnitzler-Lenoble 2007).

La deuxième menace est liée au risque d'introgression depuis le compartiment cultivé, largement représenté sur le territoire, caractérisé par un niveau de diversité génétique extrêmement faible, et qui comprend : (i) les plantations d'ornement dominées par le peuplier d'Italie (clone mâle de peuplier noir) et (ii) les plantations de cultivars hybrides (Cagelli & Lefèvre 1995). Les risques réels et les conséquences de l'introgression sur la diversité

génétique des peuplements naturels de peuplier noir sont actuellement en cours d'évaluation à l'INRA d'Orléans (Bastien *et al.* 2009, Chenault *et al.* 2011) ; si le risque d'introgression est avéré, il pourrait conduire à une modification quantitative et qualitative de la diversité génétique du peuplier noir à plus ou moins long terme (Vanden Broeck *et al.* 2005).

Les deux menaces citées ci-dessus affectent respectivement la taille efficace et la composition génétique des populations, paramètres essentiels pour le maintien à long terme de la diversité génétique de l'espèce. Suite à la conférence ministérielle sur la protection des forêts en Europe (Strasbourg 1990), le peuplier noir a été identifié comme espèce prioritaire dans les programmes de conservation des ressources génétiques aussi bien au niveau national par la Commission Nationale des Ressources Génétiques Forestières (CRGF créée en 1991), qu'au niveau Européen par le réseau EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Network) (Villar *et al.* 2004, Villar & Forestier 2009). L'objectif principal de ces programmes est de conserver un 'pool' important de diversité génétique et de préserver les populations naturelles dans leur milieu d'origine (*in situ*). Le maintien de cette diversité est crucial pour l'espèce afin de maintenir le potentiel d'adaptation des populations face aux changements de l'environnement. Dans le cadre de ces programmes, deux stratégies de conservation complémentaires ont été retenues, la conservation *ex situ* et la conservation *in situ*. La conservation *ex situ* consiste à maintenir en pépinière ou en *populetum* une collection d'individus représentative de la diversité génétique ; en France, la collection nationale du peuplier noir comprend actuellement 350 génotypes et est conservée sous forme de parc à pieds mères à la pépinière forestière d'Etat de Guémené-Penfao (Loire-Atlantique). La conservation *in situ* permet de préserver le potentiel d'adaptation de l'espèce sur le long terme tout en le laissant évoluer dans son milieu naturel (Lefèvre *et al.* 2001) ; à ce jour, 46 populations naturelles dont 14 Réserves Naturelles Nationales sont impliquées dans le programme national de conservation des ressources génétiques du peuplier noir et 7 sont candidates comme unité de conservation *in situ* (charte de gestion en cours de signature).

Depuis 2002, le programme de conservation des ressources génétique du peuplier noir est conduit par l'Unité 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF) de l'INRA d'Orléans. Le niveau de diversité génétique au sein des populations naturelles ainsi qu'entre populations est évalué à l'aide de marqueurs moléculaires ; ces derniers sont neutres vis-à-vis de la sélection naturelle et reflètent l'histoire évolutive des populations. Par ailleurs, les populations sont également caractérisées pour des caractères adaptatifs tels que la croissance juvénile, la tolérance à la rouille foliaire, la phénologie de croissance et de

floraison ; ces caractères, dont la variabilité peut permettre à une espèce de s'adapter aux changements environnementaux, permettent de révéler une structuration géographique de la diversité et donc de possibles adaptations locales.

4. Modifications climatiques et menaces additionnelles

Les experts du Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) sont unanimes sur les modifications climatiques. Ils prédisent notamment une augmentation de la fréquence d'évènements extrêmes tels que les canicules, sécheresses, inondations et tempêtes (Meehl & Tebaldi 2004, Schär *et al.* 2004, IPCC 2007, Moatar *et al.* 2010). Canicules et sécheresses pourraient notamment représenter une menace additionnelle pour l'établissement et le maintien des populations de peuplier noir. Les arbres étant des organismes pérennes, la capacité d'adaptation des espèces dans un environnement changeant dépend à court terme de la plasticité phénotypique des individus et à moyen terme du niveau de diversité génétique des populations pour des caractères fonctionnels majeurs (Bradshaw 1965, Ackerly *et al.* 2000, Atkin *et al.* 2006, Parmesan 2006, Valladares *et al.* 2007, Bower & Aitken 2008). Dans ce contexte, plusieurs caractères fonctionnels pourraient nous permettre de prédire si l'espèce sera capable d'ajuster au mieux sa croissance tout en évitant/tolérant les contraintes estivales : (i) l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE), définie comme le rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau consommée pendant le même laps de temps ; (ii) la phénologie de la croissance principalement définie par les dates de débourrement et d'arrêt de croissance et par la cinétique de croissance ; et (iii) la thermotolérance ou température critique au-delà de laquelle le fonctionnement photosynthétique est altéré irréversiblement. Evaluer la variabilité génétique disponible pour ces caractères chez le peuplier noir, leur plasticité et mettre en évidence une structuration géographique de cette variabilité pourraient nous permettre d'évaluer le potentiel adaptatif de l'espèce face aux changements climatiques.

Depuis plus de 10 ans, la problématique de recherche de l'USC1328 INRA 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE) du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures de l'Université d'Orléans (LBLGC-EA 1207) consiste à développer une approche intégrative visant à identifier chez le peuplier les bases écophysiologiques et moléculaires impliquées dans les variations génétique et phénotypique de caractères complexes tels que le potentiel de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau, la thermotolérance et la tolérance à la sécheresse. Les travaux de recherche entrepris au

LBLGC sur les hybrides *P. deltoides* × *P. nigra*, *P. deltoides* × *P. trichocarpa* ou *P. trichocarpa* × *P. deltoides*, commercialisés en Europe ont fait l'objet de quatre thèses de doctorat (Marron 2000-2003, Monclus 2002-2006, Bonhomme 2005-2009, Fichot 2006-2010). Une forte variabilité génétique pour le potentiel de croissance, WUE et la tolérance à la sécheresse a déjà été mise en évidence, et ce quels que soient l'âge des arbres et l'environnement de croissance (serre - pépinière - peupleraie) (Marron *et al.* 2005, 2008, Monclus *et al.* 2005, 2006, 2009, Bonhomme *et al.* 2008, Fichot *et al.* 2010, 2011).

5. Objectifs de la thèse et stratégie expérimentale

Compte tenu de la complémentarité des thématiques de recherche de l'unité AGPF de l'INRA d'Orléans et de l'équipe ARCHE de l'Université d'Orléans, les travaux menés au cours de ce travail de thèse visent à acquérir une meilleure connaissance de la variabilité génétique de caractères potentiellement adaptatifs chez le peuplier noir dans un contexte de modifications climatiques. Parmi les caractères cités ci-dessus, nous avons décidé de focaliser nos efforts sur l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) car aucune étude ne fait état de la variabilité génétique existant pour ce caractère chez *P. nigra*. L'objectif général de cette thèse visait donc à étudier la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir (*P. nigra*) et la plasticité de ce caractère en réponse à des contraintes thermique et hydrique. Les objectifs spécifiques de cette thèse visaient à **(i)** quantifier la variabilité de WUE en conditions contrôlées et naturelles à partir de jeunes semis en cours d'installation et de trois populations naturelles françaises (Drôme ; Pyrénées-Orientales ; Loiret), **(ii)** à estimer la plasticité phénotypique de WUE en réponse à des contraintes hydrique et thermique et **(iii)** à juger des liens entre WUE, croissance et capacité de survie.

Afin d'apporter des éléments de réponses à ces objectifs, la variabilité de WUE a été étudiée à l'aide d'expériences réalisées à partir (1) de semis cultivés en conditions contrôlées (*ex situ*), (2) de semis installés dans leur milieu naturel (*in situ*), et (3) de génotypes provenant de trois populations naturelles françaises cultivés en plantations comparatives. La plasticité phénotypique en réponse à une contrainte thermique a été étudiée à partir de semis issus de graines récoltées en France et en Italie et cultivés en phytotrons ; le dispositif comprenait deux chambres, l'une maintenue à 25°C, l'autre à 43°C. La plasticité phénotypique en réponse à la contrainte hydrique a été étudiée à partir d'individus issus des trois populations installés en

plantations comparatives ; le dispositif expérimental comprenait deux parcelles jumelles, l'une régulièrement irriguée et l'autre non irriguée.

Ce manuscrit comprend trois chapitres. Le premier chapitre consiste en un bref état de l'art de WUE chez le peuplier. Le second concerne les études *ex situ* (conditions contrôlées) et *in situ* (conditions naturelles) relatives aux semis de *P. nigra* lors de leur première année d'installation. Le troisième concerne une étude sur populations naturelles de *P. nigra* installées en pépinière en plantations comparatives. A l'issue des trois chapitres, les principaux résultats acquis dans le cadre de ce travail sont restitués au regard des objectifs initiaux, et les perspectives de recherche les plus intéressantes sont enfin présentées.

CHAPITRE 1

Etat de l'art sur l'efficience d'utilisation de l'eau chez le peuplier

L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU : UN CARACTERE CLE POUR LA REGENERATION ET LE POTENTIEL ADAPTATIF DU PEUPLIER NOIR EN REPONSE AUX MODIFICATIONS DU CLIMAT ?

1. Définitions

Dans le domaine forestier, le terme d'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE, 'water-use efficiency') rend compte du rapport entre les flux entrants de carbone (gains) et les flux sortants de vapeur d'eau (perte) de la plante et permet par conséquent la connexion entre les cycles du carbone et de l'eau. L'efficacité d'utilisation de l'eau est un caractère complexe qui peut être appréhendé à plusieurs échelles. A l'échelle de la plante entière, WUE est définie comme le rapport entre la biomasse produite par la plante et l'eau qu'elle a consommée pendant le même laps de temps (WUE_p). A l'échelle de la feuille, elle est définie directement et de façon instantanée comme le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A , $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$) et la transpiration (E , $mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$) (WUE_{inst}). Sachant que E est le produit de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s , $mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$) et du déficit de pression de vapeur d'eau entre l'air et les chambres sous-stomatiques de la feuille, on définit l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i , $mmol CO_2 mol^{-1} H_2O$) comme le rapport entre A et g_s .

2. La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}C$) comme une estimation indirecte et intégrée de l'efficacité d'utilisation de l'eau

Les éléments primordiaux en biologie (carbone, azote, hydrogène, oxygène) peuvent exister dans la nature sous plusieurs formes, les isotopes, qui ne diffèrent que par leur nombre de neutrons et donc par leur masse atomique. Les isotopes stables ne permettent pas de dater des événements mais d'identifier des processus physico-chimiques et de caractériser des sources ayant une signature isotopique spécifique. Depuis plusieurs années, la volonté d'utiliser les isotopes stables s'est généralisée car cette technique constitue un outil très performant pour les recherches en écologie, physiologie, biologie et autres sciences environnementales (revues de O'Leary 1988, Griffiths 1996, Dawson *et al.* 2002). Dès 1939, Nier & Gulbransen ont constaté une variation d'abondance relative des isotopes stables du carbone dans la nature. A l'état naturel le carbone existe sous la forme de deux isotopes stables, un isotope léger (^{12}C) abondant dans le CO_2 atmosphérique (98,9%) et un isotope lourd (^{13}C) présent sous forme de trace (1,1%). L'inégalité de masse entre les deux isotopes stables du carbone engendre des

différences de propriétés physico-chimiques entre $^{13}\text{CO}_2$ et $^{12}\text{CO}_2$: énergie de liaison, température de fusion et de vaporisation, viscosité, vitesse de réaction...

Encadré 1.1 : La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$)

L'élément carbone a deux isotopes stables : ^{12}C et ^{13}C . La composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) d'un échantillon est exprimée en ‰ par rapport à un standard connu et invariant, la Pee Dee Belemnite (un fossile calcaire du Crétacé trouvé à Pee Dee en Caroline du Sud) dans le cas du carbone (Craig 1957) :

$$\delta_{\text{échantillon}} (\text{‰}) = [(R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 \quad (1)$$

où $R_{\text{échantillon}}$ et R_{standard} représentent le ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'échantillon et du standard, respectivement. La matière organique contenant moins de ^{13}C que le standard, les valeurs de δ sont négatives. La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}\text{C}$) est ensuite définie de la façon suivante (Farquhar & Richards 1984) :

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{échantillon}}) / [1 + (\delta_{\text{échantillon}} / 1000)] \quad (2)$$

où δ_{air} représente la composition isotopique en ^{13}C de l'air (environ égale à -8‰) et $\delta_{\text{échantillon}}$ représente la composition isotopique en ^{13}C de la matière organique foliaire.

Le $^{12}\text{CO}_2$ présentant un encombrement stérique moins important que le $^{13}\text{CO}_2$, il diffuse plus facilement depuis l'atmosphère vers les chambres sous stomatiques. Par ailleurs, au cours des processus enzymatiques dynamiques comme lors de la carboxylation, l'isotope léger ($^{12}\text{CO}_2$) est préférentiellement transformé (O'Leary *et al.* 1992). La conséquence directe est un appauvrissement en ^{13}C de la matière organique des feuilles par rapport à la composition isotopique de l'air. La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}\text{C}$) permet de quantifier cet appauvrissement (**Encadré 1.1**). C'est la rareté de l'isotope ^{13}C qui permet de déterminer avec précision la discrimination isotopique du carbone. Ces isotopes existent dans de telles proportions qu'il est possible d'en mesurer la quantité de manière très précise à l'aide d'un spectromètre de masse isotopique (IRMS pour Isotope Ratio Mass Spectrometer).

Encadré 1.2 : Relation entre efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i) et discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$)

Le modèle de photosynthèse proposé par Farquhar pour les plantes en C₃ (Farquhar *et al.* 1980, 1982, 1989, Farquhar & Richards 1984) comporte 5 termes décrivant chacun un processus influant sur $\Delta^{13}\text{C}$: (i) la diffusion à travers la couche limite, (ii) la diffusion à travers les stomates, (iii) la diffusion depuis les chambres sous-stomatiques jusqu'aux sites enzymatiques de la Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (RuBisCO), (iv) la carboxylation par la RuBisCO et (v) la photorespiration et la respiration liée au Cycle de Krebs. En règle générale, le modèle est simplifié en négligeant les processus de fractionnement liés aux points (i), (iii) et (v).

Connaissant les fractions molaires de CO₂ dans l'atmosphère (c_a) et au niveau des sites évaporant intercellulaires (c_i), $\Delta^{13}\text{C}$ peut être décrit en fonction du rapport c_i/c_a de la façon suivante :

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = a + (b - a) \times (c_i / c_a) \quad (3)$$

où a représente le coefficient de fractionnement isotopique lors de la diffusion du CO₂ au travers des stomates (~4,4‰ ; O'Leary 1981), et b représente le coefficient de fractionnement isotopique lors du processus de carboxylation par la RuBisCO (~27‰ ; Farquhar & Richards 1984).

Par ailleurs, l'assimilation nette de CO₂ (A) est fonction de la conductance stomatique au CO₂ (g_{CO_2}) et de la différence de concentration en CO₂ entre l'atmosphère et les chambres sous-stomatiques si bien que :

$$A = g_{\text{CO}_2} \times (c_a - c_i) \quad (4)$$

Or, sachant que la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) est 1,6 fois plus importante que celle de g_{CO_2} et en réarrangeant les équations (3) et (4), WUE_i et $\Delta^{13}\text{C}$ sont théoriquement reliés de façon négative et linéaire (Farquhar *et al.* 1982) :

$$\text{WUE}_i = A / g_s = (c_a / 1,6) \times ((b - \Delta^{13}\text{C}) / (b - a)) \quad (5)$$

Le lien entre WUE_i et $\Delta^{13}C$ peut être explicité au travers du modèle de photosynthèse proposé par Farquhar pour les plantes en C_3 (Farquhar *et al.* 1980, 1982, 1989, Farquhar & Richards 1984), lequel prédit une relation négative et linéaire entre $\Delta^{13}C$ et WUE_i (**Encadré 1.2**). Cette relation théorique a initialement été validée chez le blé (Farquhar & Richards 1984) et depuis chez les arbres (Meinzer *et al.* 1990, Zhang *et al.* 1994, Lauteri *et al.* 1997, Roupsard *et al.* 1998, Cregg *et al.* 2000, Ponton *et al.* 2002, Grossnickle *et al.* 2005) et notamment au sein du genre *Populus* (Ripullone *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004, Yin *et al.* 2005, Monclus *et al.* 2006, Soolanayakanahally *et al.* 2009, Fichot *et al.* 2010). Certaines études n'ont toutefois pas été en mesure de démontrer un tel lien (Sun *et al.* 1996, Picon *et al.* 1996, Froux *et al.* 2002) mais l'absence de relation est souvent due à une différence d'échelle d'intégration entre les mesures instantanées d'échanges de gaz et la mesure de $\Delta^{13}C$ qui est une mesure intégrée sur le pas de temps de développement de la feuille. En fait, WUE_i change au cours de la journée en fonction de l'activité physiologique et des conditions environnementales (température, différence de pression de vapeur entre la feuille et l'atmosphère, irradiance, ouverture stomatique) (Roupsard 1997, Roussel *et al.* 2009) ; les variations de l'assimilation nette de CO_2 et de la conductance stomatique peuvent être importantes sur la journée comme cela a déjà été montré chez le peuplier (Dickmann *et al.* 1992, Pathre *et al.* 1998) démontrant l'importance de la répétition des mesures d'échanges gazeux dans la journée ou sur plusieurs jours. L'imprécision sur la mesure des échanges gazeux est reconnue supérieure à celle sur la mesure d'abondance du ^{13}C dans les feuilles. De plus, des variations de conductance mésophyllienne au CO_2 (considérée comme infinie dans le modèle présenté ci-dessus) et des étapes de discrimination post-photosynthétiques peuvent également contribuer au bruit de fond parfois observé dans la relation $\Delta^{13}C$ - WUE_i (Keitel *et al.* 2003, Warren & Adams 2006). Toutefois, compte tenu de la relation linéaire et négative entre WUE_i et $\Delta^{13}C$, $\Delta^{13}C$ est généralement considéré comme un estimateur rétrospectif de WUE_i , reflétant directement le niveau de compromis réalisé entre la maximisation des gains associés à l'assimilation de CO_2 et la minimisation des pertes associées à la transpiration (Ehleringer 1993). La discrimination isotopique est donc utilisée soit comme indicateur des processus physiologiques et des conditions environnementales prévalant lors de l'assimilation de CO_2 (Ehleringer 1988, 1993), soit comme outil de comparaison de WUE_i entre génotypes ou populations sous des conditions environnementales similaires (DeLucia & Schlesinger 1991, Bonal *et al.* 2000, Brendel *et al.* 2002, Ponton *et al.* 2002, Marron *et al.* 2005, Turner *et al.* 2010). La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 présente une grande variabilité

interspécifique et est de ce fait souvent utilisée comme marqueur de différenciation d'espèces du même genre (Guehl *et al.* 1998, Bonal *et al.* 2000, Ponton *et al.* 2001). De larges différences de $\Delta^{13}\text{C}$ ont été trouvées entre différentes provenances d'une même espèce (Zhang *et al.* 1993, Guehl *et al.* 1995, Lauteri *et al.* 1997, Roupsard *et al.* 1998, Brendel *et al.* 2002). De nombreux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer A et/ou g_s sont susceptibles d'influencer WUE_i et $\Delta^{13}\text{C}$ tels que l'irradiance (Farquhar *et al.* 1989, Zimmerman & Ehleringer 1990, Israeli *et al.* 1996), la disponibilité en eau du sol (Farquhar & Richards 1984, Zhang *et al.* 2004, Monclus *et al.* 2006, Bonhomme *et al.* 2008), l'humidité relative (Madhavan *et al.* 1991), la concentration en CO_2 de l'air (Guehl *et al.* 1994, Picon *et al.* 1996), la teneur en azote (Ripullone *et al.* 2004), la température (Craufurd *et al.* 1999)...

3. Variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ au sein du genre *Populus*

L'essentiel des travaux réalisés sur la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ chez le peuplier a été effectué à partir des hybrides interspécifiques *P. deltoides* $\times$ *P. nigra* (Ripullone *et al.* 2004, Marron *et al.* 2005, Monclus *et al.* 2005, 2006, Voltas *et al.* 2006, Bonhomme *et al.* 2008, Dillen *et al.* 2008), *P. trichocarpa* $\times$ *P. deltoides* (Rae *et al.* 2004, Bonhomme *et al.* 2008) et *P. deltoides* $\times$ *P. trichocarpa* (Dillen *et al.* 2008, Monclus *et al.* 2009) ; la caractérisation à large échelle de $\Delta^{13}\text{C}$ chez les hybrides et de ses liens avec la productivité et la tolérance à des sécheresses modérées était particulièrement justifiée dans un contexte agronomique. Une large gamme de variation génotypique a été mise en évidence quel que soit le fond génétique. Toutefois, les bases physiologiques à l'origine de la variation pour WUE_i et $\Delta^{13}\text{C}$ diffèrent entre fonds génétiques ; chez *P. deltoides* $\times$ *P. nigra*, la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ est principalement contrôlée par des variations de g_s (Monclus *et al.* 2006) alors que chez *P. deltoides* $\times$ *P. trichocarpa*, elle est essentiellement sous le contrôle de A (Monclus *et al.* 2009). Par ailleurs, aucun lien entre $\Delta^{13}\text{C}$ et productivité n'a pu être observé ni chez *P. deltoides* $\times$ *P. nigra* (Marron *et al.* 2005, Monclus *et al.* 2005, 2006, Voltas *et al.* 2006, Bonhomme *et al.* 2008) ni chez *P. trichocarpa* $\times$ *P. deltoides* (Rae *et al.* 2004, Bonhomme *et al.* 2008) suggérant ainsi la possibilité de sélectionner des génotypes à la fois efficaces pour l'utilisation de l'eau et productifs chez ces formules hybrides. Toutefois, une corrélation positive entre $\Delta^{13}\text{C}$ et productivité a été mise en évidence en conditions hydriques non-limitantes au sein d'une descendance F_1 de *P. deltoides* $\times$ *P. trichocarpa* (Monclus *et al.* 2009), la relation WUE -productivité est donc également fonction du fond génétique. Enfin, aucun lien direct n'a pu

être mis en évidence entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la capacité à limiter la chute de production de biomasse en conditions hydriques limitantes (*i.e.* la tolérance à la sécheresse) ni chez les hybrides *P. deltoides* × *P. nigra* (Monclus *et al.* 2006) ni chez les hybrides *P. deltoides* × *P. trichocarpa* (Monclus *et al.* 2009).

Si les études concernant la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ sont bien documentées chez les peupliers hybrides, elles le sont beaucoup moins sur les populations naturelles. Les études portant sur des populations naturelles de peuplier utilisent souvent $\Delta^{13}\text{C}$ comme indicateur de WUE ; la caractérisation à large échelle de $\Delta^{13}\text{C}$ dans un contexte écologique est davantage justifiée pour la mise en évidence de structurations géographiques et d'adaptations locales. Une importante gamme de variabilité pour $\Delta^{13}\text{C}$ comprise entre 1‰ et 4‰ selon les études a été rapportée chez *Populus fremontii* Wats (Sparks & Ehleringer 1997, Leffler & Evans 2001), *Populus angustifolia* James (Sparks & Ehleringer 1997), *P. trichocarpa* (Gornall & Guy 2007), *Populus cathayana* Rehd (Xu *et al.* 2008), *Populus davidiana* Dode (Zhang *et al.* 2004) et *P. balsamifera* (Soolanayakanahally *et al.* 2009). Chez *P. fremontii* et *P. angustifolia*, des corrélations négatives $\Delta^{13}\text{C}$ - altitude ou $\Delta^{13}\text{C}$ - concentration en azote foliaire ont été observées, suggérant que la variabilité observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ est principalement contrôlée par des différences de capacité photosynthétique (Sparks & Ehleringer 1997). Un récent travail sur *P. balsamifera* a montré que la variabilité pour $\Delta^{13}\text{C}$ entre 21 provenances était davantage contrôlée par des variations de la conductance interne du mésophylle foliaire au CO_2 que par des variations de conductance stomatique et d'assimilation nette de CO_2 (Soolanayakanahally *et al.* 2009). Au contraire, Gornall & Guy (2007) n'ont pas pu mettre en évidence de liens entre $\Delta^{13}\text{C}$ et les variables climatiques chez *P. trichocarpa* et expliquent l'absence de différences entre les populations pour $\Delta^{13}\text{C}$ par le fait que la conductance stomatique et l'assimilation nette de CO_2 co-varient. Chez *P. angustifolia*, Leffler & Evans (2001) ont également mis en évidence une relation négative entre $\Delta^{13}\text{C}$ et l'altitude, mais aussi une relation positive entre $\Delta^{13}\text{C}$ et les précipitations, suggérant une chute de la conductance stomatique lorsque les précipitations sont faibles. Une diminution des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à une diminution de la ressource en eau traduisant une fermeture des stomates a été mise en évidence chez *P. davidiana* (Zhang *et al.* 2004, 2005), chez *Populus kangdingensis* C Wang & Tung (Yin *et al.* 2005), chez *P. cathayana* (Xu *et al.* 2008, Lu *et al.* 2009) et *P. balsamifera* (Soolanayakanahally *et al.* 2009). Stella & Battles (2010) montrent que les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ chez des semis de *P. fremontii* diminuent avec l'éloignement de la nappe phréatique suggérant une fermeture des stomates pour limiter les pertes en eau. A ce

jour, aucun travail concernant la variabilité pour $\Delta^{13}\text{C}$ au sein de populations naturelles de *P. nigra* n'a été entrepris.

CHAPITRE 2

Variabilité de l'efficienne d'utilisation de l'eau chez des semis de *Populus nigra* L.

INTRODUCTION

La régénération naturelle constitue une étape déterminante dans la transmission du 'pool' génétique. La dissémination des graines est souvent synchrone avec la période de récession des débits des cours d'eau ; le succès de l'établissement dépend par la suite de l'adéquation entre vitesse de déclin de la nappe et vitesse de croissance racinaire, cette dernière restant généralement inférieure à 4 cm/jour (Mahoney & Rood 1991, Segelquist *et al.* 1993, Mahoney & Rood 1998, Stella *et al.* 2010, Stella & Battles 2010). L'adéquation entre croissance racinaire et abaissement du niveau de la nappe constitue une première étape limitante pour la régénération chez *P. nigra* (Guilloy-Froget *et al.* 2002).

Au début de l'été, les jeunes semis installés ne dépassent pas quelques centimètres. Au cours de cette période, leur appareil aérien demeure à proximité de la surface sableuse et est par conséquent sujet à de fortes températures. Nos mesures ont démontré que la température de l'air pouvait atteindre jusqu'à 38°C pour des températures au sol de plus de 50°C. L'augmentation des températures estivales (IPCC 2007) pourrait donc devenir un deuxième facteur limitant la régénération de *P. nigra* en exerçant une pression de sélection sur les semis au cours de l'installation.

Dans un contexte de survie, la capacité à maintenir la température de l'appareil aérien dans les limites de fonctionnement pourrait être un facteur clé. Sous l'effet du rayonnement solaire, l'eau liquide arrivant dans les chambres sous-stomatique est vaporisée ; cette émission de vapeur d'eau dans l'atmosphère, également appelée transpiration, permet notamment d'éliminer l'excédent d'énergie emmagasinée et donc de limiter les fortes hausses de température à la surface des feuilles *via* un processus de 'cooling'. Le taux de transpiration intègre fondamentalement deux composantes. L'une propre à la plante, la conductance stomatique à la vapeur d'eau, reflète la facilité avec laquelle la vapeur d'eau peut diffuser depuis les chambres sous-stomatiques vers l'extérieur ; elle dépend essentiellement du degré d'ouverture des stomates et de leur densité. L'autre propre à l'environnement (et donc non modulable par la plante), le déficit de pression de vapeur d'eau entre la chambre sous stomatique et l'atmosphère (VPD), reflète la demande évaporative ; il dépend essentiellement du taux d'humidité et de la température ambiants. Par conséquent, pour un VPD donné, le maintien d'une forte conductance stomatique est certainement crucial pour la régulation de la température de l'appareil aérien. Sachant que l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i) est définie comme le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), une forte conductance stomatique est généralement associée

à une faible WUE_i . Une faible WUE_i est par ailleurs associée à une forte discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}C$) compte tenu de la relation linéaire et négative démontrée entre les deux caractères (**Chapitre 1**). Dans ce contexte, nous posons comme hypothèse que le potentiel de survie des semis est lié à une faible efficacité d'utilisation de l'eau et donc que les semis de *P. nigra* les plus aptes à survivre sous de fortes températures sont ceux qui présentent les plus fortes valeurs de $\Delta^{13}C$.

Afin de tester cette hypothèse, deux approches expérimentales complémentaires ont été retenues. Tout d'abord, une expérience en conditions contrôlées (*ex situ*) a été réalisée en chambres de croissance dans le but d'isoler le facteur 'température' et de s'affranchir des interactions environnementales extérieures complexes ; cette approche *ex situ* a permis de quantifier la variabilité pour WUE et la plasticité en réponse à de fortes températures chez des semis de *P. nigra*. Ensuite, une expérience en milieu naturel (*in situ*) a été réalisée dans le but de se rapprocher des conditions naturelles dans lesquelles s'établissent les semis de *P. nigra* ; cette approche *in situ* a permis de quantifier la variabilité pour WUE chez des semis de *P. nigra* dans leur milieu d'origine et de juger de leur capacité de survie au cours de la période estivale. Ces deux approches sont présentées dans deux sous-chapitres distincts : l'approche *ex situ* constitue le **Chapitre 2.1** et l'approche *in situ* le **Chapitre 2.2**. Le **Chapitre 2.1** est présenté sous forme d'article scientifique soumis pour publication au journal *Oecologia* ; le **Chapitre 2.2** est présenté sous forme académique. Une synthèse de l'ensemble des résultats est présentée à la fin de ce chapitre.

CHAPITRE 2.1

**Variabilité de l'efficienne d'utilisation de l'eau chez
des semis de *Populus nigra* L.**

~

Approche ex situ

Variabilité de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 et plasticité en réponse à une augmentation de température chez des semis de peuplier noir

Sylvain Chamaillard, Marc Villar, Régis Fichot, Franck Brignolas & Cécile Vincent-Barbaroux

Soumis pour publication à la revue Oecologia le 24 Février 2011

PRESENTATION SYNTHETIQUE DE L'ARTICLE

- **Contexte.** Dans le contexte climatique actuel, l'augmentation des températures estivales pourrait d'ici quelques décennies devenir un facteur limitant la régénération du peuplier noir. La capacité à maintenir la température de l'appareil aérien dans les limites de fonctionnement pourrait constituer un facteur clé pour la survie des jeunes semis installés. Nous posons comme hypothèse de travail que les semis les plus aptes à survivre sous de fortes températures seraient ceux qui présentent la plus forte discrimination vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$).
- **Objectifs.** Les objectifs spécifiques de ce travail étaient (i) de quantifier la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ chez des semis de *P. nigra*, et (ii) de juger de l'impact d'une augmentation de température sur $\Delta^{13}\text{C}$ et d'évaluer le lien potentiel entre $\Delta^{13}\text{C}$ et capacité de survie.
- **Stratégie.** L'étude a été réalisée en chambre de croissance sur 800 semis issus de graines collectées sur 16 arbres femelles : huit arbres installés en France le long de la Loire au sein de la Réserve Naturelle Nationale de Saint-Mesmin, et huit arbres femelles installés en Italie le long de la rivière Paglia. Les 800 semis ont été élevés en godets pendant 40 jours dans deux chambres de croissance à une température constante de 25°C et une photopériode 16-8. Après 40 jours de croissance (t_1) lorsque les semis présentaient au moins six feuilles, la température de l'une des chambres a été maintenue à 25°C (contrôle) alors que la température de la seconde chambre a été progressivement augmentée ; l'expérience a été stoppée dès l'apparition des premiers symptômes de flétrissement, lorsque la température atteignait 43°C, c'est-à-dire 17 jours après le début de l'augmentation de la température (t_2). Quelle que soit la chambre de croissance, tous les semis ont été maintenus à la capacité au champ tout au long de l'expérience. $\Delta^{13}\text{C}$ et ses

composantes structurales associées (surface foliaire massique, SLA ; teneurs massiques en azote et en carbone, N_M et C_M respectivement) ainsi que la hauteur des semis ont été mesurés sur tous les semis aux dates t_1 et t_2 et dans les deux chambres de croissance.

- **Résultats.** A t_1 une gamme de variabilité d'environ 4‰ pour $\Delta^{13}C$ a pu être observée quelque soit la provenance considérée. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux provenances alors qu'un effet femelle significatif a été détecté, suggérant que les variations de $\Delta^{13}C$ étaient dans notre cas davantage influencées par le fond génétique que par l'histoire évolutive des populations. A t_2 , en réponse à l'augmentation de température, une augmentation moyenne des valeurs de $\Delta^{13}C$ (0,5‰) a été enregistrée en comparaison des valeurs observées en condition témoin ; cette augmentation n'était cependant ni provenance- ni femelle-dépendante. De plus, 39,5% des semis ayant subi l'augmentation de température présentaient à t_2 des symptômes de flétrissement ; la mise en relation du phénotype foliaire avec les valeurs intrinsèques de $\Delta^{13}C$ observées à t_1 (c'est-à-dire avant l'augmentation de température) a indiqué que les individus non flétris présentaient des valeurs de $\Delta^{13}C$ significativement plus fortes que les individus flétris d'environ 0.5‰ en moyenne. Par ailleurs, indépendamment des facteurs température et provenance, nos résultats ont également démontré (i) une diminution des valeurs de $\Delta^{13}C$ entre t_1 et t_2 d'environ 2‰, (ii) une relation significative et positive entre $\Delta^{13}C$ et le SLA ou N_M , et (iii) une relation significative et négative entre $\Delta^{13}C$ et la hauteur.

- **Conclusions.** A notre connaissance, cette étude est la première à caractériser la variabilité de $\Delta^{13}C$ chez de jeunes semis de peuplier noir. Nos résultats indiquent notamment de très fortes variations intra-provenance mais aucune différence significative n'a pu être observée entre provenance, un résultat à toutefois modérer compte tenu du fait que seulement deux provenances ont été considérées. Par ailleurs, les liens observés entre $\Delta^{13}C$, croissance et survie de l'appareil foliaire suggèrent que les semis présentant une plus faible efficacité d'utilisation de l'eau ainsi qu'une plus faible croissance juvénile pourraient s'avérer être de meilleurs compétiteurs lorsque la demande évaporative est forte mais la ressource en eau non limitante ; ces liens pourraient avoir une conséquence directe sur la structuration génétique des populations futures si les conditions de température en milieu naturel s'avèrent de plus en plus contraignantes.

Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination among *Populus nigra* L. seedlings and relationship with leaf survival under elevated temperature

SYLVAIN CHAMAILLARD^{1,2,3} · MARC VILLAR³ · REGIS FICHOT^{1,2,3}# · FRANCK BRIGNOLAS^{1,2*} · CECILE VINCENT-BARBAROUX^{1,2}

¹ Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, UPRES EA 1207 'Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures' (LBLGC), rue de Chartres, BP 6759, F-45067 Orléans, France

² INRA, USC1328 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE), rue de Chartres, BP 6759, F-45067 Orléans, France

³ INRA, UR588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF), Equipe Génétique, Centre de Recherche d'Orléans, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans, France

Present address: University of Antwerp, Research Group of Plant and Vegetation Ecology (PLECO), Department of Biology, Campus Drie Eiken, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium

*Author to whom correspondance should be addressed:

Franck Brignolas

¹ Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, UPRES EA 1207 'Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures' (LBLGC), BP 6759, F-45067, Orléans, France, ² INRA, USC1328 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE), BP 6759, F-45067, Orléans, France

Phone: +33 (0)2 38 49 48 02

Fax: +33 (0)2 38 49 40 89

Email: franck.brignolas@univ-orleans.fr

ABSTRACT

The objectives of this study were to (i) evaluate the variations in bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) of 1- to 2-months-old *P. nigra* L. seedlings among and within two European populations originating from France and Italy, and (ii) investigate the effect of increasing temperature on $\Delta^{13}\text{C}$ and the relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and leaf survival. Seeds from sixteen open-pollinated female trees (eight for each provenance) were allocated to two growth chambers and were first grown for 40 days at 25°C (t_1). The temperature of one of the two chambers was then gradually increased for 17 days up to 43°C and the experiment was stopped (t_2). At t_1 , important within-population variations were observed for $\Delta^{13}\text{C}$ (ca. 4‰). Variations among the two provenances were not significant but they were female-dependant suggesting that observed $\Delta^{13}\text{C}$ variations were more influenced by the genetic background rather than by life history of the two populations. At t_2 , in response to increasing temperature, $\Delta^{13}\text{C}$ values were significantly increased by 0.5‰ on average as compared to the control; the increase was however neither provenance- nor female-dependant. In addition, 39.5% of the seedlings started to show wilting symptoms on the first top leaves while the other 60.5% remained healthy, and seedlings exhibiting the healthy phenotype exhibited higher $\Delta^{13}\text{C}$ values of ca. 0.5‰ on average than those exhibiting the wilted phenotype. The ecological implications of these results for seedlings recruitment and *P. nigra* population dynamics are further discussed in the context of a future changing climate regime.

Key words: black poplar, seedlings, growth chamber, water-use efficiency, temperature

INTRODUCTION

Populus nigra L. is a key pioneer tree species colonizing alluvial soils along large rivers in temperate climatic zones of Europe, northern Africa and western Asia (Dickmann & Kuzovkina 2008). Combined with other tree species such as willows, *P. nigra* forms riparian forests which have been designated priority habitats in the Europe's Natura2000 conservation strategy (EU Habitats Directive, EC, 1992). European river systems have been however heavily modified during the last decades by anthropogenic factors, causing significant threat to riparian species and communities. Regarding *P. nigra*, fragmentation of its native habitat (Naiman *et al.* 2005) as well as hybridization from domestic poplars (including the widespread Lombardy poplar *P. nigra* cv. *Italica*) are generally recognized as the two main threats upon genetic diversity and adaptive potential (Vanden Broeck *et al.* 2005). In this context, national programs for the conservation of *P. nigra* genetic resources have been therefore established to preserve the long-term survival of populations, and all merge in the European Forest Genetic Resources Network (EUFORGEN) (Lefèvre *et al.* 2001, Villar & Forestier 2009).

Consequences of global change such as enhanced amplitude of water table fluctuations and increased frequency of summer heat waves (IPCC 2007) may impact riparian forest ecosystems and place an additional threat upon the establishment and the long-term survival of riparian species, including *P. nigra*. The establishment of *P. nigra* seedlings starts with the dissemination of cottony seeds through wind and water from mid-May to end-June (Guilloy-Froget *et al.* 2002) and germination success is then tightly dependent upon soil characteristics and water table level (Barsoum & Hughes 1998, Guilloy-Froget *et al.* 2002). Afterwards, once germination occurs on moist bare soil, the small leafy seedlings have to face two major challenges, *i.e.*, (i) co-ordinating root growth with the rapid receding of water table and (ii) surviving high summer temperatures with high radiation load (up to 50°C, Chamaillard *et al.*

unpublished data). If the first process has already been documented (Barsoum & Hughes 1998, Guilloy-Froget *et al.* 2002), the impact of elevated temperatures on the physiology and the survival of *P. nigra* seedlings remains so far unexplored.

The control of leaf transpiration may have important implications for seedlings survival against high temperatures through the process of leaf cooling, thereby allowing the maintenance of a functional photosynthetic apparatus. Water loss from leaves is fundamentally controlled by stomatal conductance (which is a function of the size, the density and the degree of stomata opening) and boundary layer conductance (which is a function of leaf size, leaf morphology and wind speed) operating in series; however, in the case of seedlings with very small leaves, we might assume that stomatal conductance is the main driver of leaf transpiration (Nobel 1999). As a consequence, under high temperature and all other environmental parameters being equal (irradiance, vapour pressure deficit and non-limiting water availability), maintaining a high stomatal conductance may be a prerequisite for seedling survival. However, stomatal aperture not only controls water vapour exchange but also the diffusion of CO₂ into the leaf, thus influencing the ratio of leaf internal to external CO₂ concentration (c_i/c_a) and leaf intrinsic water use efficiency (WUE_i, the ratio of net assimilation rate to stomatal conductance). Large differences in leaf c_i/c_a and WUE_i exist among C₃ plant species (*e.g.*, Cernusak *et al.* 2008), and since carbon isotope discrimination against ¹³C ($\Delta^{13}\text{C}$) has been shown to correlate positively with c_i/c_a and negatively with WUE_i in C₃ plant leaves (Farquhar *et al.* 1982, Farquhar & Richards 1984), the analysis of the ¹³C/¹²C ratio in plant organic material has played a central role in water-use efficiency research (Bacon 2004).

In this study, we evaluated the variability of leaf physiological and growth performances of *P. nigra* seedlings in relation to high temperatures. Using $\Delta^{13}\text{C}$ as a time-integrated measure of WUE_i and accounting for the linear and negative relationship already

observed between $\Delta^{13}\text{C}$ and WUE_i in poplar (Ripullone *et al.* 2004, Monclus *et al.* 2006), we hypothesized in particular that the ability of *P. nigra* seedlings to survive high temperature is positively related with $\Delta^{13}\text{C}$. The specific objectives were to (1) quantify the variability of $\Delta^{13}\text{C}$ and related traits among *P. nigra* seedlings, and (2) assess the plasticity of $\Delta^{13}\text{C}$ in response to increasing temperature and investigate the relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and leaf survival. These objectives were addressed using 800 seedlings grown under two contrasting temperature regimes and originating from seeds collected on 16 open-pollinated female trees at two geographical provenances (one site along the Loire river in France vs. one site along the Paglia river in Italy).

MATERIALS AND METHODS

Origin of plant material and experimental design

Eight open-pollinated female trees growing along the Loire river (National Natural Reserve of Saint-Mesmin, Loiret, France) and eight open-pollinated females trees growing along the Paglia river (Plain of Rena, Umbria, Italy) were selected at random and were used as a source of seeds for this study. The Loire is a long river (1020 km) partially regulated with the flow regime varying from $10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in summer up to $2000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ during flooding periods (mean annual flow of $350 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) in the area of seed collection. The Paglia is a small river (86.5 km) with a natural flow regime following closely the precipitation pattern ($0.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in summer, $800 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ during flooding periods, mean annual flow of $12.4 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). Climate data of each source habitat were provided by Météo-France for the French site and by Servizio Meteorologico for the Italian site, using the closest meteorological station (**Table 2.1.1**). For each provenance, seeds were collected during the second week of May-2008 and were brought back to the INRA Research Unit of Forest Genetics of Orléans (Loiret, France), the location of the experiment.

Table 2.1.1 Location, coordinates and climatic data of the two provenance sites. Climate data were obtained from the closest meteorological station and are presented for the 30-years normal (not available for the same period at the two sites).

Site	Latitude	Longitude	Year	Mean temperature (°C)				Cumulative precipitation (mm)			
				March to May	June to August	September to November	Annual mean	March to May	June to August	September to November	Annual mean
France	47°51'48"N	1°48'09" E	1971-2000	10.0	15.4	11.4	10.9	163	99	174	636
Italy	42°48'46 N	11°47'22" E	1961-1991	11.3	20.9	14.4	13.1	110	86	238	728

The progenies were grown in two growth chambers. At the beginning of the experiment (16-May-2008), two seeds per pot were planted in 250 cm³-pots containing a perlite-peat mixture (3:2 v/v, fertilized with NPK 14:16:18 at 0.5 kg m³) and were watered to field capacity every day with pots' base kept in water using collecting trays; two weeks after germination, only one seedling per pot was retained for the experiment (Pliura & Eriksson 2002). For each female tree, 48 seedlings were then used and 24 were allocated to each chamber in which a random block design with eight blocks was set up, each block including three seedlings of each female tree.

Growth conditions and treatments

All seedlings from the two growth chambers were maintained under similar growth conditions for a period of 40 days (constant temperature 25°C; photoperiod day-night 16-8). All pots were placed on tablets with modulating height in order to keep the distance between the light source and the top of seedlings constant. In each chamber, ambient air temperature (T, °C), relative humidity (RH, %) and irradiance (I, $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) were recorded for each climatic chamber every 15 minutes using a HOBO data logger (Onset Corp., Pocasset, MA, USA) during the growth period; data obtained in the two growth chambers for T ($24.74 \pm 0.03^\circ\text{C}$ vs. $25.17 \pm 0.02^\circ\text{C}$), RH ($58.90 \pm 0.12\%$ vs. $59.65 \pm 0.15\%$) and I ($95.3 \pm 1.1 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ vs. $104.2 \pm 1.2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) did not show important deviations and we assumed that these differences were small enough to be neglected. On 26-June, the temperature of one of the two chambers was increased by 5°C every four days until a maximum of 43°C was reached (08-July-2008) while the temperature of the other climatic chamber was maintained at 25°C and served as a control. Regardless of the climatic chamber, all seedlings were maintained watered to field capacity all along the experiment. On 12-July, when the apex and the first top leaves of the seedlings started to show wilting symptoms, the experiment was stopped; at this

time, 39.5% of the seedlings exhibited a wilted phenotype, while the other 60.5% exhibited a healthy phenotype.

Growth, carbon isotope discrimination and related leaf traits

Seedlings' height (cm) was monitored for all seedlings once on 26-June at 25°C for both chambers (t_{1-25}) and once again on 12-July at 25°C (t_{2-25} , first chamber) and 43°C (t_{2-43} , second chamber). At the same times and for each seedling, one healthy mature leaf (foliar rank 5 counting from the top of seedling) was collected for subsequent leaf trait measurements; note that the leaves sampled on 12-July inside the 43°C chamber were formed during the temperature constraint. After sampling, each leaf was scanned to assess leaf area and dried at 60°C during 48h; leaf dry mass was then recorded and used to compute specific leaf area (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$). Leaves were then ground to a fine powder for the analysis of carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$). One milligram sub-samples of ground material were enclosed in tin capsules and combusted; the CO_2 produced by combustion was purified and the $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratio was analysed with a Finnigan MAT Delta S isotope ratio mass spectrometer (IRMS) (Bremen, Germany). Carbon isotope composition was expressed relative to the Pee Dee Belemnite (PDB) standard and was calculated as in Craig (1957):

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 (\text{‰})$$

where R_{sample} and R_{standard} are the $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratios of the sample and the standard, respectively (Farquhar *et al.* 1989). All analyses were performed at the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at the INRA-NANCY 1137 Forest Ecology and Ecophysiology Unit. The accuracy of $\delta^{13}\text{C}$ measurements during the time samples were passed on the IRMS was $\pm 0.03\text{‰}$ (standard deviation). The carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) between

atmospheric CO₂ (δ_{air}) and plant material (δ_{plant}) was then calculated according to Farquhar & Richards (1984) as:

$$\Delta^{13}\text{C} = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plant}}) / (1 + (\delta_{\text{plant}} / 1000))(\text{‰})$$

Because air flow in the two growth chambers was continuously renewed using air from the outside, the isotopic composition of the air surrounding seedlings was assumed to be similar in the two growth chambers ($\delta_{\text{air}} = -8\text{‰}$). Carbon and nitrogen concentrations of the same samples that those used for $\Delta^{13}\text{C}$ analyses were obtained with a Carlo Erba NA1500 elemental analyser (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy) coupled to the IRMS and were expressed on a dry mass basis (C_M and N_M , mg g⁻¹).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the R software (Version 2.10.1, A Language and Environment Copyright, 2007). Means are presented with their standard error (SE) and all statistical tests were considered significant at $P < 0.05$. Data were found to meet the assumption of homoscedasticity and normality distribution of residuals; all analyses were therefore performed using analysis of variance (ANOVA) using the following models:

- (i) Block effects were first tested within each growth chamber at each sampling time (t_1 and t_2) for all variables ($\Delta^{13}\text{C}$, SLA, C_M , N_M and Height) using a simple one-way ANOVA model. Whenever they were significant (*i.e.*, at t_1 for C_M in the second growth chamber; at t_2 for $\Delta^{13}\text{C}$, SLA, N_M in the two chambers and for Height only in the control chamber), individual values were adjusted to block effects by calculating the difference between the

mean of each block and the general mean of all seedlings in the chamber (Dillen *et al.* 2008).

- (ii) Provenance and female effects were tested at t_{1-25} in the two growth chambers using the following model, with female nested within provenance:

$$var = Chamber + Prov. + Fem(Prov.) + Chamber \times Prov. + Chamber \times Fem(Prov.),$$

where 'var' refers to the tested variable ($\Delta^{13}C$, SLA, C_M , N_M), 'Chamber' refers to the chamber effect considered as fixed, 'Prov.' refers to the provenance effect (France vs. Italy) considered as fixed, 'Fem(Prov.)' refers to the female effect nested within provenance considered as random, 'Chamber $\times$ Prov.' refers to the chamber by provenance interaction, and 'Chamber $\times$ Fem(Prov.)' refers to the chamber by female interaction.

- (iii) Temporal variations between t_1 and t_2 were evaluated only in the control growth chamber where temperature remained unchanged (t_{1-25} vs. t_{2-25}) using the following model:

$$var = Time + Prov. + Fem(Prov.) + Time \times Prov. + Time \times Fem(Prov.),$$

where 'var' refers to the tested variable ($\Delta^{13}C$, SLA, C_M and N_M), 'Time' refers to the temporal effect between t_1 and t_2 considered as fixed, 'Prov.' refers to the provenance effect (France vs. Italy) considered as fixed, 'Fem(Prov.)' refers to the female effect nested within provenance considered as random, 'Time $\times$ Prov.' refers to the temporal by provenance interaction, and 'Time $\times$ Fem(Prov.)' refers to the temporal by female interaction.

- (iv) Temperature-induced variations were evaluated at t_2 by comparing the two growth chambers (t_{2-25} vs. t_{2-43}) using the following model:

$$var = Temp. + Prov. + Fem(Prov.) + Temp. \times Prov. + Temp. \times Fem(Prov.),$$

where 'var' refers to the tested variable ($\Delta^{13}C$, SLA, C_M and N_M), 'Temp.' refers to the temperature effect considered as fixed, 'Prov.' refers to the provenance effect (France vs. Italy) considered as fixed, 'Fem(Prov.)' refers to the female effect nested within provenance considered as random, 'Temp. $\times$ Prov.' refers to the temperature by provenance interaction, and 'Temp. $\times$ Fem(Prov.)' refers to the temperature by female interaction.

- (v) Finally, to test whether leaf survival observed at t_{2-43} after increasing temperature ('healthy' phenotype vs. 'wilted' phenotype) could be related to differences in $\Delta^{13}C$, the following model was run using individual values:

$$var = Phenotype + Prov. + Fem(Prov.) + Phenotype \times Prov. + Phenotype \times Fem(Prov.),$$

where 'var' refers to the tested variable ($\Delta^{13}C$), 'Phenotype' refers to the leaf phenotype effect (healthy vs. wilted) considered as fixed, 'Prov.' refers to the provenance effect (France vs. Italy) considered as fixed, 'Fem(Prov.)' refers to the female effect nested within provenance considered as random, 'Phenotype $\times$ Prov.' refers to the phenotype by provenance interaction, and 'Phenotype $\times$ Fem(Prov.)' refers to the phenotype by female interaction. Note that the model was run using $\Delta^{13}C$ values recorded at t_{2-43} , but also using $\Delta^{13}C$ values recorded at t_{1-25} on the same individuals in order to test whether leaf survival phenotype could be related to intrinsic $\Delta^{13}C$ values.

Relationships between pairs of continuous variables were analyzed by linear regression analysis [Pearson's correlation coefficients (r)] on a seedling basis, for each provenance and for each sampling time. Because seedlings' height was found to covary with leaf traits (see

Results section), the main ANOVA effects on $\Delta^{13}\text{C}$ and related traits in models (ii) to (v) were tested independently of seedlings' size by adding height as a covariate.

RESULTS

After 40 days of growth at 25°C (26-June-2008, t_{1-25}), there were no significant ‘*Chamber*’ and ‘*Chamber* × *Fem(Prov.)*’ effects for all variables tested, while a significant ‘*Chamber* × *Prov.*’ effect was recorded for N_M only (**Table 2.1.2**); box plots at t_{1-25} were therefore represented using individual values pooled over the two growth chambers (**Fig. 2.1.1**). Significant variations were observed among seedlings for all variables, with $\Delta^{13}C$ values noteworthy lying between ca. 24 and 28‰ (**Fig. 2.1.1**). No significant ‘*Prov.*’ effect could be observed (**Fig. 2.1.1**; **Table 2.1.2**) while a significant ‘*Fem(Prov.)*’ effect was detected for all variables (**Fig. 2.1.1**; **Table 2.1.2**).

Table 2.1.2 F values of the ANOVAs for bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$, ‰), specific leaf area (SLA, $cm^2.g^{-1}$), leaf carbon content (C_M , $mg.g^{-1}$) and leaf nitrogen content (N_M , $mg.g^{-1}$). Note that the main ANOVA effects on $\Delta^{13}C$, SLA, C_M and N_M were tested independently of variations in seedling sizes by adding height as a covariate in each model.

Models	Variables	<i>Chamber</i>	<i>Prov.</i>	<i>Fem(Prov.)</i>	<i>Chamber</i> × <i>Prov.</i>	<i>Chamber</i> × <i>Fem(Prov.)</i>
(ii)	$\Delta^{13}C$	0.42ns	0.01ns	1.90*	2.90ns	1.67ns
	SLA	1.39ns	0.92ns	1.96*	0.02ns	0.78ns
	C_M	0.32ns	0.36ns	2.62***	0.92ns	0.95ns
	N_M	0.56ns	2.56ns	4.74***	9.54**	0.71ns
	Height	0.61ns	27.72***	7.99***	4.01*	0.92ns
		<i>Time</i>	<i>Prov.</i>	<i>Fem(Prov.)</i>	<i>Time</i> × <i>Prov.</i>	<i>Time</i> × <i>Fem(Prov.)</i>
(iii)	$\Delta^{13}C$	62.09***	2.33ns	3.09***	0.03ns	0.81ns
	SLA	5.29*	0.08ns	1.48ns	3.42ns	1.37ns
	C_M	0.11ns	0.05ns	2.49**	1.87ns	2.12**
	N_M	33.90***	1.58ns	3.10***	6.32*	1.79*
	Height	1623.60***	42.63***	7.51***	3.42ns	1.14ns
		<i>Temp.</i>	<i>Prov.</i>	<i>Fem(Prov.)</i>	<i>Temp.</i> × <i>Prov.</i>	<i>Temp.</i> × <i>Fem(Prov.)</i>
(iv)	$\Delta^{13}C$	22.98***	0.39ns	1.85*	2.24ns	1.47ns
	SLA	8.28**	2.56ns	2.19**	0.07ns	1.48ns
	C_M	28.52***	0.22ns	2.90***	0.15ns	1.38ns
	N_M	129.22***	17.31***	3.01***	0.87ns	1.06ns
	Height	39.10***	17.39***	5.43***	8.76**	1.37ns

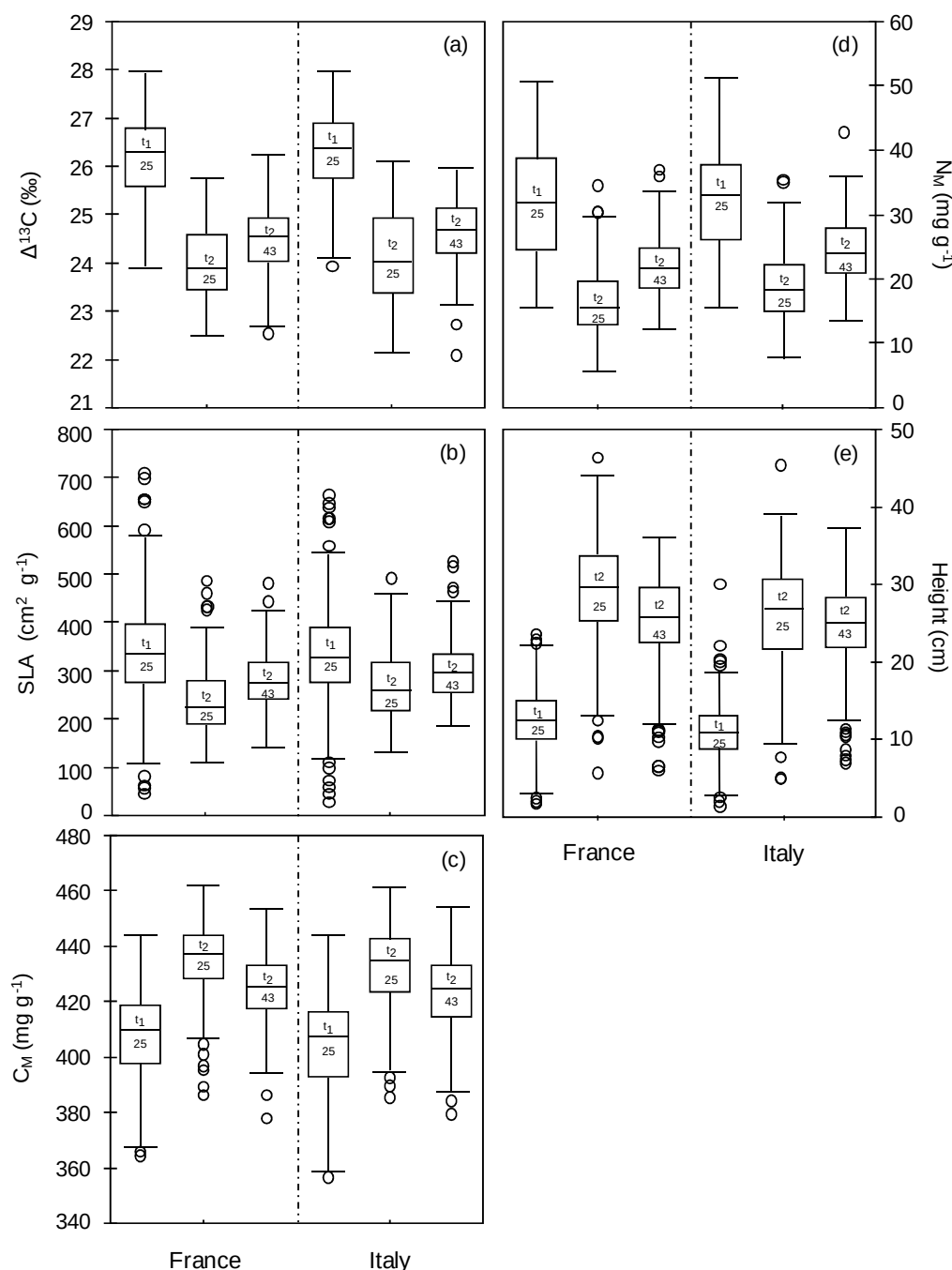


Figure 2.1.1 Box plots on individual seedlings values for (a) bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$), (b) specific leaf area (SLA), (c) leaf carbon content (C_M), (d) leaf nitrogen content (N_M) and (e) seedlings' height (Height). For each trait, box plots are shown by provenance (France, left panel; Italy, right panel), time of measurement (t1 and t2) and growth temperature (25°C and 43°C). Note that box plots at t1-25 were represented using values pooled over the two growth chambers because the 'Chamber' effect was not significant for all variables. Each box represents the quartile below (Q1) and above (Q3) the median value. Vertical bars represent minimum and maximum values except for seedlings that are away from 1.5 times from the top of the quartile (Q3 - Q1) range. Values outside this range are represented as circles.

Significant relationships were detected between traits regardless of the provenance (France vs. Italy), the time of collect (t_{1-25} vs. t_{2-25}) and the temperature (t_{2-25} vs. t_{2-43}) (**Fig. 2.1.2; Table 2.1.3**); overall, relationships were not strongly modified although the strength of all relationships was enhanced between t_1 and t_2 (**Fig. 2.1.2; Table 2.1.3**). $\Delta^{13}\text{C}$ scaled positively with SLA and N_M and negatively with C_M and Height (**Fig. 2.1.2**). Height scaled negatively with SLA and N_M while positively with C_M (**Table 2.1.3**). A significant and positive correlation was observed between N_M and SLA while C_M scaled negatively with SLA and N_M (**Table 2.1.3**).

Significant variations between t_{1-25} and t_{2-25} were detected for $\Delta^{13}\text{C}$, SLA and N_M , independently of variations in seedlings' size (**Fig. 2.1.1; Table 2.1.2**). The '*Time* $\times$ *Prov.*' interaction was found significant for N_M only, while the '*Time* $\times$ *Fem(Prov.)*' interaction was found significant for C_M and N_M (**Table 2.1.2**). Overall, differences between t_{1-25} and t_{2-25} were characterized by a sharp decrease in $\Delta^{13}\text{C}$ (approx. 2‰ on average), SLA and N_M , and an increase in C_M (**Fig. 2.1.1**).

A significant '*Temp.*' effect was detected at t_2 for all variables, independently of variations in seedlings' size (**Fig. 2.1.1; Table 2.1.2**). '*Temp.* $\times$ *Prov.*' and '*Temp.* $\times$ *Fem(Prov.)*' interactions were not significant for all variables, thereby suggesting that temperature-induced variations were neither provenance- nor female-dependant (**Table 2.1.2**). Overall, acclimated seedlings displayed higher $\Delta^{13}\text{C}$ (ca. 0.5‰ on average), SLA and N_M values and lower C_M values (**Fig. 2.1.1**).

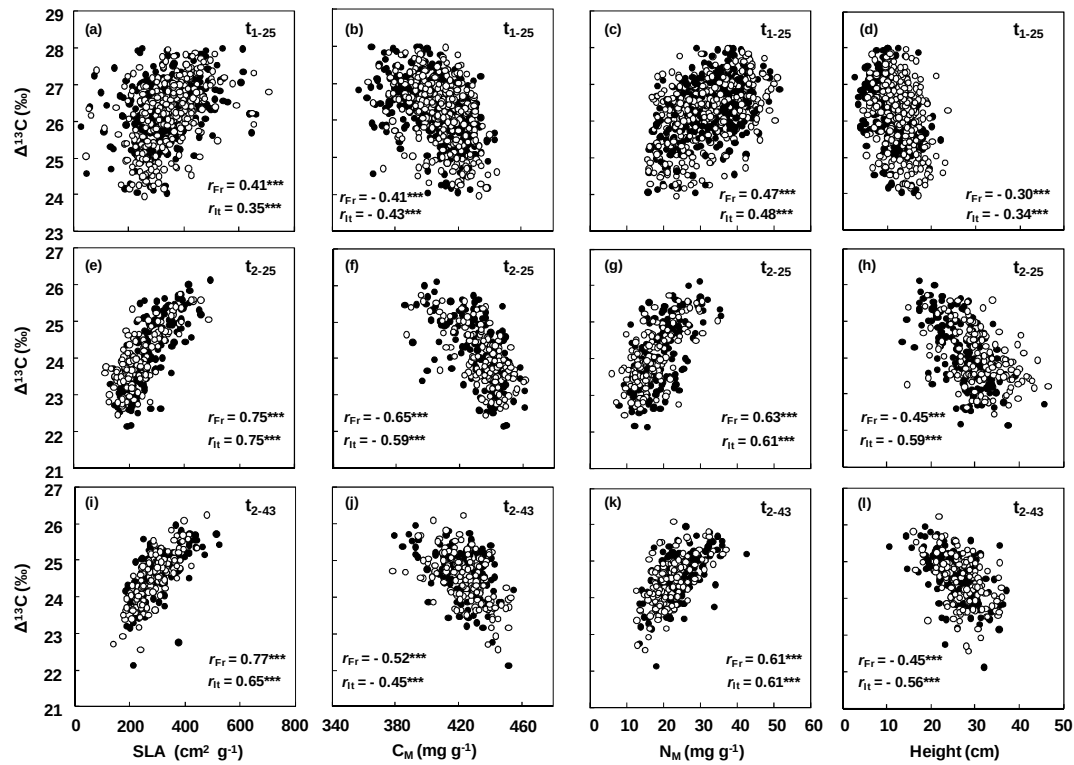


Figure 2.1.2 Relationships between bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) and specific leaf area [SLA (a, e, i)], leaf carbon content [C_M (b, f, j)], leaf nitrogen content [N_M (c, g, k)] and height [Height (d, h, l)]. Relationships are presented for each sampling time (t_1 and t_2) and each growth temperature (25°C, 43°C), i.e., t_{1-25} , t_{2-25} and t_{2-43} , respectively. Linear regressions (Pearson's correlation coefficients) were calculated for each provenance (r_{Fr} for France and r_{It} for Italy, respectively). Open symbols are for France; closed symbols are for Italy. Note that relationships at t_{1-25} are represented using individual seedling values pooled over the two growth chambers because the 'Chamber' effect was not significant for all variables. Level of significance is *** $P < 0.001$.

Table 2.1.3 Linear regressions (Pearson's correlation coefficients) between specific leaf area (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$), leaf carbon content (C_M , mg g^{-1}), leaf nitrogen content (N_M , mg g^{-1}) and height (Height, cm). Correlations were calculated on a seedling basis for each provenance (France and Italy), and for each sampling time (t_1 and t_2) and each growth temperature (25 and 43).

Variables	Provenance	C_M			N_M			Height		
		t_{1-25}	t_{2-25}	t_{2-43}	t_{1-25}	t_{2-25}	t_{2-43}	t_{1-25}	t_{2-25}	t_{2-43}
SLA	France	-0.32***	-0.64***	-0.56***	0.37***	0.84***	0.62***	-0.10ns	-0.45***	-0.49***
	Italy	-0.30***	-0.52***	-0.56***	0.39***	0.80***	0.59***	-0.11*	-0.59***	-0.57***
C_M	France				-0.37***	-0.50***	-0.50**	0.41***	0.50***	0.34***
	Italy				-0.39***	-0.35***	-0.35***	0.49***	0.49***	0.36***
N_M	France							-0.33***	-0.24**	-0.19*
	Italy							-0.34***	-0.36***	-0.30***

Finally, when individual $\Delta^{13}\text{C}$ values were confronted to the binary score describing leaf survival at the end of the experiment, it could be seen that 'healthy' phenotypes tended to exhibit higher $\Delta^{13}\text{C}$ values (ca. 0.5‰ on average) than 'wilted' phenotypes (**Fig. 2.1.3**). However, the '*Phenotype*' effect was only significant when considering $\Delta^{13}\text{C}$ values recorded at t_{1-25} , *i.e.*, intrinsic $\Delta^{13}\text{C}$ values (**Fig. 2.1.3**); in addition, regardless of sampling time and phenotypic groups, '*Phenotype* $\times$ *Prov.*' and '*Phenotype* $\times$ *Fem(Prov.)*' interactions were not significant (**Fig. 2.1.3**).

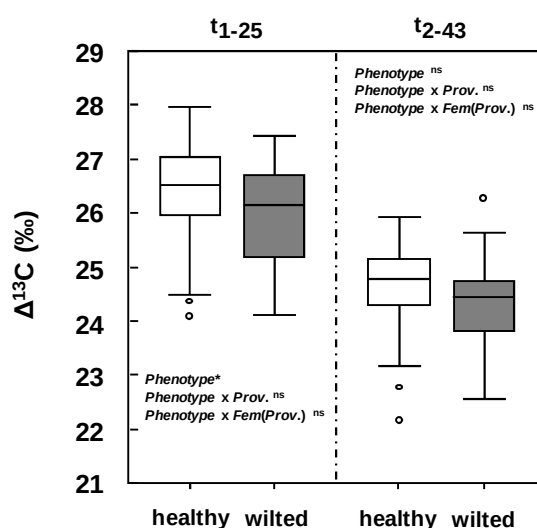


Figure 2.1.3 Relationship between bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) and leaf survival in response to elevated temperature. A binary score describing leaf survival was attributed to each seedling at the end of the temperature experiment based on whether the first top leaves were 'healthy' (no visible symptom) or 'wilted'. Box plots are presented on the basis of individual seedlings values recorded at the end of the experiment after the increase in temperature (t_{2-43} at 43°C) but also before temperature was increased in the growth chamber (t_{1-25} at 25°C, same seedlings). White boxes are for the 'healthy' phenotype; grey boxes are for the 'wilted' phenotype. Each box represents the quartile below (Q1) and above (Q3) the median value. Vertical bars represent minimum and maximum values except for seedlings that are away from 1.5 times from the top of the quartile (Q3 - Q1) range. Values outside this range are represented as circles. Levels of significance are indicated for '*Phenotype*' for the phenotypic effect, '*Phenotype* $\times$ *Prov.*' for the phenotype by provenance interaction, and '*Phenotype* $\times$ *Fem(Prov.)*' for the phenotype by female interaction. Level of significance is * $P < 0.05$; ns = non significant.

DISCUSSION

Variations in $\Delta^{13}\text{C}$ and related traits among *P. nigra* seedlings

To our knowledge, this is the first large-scale investigation documenting bulk leaf $\Delta^{13}\text{C}$ variations in very young (2 months-old) *Populus* spp. seedlings. Regardless of provenances (France vs. Italy), sampling dates and growth temperatures, a range of variation of approx. 4‰ was evidenced for $\Delta^{13}\text{C}$ among the 800 *Populus nigra* seedlings investigated. This was much higher than genotypic variations already reported among saplings and older trees within pure poplar species (*e.g.*, Sparks & Ehleringer 1997, Leffler & Evans 2001, Gornall & Guy 2007, Soolanayakanahally *et al.* 2009) or within inter-specific hybrids (Ripullone *et al.* 2004, Marron *et al.* 2005, Monclus *et al.* 2005, 2006, 2009, Voltas *et al.* 2006, Bonhomme *et al.* 2008, Dillen *et al.* 2008). Further comparison with data available on seedlings of other tree species indicated that the range of variation observed in our survey was at least comparable or even higher than that reported across a wide range of Gymnosperm and Angiosperm tree species (*e.g.*, Roupsard *et al.* 1998, Li 2000, Cregg & Zhang 2001, Lauteri *et al.* 2004, Cernusak *et al.* 2007, 2008, Aranda *et al.* 2010). In addition it may be worth to note that although mean $\Delta^{13}\text{C}$ values were rather uniform among the two provenances investigated (France vs. Italy) they were strongly female-dependant, suggesting that observed $\Delta^{13}\text{C}$ variations were more influenced by the female genetic background rather than by the life history of the two populations investigated. In comparison, strong provenance and genetic effects on $\Delta^{13}\text{C}$ have already been reported for seedlings across a wide range of species (*e.g.* Roupsard *et al.* 1998, Cregg & Zhang 2001, Lauteri *et al.* 2004, Aranda *et al.* 2010).

Large variations among seedlings were also found for other leaf traits (*i.e.*, SLA, N_M and C_M). Similarly to what was observed for $\Delta^{13}\text{C}$, mean values were not significantly different among provenances but seemed to be influenced by genetic background. In addition, significant correlations were detected with $\Delta^{13}\text{C}$. Overall, relationships were comparable

between provenances, sampling times and growth temperature (see **Fig. 2.1.2**); seedlings with higher $\Delta^{13}\text{C}$ exhibiting higher SLA, higher N_M and lower C_M . It should be noted that inherent variations in $\Delta^{13}\text{C}$ are dependent upon the relative balance between at least two main physiological determinants, *i.e.*, variations in (i) leaf diffusive characteristics to water vapour and CO_2 , and (ii) photosynthetic capacity. Even if gas exchange rates were not addressed in the present study, the main physiological process driving $\Delta^{13}\text{C}$ variations among seedlings may be however assessed from the $\Delta^{13}\text{C}$ -SLA- N_M relationships. Leaf structure assessed through SLA plays a central role in regulating leaf water and carbon economics (Wright *et al.* 2004). Denser and/or thicker leaves had lower N_M , as already reported across a wide range of species (Field & Mooney 1986, Reich *et al.* 1998) including *Populus* spp. (Marron *et al.* 2005, Marron & Ceulemans 2006). As a large part of leaf nitrogen is allocated to the proteins of the photosynthetic machinery, especially RuBisCO, higher N_M is generally associated with higher net assimilation rates (Evans 1989, Reich *et al.* 1998) and would therefore be expected to translate into higher WUE_i and lower $\Delta^{13}\text{C}$ values. However, the reverse pattern was observed as $\Delta^{13}\text{C}$ and N_M were positively related, a pattern that may be explained if leaf diffusive characteristics vary in a much greater extent and contribute to offset the relationship. In addition, $\Delta^{13}\text{C}$ and SLA were positively related which may also seem counterintuitive. Lower SLA is generally related to higher resistance to CO_2 internal transfer, due to denser packing of mesophyll cells and thicker or more rigid cell walls (Galmés *et al.* 2011). This should ultimately relate to lower WUE_i and higher $\Delta^{13}\text{C}$ (Flexas *et al.* 2008) unless leaf diffusive characteristics to water vapour vary in a greater extent as compared to internal leaf tissue diffusive characteristics to CO_2 . Actually, a similar positive relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and SLA was already observed among 29 *Populus deltoides* $\times$ *P. nigra* genotypes and further gas exchange measurements revealed that variations in stomatal conductance to water vapour were mainly responsible for $\Delta^{13}\text{C}$ variations (Monclus *et al.* 2006). It is therefore conceivable

that, in the present study, stomatal conductance was the main driver for the variations observed in $\Delta^{13}\text{C}$ among the *P. nigra* seedlings.

Regardless of the provenance, absolute values of leaf traits varied significantly between the two sampling times in the control chamber indicating that leaf structure, chemistry and function varied as a function of time. As leaf traits were assessed for the same foliar index at the two sampling times, it is however likely that the observed changes were more influenced by seedling's age *per se* rather than by leaf age. Overall, leaves were characterized by lower SLA and N_M values, higher C_M values, and most of all, by a lower $\Delta^{13}\text{C}$ (approx. 2% on average); the decline in SLA and N_M related to leaf ontogeny has already been documented in poplar (Marron *et al.* 2003, 2008) but data on variation related to the age of the plant itself (at constant leaf age) are lacking for seedlings. As WUE is a composite trait, the decrease in $\Delta^{13}\text{C}$ must have been caused by a relative shift in the balance between leaf transpiration and net photosynthesis, but the exact basis remains unknown. However, ontogenic changes for $\Delta^{13}\text{C}$ between t_{1-25} and t_{2-25} were not significantly dependent upon either provenances or females, indicating that the response among seedlings was quite homogeneous. In addition, relationships between leaf traits were comparable and even strengthened between the two sampling times. Therefore, although absolute $\Delta^{13}\text{C}$ values were significantly affected by seedling's age, it is very likely that the main driver for $\Delta^{13}\text{C}$ variations among seedlings remained the same over time.

There was a trade-off between $\Delta^{13}\text{C}$ and seedling's height, similarly to what was reported among *Castanea sativa* seedlings (Lauteri *et al.* 2004). In other words, the least efficient seedlings for water-use were also those exhibiting the lowest above-ground biomass. Such a relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth potential has sometimes been interpreted as the consequence of photosynthetic capacity controlling $\Delta^{13}\text{C}$ variations (see Farquhar *et al.* 1989). However, considering the low light irradiance to which seedlings were exposed during the

experiment, it could be inferred that growth control in the juvenile stage was not primarily limited by assimilation rate but rather by leaf structure and whole-plant allocation differences (Shipley 2002, see also Marron *et al.* 2005 on poplar). Similarly, variations in $\Delta^{13}\text{C}$ are not expected to be dominated by differences in assimilation rate but by differences in stomatal conductance. In such a case, both growth and $\Delta^{13}\text{C}$ would therefore be relatively independent from photosynthetic capacity but they would be strongly determined (in opposite directions) by the level of soil-plant-atmosphere coupling (see discussion in Lauteri *et al.* 2004). Riparian species such as *P. nigra* are dependent on groundwater which is frequently linked to stream water, and lower above-ground growth may indicate higher allocation to roots and facilitated access to water (Kranjcec *et al.* 1998, Stella & Battles 2010). Therefore, seedlings combining a slow-growth strategy (with a reduced total canopy area and possible increased investment to roots) with a water-spending strategy (low WUE) may be favoured in case of fluctuating environmental conditions with high evaporative demand; in contrast, the combination of a rapid-growth and a better stomatal control would confer a competitive advantage in case of more favorable conditions. In fact, the persistence of this trade-off resulting in multiple trait combinations may ultimately reflect the opportunistic/pioneering strategy of *P. nigra*, thereby ensuring successful seedlings establishment under a wide range of micro-environmental conditions. Noteworthy, Lauteri *et al.* (2004) noticed that in *Castanea sativa* the negative link between $\Delta^{13}\text{C}$ and above-ground growth was reversed at the adult stage. Whether this trend also applies to *P. nigra* is a question that remains to be explored.

Effects of elevated temperature on $\Delta^{13}\text{C}$ and relationship with leaf survival

The step-wise increment in air temperature (from 25°C up to 43°C) along the 17 days-period resulted in significant leaf acclimation that was neither provenance- nor female-dependant. Overall, SLA and N_M increased while C_M decreased, in agreement with findings reported for

Populus tremuloides seedlings (Tjoelker *et al.* 1998) and peanut (Craufurd *et al.* 1999). Most importantly, mean $\Delta^{13}\text{C}$ values were slightly but significantly increased by 0.5‰ on average, indicating that temperature induced a significant decrease in WUE. There are only few reports on the effects of elevated temperature on $\Delta^{13}\text{C}$. For instance, Craufurd *et al.* (1999) reported that well-watered peanut lines grown at 34°C exhibited an almost 2‰ higher $\Delta^{13}\text{C}$ than the same lines grown at 27°C. Similarly, *Castanea sativa* seedlings grown at 32°C under non-limiting water supply were found to display higher $\Delta^{13}\text{C}$ than those grown at 25°C, the range of variation depending on the populations considered (up to 0.6‰, Lauteri *et al.* 2004). In both cases however, incl. our study, the functional basis for $\Delta^{13}\text{C}$ variations in response to elevated temperature remained unknown. It is conceivable that increased air temperature modified leaf anatomy and stomatal density (Reddy *et al.* 1998, Luomala *et al.* 2005) so that to facilitate water vapour diffusion, thereby enhancing leaf cooling. However, we cannot definitely rule out the possibility that the photosynthetic machinery was altered by the high temperatures during the last steps of the experiment at 43°C. Indeed, several studies have reported that leaf temperature can sometimes exceed air temperature by several degrees (Gates *et al.* 1968, Martin *et al.* 1999) and previous experiment on *P. deltoides* × *P. nigra* hybrid cuttings demonstrated that the critical temperature for the stability of photochemistry was around 46°C (Marron *et al.* 2008).

The most interesting finding is the positive relationship observed between $\Delta^{13}\text{C}$ and leaf survival under elevated temperature (healthy phenotype). Seedlings that remained 'healthy' under elevated temperature exhibited on average a ca. 0.5‰ higher $\Delta^{13}\text{C}$ than those exhibiting a 'wilted' phenotype. This was especially true when considering $\Delta^{13}\text{C}$ data obtained for seedlings at 25°C (t_{1-25}) before the temperature was increased, suggesting that it is more the intrinsic $\Delta^{13}\text{C}$ value rather than its plastic response that is invoked. This relationship should however not be taken as directly causal and may surely reflect more global co-ordinations

between the physiological and morphological determinants of seedlings' growth behaviour. In fact, if a lower WUE somehow confers a competitive advantage under high evaporative demand, then it must be the structural/functional factors controlling leaf and whole-plant transpiration that should be the target of selection rather than WUE by itself. In addition, although the two phenotypic classes (healthy vs. wilted) differed significantly for $\Delta^{13}\text{C}$ values on average, box plots showed significant overlap indicating that the response is not simply binary and that other factors, such as the thermo-stability of the photosynthetic apparatus, are also probably involved in leaf survival.

Ecological implications

The links observed between $\Delta^{13}\text{C}$, growth and leaf survival may have important implications for the establishment of *P. nigra* seedlings and population genetic structuration in a context of high temperatures. Taken together, the results suggest that slow growing and less water-use efficient seedlings are better competitors under conditions of extremely high evaporative demand and non-limiting water availability. As a result, if physiological differences do drive differences in seedling survival *in situ*, we would expect punctual and localized heat waves to have a significant impact on *P. nigra* population composition along its native range. It was surprising to us, therefore, to find no differences among the two provenances but this result must be taken cautiously for at least two reasons: (i) the low number of provenances studied, (ii) the fact that average climatic data may not be necessarily representative of the local micro-environmental conditions that prevailed during the establishment of the female trees, and (iii) the fact that the large individual variations observed due to a large genetic background (800 seedlings issued from a combination of 16 female trees by numerous male trees) may offset the effect of climate. These data were obtained from experiment in controlled environment. Even if natural selection could operate within this initial large range

of $\Delta^{13}\text{C}$ variation for the success of population establishment, conditions *in situ* are much more different and complex. Riparian species, including poplars, are generally dependant on stream flow (Rood *et al.* 2003) and seasonally fluctuating water tables, in interaction with high temperature, can also drastically alter survival rate during the critical establishment stage (Horton & Clark 2001, Stella & Battles 2010). Additional experimental manipulations exploring the high temperature $\times$ drought interaction and combining WUE, leaf thermo-tolerance and leaf survival among a larger panel of geographic provenances should help to gain insights into the physiological processes driving seedlings' recruitment and population dynamics in *P. nigra*.

ACKNOWLEDGMENTS

SC and RF were junior researchers. SC was supported by a PhD grant from the '*Conseil Régional, Région Centre, France*'. RF was supported by a PhD grant from the '*French Ministry of Higher Education and Research*'. This study has been carried out with financial support from the '*Délégation Régionale de la Recherche et de la Technologie de la Région Centre, France*' (ANR-07-CPER-063-01), from the UE-FP6 Network of Excellence EVOLTREE 'Evolution of Trees as drivers of Terrestrial Biodiversity', N°016322) and from Etablissement Public Loire in the framework of Loire River Interregional Programme (Plan Loire Grandeur Nature). The authors gratefully acknowledge M Chantereau (National Natural Reserve of Saint-Mesmin, France) and M Sabatti (University of Tuscia, Viterbo, Italy) for access to plant material and their help during seed collection. We are indebted to P Anselme, JM Petit at Orleans University for their help during the measurements. We gratefully acknowledge the logistic support provided by the experimental unit of INRA-Orleans during the experiment and especially by J Despras, P Poursat and L Pasquier. We thank C Brechet and C Hossann at the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at INRA-NANCY 1137 Forest Ecology and Ecophysiology Unit for passing carbon isotope samples on the IRMS. We also thank E Dreyer (UMR-1137 INRA-UHP, Nancy) and C Bastien (INRA Orléans, UR-588 AGPF) for the discussions and comments.

REFERENCES

- Aranda I**, Alía R, Ortega U, Dantas AK, Majada J (2010) Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genet Genomes* 6:169–178.
- Bacon MA** (2004) Water use efficiency in plant biology. *In*: Bacon MA, (eds) Water use efficiency in plant biology. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp 1–26.
- Barsoum N**, Hughes FMR (1998) Regeneration response of black poplar to changing river levels. *In*: Wheater WH, Kirkby C, Harding R, Gilvear D (eds) Hydrology in a changing environment. British Hydrological Society and Wiley's, Chichester, UK. pp 397–412.
- Bonhomme L**, Barbaroux C, Monclus R, Morabito D, Berthelot A, Villar M, Dreyer E, Brignolas F (2008) Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. *Ann For Sci* 65:1–9.
- Cernusak LA**, Aranda J, Marshall JD, Winter K (2007) Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytol* 173:294–305.
- Cernusak LA**, Winter K, Aranda J and Turner BL (2008) Conifers, angiosperm trees, and lianas: growth, whole-plant water and nitrogen use efficiency, and stable isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) of seedlings grown in a tropical environment. *Plant Physiol* 148:642–659.
- Craig H** (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* 12:133–149.
- Craufurd PQ**, Wheeler TR, Ellis RH, Summerfield RJ, Williams JH (1999) Effect of temperature and water deficit on water-use efficiency, carbon isotope discrimination, and specific leaf area in peanut. *Crop Sci* 39:136–142.
- Cregg BM**, Zhang JW (2001) Physiology and morphology of *Pinus sylvestris* seedlings from diverse sources under cyclic drought stress. *For Ecol Manag* 154:131–139.

- Dickmann** DI, Kuzovkina J (2008) Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species. *In*: Isebrands JG, Richardson J (eds) Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment. FAO/IPC, Rome, Italy, 135 p-Chapter 2.
- Dillen** SY, Marron N, Koch B, Ceulemans R (2008) Genetic variation of stomatal traits and carbon isotope discrimination in two hybrid poplar families (*Populus deltoides* 'S9-2' × *P. nigra* 'Ghoy' and *P. deltoides* 'S9-2' × *P. trichocarpa* 'V24'). *Ann Bot* 102:399–407.
- European Commission** (1992) Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. EC, Brussels, Belgium.
- Evans** JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78:9–19.
- Farquhar** GD, O'Leary MH, Berry JA (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust J Plant Physiol* 9:121–137.
- Farquhar** GD, Richards RA (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust J Plant Physiol* 11:539–552.
- Farquhar** GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Phys Mol Biol* 40:503–537.
- Field** C, Mooney HA (1986) The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. *In*: Givnish TJ (eds) On the economy of plant form and function. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 25–55.
- Flexas** J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 31:602–621.

- Galmés J**, Ribas-Carbó M, Medrano H, Flexas J (2011) Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J Exp Bot* 62:653–665.
- Gates DM**, Aderfer R, Taylor E (1968) Leaf temperature of desert plants. *Science* 159:994–995.
- Gornall JL**, Guy RD (2007) Geographical variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Can J Bot* 85:1202–1213.
- Guilloy-Froget H**, Muller E, Barsoum N, Hughes FMR (2002) Dispersal, germination, and survival of *Populus nigra* L. (Salicaceae) in changing hydrologic conditions. *Wetlands* 22:478–488.
- Horton JL**, Clark JL (2001) Water table decline alters growth and survival of *Salix gooddingii* and *Tamarix chinensis* seedlings. *For Ecol Manag* 140:239–247.
- IPCC**, Climate change (2007) The physical science basis: working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kranjcec J**, Mahoney JM, Rood SB (1998) The responses of three riparian cottonwood species to water table decline. *For Ecol Manag* 110:77–87.
- Lauteri M**, Pliura A, Monteverdi MC, 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. *J Evol Biol* 17:1286–1296.
- Lefèvre F**, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (2001) EUFORGEN Technical Bulletin: *In situ* conservation of *Populus nigra*. IPGRI, Rome, Italy.
- Leffler AJ**, Evans AS (2001) Physiological variation among *Populus fremontii* populations: short- and long-term relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and water availability. *Tree Physiol* 21:1149–1155.

- Li C** (2000) Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiol Plant* 108:134–139.
- Luomala EM**, Laitinen K, Sutinen S, Kellomäki S, Vapaavuori E (2005) Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ* 28:733–749.
- Marron N**, Dreyer E, Boudouresque E, Delay D, Petit J-M, Delmotte FM, Brignolas F (2003) Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus × canadensis* (Moench) clones, ‘Dorskamp’ and ‘Luisa_Avanzo’. *Tree Physiol* 23:1225–1235.
- Marron N**, Villar M, Dreyer E, Delay D, Boudouresque E, Petit J-M, Delmotte FM, Guehl JM, Brignolas F (2005) Diversity of leaf traits related to productivity in 31 *Populus deltoides × Populus nigra* clones. *Tree Physiol* 25:425–435.
- Marron N**, Ceulemans R (2006) Genetic variation of leaf trait related to productivity in a *Populus deltoides × Populus nigra* family. *Can J For Res* 36:390–400.
- Marron N**, Brignolas F, Delmotte FM, Dreyer E (2008) Modulation of leaf physiology by age and in response to abiotic constraints in young cuttings of two *Populus deltoides × P. nigra* genotypes. *Ann For Sci* 65:404.
- Martin TA**, Hinckley TM, Meinzer FC, Sprugel DG (1999) Boundary layer conductance, leaf temperature and transpiration of *Abies amabilis* branches. *Tree Physiol* 19:435–443.
- Monclus R**, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Boudouresque E, Petit J-M, Marron N, Bréchet C, Brignolas F (2005) Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides × P. nigra* clones. *New Phytol* 167:53–62.
- Monclus R**, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Petit J-M, Barbaroux C, Le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes *Populus deltoides × Populus nigra*. *New Phytol* 169:765–777.

- Monclus R**, Villar M, Barbaroux C, Bastien C, Fichot R, Delmotte FM, Delay D, Petit J-M, Bréchet C, Dreyer E, Brignolas F (2009) Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* × *Populus trichocarpa* F₁ progeny. *Tree Physiol* 29:1329–1339.
- Naiman RJ**, Décamps H, McClain ME (2005) Riparia - Ecology, conservation, and management of streamside communities. Elsevier, Amsterdam.
- Nobel PS** (1999) Resistances and conductances - Transpiration. In: Physicochemical and environmental plant physiology. (2nd edn) Academic Press, San Diego, pp 301–303
- Pliura A**, Eriksson G (2002) Genetic variation juvenile height and biomass of open pollinated families of six *Castanea sativa* Mill. populations in a 2 × 2 factorial temperature × watering experiment. *Silvae Genet* 51:152–160.
- Reddy KR**, Robana RR, Hodges HF, Liu XJ, McKinion JM (1998) Interactions of CO₂ enrichment and temperature on cotton growth and leaf characteristics. *Environ Exp Bot* 39:117–129.
- Reich PB**, Ellsworth DS, Walters MB (1998) Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Funct Ecol* 12:948–958.
- 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 Physiol* 24:671–679.
- Rood SB**, Braatne JH, Hughes FMR (2003) Ecophysiology of riparian cottonwoods: stream flow dependency, water relations and restoration. *Tree Physiol* 23:1113–1124.
- Roupsard O**, Joly HI, 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 effects. *Ann Sci For* 55:329–348.
- Shipley B** (2002) Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Funct Ecol* 16:682–689.
- Soolanayakanahally RY**, Guy RD, Silim SN, Drewes EC, Schroeder WR (2009) Enhanced assimilation rate and water use efficiency with latitude through increased photosynthetic capacity and internal conductance in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Plant Cell Environ* 32:1821–1832.
- Sparks JP**, Ehleringer JR (1997) Leaf carbon isotope discrimination and nitrogen content for riparian trees along elevational transects. *Oecologia* 109:362–367.
- Stella JC**, Battles JJ (2010) How do riparian woody seedlings survive seasonal drought? *Oecologia* 164:579–590.
- Tjoelker MG**, Oleksyn J, Reich PB (1998) Seedlings of five boreal tree species differ in acclimation of net photosynthesis to elevated CO₂ and temperature. *Tree Physiol* 18:715–726.
- Vanden Broeck A**, Villar M, Van Bockstaele E, Van Slycken J (2005) Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Ann For Sci* 62:601–613.
- Villar M**, Forestier O (2009) Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? *Rev For Fr LXI* – 5:457–466.
- Voltas J**, Serrano L, Hernandez M, Peman J (2006) Carbon isotope discrimination, gas exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering regimes. *New Forest* 31:435–451.

Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier Eric, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas ML, Niinemets U, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428:821–827.

CHAPITRE 2.2

**Variabilité de l'efficiencia d'utilisation de l'eau chez
des semis de *Populus nigra* L.**

~

Approche in situ

1. INTRODUCTION

Dans le but de se rapprocher des conditions naturelles dans lesquelles s'établissent les semis de *P. nigra* et de juger si les résultats observés lors de l'approche *ex situ* étaient transposables en milieu naturel, une expérience *in situ* a été réalisée. Il était notamment important de vérifier (1) que l'importante gamme de variabilité observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ sur des semis en conditions contrôlées était également observée en conditions naturelles, et (2) que la diminution des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ observée au cours du développement des semis était observable *in situ*. Par ailleurs, en conditions naturelles, les graines sont déposées sur les sédiments frais principalement par l'eau de la rivière; la fluctuation des niveaux d'eau entraîne ainsi le dépôt des graines par 'vagues' successives sur les sédiments et constitue après germination des bandes de régénération. Ces dernières varient fortement en termes de densité de semis. La densité pourrait alors être un facteur important à prendre en compte lors de l'installation des semis de *P. nigra* ; ainsi, nous posons l'hypothèse d'un lien entre WUE et la densité. Au contraire de l'approche *ex situ* où l'échelle de raisonnement était située au niveau de l'individu, la notion de densité implique une échelle de raisonnement au niveau de la population.

Les objectifs spécifiques de cette étude en milieu naturel étaient de (i) quantifier la variabilité pour $\Delta^{13}\text{C}$ et la densité de semis avant et après la période estivale (ii) juger de la plasticité de $\Delta^{13}\text{C}$ en fonction de la densité et de l'âge des semis. Afin d'apporter des éléments de réponse à ces objectifs, trois sites d'étude ont été retenus : deux situés le long de la Loire en France et un situé le long de la rivière Paglia en Italie. $\Delta^{13}\text{C}$, les teneurs massiques en azote et en carbone (N_M et C_M respectivement) ainsi que la démographie ont été évaluées en juin et septembre au sein de quadrats installés le long des cours d'eau et représentatifs de la gamme de densité rencontrée. Par ailleurs, afin de préciser les liens entre WUE et croissance en milieu naturel, la longueur de la racine et de la tige ont également été mesurées sur l'un des sites.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Présentation des sites d'étude

Les expériences ont été réalisées le long de deux cours d'eau naturel : la Loire en France et la rivière Paglia en Italie. La Loire est un fleuve français, long de 1020 kilomètres, qui prend sa source au pied du mont Gerbier de Jonc dans le Massif Central et qui se jette dans l'Océan Atlantique près de Saint-Nazaire en Loire-Atlantique. La rivière Paglia est un cours d'eau italien long de 86,5 kilomètres qui prend sa source au pied du Mont Amiata et qui se jette dans le Tibre près de la ville d'Orvieto. Les deux cours d'eau diffèrent essentiellement par leurs caractéristiques hydrologiques. La Loire est un fleuve partiellement régulé dont le débit peut néanmoins varier entre $10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en période d'étiage et $2000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en période de crues ; la rivière Paglia est une rivière sauvage non régulée, étroitement dépendante des précipitations et dont le débit varie entre $0,3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en période d'étiage et $800 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en période de crues. Les deux sites diffèrent également par la texture du substrat : sable fin en Loire ; glaise, sable et gros galets à Paglia. Enfin les deux sites diffèrent par leurs conditions climatiques : climat tempéré de type océanique dégradé en Loire avec sur la période 1971-2000 une température moyenne annuelle de $10,9^\circ\text{C}$ et des précipitations moyennes annuelles de 635,7 mm (données Météo France); climat méditerranéen à Paglia avec sur la période 1961-1990 une température moyenne annuelle de $13,1^\circ\text{C}$ et des précipitations moyennes annuelles de 728,1 mm (données Servizio Meteorologico). Au cours de la période de végétation (mai à septembre) de l'année de récolte des semis, les températures moyennes et les précipitations cumulées étaient de $17,4^\circ\text{C}$ et 235 mm en Loire contre $21,6^\circ\text{C}$ et 283 mm à Paglia.

En Loire, les expériences ont été réalisées au sein de la Réserve Naturelle Nationale de St-Mesmin sur l'île de Mareau-aux-Prés située à une dizaine de kilomètres en aval d'Orléans ($47^\circ51'49''\text{N}$, $1^\circ46'43''\text{E}$, altitude 87 mètres) et sur l'île Arrault située au cœur d'Orléans ($47^\circ53'43''\text{N}$, $1^\circ53'15''\text{E}$, altitude 89 mètres). Le long de la rivière Paglia, un linéaire de 6 kilomètres situé au sein de la partie moyenne de cette rivière a été retenu (limite Nord, Ponte del Rigo : $42^\circ49'09''\text{N}$, $11^\circ46'30''\text{E}$, 290 m ; limite Sud, Arteverde : $42^\circ46'48''\text{N}$, $11^\circ49'36''\text{E}$, 250 m).

2.2 Stratégie d'échantillonnage

Sur chaque site d'étude retenu, des zones de régénération ont été sélectionnées. Une zone de régénération est définie comme un espace au sein duquel se trouve une répartition homogène des semis de peuplier noir de l'année. Sur chaque site d'étude, des surfaces fixes appelées 'quadrats' ont été positionnées. La surface et la forme du quadrat dépendaient de la densité et de la forme des bandes de régénération.

Tableau 2.2.1. Récapitulatif des sites d'étude, des années et dates de collecte, de la stratégie d'échantillonnage et des variables mesurées.

Pays	Italie				France		
Sites (année)	Paglia (2008)				Mareau (2009)		Arrault (2009)
Dates de collecte	juin	septembre			juin	septembre	juin
Échantillonnage							
Âge des cohortes	2 mois	1 et 2 ans	5 mois	1 et 2 ans	2 mois	5 mois	2 mois
Nombre de quadrats	8	2	8	2	9	9	28
Variables mesurées							
Densité (semis m ⁻²)	OUI	x	OUI	x	OUI	OUI	OUI
Δ ¹³ C (‰)	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
C _M (mg. g ⁻¹)	x	x	x	x	OUI	OUI	OUI
N _M (mg. g ⁻¹)	x	x	x	x	OUI	OUI	OUI
L _{tige} (cm)	x	OUI	x	OUI	OUI	OUI	x
L _{racine} (cm)	x	x	x	x	OUI	x	x

Sur le site de Paglia, huit zones de régénération ont été sélectionnées sur une distance de 6 kilomètres. Pour chaque zone de régénération, deux quadrats d'1 m² ont été positionnés côte à côte le 29 juin 2008. Le premier quadrat a servi à estimer la densité (nombre de semis m⁻²) de façon non destructive à deux dates : l'une le 29 juin, l'autre après passage de la période estivale le 10 septembre (**Tableau 2.2.1**). Par ailleurs, 16 semis ont été prélevés de façon aléatoire aux deux dates: le 29 juin les prélèvements ont été effectués au sein du deuxième quadrat, alors que le 10 septembre les prélèvements ont été effectués au sein du quadrat densité après inventaire. A chaque date de collecte, les deux dernières feuilles formées de chaque semis collecté ont été prélevées. De plus, sur l'une des huit zones de régénération étudiées, là où la densité de régénération était la plus importante, 14 individus appartenant à une cohorte âgée d'un an (*i.e.* installée en 2007) et 14 individus appartenant à une cohorte âgée de deux ans (*i.e.* installée en 2006) ont été identifiés; pour chaque individu identifié, une feuille mature bien illuminée et de rang foliaire constant (15 à 17) a été prélevée à chaque date de collecte.

Sur le site de Mareau-aux-Prés, neuf zones de régénération ont été sélectionnées sur une distance d'un kilomètre. Pour chaque zone de régénération, quatre quadrats de surface et de forme identiques ont été positionnés côte à côte le 30 juin 2009 ; la surface et la forme des quadrats entre zones de régénération étaient toutefois variables en fonction de la densité et de la forme des bandes de régénération rencontrées. Les trois premiers quadrats ont servi à estimer la densité de façon non destructive à deux dates, le 30 juin et le 16 septembre (**Tableau 2.2.1**). Par ailleurs, 30 semis ont été prélevés de façon aléatoire aux deux dates : le 30 juin les prélèvements ont été effectués au sein du quatrième quadrat, alors que le 16 septembre, dix semis ont été prélevés au sein de chacun des trois premiers quadrats densité après inventaire. A chaque date de collecte, les deux dernières feuilles formées de chaque semis collecté ont été prélevées de la même façon qu'à Paglia.

Sur le site de l'île Arrault, 28 quadrats de 0,02 m² ont été positionnés au sein d'une large surface de régénération à densité variable, le 28 juin 2009 (**Tableau 2.2.1**). Après comptage des individus au sein de chacun des 28 quadrats, l'ensemble des semis de chaque quadrat (de 3 à 793) a été récolté et les deux dernières feuilles formées de chaque semis ont été prélevées ; contrairement aux deux sites précédents, les feuilles ont d'abord été mélangées puis analysées afin d'obtenir une valeur unique par quadrat.

En résumé, il est important de noter qu'à Paglia et à Mareau-Aux-Prés les données étaient disponibles par individu, par quadrat et par date permettant ainsi d'évaluer la variabilité entre individus présents au sein de chaque quadrat aux deux dates ($n = 16$ à Paglia ; $n = 30$ à Mareau-aux-Prés) ainsi que l'effet date ; les données individuelles ont pu être par ailleurs moyennées afin d'obtenir une valeur moyenne par quadrat. A Arrault, la stratégie d'échantillonnage était différente. Les collectes ont été uniquement réalisées en juin ; par ailleurs, le nombre de quadrats étudiés était largement supérieur aux deux autres sites (28 contre 8 à Paglia et 9 à Mareau-aux-Prés), de même que le nombre d'individus par quadrat (jusqu'à 793). Par conséquent, les analyses n'ont pas été conduites au niveau individuel, mais simplement à l'échelle du quadrat après avoir mélangé l'ensemble des feuilles.

2.3 Variables mesurées

Pour les trois sites, les feuilles prélevées ont été séchées à 60°C pendant 48h, puis broyées en fine poudre pour les analyses de composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$). Un milligramme de poudre de chaque échantillon broyé a été pesé à l'aide d'une balance haute-précision (Mettler Toledo MX5, Greifensee, Switzerland), puis placé dans des capsules en étain pour

l'analyse du rapport isotopique $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ à l'aide d'un spectromètre de masse à flux continu. La composition isotopique relative en ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) a été calculée par rapport au standard Pee Dee Belemmite (PDB) de la façon suivante (Craig 1957) :

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 (\text{‰})$$

où $R_{\text{échantillon}}$ et R_{standard} sont respectivement les ratios $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ de l'échantillon et du standard, respectivement (Farquhar *et al.* 1989). Les analyses ont été réalisées à la plateforme isotopique du CNR, Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale (IBAF) à Porano en Italie pour le site de Paglia, et à la plateforme Scottish Crop Research Institute (SCRI) de Dundee en Ecosse pour les sites de Loire. L'erreur standard des mesures de $\delta^{13}\text{C}$ durant la durée de passage des échantillons sur le spectromètre de masse a été estimée à $\pm 0.01\text{‰}$ au CNR et de $\pm 0.03\text{‰}$ au SCRI à l'aide des standards internes. La discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}\text{C}$) entre le CO_2 atmosphérique et la matière organique de la plante a été calculée de la façon suivante selon Farquhar & Richards (1984) :

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plante}}) / (1 + (\delta_{\text{plante}} / 1000))$$

où δ_{air} représente la composition isotopique de l'air (considérée égale à -8‰) et δ_{plante} représente la composition isotopique de la matière organique foliaire. A Mareau-aux-Prés et à Arrault seulement, les teneurs massiques en carbone et en azote des mêmes échantillons que ceux utilisés pour les analyses de $\Delta^{13}\text{C}$ ont été mesurées à l'aide d'un analyseur élémentaire (ConFlo IV, Thermo Fischer, Brême, Allemagne) couplé au spectromètre de masse ; les valeurs sont exprimées par unité de masse (C_M et N_M , mg g^{-1}) (**Tableau 2.2.1**).

A Mareau-aux-Prés, la longueur de la tige (L_{tige} , cm) et de la racine principale (L_{racine} , cm) ont été mesurées sur l'ensemble des semis prélevés en juin ; L_{tige} a également été mesurée en septembre mais pas L_{racine} (dû à l'impossibilité d'extraire la racine dans son intégrité). A Paglia, L_{tige} a été mesurée en juin et en septembre sur les individus des deux cohortes âgées (**Tableau 2.2.1**).

2.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (Version 2.10.1, A Language and Environment Copyright, 2007). Les moyennes sont présentées avec leur erreur standard (ES) et tous les tests statistiques ont été considérés significatifs à $P < 0.05$. Pour chaque variable, l'ajustement des données individuelles à une distribution gaussienne a été testé à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Toutes les analyses ont été effectuées par analyse de variance (ANOVA) :

(i) Des ANOVA à un facteur ont été appliquées afin de tester (a) les différences de densité par quadrat entre les deux dates de collecte à Paglia et à Mareau-aux-Prés (juin vs. septembre), (b) les différences de valeurs pour $\Delta^{13}\text{C}$, N_M , C_M entre juin et septembre à Paglia et à Mareau-aux-Prés, et (c) les différences entre cohortes au sein de chaque date. Lorsque les ANOVAs ont révélé des effets significatifs, les moyennes ont été comparées à l'aide d'un test de Tukey.

(ii) Les effets '*Cohorte*' et '*Date*' ainsi que l'interaction '*Cohorte* $\times$ *Date*' pour les trois cohortes d'âge différent (2006, 2007 et 2008) à Paglia ont été testées selon le modèle suivant :

$$var = Cohorte + Date + Cohorte \times Date$$

où *var* représente la variable testée (ici $\Delta^{13}\text{C}$), '*Cohorte*' correspond à l'effet de l'âge des cohortes considéré comme un effet fixe, '*Date*' correspond à l'effet de la date de collecte (juin et septembre) considéré comme un effet fixe, et '*Cohorte* $\times$ *Date*' correspond à l'interaction entre l'effet de l'âge des cohortes et l'effet date de collecte considéré comme un effet aléatoire.

Les relations entre paires de variables continues ont été analysées par régressions linéaires [coefficient de corrélation de Pearson (r_p)] pour chaque site d'étude et chaque date de collecte. Les relations entre les variables continues et la densité ont été analysées par des régressions non linéaires (courbe d'ajustement logarithmique [$f(x) = a * \ln(x) + b$, où a et b sont des constantes et $\ln$ le logarithme népérien] pour chaque site et chaque date de collecte.

3.RESULTATS

Les trois sites différaient par leur nombre maximum de semis par unité de surface : les densités maximales les plus faibles ont été observées sur le site de Paglia (370 semis m⁻²) et les plus fortes sur le site de l'île Arrault (38623 semis m⁻²) (**Fig. 2.2.1**). Aucune mortalité n'a été détectée entre juin et septembre pour les deux cours d'eau, excepté pour deux quadrats à Mareau-aux-Prés (**Fig. 2.2.1a et b**).

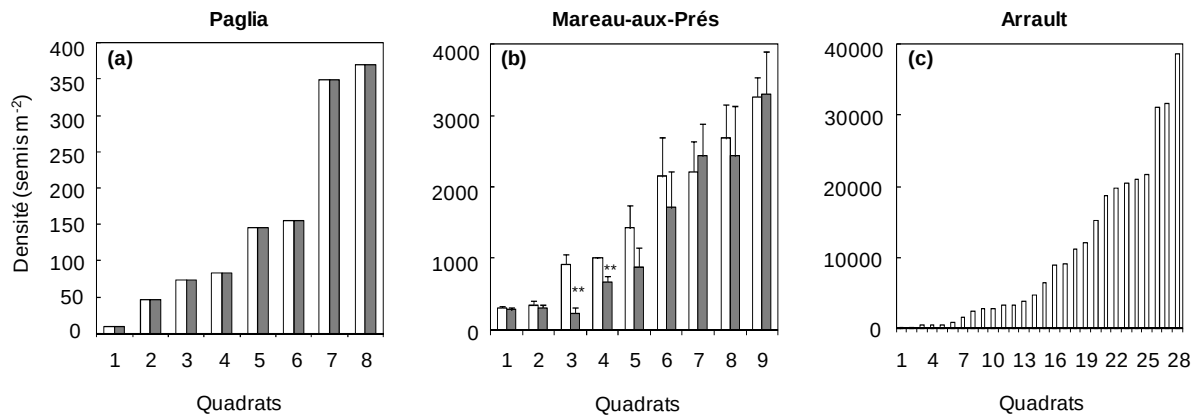


Figure 2.2.1 Densité de semis par quadrat (m⁻²) à Paglia (a), Mareau-aux-Prés (b) et Arrault (c). Les histogrammes représentent les valeurs de densité mesurées à chaque date de collecte (blanc pour juin ; gris pour septembre) ; les valeurs de densité présentées à Mareau-aux-Prés correspondent à la moyenne $\pm$ ES des trois quadrats adjacents. Les résultats de l'ANOVA à un facteur testant la mortalité entre les deux dates à Mareau-aux-Prés ne sont présentés que lorsqu'ils sont significatifs (** $P < 0,01$).

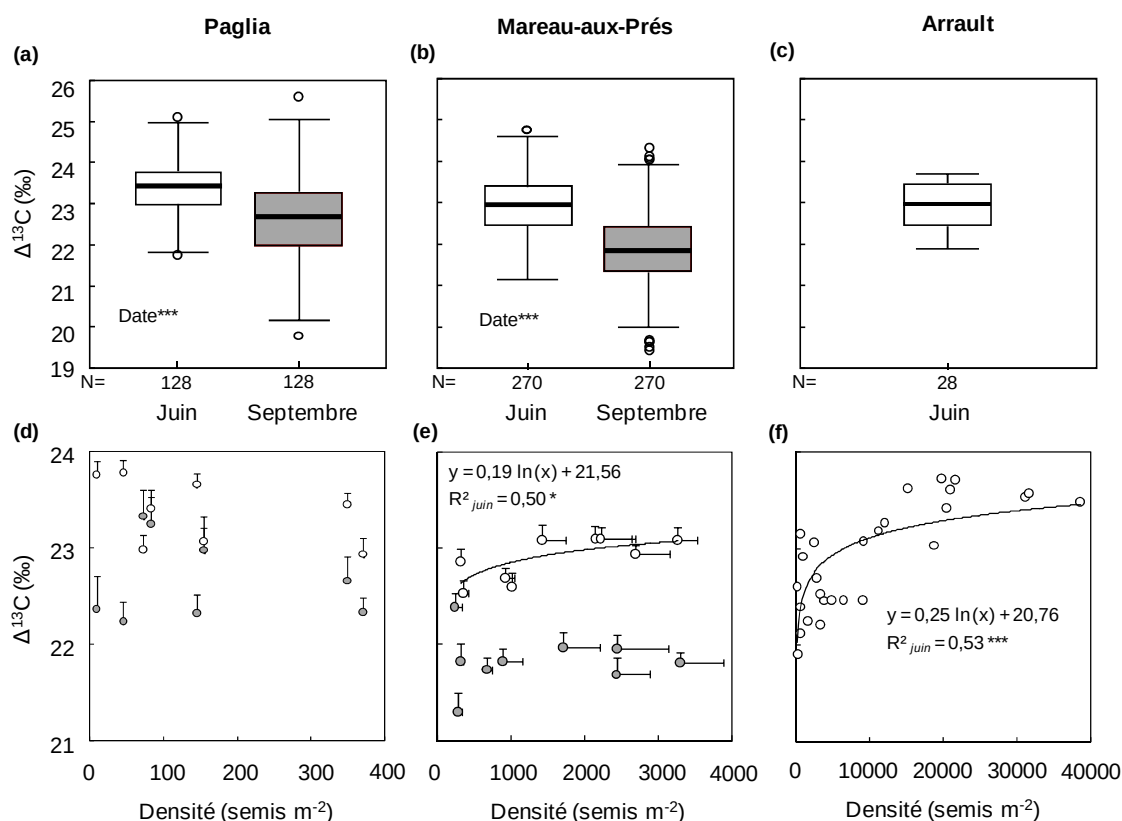


Figure 2.2.2. Boîtes à moustache pour $\Delta^{13}\text{C}$ (a-c) et relations $\Delta^{13}\text{C}$ -densité de semis (d-f) représentées par site et par date ; données de juin en blanc, données de septembre en gris. Les boîtes à moustache de Paglia et Mareau-aux-Prés sont construites sur les données individuelles ($n = 16$ individus $\times$ 8 quadrats = 128 à Paglia ; $n = 30$ individus $\times$ 9 quadrats = 270 à Mareau-aux-Prés) ; celle de Arrault est construite sur les données par quadrat ($n = 28$). Les relations entre variables sont appréhendées à l'échelle du quadrat (moyenne des données individuelles par quadrat $\pm$ ES à Paglia et Mareau-aux-Prés ; donnée unique par quadrat à Arrault). Chaque boîte à moustache représente le quartile en dessous (Q1) et au dessus (Q3) de la médiane. Les barres verticales représentent les valeurs minimum et maximum. Les valeurs extrêmes au delà de cette étendue sont représentées par des cercles. Les résultats de l'ANOVA à 1 facteur testant l'effet 'Date' sont présentés avec leur niveau de significativité : *** $P < 0,001$. Le résultat des ajustements de fonction et l'équation correspondante sont uniquement présentés lorsque les relations sont significatives. Les niveaux de significativité sont : * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

A Paglia comme à Mareau-aux-Prés, les étendues pour $\Delta^{13}\text{C}$ détectées en juin étaient toujours inférieures à celles observées en septembre (Paglia : 3,35‰ vs. 5,85‰ ; Mareau-aux-Prés : 3,58‰ vs. 4,85‰) alors que les valeurs moyennes diminuaient significativement entre les deux dates (Paglia : $23,38 \pm 0,06$ ‰ vs. $22,68 \pm 0,10$ ‰ ; Mareau-aux-Prés : $22,89 \pm 0,04$ ‰ vs. $21,83 \pm 0,5$ ‰) (**Fig. 2.2.2a et b**). A Arrault, l'étendue pour $\Delta^{13}\text{C}$ observée était de 1,82‰ (**Fig. 2.2.2c**). En juin, une relation non-linéaire et positive a été mise en évidence entre densité et $\Delta^{13}\text{C}$ à Mareau-aux-Prés et à Arrault ; aucune relation n'a été observée à Paglia pour les plus faibles densités (**Fig. 2.2.2d, e et f**). A Paglia sur une unique zone de régénération où trois cohortes 2006, 2007 et 2008 étaient présentes en moyenne une diminution de $\Delta^{13}\text{C}$ a été observée entre ces trois cohortes en juin comme en septembre tandis que les étendues moyennes restaient de l'ordre de 2,3‰ (**Fig. 2.2.3**).

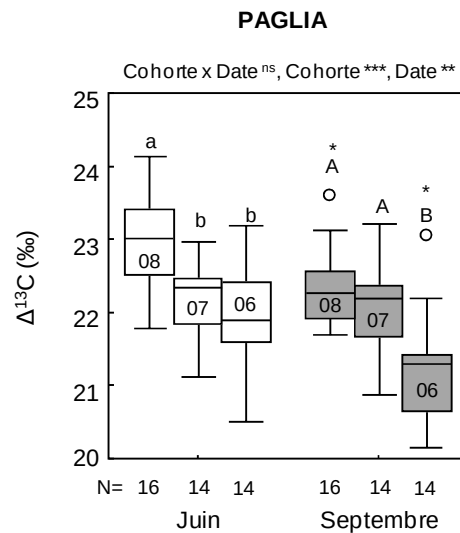


Figure 2.2.3. Boîtes à moustache pour $\Delta^{13}\text{C}$ pour les semis de l'année (08) et les cohortes âgées de un an (07) et deux ans (06) en juin (blanc) et en septembre (gris) à Paglia. Les boîtes à moustache sont construites sur les données individuelles ($n = 16$ pour les semis ; $n = 14$ pour les cohortes). Chaque boîte représente le quartile en dessous (Q1) et au dessus (Q3) de la médiane. Les barres verticales représentent les valeurs minimum et maximum. Les valeurs extrêmes au delà de cette étendue sont représentées par des cercles. Les résultats de l'ANOVA à deux facteurs sont présentés, où 'Cohorte' se réfère à l'effet de l'âge de la cohorte, 'Date' se réfère à l'effet date et 'Cohorte × Date' se réfère à l'interaction entre les effets 'Cohorte' et 'Date'. Des lettres différentes indiquent pour chaque date des différences de moyenne significatives entre cohortes (test de Tukey ; minuscules pour juin, majuscules pour septembre). Les astérisques indiquent des différences significatives entre juin et septembre au sein d'une même cohorte. Les niveaux de significativité sont : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns = non significatif.

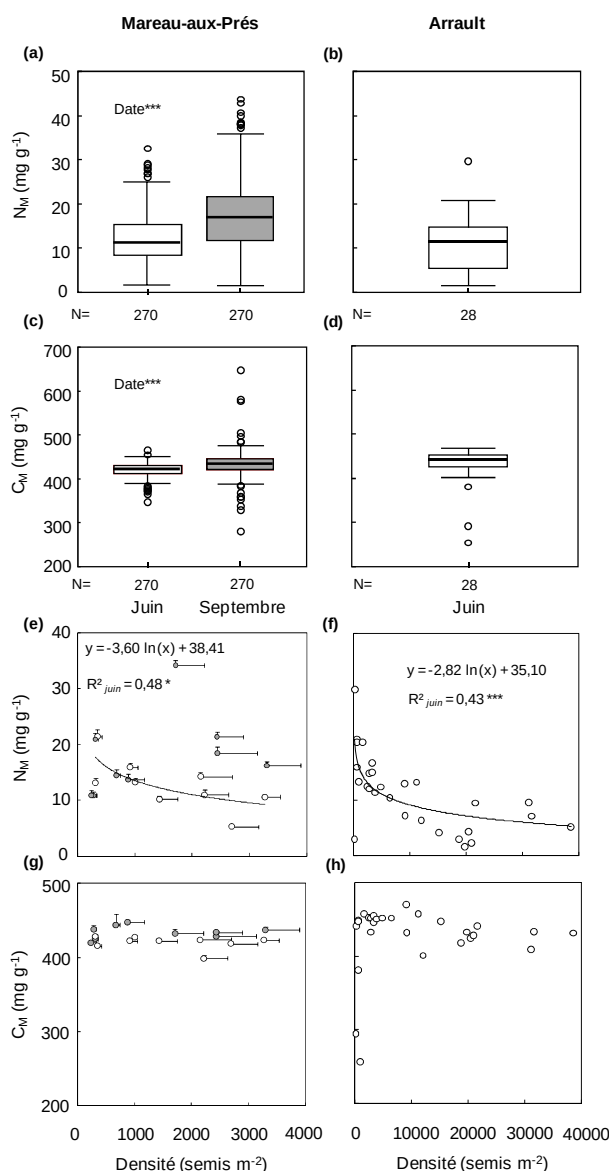


Figure 2.2.4. Boîtes à moustache pour les teneurs massiques en azote (N_M) et en carbone (C_M) (a-d) et relations avec la densité de semis (e-h) représentées par site et par date ; données de juin en blanc, données de septembre en gris. Les boîtes à moustache de Mareau-aux-Prés sont construites sur les données individuelles ($n = 30$ individus $\times$ 9 quadrats = 270) ; celle de Arrault sont construites sur les données par quadrat ($n = 28$). Les relations entre variables sont appréhendées à l'échelle du quadrat (moyenne des données individuelles par quadrat $\pm$ ES à Mareau-aux-Prés ; donnée unique par quadrat à Arrault). Chaque boîte à moustache représente le quartile en dessous (Q1) et au dessus (Q3) de la médiane. Les barres verticales représentent les valeurs minimum et maximum. Les valeurs extrêmes au delà de cette étendue sont représentées par des cercles. Les résultats de l'ANOVA à 1 facteur testant l'effet 'Date' sur N_M et C_M sont présentés avec leur niveau de significativité Le résultat des ajustements de fonctions et l'équation correspondante sont uniquement présentés lorsque les relations sont significatives. Les niveaux de significativité sont : * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

A Mareau-aux-Prés, les étendues minimales pour N_M et C_M , ont été observées en juin, respectivement de $30,75\ mg\ g^{-1}$ et de $116,81\ mg\ g^{-1}$ (**Fig. 2.2.4a et c**) et des effets 'Date'

significatifs ont été détectés ; une augmentation significative des valeurs de N_M et C_M a été détectée entre juin et septembre. A Arrault, les étendues pour N_M et C_M en juin étaient respectivement de $28,25 \text{ mg g}^{-1}$ et de $214,52 \text{ mg g}^{-1}$ (**Fig. 2.2.4b et d**). En juin, une relation non-linéaire et négative a été mise en évidence uniquement entre densité et N_M à Mareau-aux-Prés et à Arrault (**Fig. 2.2.4e, f, g et h**). A Mareau-aux-Prés, la longueur moyenne de la tige mesurée en juin était inférieure à celle de la racine ($2,01 \pm 0,18 \text{ cm}$ vs. $6,04 \pm 0,65 \text{ cm}$). Aucune relation significative n'a été mise en évidence ni entre L_{tige} et la densité ni entre L_{racine} et la densité (**Fig. 2.2.5a et b**).

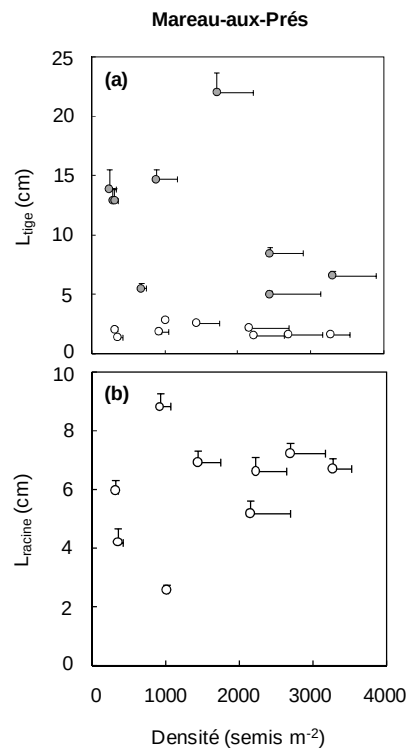


Figure 2.2.5. Relations entre la longueur de la tige (L_{tige}) et la densité de semis (a), et entre la longueur de la racine (L_{racine}) et la densité de semis (b) à Mareau-aux-Prés (moyennes par quadrat $\pm$ ES). Les symboles blancs se réfèrent aux données relatives à juin, les symboles gris aux données relatives à septembre.

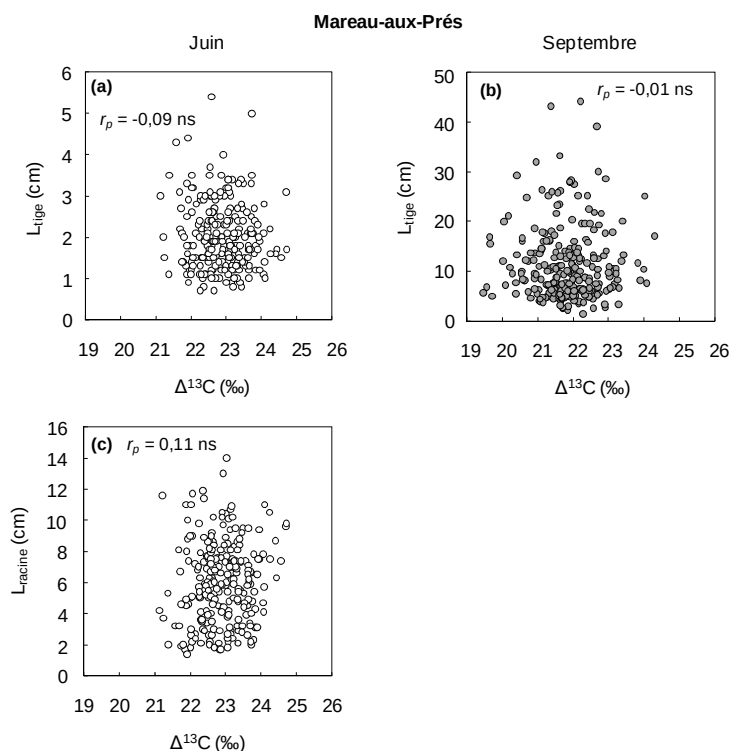


Figure 2.2.6. Relations entre la longueur de la tige (L_{tige}), la longueur de la racine (L_{racine}) et $\Delta^{13}C$ à Mareau-aux-Prés en juin et en septembre. La longueur de la racine n'a été mesurée qu'en juin. Les régressions linéaires ont été calculées en utilisant les données individuelles ; ns = non significatif. Les symboles blancs se réfèrent aux données relatives à juin, les symboles gris aux données relatives à septembre.

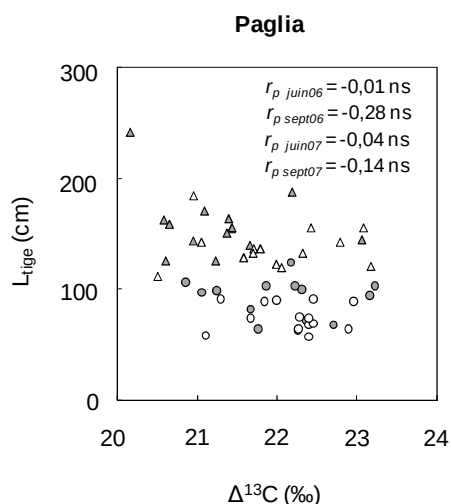


Figure 2.2.7. Relations entre la longueur de la tige (L_{tige}) et $\Delta^{13}C$ pour les cohortes âgées de un an (triangles, 07) et deux ans (cercles, 07) à Paglia. Les régressions linéaires (r_p) ont été calculées en utilisant les données individuelles ; ns = non significatif. Les symboles blancs se réfèrent aux données relatives à juin, les symboles gris aux données relatives à septembre.

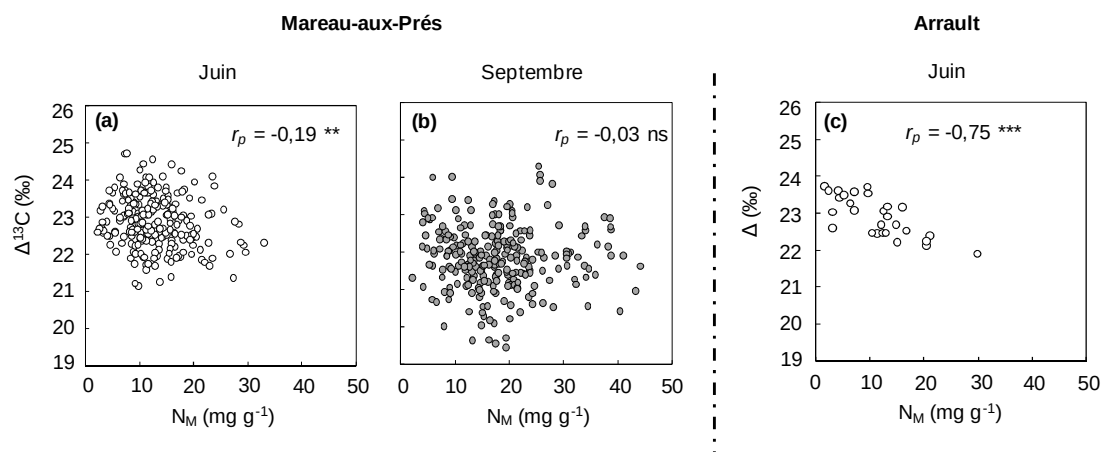


Figure 2.2.8. Relations entre $\Delta^{13}C$ et la teneur massique en azote (N_M) à Mareau-aux-Prés en juin (a) et en septembre (b), ainsi qu'à Arrault en juin (c). Les données présentées à Mareau-aux-Prés correspondent aux données individuelles ; les données présentées à Arrault correspondent aux données par quadrat. Les régressions linéaires (r_p) ont été calculées en utilisant les données individuelles. Les niveaux de significativité sont : ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns = non significatif. Les symboles blancs se réfèrent aux données relatives à juin, les symboles gris aux données relatives à septembre.

A Paglia comme à Mareau-aux-Prés, aucun lien n'a pu être détecté entre $\Delta^{13}C$ et L_{tige} quel que soit l'âge des plants (semis et cohortes âgées d'un et deux ans) en juin ou en septembre (**Fig. 2.2.6a et b, 2.2.7**). A Mareau-aux-Prés, aucun lien n'a été observé entre L_{racine} et $\Delta^{13}C$ (**Fig. 2.2.6c**). De plus, une corrélation négative a été observée entre L_{racine} et N_M en juin ($r_p = -0,19^{**}$) tandis qu'une corrélation positive a été détectée entre L_{tige} et N_M en septembre ($r_p = 0,30^{***}$). Enfin, à Mareau-aux-Prés comme à Arrault, une corrélation négative entre N_M et $\Delta^{13}C$ a été observée en juin (**Fig. 2.2.8**).

4.DISCUSION

Les différences de régimes hydrologiques, de texture de sol et de conditions climatiques entre les deux cours d'eau ont permis d'observer une large gamme de densité de semis au sein de chaque site d'étude. Les valeurs maximales de densité étaient site-dépendantes, les densités maximales de semis observées le long de la Loire étant rapportées en moyenne 10 à 100 fois plus élevées que celles observées le long de la rivière Paglia ($< 400 \text{ semis m}^{-2}$). La présence de gros galets le long de la rivière Paglia constitue une limite physique importante et pourrait contribuer à expliquer ces différences. Plusieurs études ont en effet montré que la texture du substrat pouvait être l'un des paramètres environnementaux les plus importants à prendre en compte pour la germination, la croissance et la survie des semis (Knox *et al.* 1995, Reich *et al.* 1997, Mahoney & Rood 1991, Sprenger 1999, Sher & Marshall 2003, Bhattacharjee *et al.* 2008). A notre connaissance, peu d'études font état des densités de régénération chez *P. nigra*. On peut citer à cet égard les travaux de Guillois-Froget (2002) et Langlade & Décamps (1995) le long de la Garonne qui décrivent des densités maximales variant entre 320 semis m^{-2} et $1500 \text{ semis m}^{-2}$, respectivement, ou encore les travaux de Légionnet *et al.* (1997) qui font état de $1500 \text{ semis m}^{-2}$ le long de l'Allier. En revanche, des densités maximales de $7000 \text{ semis m}^{-2}$ dans la gamme de celles observées dans notre étude ont été rapportées chez *P. fremontii* (Cooper *et al.* 1999).

De nombreux auteurs insistent sur le fait que la première année d'installation des semis est une étape critique pour leur survie (Seguelquist *et al.* 1993, Stromberg 1993, Johnson 1994, Shafroth *et al.* 1994, Rood *et al.* 1995, 1998, Van Splunder *et al.* 1995, Scott *et al.* 1997, Stella & Battles 2010). A Paglia comme à Mareau-aux-Prés, aucune mortalité importante n'a toutefois pu être observée après passage de la période estivale et ce malgré les différences de régimes hydrologiques, de texture du substrat, de température et de densité de semis. Si l'on remet en perspectives les résultats observés au **Chapitre 2.1** en conditions contrôlées, il semble que les conditions naturelles environnementales (notamment le facteur température) ne soient finalement pas suffisamment contraignantes pour engendrer une étape de sélection à un stade précoce. Par ailleurs, McBride & Strahan (1984) ont rapporté que 93% des semis chez *P. fremontii* étaient capables de survivre à la période estivale si la nappe était située à moins d'un mètre des semis ; ceci laisse donc supposer que les semis sur lesquels nous avons travaillé le long des deux cours d'eau n'étaient pas en conditions hydriques limitantes et/ou ont été capables de palier aux variations du niveau de la nappe. Les mesures de longueur de racine réalisées sur le site de Mareau-aux-Prés en juin ont notamment

confirmé que le jeune système racinaire était essentiellement constitué d'un pivot central largement plus développé que la partie aérienne, en accord avec de nombreuses autres études réalisées au sein du genre *Populus* (Mahoney & Rood 1991, Virginillo *et al.* 1991, Segelquist *et al.* 1993, Guilloy-Froget *et al.* 2002, Stella & Battles 2010).

4.1 Variabilité et plasticité de $\Delta^{13}\text{C}$ en fonction de la densité

La densité est un facteur qui affecte la disponibilité des ressources, la croissance et par conséquent la physiologie de la plante (Morris & Farmer 1985, Aphalo & Rikala 2006, Robinson *et al.* 2001). Compte tenu du fait qu'en milieu naturel, les zones de régénération varient fortement en terme de densité de semis, il était également légitime de supposer que la densité pouvait affecter les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ et donc de WUE. Une relation significative et positive entre $\Delta^{13}\text{C}$ et densité a été observée sur deux des trois sites en juin (Mareau-aux-Prés et Arrault); la relation observée n'était toutefois pas linéaire mais plutôt de type logarithmique, avec une forte interdépendance des deux variables à faible densité. Plusieurs explications peuvent alors être envisagées pour expliquer cette relation, bien qu'aucune ne puisse être clairement retenue sur la base de nos résultats.

(1) La première explication met en cause la compétition pour les nutriments, notamment l'azote, et ses effets indirects sur WUE. Plus de 50% de l'azote foliaire est investi dans la machinerie photosynthétique, plus précisément la RuBisCO, et de faibles valeurs de N_M sont généralement associées à une faible assimilation nette de CO_2 (Evans 1989, Reich *et al.* 1998). La relation négative observée en juin entre N_M et la densité corrobore cette idée et semble indiquer une compétition croissante pour les nutriments à mesure que la valeur de densité augmente. L'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i) étant définie comme le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), il est concevable que la diminution de A entraîne de plus faibles valeurs de WUE_i et donc de plus fortes valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$. Cette hypothèse est par ailleurs renforcée par la relation négative observée entre $\Delta^{13}\text{C}$ et N_M . Une étude expérimentale sur *Pinus banksiana* Lamb. a mis en évidence une diminution de la concentration en azote foliaire, de la photosynthèse et de WUE_i à mesure que la densité d'espèces compétitrices augmentait (Robinson *et al.* 2001). Une autre étude sur *Betula pendula* Roth a également montré une augmentation de $\Delta^{13}\text{C}$ à mesure que la densité augmentait (Aphalo & Rikala 2006).

Il faut noter que la relation $\Delta^{13}\text{C}$ -densité n'a pas été observée à Paglia, et n'était plus observée non plus sur les deux autres sites en septembre. De façon intéressante, on a pu voir que les valeurs de N_M observées en septembre étaient significativement supérieures à celles de juin ; or les terres agricoles à proximité de la Loire en région orléanaise sont intensivement cultivées et leur drainage lors des périodes de pluies pourrait avoir contribué à combler les carences en azote et à supprimer au moins partiellement la compétition. Les données de N_M à Paglia n'étaient malheureusement pas disponibles.

(2) On peut également supposer qu'une forte densité combinée à la faible hauteur des jeunes semis contribue à limiter le brassage de l'air environnant et à maintenir sous les semis une atmosphère plus humide. Cette humidité plus importante pourrait contribuer à limiter la demande évaporative locale et les tensions sur les colonnes d'eau dans la plante, permettant ainsi le maintien de l'ouverture des stomates, c'est-à-dire le maintien d'une forte conductance stomatique. Une forte conductance stomatique est associée à une faible WUE_i et donc à de fortes valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ (Monclus *et al.* 2006). Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait que la relation observée entre $\Delta^{13}\text{C}$ et densité n'est pas linéaire, c'est-à-dire que les effets bénéfique d'un regroupement des semis s'estomperaient au-delà d'une valeur seuil de densité.

4.2 Variabilité et plasticité de $\Delta^{13}\text{C}$ en fonction de l'âge

Si l'on remet en perspectives les résultats observés au **Chapitre 2.1** en conditions contrôlées, une chute significative des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ a été observée au cours du développement des semis. Il est à noter que le même sens de variation a été observé le long des deux cours d'eau entre les semis de l'année prélevés en juin et ceux prélevés en septembre indiquant donc une augmentation de WUE au cours de la saison. De façon remarquable, cette diminution des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ a également été observée entre les cohortes d'âge différent quelle que soit la date de collecte (juin et septembre). Les feuilles ayant été prélevées à un même rang foliaire entre juin et septembre, il est raisonnable de penser que cette augmentation de WUE au cours du temps est plus influencée par l'âge de l'individu que par l'âge de la feuille et ceci en accord avec les résultats observés au cours du **Chapitre 2.1**. A notre connaissance, cette étude est la première à rapporter une plasticité développementale de $\Delta^{13}\text{C}$ chez *P. nigra*. Toutefois, une augmentation de WUE en fonction de l'âge des individus a déjà été rapportée chez les arbres tels que chez *P. fremontii* (Leffler & Evans 2001), chez *Fagus sylvatica* L. (Duquesnay *et al.* 1998), chez *Eucalyptus globulus* Labill. (Pita *et al.* 2001) et chez *Salix exigua* Nutt.

(Donovan & Ehleringer 1991). Sandquist *et al.* (1993) ont également rapporté de plus fortes valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ chez les semis que chez les adultes chez quatre espèces arbustives désertiques, *Coleogyne ramosissima* Torr., *Larrea tridentata* Covill, *Encelia farinosa* A. Gray et *Ambrosia dumosa* W. W. Payne. De façon générale, ces différences de $\Delta^{13}\text{C}$ entre classes d'âge sont attribuées à des changements physiologiques et structuraux (qui peuvent être d'origine génétique et/ou environnementale) au cours du développement des individus (Donovan & Ehleringer 1991, Sandquist *et al.* 1993, Marshall & Monserud 1996, Bert *et al.* 1997). Cette tendance à l'augmentation de WUE en fonction de l'âge des individus suggère un changement du rapport entre l'assimilation nette de CO_2 et la conductance stomatique au cours du développement des individus (*cf.* Leffler & Evans 2001).

Au cours des expériences menées en chambre de croissance, une large étendue pour $\Delta^{13}\text{C}$ a été observée à une température de 25°C (4‰) (**Chapitre 2.1**). Il est à noter que l'étendue moyenne de $\Delta^{13}\text{C}$ observée le long des deux cours d'eau pour les semis de l'année prélevés en juin (3,5‰) était similaire à celle observée en chambre de croissance. Des étendues de $\Delta^{13}\text{C}$ similaires ou inférieures ont été rapportées au sein du genre *Populus* (Sparks & Ehleringer 1997, Leffler & Evans 2001, Ripullone *et al.* 2004, Marron *et al.* 2005, Monclus *et al.* 2005, 2006, 2009, Gornall & Guy 2007, Voltas *et al.* 2006, Bonhomme *et al.* 2008, Dillen *et al.* 2008, Soolanayakanahally *et al.* 2009). Les résultats observés au **Chapitre 2.1** en conditions contrôlées ont mis en évidence un lien entre WUE, croissance et survie sous de fortes températures. Dans ce contexte et dans le cadre des modifications climatiques prédisant une augmentation des températures, le maintien d'une importante variabilité au sein des populations pour des caractères complexes tels que WUE liée à la survie des individus, est crucial pour le maintien du potentiel adaptatif et la survie des populations de *P. nigra*. Ce maintien de variabilité pour des caractères adaptatifs au sein des populations semble une caractéristique des espèces pionnières de la ripisylve, leur permettant de s'installer avec succès et de s'adapter au sein de ce milieu très perturbé (Weber *et al.* 1985).

Enfin de façon notable, à Paglia comme à Mareau-aux-Prés une augmentation de l'étendue de $\Delta^{13}\text{C}$ a été observée chez les semis de l'année entre juin et septembre, passant en moyenne de 3,5‰ à plus de 5‰. Il est important de noter que malgré l'augmentation de l'étendue au cours du temps, les valeurs maximales pour $\Delta^{13}\text{C}$ étaient globalement comparables entre juin et septembre quel que soit le site; par contre les valeurs minimales de $\Delta^{13}\text{C}$ étaient toujours plus élevées en juin qu'en septembre, expliquant l'augmentation de l'étendue entre les deux dates. De façon intéressante, au cours de l'expérience en conditions

contrôlées du **Chapitre 2.1**, une diminution de l'étendue de $\Delta^{13}\text{C}$ a été observée en réponse à l'augmentation de la température pour la provenance italienne sans pour autant que les valeurs maximales de $\Delta^{13}\text{C}$ varient. Ces résultats laissent penser que la moindre étendue observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ en juin par rapport à septembre pourrait être due à des différences de températures moyennes entre juin et septembre ; une plus forte température moyenne en juin conduirait alors à une réduction de l'étendue de $\Delta^{13}\text{C}$ en diminuant notablement l'efficacité des individus présentant un plus faible $\Delta^{13}\text{C}$. Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait qu'à Paglia comme à Mareau-aux-Prés, les températures moyennes observées en juin étaient supérieures à celles observées en septembre (Paglia : 21,4°C vs. 19,7°C ; Mareau-aux-Prés : 16,7°C vs. 16,3°C).

CONCLUSIONS ET TRANSITION

Ce deuxième chapitre s'est focalisé sur l'étude du stade juvénile de *P. nigra* lors de la première année d'installation. Ce chapitre avait pour but de juger si le caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau' était un caractère limitant de la régénération de *P. nigra* dans le contexte des modifications climatiques. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, deux approches expérimentales ont été réalisées ; l'une en conditions contrôlées (**Chapitre 2.1**) dans le but d'isoler le facteur 'température' et de s'affranchir des interactions environnementales extérieures complexes ; l'autre en milieu naturel (**Chapitre 2.2**) dans le but de se rapprocher des conditions naturelles dans lesquelles s'établissent les semis de *P. nigra*.

Nos résultats ont permis pour la première fois chez *P. nigra* de mettre en évidence des variations significatives de $\Delta^{13}\text{C}$, au minimum de 2‰ traduisant des différences d'efficacité d'utilisation de l'eau au minimum de 40% (cf. modèle de Farquhar **Chapitre 1 encadré 1.2**), et ceci quels que soient le fond génétique et les conditions de croissance (**Chapitres 2.1 et 2.2**). Ces travaux ont également permis de mettre en évidence un compromis entre WUE, croissance et potentiel de survie à l'échelle de l'individu (**Chapitre 2.1**) ; les semis présentant une plus faible efficacité d'utilisation de l'eau ainsi qu'une plus faible croissance pourraient s'avérer de meilleurs compétiteurs lorsque la demande évaporative est forte mais la ressource en eau non limitante. A l'échelle des bandes de régénération, l'absence de mortalité le long des deux cours d'eau semble montrer que les conditions naturelles environnementales actuelles (densité de semis, température, régime hydrologique, condition pédoclimatique) ne soient finalement pas assez contraignantes pour engendrer une sélection à ce stade juvénile chez *P. nigra* (**Chapitre 2.2**). Toutefois, un lien positif entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la densité a été détecté ; par contre l'étendue de $\Delta^{13}\text{C}$ ne semblait pas modifiée par la densité de semis (**Chapitre 2.2**). Sous l'hypothèse où les températures élevées affectent préférentiellement les individus les plus efficaces (comme cela a été montré dans le cadre du **Chapitre 2.1**) la partie de la population (au stade juvénile) capable de résister à l'augmentation des températures serait celle présentant en valeur absolue les plus faibles valeurs de WUE et donc celle présente sous les plus fortes densités (**Chapitre 2.2**). L'étendue de $\Delta^{13}\text{C}$ n'étant pas liée à la densité de semis, la partie de la population capable de résister aux fortes températures maintiendra donc une variabilité pour WUE comparable à celle observée actuellement en l'absence de contrainte thermique avérée. Ainsi, nous pouvons dire que sous les fortes températures prédites par le changement climatique, une partie de la population (au stade juvénile) sera

capable de survivre et ceci grâce aux fortes densités de régénération renfermant toute la gamme de variabilité de la population pour WUE. Le caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau' pourrait donc s'avérer un caractère limitant de la régénération de l'espèce dans des conditions d'augmentation de températures. L'augmentation des températures pourraient alors avoir une conséquence directe sur la structuration génétique des populations futures.

Compte tenu de ces premiers résultats obtenus sur semis, le **Chapitre 3** vise à juger si (i) l'importante variabilité observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ sur les semis peut être observée sur des populations naturelles d'origines variées (Drôme, Pyrénées-Orientales et Loiret) installées en plantations comparatives et si (ii) la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ est structurée selon les environnements d'origine des populations.

CHAPITRE 3

Variabilité de l'efficienne d'utilisation de l'eau chez trois populations de *Populus nigra* L. installées en pépinière

Variabilité de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, de la croissance et des traits foliaires associées chez trois populations de *Populus nigra* L.

Sylvain Chamaillard, Régis Fichot, Cécile Vincent-Barbaroux, Catherine Bastien, Christiane Depierreux, Erwin Dreyer, Marc Villar & Franck Brignolas

Soumis pour publication à la revue Tree Physiology le 15 Avril 2011

PRESENTATION SYNTHETIQUE DE L'ARTICLE

- **Contexte.** Les augmentations de l'intensité et de la fréquence d'événements extrêmes tels que la canicule ou la sécheresse peuvent représenter une menace quant à la survie des populations installées de *P. nigra*. L'aptitude de l'espèce à faire face à de tels changements dépendra alors de la plasticité phénotypique des individus et de la capacité d'adaptation des populations. Une estimation de la variabilité génétique et de sa plasticité au sein et entre des populations installées pour des caractères adaptatifs est alors nécessaire.
- **Objectifs.** Les objectifs spécifiques de ce travail étaient (i) de quantifier la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ au sein et entre des populations de *P. nigra* et juger d'une possible structuration géographique de cette variabilité (ii) d'étudier la plasticité phénotypique de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à une contrainte hydrique (iii) étudier le lien entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la croissance.
- **Stratégie.** L'étude a été réalisée sur 90 génotypes échantillonnés au sein de trois populations naturelles françaises (30 génotypes par population). Les trois populations sont issues de trois environnements d'origine différents ; une population de plaine le long de la Drôme où le climat est caractérisé par de fortes températures estivales ; une population de plaine dans le Loiret où le climat est tempéré ; une population d'altitude dans les Pyrénées-Orientales. Les 90 génotypes échantillonnés ont été plantés en France, dans trois parcelles expérimentales réparties sur deux sites; une parcelle à Guémené-Penfao, deux parcelles à Orléans. A Guémené-Penfao, les travaux ont été réalisés à partir de plançons enracinés depuis 1 an ; le dispositif a été fertilisé et irrigué. A Orléans, les travaux ont été réalisés en conditions hydriques optimales ou limitantes, à partir de plançons enracinés depuis deux ans ; le dispositif n'a pas été fertilisé. Quel que soit le site, les mesures ont été réalisées sur la tige de l'année. La discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$) et ses

composantes structurales associées (surface foliaire massique, SLA ; teneurs massiques en azote et en carbone, N_M et C_M respectivement) ainsi que la biomasse aérienne des plants ont été mesurées sur tous les génotypes au sein de chaque site. Des valeurs d'héritabilité (H^2) et de coefficients de variation génétique (CV_G) ont également été calculées pour chaque population au sein de chaque site.

- **Résultats.** Des variations significatives ont été détectées pour tous les traits mesurés au sein et entre les populations quelles que soient les conditions de croissance. La variabilité au sein des populations était toujours supérieure à la variabilité entre les populations pour $\Delta^{13}C$, SLA et la biomasse aérienne. Les plus fortes valeurs d'héritabilité ont été observées pour $\Delta^{13}C$ et la biomasse ($H^2 > 0,75$) ; H^2 étaient toujours associées à de fortes valeurs de CV_G pour la biomasse (21-57%) et toujours associées à de faibles valeurs de CV_G pour $\Delta^{13}C$ (<4%). A Orléans, en réponse à une sécheresse modérée, une chute significative des valeurs de $\Delta^{13}C$, SLA et de biomasse a été détectée. Les variations induites par la sécheresse n'étaient ni génotype ni population-dépendantes alors que les variations induites par les conditions expérimentales du site de Guémené-Penfao étaient génotype et population-dépendantes. De façon remarquable, le classement des populations restait stable entre les parcelles étudiées pour les deux caractères complexes $\Delta^{13}C$ et la biomasse. Les trois populations différaient principalement pour ces deux caractères; les plus faibles valeurs de $\Delta^{13}C$ ont toujours été observées pour la population issue de l'environnement le plus chaud ; les plus faibles valeurs de biomasse ont toujours été observées pour la population d'altitude. Enfin aucune corrélation n'a été mise en évidence entre $\Delta^{13}C$ et la biomasse.

- **Conclusions.** A notre connaissance, cette étude est la première à caractériser la variabilité de $\Delta^{13}C$ au sein et entre des populations naturelles installées de peuplier noir ; nos résultats indiquent notamment de très fortes variations intra-populations et une stabilité du classement des populations pour deux caractères complexes, $\Delta^{13}C$ et la biomasse. Toutefois, aucun lien n'a été détecté entre ces deux caractères indiquant (1) que WUE et la biomasse étaient découplés chez le peuplier noir et (2) les facteurs environnementaux structurant la variabilité pour $\Delta^{13}C$ (*a priori* la température) et la biomasse (*a priori* l'altitude) opéraient de façon indépendantes. L'ensemble des résultats a permis de montrer une importante plasticité phénotypique et une importante variabilité génétique pour les traits étudiés mettant en lumière un important potentiel adaptatif suggérant une importante capacité d'adaptation de l'espèce dans un contexte de modifications environnementales.

Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three *Populus nigra* L. populations

SYLVAIN CHAMAILLARD^{1,2,3}, REGIS FICHOT^{1,2,3#}, CECILE VINCENT-BARBAROUX^{1,2}, CATHERINE BASTIEN³, CHRISTIANE DEPIERREUX^{1,2}, ERWIN DREYER^{4,5}, MARC VILLAR³ and FRANCK BRIGNOLAS^{1,2*}

¹ Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, UPRES EA 1207 'Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures' (LBLGC), rue de Chartres, BP 6759, F-45067 Orléans Cedex 2, France

² INRA, USC1328 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE), rue de Chartres, BP 6759, F-45067 Orléans Cedex 2, France

³ INRA, UR588 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF), Centre de Recherche d'Orléans, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans Cedex 2, France

⁴ INRA, UMR1137 INRA-UHP 'Écologie et Écophysiologie Forestières', IFR 110 'Génomique, Écophysiologie et Écologie Fonctionnelle', INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

⁵ Nancy-Université, UMR1137 INRA-UHP 'Écologie et Écophysiologie Forestières', Faculté des Sciences, F-54500 Vandœuvre, France

Present address: University of Antwerp, Research Group of Plant and Vegetation Ecology (PLECO), Department of Biology, Campus Drie Eiken, Universiteitsplein 1, B-2610, Wilrijk, Belgium

*Author to whom correspondence should be addressed:

FRANCK BRIGNOLAS

Phone: +33 (0)2 38 49 48 02

Fax: +33 (0)2 38 49 40 89

Email: franck.brignolas@univ-orleans.fr

Running Head: WATER-USE EFFICIENCY AND GROWTH IN *P. nigra*

SUMMARY

The ongoing global change could be an additional threat to the establishment and the long-term survival of *Populus nigra* L., an emblematic European riparian species. With the general aim of gaining insights into the adaptive potential of this species, we (i) quantified variations within and among three French *P. nigra* populations for key physiological attributes, i.e. water-use efficiency (assessed from bulk leaf carbon isotope discrimination, $\Delta^{13}\text{C}$), growth performance and related leaf traits, (ii) examined genotype and population by environment interactions, and (iii) explored the relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth. Thirty genotypes were sampled in each of three naturally-established populations and grown in two different sites. In one site two different watering regimes were applied. Significant variations were observed for all traits within and among populations irrespective of site and watering. Trait variation was larger within than among populations. Drought-induced acclimation was neither genotype- nor population dependent while site-induced variations were. The population ranking was however maintained in all sites and watering regimes for the two most complex traits $\Delta^{13}\text{C}$ and growth. Moreover, these two traits were unrelated, which indicates that (1) water-use efficiency and growth are largely uncoupled in this species, and (2) the environmental factors driving genetic structuration for $\Delta^{13}\text{C}$ and growth act independently. Taken together, our results suggest a large adaptive potential for *P. nigra* as revealed by the large inter-population differences of the studied traits

KEYWORDS: European black poplar, common gardens, phenotypic plasticity, population differentiation, water-use efficiency

INTRODUCTION

European black poplar (*Populus nigra* L.) is a key pioneer tree species colonizing alluvial sediments along large rivers in temperate climate zones of Europe, northern Africa and western Asia (Dickmann and Kuzovkina 2008). Along with other riparian species such as willows, *P. nigra* stands as a remarkable support for faunistic biodiversity (Rotach 2004) and is involved in various ecological processes such as the anchorage of sandy bars through its efficient rooting system (Karrenberg *et al.* 2003) or as nutrient recycling and water purification (Ruffinoni *et al.* 2003).

During the last decades, modifications of European river systems imposed significant threats to riparian communities. The two main factors currently threatening *P. nigra* are (1) fragmentation and the loss of its native habitat (Naiman *et al.* 2005), as well as (2) hybridization with domestic poplars including the widespread Lombardy poplar (*P. nigra* cv. *Italica*) (Vanden Broeck *et al.* 2005). The two factors affect population size and genetic diversity. Because the conservation of genetic diversity is a prerequisite to preserve the adaptive potential and the long-term survival of populations, programmes for the conservation of *P. nigra* genetic resources have been established in most European countries (European Forest Genetic Resources Network, EUFORGEN, Lefèvre *et al.* 2001, Villar & Forestier 2009).

Global change is likely to result in drier and warmer summers (IPCC 2007) which represents an additional threat to the establishment and the survival of *P. nigra* populations. An improved understanding of genotypic and phenotypic variations that occur within and among populations for key traits is required to gain insights into the geographical structuration and the adaptive potential of these populations. Water-use efficiency (WUE), defined at the whole-plant level as the ratio of biomass accumulation/water consumption, is

likely to influence tree fitness and to be therefore a target for natural selection (Lauteri *et al.* 2004). Intrinsic WUE (WUE_i) that is the ratio of net CO₂ assimilation rate to stomatal conductance for water vapour is a key component of whole plant WUE. It can be recorded from its proxy bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) (Farquhar & Richards 1984) incl. in poplar (Ripullone *et al.* 2004, Fichot *et al.* 2011). Significant variation for $\Delta^{13}C$, growth and related leaf traits (e.g. specific leaf area, leaf nitrogen content) has already been reported both within and among populations of different pure poplar species such as *P. fremontii* Wats (Sparks & Ehleringer 1997, Leffler & Evans 2001), *P. angustifolia* James (Sparks & Ehleringer 1997), *P. davidiana* Dode (Zhang *et al.* 2004), *P. trichocarpa* Torr. & Gray (Gornall & Guy 2007), *P. cathayana* Rehd (Xu *et al.* 2008) and *P. balsamifera* L. (Soolanayakanahally *et al.* 2009). To our knowledge, data on *P. nigra* populations remain so far not documented.

Many studies examining physiological differentiation within and among populations have been conducted *in situ*, and may therefore confound genetic and environmental (phenotypic) variations (*e.g.* Leffler & Evans 2001). Phenotypic plasticity, which is the ability of a genotype to express different phenotypes depending on the environment, is considered as the major mean by which plant populations cope with environmental heterogeneity and may therefore confer an adaptive potential (Bradshaw 1965, Nicotra *et al.* 2010). Common garden plantations are required to separate genetic and environmental components of trait variation and allow the assessment of 'Genotype by Environment' (G×E) and 'Population by Environment' interactions (P×E). Significant G×E and P×E may eventually indicate that the observed phenotypic plasticity is genotype- or population-dependent.

Here, we aimed at examining variations in physiological performances within and among three French *P. nigra* populations. Traits investigated included growth, $\Delta^{13}C$, and

related leaf traits (specific leaf area, carbon and nitrogen contents). Our specific objectives were (i) to quantify within- and among-populations variations, (ii) quantify phenotypic plasticity, i.e. examine genotype and population by environment interactions, and (iii) precise the relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth performance. To answer these questions, thirty genotypes from three populations were grown in two sites. In one site, two different watering regimes were applied.

MATERIALS AND METHODS

Origin and sampling of plant material

Three French *P. nigra* populations, each occurring in Natural National Reserves and part of the network of the French programmes of conservation of genetic resources of *Populus nigra* L. (Villar & Forestier 2009), were retained. The Nohèdes population (NOH) originates from Southern France (Pyrénées Orientales) along the Nohèdes river on an alluvial soil with rocks. The Nohèdes river is very small (17 km), torrential-type, with a natural flow regime varying from $0.05 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in summer to $4.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ during peak periods (mean annual flow of $0.2 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). The Ramières population (RAM) originates from South-Eastern France (Drôme) along the Drôme river, on a sandy alluvial soil (Regosol). The Drôme river is undammed along its 108 km and the flow regime can vary from $4 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in summer to $900 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ during flooding periods (mean annual flow of $25 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). The St-Pryvé St-Mesmin population (SPM) originates from Central France (Loiret) along the Loire river on an alluvial soil (Fluviosol). The Loire river is a long river (1020 km), partially regulated, with a flow regime ranging from 10 to $2000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (mean annual flow of $350 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$).

Table 3.1 Geo-climatic data for the three *P. nigra* populations

Populations	LAT	LON	ELEV	MAT	MAST	MAP	MASP	FFD	ADI	SDI
NOH	42°37'24"N	2°16'36"E	1000	10.8	17.2	753.2	60.4	303	1.73	3.54
RAM	44°45'08"N	4°54'01"E	187	12.7	21.1	910.4	57.4	321	1.62	4.57
SPM	47°52'19"N	1°49'24"E	91	10.9	18.8	635.9	46.5	311	2.08	4.77

Data were retrieved from the meteorological stations located close to the three sites of origin. Abbreviations: NOH, Nohèdes (Pyrénées-Orientales); RAM, Ramières (Drôme); SPM, St-Pryvé St-Mesmin (Loiret); LAT, latitude; LON, longitude; ELEV, elevation (m); MAT, mean annual temperature (°C); MAST, mean annual summer temperature (°C); MAP, mean annual precipitation (mm); MASP, mean annual summer precipitation (mm); FFD, mean number of frost-free days based on the number of days where minimum temperature was above zero (days); ADI, annual dryness index; SDI, summer dryness index.

Climate data (1971-2000) of each source habitat were provided by Météo-France from the closest meteorological station (**Table 3.1**). Basic meteorological variables included mean annual temperature (MAT, °C), mean annual summer temperature (MAST, °C), mean annual precipitation (MAP, mm), mean annual summer precipitation (MASP, mm) and mean number of frost-free days (FFD, days); MAST and MASP data were derived from June-to-August data. The FFD is calculated based on the number of days where minimum temperature was above 0°C, and is used here as a proxy for season length (Soolanayakanahally *et al.* 2009). Also included were indices of annual and summer ‘dryness’ (ADI and SDI, respectively); these indices were derived as described in Soolanayakanahally *et al.* (2009) using MAT, MAP, MASP and the mean temperature of the warmest month, higher ADI or SDI values being indicative of a drier habitat.

Branch cuttings were sampled on 30 sexually mature trees without *a priori* phenotypic selection in each population, along a linear distance depending on the size of the population (*i.e.* 1 km for NOH, 20 km for RAM and 2.3 km for SPM). The collection was done during January to March 2004 from the upper crowns of dormant trees. During sampling, attention was paid to reduce the possibility of sampling clones more than once by collecting well separated individuals. Cuttings were then propagated and kept in a first common garden as a source of plant material until the plots were set up. A set of 11 nuclear SSR markers actually revealed that all collected individuals were distinct genotypes (Jorge & Villar, unpublished data).

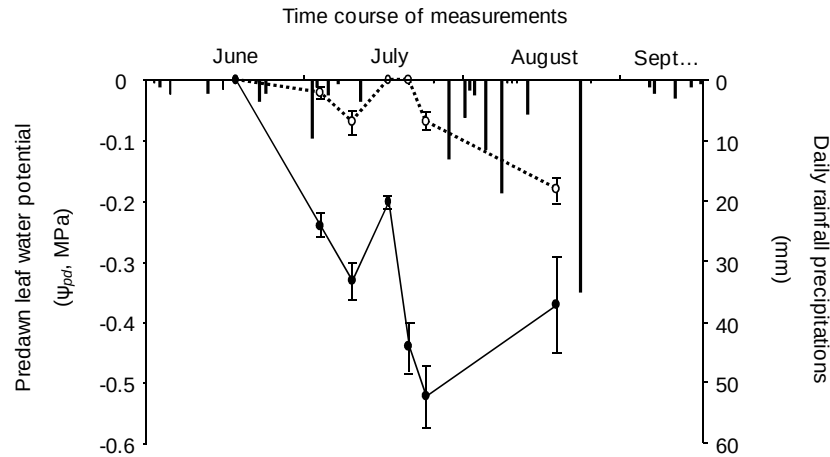
Experimental design and growth conditions

Three plots containing the three *P. nigra* populations were installed in France. The two first ones were located at the same site at nursery of the INRA Research Unit of Orléans (Loiret, 47°49’40’’N, 1°54’45’’E, 110 m a.s.l.) but they differed in terms of water regime. The third

one was located at the Forest State nursery of Guémené-Penfao (Loire-Atlantique, 47°37'46''N, 1°53'33''W, 20 m a.s.l.).

Plots at Orléans (ORL_{WW} and ORL_{WD})

Two plots were set up in June 2006, 15-m apart from each other, with five randomized complete blocks with one cutting of each genotype per block, on a loamy sand soil without fertilizer addition. Hardwood cuttings (0.25-m-long) were planted at an initial spacing within and between rows of 0.75 × 1.2 m, respectively. One border row of the same *P. nigra* genotype ('Blanc de Garonne') was planted around each plot to minimize edge effects. All trees were cut back at the end of 2006 and 2007, and in early spring of each growing season only the most vigorous shoot of each stump was retained. Plantation management included mechanical and manual weed control, as well as fungicide (Horizon, tebuconazole) and insecticide (Decis, deltamethrine) treatments when required. During 2007, the two plots were irrigated with overhead sprinklers as to meet evaporative demand (*i.e.* 4.5 mm of water were sprinkled every time cumulative potential evapotranspiration reached 4 mm). During 2008, irrigation was withheld in one of the two plots from 18 June 2008 to the end of the growing season (ORL_{WD}), while the second one remained regularly irrigated (ORL_{WW}). Cumulative rainfall reached 126 mm from 18 June to 30 September 2008. Soil water availability was monitored from 18 June to 18 August 2008 by measuring predawn leaf water potential (Ψ_{pd} , MPa); measurements were performed approx. once a week using a pressure chamber (PMS instruments, Albany, OR, USA) on one mature leaf for all cuttings of one genotype per population (*i.e.* $n = 15$ per plot) to check for the spatial and genotypic stability of Ψ_{pd} . Results indicated that from mid-June to mid-August Ψ_{pd} remained above -0.18 MPa on the control plot, while a progressive drop was recorded on the non-irrigated plot with a trough at -0.52 MPa on 24 July (see **Supplementary Fig. S3.1**).



Supplementary Fig. S3.1 Summer time course of pre-dawn leaf water potential (Ψ_{pd} , MPa, circles) and daily rainfall precipitations (mm, vertical bars) in Orléans. Values of pre-dawn leaf water potential are means $\pm$ SE from 15 well-watered trees (open circles) and 15 drought-exposed trees (closed circles).

Plot at Guémené-Penfao (GMN)

The plot was set up in May 2005, with six randomized complete blocks with one cutting of each genotype per block, on a loamy sand soil with fertilizer addition. Hardwood cuttings (0.25-m-long) were planted at an initial spacing within and between rows of 0.75×1.2 m, respectively. One border row of the same *P. nigra* genotype ('Blanc de Garonne') was planted around each plot to minimize edge effects. Trees were cut back at the end of 2005 and in early spring of growing season only the most vigorous shoot of each stump was retained. Additional fertilization was supplied with 150 and 100 kg/ha of NPK (10/20/20, v/v) during March and May 2006, respectively. Plantation management in terms of mechanical and manual weed control as well as fungicide and insecticide applications was comparable to the ORL site; however, irrigation was performed during the growing season, but we do not have information regarding the cumulated amount of water supplied.

Carbon isotope discrimination, related leaf traits and growth performance

The same traits were measured in the three plots for all genotypes, but the years of harvest differed with site. In Guémené-Penfao, leaves were collected on 8 August 2006 (one year-old shoots, second growing season) from three randomly selected blocks out of the six; in Orléans, leaves were sampled on 12 September 2008 (one year-old shoots, third growing season) from all blocks. At each sampling date, one mature and fully illuminated leaf was selected for each individual; six discs of leaf lamina (2 cm² each) were then punched from each leaf, dried at 60°C during 48 hrs before being weighted and used to compute specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹). The same discs were then ground to a fine powder for the analysis of carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$). One milligram sub-samples of ground material were enclosed in tin capsules and combusted in an elemental analyser (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy). The CO₂ produced by combustion was purified and the ¹³CO₂/¹²CO₂ ratio was analysed with a Finnigan MAT Delta S isotope ratio mass spectrometer (IRMS) (Bremen, Germany). Carbon isotope composition was expressed relative to the Pee Dee Belemnite (PDB) standard and was calculated as in Craig (1957):

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 (\text{‰})$$

where R_{sample} and R_{standard} are the ¹³CO₂/¹²CO₂ ratios of the sample and the standard, respectively (Farquhar *et al.* 1989). All analyses were performed at the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at INRA-Nancy. The accuracy of $\delta^{13}\text{C}$ measurements was $\pm 0.03\text{‰}$ (standard deviation). The carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) between atmospheric CO₂ (δ_{air}) and plant material (δ_{plant}) was calculated according to Farquhar & Richards (1984) as:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plant}}) / (1 + (\delta_{\text{plant}} / 1000))$$

assuming δ_{air} was -8‰. Carbon and nitrogen contents of the same samples were expressed on a dry mass basis (C_M and N_M , mg g⁻¹).

Growth performance was estimated by measuring fresh mass of the annual shoot (Biom_F , g) in January 2007 (Guémené-Penfao) and January 2009 (Orléans).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the R software (Version 2.10.1, A Language and Environment Copyright, 2007). Means are presented with their standard error (SE) and all statistical tests were considered significant at $P < 0.05$. Data were found to meet the assumption of homoscedasticity and normality distribution of residuals; all analyses were therefore performed using analysis of variance (ANOVA) using the following models:

- (i) Block effects were first tested within each plot for all using a simple one-way ANOVA model. Whenever they were significant, individual values were adjusted to block effects by calculating the difference between the mean of each block and the general mean computed from all individuals.
- (ii) Population and genotype effects were tested within each plot for all variables using the following model:

$$\text{var} = \text{Pop} + \text{Geno}(\text{Pop})$$

where 'var' refers to the tested variable, 'Pop' refers to the population effect considered as fixed, 'Geno(Pop)' refers to the genotype effect nested within population considered as random.

- (iii) Differences between plots were tested using the following model:

$$\text{var} = \text{Plot} + \text{Pop} + \text{Geno}(\text{Pop}) + \text{Plot} \times \text{Pop} + \text{Plot} \times \text{Geno}(\text{Pop}),$$

where ‘*var*’ refers to the tested variable, ‘*Plot*’ refers to the plot effect considered as fixed, ‘*Pop*’ refers to the population effect considered as fixed, ‘*Geno(Pop)*’ refers to the genotype effect nested within population considered as random, ‘*Plot × Pop*’ refers to the plot by population interaction, and ‘*Plot × Geno(Pop)*’ refers to the plot by genotype interaction. Note that these analyses were run as pair-wise comparisons between plots (*i.e.* ORL_{WW} vs. ORL_{WD}, ORL_{WW} vs. GMN and ORL_{WD} vs. GMN; see **Table 3.2**).

For each variable, population and plot, genotypic and residual variance components (σ^2_G and σ^2_e , respectively) were estimated using the restricted maximum likelihood method (REML). Broad-sense heritability (H^2) was then computed on an individual basis as $H^2_{\text{individual}} = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_e)$ and standard errors associated to values of $H^2_{\text{individual}}$ were calculated as described by Singh *et al.* (1993). In the same way, the coefficient of genetic variation (CV_G) was calculated as $CV_G = (s \times 100) / \mu$ where s is the standard deviation and μ is the grand mean.

Relationships between pairs of continuous variables were analyzed by linear regression analysis [Pearson’s correlation coefficients (r_p)] on a genotypic mean basis, for each population and each plot. The stability of genotype ranking across plots was assessed on a genotypic mean basis for each variable and each population using Spearman’s rank correlation coefficients (r_s).

RESULTS

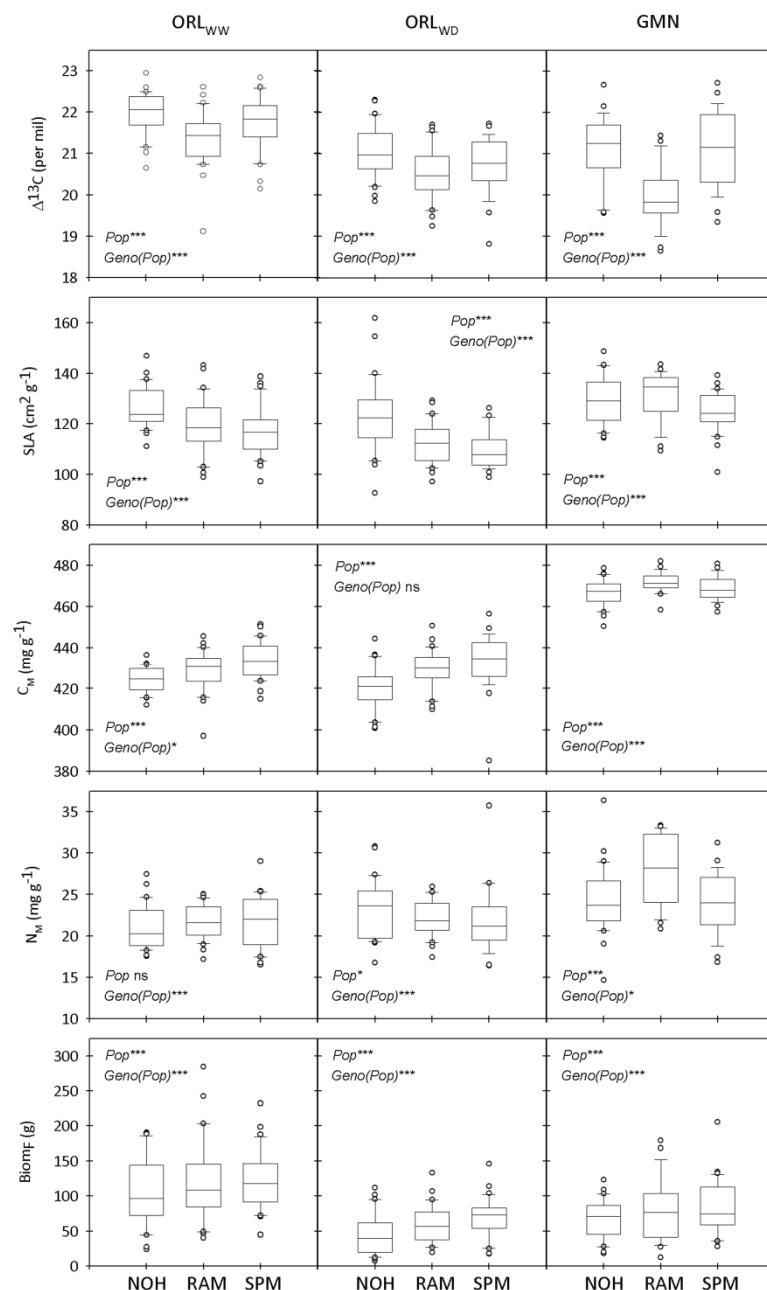


Figure 3.1 Box plots of genotypic means for each trait in each plot. Each box represents the quartile below (Q1) and above (Q3) the median value. Vertical bars represent minimum and maximum values except for genotypes that are away from 1.5 times from the top of the inter-quartile (Q3-Q1) range. Values beyond this range are represented as circles. Results of the ANOVA for within each plot are indicated, where *Pop* is the population effect and *Geno(Pop)* is the genotype effect nested in the population. Levels of significance are: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ns = non significant. Abbreviations: ORL_{WW}, irrigated plot at Orléans; ORL_{WD}, non-irrigated plot at Orléans; GMN, irrigated plot at Gien.

Orléans; GMN, plot at Guémené-Penfao; NOH, Nohèdes; RAM, Ramières; SPM, St-Pryvé St-Mesmin; $\Delta^{13}\text{C}$, bulk leaf carbon isotope discrimination (‰); SLA, specific leaf area ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), C_M , leaf carbon content (mg g^{-1}), N_M , leaf nitrogen content (mg g^{-1}); Biom_F , annual shoot fresh mass (g).

Table 3.2 ANOVA results for pair-wise comparisons between plots. Abbreviations: ORL_{WW}, irrigated plot at Orléans; ORL_{WD}, non-irrigated plot at Orléans; GMN, plot at Guémené-Penfao; $\Delta^{13}\text{C}$, bulk leaf carbon isotope discrimination (‰); SLA, specific leaf area ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), C_M , leaf carbon content (mg g^{-1}), N_M , leaf nitrogen content (mg g^{-1}); Biom_F , annual shoot fresh mass (g). Levels of significance are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non significant. *Plot* refers to the plot effect, *Pop* refers to the population effect, *Geno(Pop)* refers to the genotype effect nested within population, *Plot × Pop* refers to the plot by population interaction and *Plot × Geno(Pop)* refers to the plot by genotype interaction.

Plot comparisons	Variables	<i>Plot</i>	<i>Pop</i>	<i>Geno(Pop)</i>	<i>Plot × Pop</i>	<i>Plot × Geno(Pop)</i>
ORL _{WW} vs. ORL _{WD}	$\Delta^{13}\text{C}$	344.06***	35.83***	4.71***	0.56 ns	1.16ns
	SLA	58.80***	63.19***	4.08***	1.25ns	1.38*
	C_M	0.68ns	30.19***	1.72***	1.27ns	0.89ns
	N_M	14.52***	0.31 ns	4.53***	5.04**	1.17ns
	Biom_F	286.53***	17.58***	5.66***	1.91 ns	1.35*
ORL _{WW} vs. GMN	$\Delta^{13}\text{C}$	409.80***	109.33***	7.70***	16.20***	2.05***
	SLA	70.43***	20.20***	2.66***	8.38***	1.82***
	C_M	1479.17***	15.87***	1.60**	5.73**	0.89ns
	N_M	132.28***	12.03***	2.54***	12.30***	1.56**
	Biom_F	121.41***	14.96***	5.64***	0.64ns	2.09***
ORL _{WD} vs. GMN	$\Delta^{13}\text{C}$	0.07ns	58.07***	4.31***	16.30***	1.62**
	SLA	213.80***	21.89***	2.20***	12.00***	1.65***
	C_M	1212.73***	19.56***	1.32*	8.37***	1.11ns
	N_M	58.35***	6.27**	2.31***	15.35***	1.50**
	Biom_F	38.31***	21.37***	4.63***	1.33ns	2.43***

Variations among populations, $P \times E$ interactions and geographical trends

In each of the three plots (ORL_{WW}, ORL_{WD} and GMN), ANOVA revealed significant differences between mean performance of the three populations for all studied traits, with the exception of N_M in ORL_{WW} (**Fig. 3.1**). The difference between the two extreme population means at each site reached at least 0.55 ‰ for $\Delta^{13}\text{C}$, $6.3 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ for SLA, 4.9 mg g^{-1} for C_M , 1.1 mg g^{-1} for N_M and 16.2 g for Biom_F .

Overall, most traits varied significantly from one plot to the other (**Table 3.2, Fig. 3.1**). As expected, drought at Orléans resulted in lower $\Delta^{13}\text{C}$, SLA and Biom_F values as compared to at the irrigated plot ORL_{WW} (**Fig. 3.1**). Trees grown at GMN exhibited intermediate Biom_F values, similar $\Delta^{13}\text{C}$ values as those grown at ORL_{WD} but higher SLA, C_M and N_M values than trees grown at ORL_{WW} or ORL_{WD} (**Fig. 3.1**). The ANOVA model revealed no '*Plot × Pop*' interaction between ORL_{WW} and ORL_{WD} , except for N_M , so that population ranking was maintained for most of the variables (**Table 3.2, Fig. 3.1**). In contrast, the comparison of GMN with ORL_{WW} or ORL_{WD} revealed a significant '*Plot × Pop*'; however it is worth to note that for $\Delta^{13}\text{C}$, although a significant interaction was observed, population ranking was maintained (**Table 3.2, Fig. 3.1**).

In spite of the low number of populations investigated, some trends between physiological and climatic variables could be noticed directly from box plot and climate data. Growth performance seemed to vary negatively with elevation and MASP while positively with SDI (**Table 3.1, Fig. 3.1**); Otherwise, $\Delta^{13}\text{C}$ values seemed to vary negatively with temperature indices (MAT, MAST, FFD), the population from the warmest habitat (RAM) exhibiting consistently lower $\Delta^{13}\text{C}$ values (**Table 3.1, Fig. 3.1**).

Table 3.3 Relative percentages of variance components in each plot and for each trait. Abbreviations are as in Table 3.2.

	Variance	$\Delta^{13}\text{C}$	SLA	C_M	N_M	Biom_F
ORL_{WW}	Pop	10%	11%	8%	0%	1%
	Geno(Pop)	38%	28%	7%	30%	41%
	Residual	52%	61%	85%	70%	58%
ORL_{WD}	Pop	6%	19%	12%	1%	6%
	Geno(Pop)	21%	20%	4%	30%	25%
	Residual	73%	61%	84%	69%	69%
GMN	Pop	34%	3%	8%	11%	2%
	Geno(Pop)	48%	13%	31%	9%	65%
	Residual	18%	84%	61%	80%	33%

Table 3.4 Broad-sense heritability $\pm$ standard error ($H^2_{\text{individual}} \pm \text{SE}$) and coefficient of genetic variation (CV_G , %) calculated for each trait, each population in each plot. Abbreviations are as in Tables 3.1 and 3.2.

Variables	Populations	$H^2_{\text{individual}} \pm \text{SE}$			CV_G		
		ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN	ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN
$\Delta^{13}\text{C}$	NOH	0.32 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.09	0.70 $\pm$ 0.13	1.96	2.09	3.41
	RAM	0.60 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.13	2.89	2.35	3.45
	SPM	0.34 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.16	2.50	2.16	3.93
SLA	NOH	0.12 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.07	4.02	8.44	5.07
	RAM	0.46 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.05	8.15	4.63	4.60
	SPM	0.40 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.08	0.10 $\pm$ 0.06	6.88	3.99	3.93
C_M	NOH	ns	ns	0.54 $\pm$ 0.05	ns	ns	1.23
	RAM	ns	ns	0.19 $\pm$ 0.10	ns	ns	0.64
	SPM	0.17 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.10	1.41	1.31	0.86
N_M	NOH	0.25 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.10	9.84	9.41	10.19
	RAM	0.15 $\pm$ 0.08	ns	ns	6.24	ns	ns
	SPM	0.45 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.06	ns	12.63	16.46	ns
Biom _F	NOH	0.50 $\pm$ 0.31	0.50 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.08	41.39	57.30	33.31
	RAM	0.45 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.17	42.36	33.91	53.26
	SPM	0.28 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.13	26.11	21.49	42.36

Variations within populations and $G \times E$ interactions

ANOVA revealed significant differences between genotype performances for all studied traits, with the exception of C_M in ORL_{WD} (Table 3.2, Fig. 3.1). Variations within populations were larger than among populations (Table 3.3); the range of variations between the two extreme genotypic means at each site always reached at least 2.29 ‰ for $\Delta^{13}\text{C}$, 27.33 cm² g⁻¹ for SLA, 23.47 mg g⁻¹ for C_M , 7.85 mg g⁻¹ for N_M and 104.14 g for Biom_F. The range of genotypic variation was similar among the three populations (Fig. 3.1). The highest CV_G were detected for Biom_F (21.49 to 57.30 %) although values differed markedly depending on population and plot (Table 3.4); lower or non significant CV_G values were observed for the other variables (Table 3.4). Highly different heritabilities (0.08-0.77) were detected among traits when expressed on an individual basis ($H^2_{\text{individual}}$) (Table 3.4). The highest values were observed for $\Delta^{13}\text{C}$ and Biom_F at GMN, and the lowest ones for C_M at ORL_{WW} and ORL_{WD} (Table 3.4).

Table 3.5 Spearman's rank coefficients calculated from genotypic means of each population
Abbreviations and levels of significance are as in Table 3.2.

Variables	Populations	Spearman's rank coefficients		
		ORL _{WW} vs. ORL _{WD}	ORL _{WW} vs. GMN	ORL _{WD} vs. GMN
$\Delta^{13}\text{C}$	NOH	0.51**	0.62***	0.46*
	RAM	0.71***	0.69***	0.41*
	SPM	0.51**	0.44*	0.39*
SLA	NOH	0.57**	ns	ns
	RAM	0.54**	0.43*	ns
	SPM	0.74***	ns	ns
C_M	NOH	ns	ns	ns
	RAM	0.36**	ns	ns
	SPM	0.63***	0.37*	ns
N_M	NOH	ns	0.43*	ns
	RAM	0.59**	ns	ns
	SPM	0.69***	ns	ns
Biom _F	NOH	0.48**	ns	ns
	RAM	0.79***	0.57**	0.57**
	SPM	0.58**	0.37*	ns

The ANOVA model revealed a significant '*Plot × Geno(Pop)*' interaction for SLA and Biom_F at Orléans (**Table 3.2**); Spearman's rank correlations coefficients (r_s) calculated for each population from genotypic means were however highly significant for most of the variables, indicating that genotype ranking was overall maintained between ORL_{WW} and ORL_{WD} (**Table 3.5**). In contrast, when comparing GMN with ORL_{WW} or ORL_{WD}, results of the ANOVA model revealed a significant '*Plot × Geno(Pop)*' interaction for all variables, except C_M (**Table 3.2**); r_s calculated at the population level were not significant for most of the variables, except $\Delta^{13}\text{C}$, indicating that genotype ranking was not maintained for other variables (**Table 3.5**).

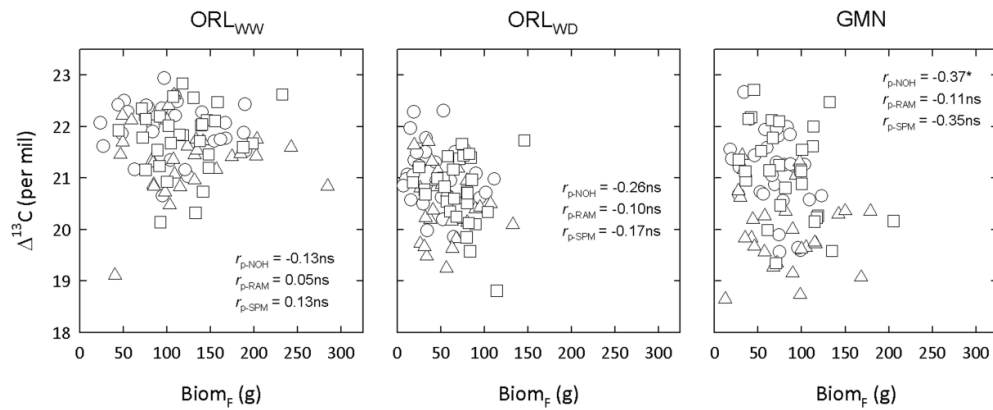


Figure 3.2 Relationship between bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰) and annual shoot fresh mass (Biom_F , g) for each population (NOH circles, RAM triangles and SPM squares) in each plot. Linear regressions (Pearson's correlation coefficients, r_p) were computed on a genotypic mean basis for each population ($r_{p\text{-NOH}}$, $r_{p\text{-RAM}}$ and $r_{p\text{-SPM}}$; $n = 30$). Levels of significance are $*P < 0.05$ and ns, non-significant. Abbreviations: ORL_{WW}, irrigated plot at Orléans; ORL_{WD}, non-irrigated plot at Orléans; GMN, plot at Guémené-Penfao, NOH, Nohèdes; RAM, Ramières; SPM, St-Pryvé St-Mesmin.

Supplementary Table S3.1 Linear correlations (Pearson's correlation coefficients) between variables computed at the genotypic level for each population in each plot. Significant correlations are highlighted in bold. Levels of significance are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Abbreviations: ORL_{WW}, irrigated plot at Orléans; ORL_{WD}, non-irrigated plot at Orléans; GMN, plot at Guémené-Penfao; NOH, Nohèdes; RAM, Ramières; SPM, St-Pryvé St-Mesmin; $\Delta^{13}\text{C}$, bulk leaf carbon isotope discrimination (‰); SLA, specific leaf area ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), C_M , leaf carbon content (mg g^{-1}), N_M , leaf nitrogen content (mg g^{-1}); Biom_F, annual shoot fresh mass (g).

Variables	Populations	$\Delta^{13}\text{C}$			SLA			C_M			N_M			Biom _F		
		ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN	ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN	ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN	ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN	ORL _{WW}	ORL _{WD}	GMN
$\Delta^{13}\text{C}$	NOH				-0.04	0.21	0.27	-0.37*	-0.11	0.04	-0.69***	-0.20	-0.38*	-0.13	-0.26	-0.37*
	RAM				0.23	0.37*	0.02	-0.26	-0.35	0.01	0.16	0.27	0.04	0.05	-0.10	-0.11
	SPM				0.05	0.33	0.32	0.07	0.11	-0.11	-0.21	-0.15	-0.47*	0.13	-0.17	-0.35
SLA	NOH							0.37*	-0.30	-0.20	0.28	0.49**	0.22	-0.13	-0.19	-0.28
	RAM							-0.28	-0.16	-0.04	0.38*	0.46*	0.04	0.17	0.04	0.16
	SPM							-0.18	0.21	-0.20	0.48**	0.55**	0.12	-0.01	0.15	0.01
C_M	NOH										0.55**	-0.47**	0.30	0.30	-0.24	0.48**
	RAM										-0.00	0.21	0.10	-0.05	0.16	0.04
	SPM										-0.11	0.18	0.09	0.04	0.33	0.26
N_M	NOH													-0.07	0.12	0.32
	RAM													0.14	0.34	0.03
	SPM													-0.20	0.37*	0.24
Biom _F	NOH															
	RAM															
	SPM															

Relationships between traits

The relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and Biom_F was never significant, except in one case (**Fig. 3.2**). Correlations between other variables were weak and most of the times not significant, so that no clear relationship could be evidenced (see **Supplementary Table S3.1**). Pooling values from the three populations did not modify these trends (data not shown).

DISCUSSION

P. nigra is an emblematic riparian species in Europe, for which we have to date only little information with respect to the diversity of functional traits. The present study revealed substantial variation in physiological performances within and among three French *P. nigra* populations originating from different geographic origins. The comparison among plots was valuable in assessing environmental effects on trait variations at population and genotype scales. Plant growth performance and WUE (here assessed through carbon isotope discrimination) are key physiological components integrating many structural and functional characters, *e.g.* photosynthetic capacity, stomatal function, relative carbon allocations among roots, stems and leaves. Characterizing genetic variations for these traits and their variations in response to changes in the environment may therefore provide insights into the adaptive potential of *P. nigra*.

Inter- and intra-populations variations and relationships to climate of origin

Mean $\Delta^{13}\text{C}$ values differed among populations, and population ranking remained stable across plots, suggesting strong population differentiation for WUE in this species. Available data regarding population differentiation for $\Delta^{13}\text{C}$ among other poplar species are rather limited and results appear dependent upon both the species and the number of populations considered; for instance, a recent comparison across 21 provenances of *P. balsamifera* L. indicated a maximum inter-population range of variation of 0.98‰ (Soolanayakanahally *et al.* 2009) while another study could not find significant differences among five provenances of *P. trichocarpa* Torr. & Gray (Gornall & Guy 2007). Water availability in the area of origin are well known to drive tree population differentiation in WUE, populations from drier sources generally exhibiting lower $\Delta^{13}\text{C}$ (Lauteri *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004, Marchin *et al.* 2008, Aletà *et al.* 2009). However, our results did not fit with this trend as attested by the lack of

clear relationship between population ranking for $\Delta^{13}\text{C}$ and either precipitation patterns or dryness indices. The phreatophyte behaviour of riparian poplar species is expected to ensure adequate water supply to the leaves and to help buffering summer drought (Rood *et al.* 2003), which may partly explain why water availability would not be the main factor driving WUE differentiation in *P. nigra*. In contrast, population variations for $\Delta^{13}\text{C}$ were matched by temperature indices of the area of origin: the population from the warmest area (RAM) displayed a consistently lower $\Delta^{13}\text{C}$ than the two other ones, in agreement with results reported for *P. trichocarpa* provenances (Gornall & Guy 2007). Higher air temperatures are expected to lead to higher air vapour pressure deficits, and differences in evaporative demand may have been therefore a more important driver for geographical differentiation than water availability in riparian poplars (Leffler & Evans 1999).

Growth performance also proved to differentiate the three populations in a consistent manner across the three plots. The extent of the period of active tree growth is known to be influenced by day length and/or temperature and typically shows strong genetic differentiation resulting in locally adapted ecotypes (Luquez *et al.* 2008, Rohde *et al.* 2011). In the present study, realized growth declined with elevation like among *P. trichocarpa* provenances (Gornall & Guy 2007) but it was however not directly related to the number of frost-free days (FFD, a proxy index of the growing season length) and to temperature indices contrary to other reports (Soolanayakanahally *et al.* 2009). On the other hand, growth appeared to be negatively related to mean annual summer precipitations and positively to the summer dryness index, a trend already documented to some extent in *P. balsamifera* (Soolanayakanahally *et al.* 2009) and in *P. tremuloides* Michx. (Messaoud & Chen 2011) but which contrasts severely with other common observations in tree species (Nguyen-Queyrens *et al.* 1998, Lauteri *et al.* 2004, Ducrey *et al.* 2008).

Traits variation was larger within than among populations. In addition, the range of intra-population variation was quite comparable in the three populations: the range of within-population variations was not significantly influenced by the area of origin. It is very likely that the imbalance between the low number of populations (3) as compared to the high number of representative genotypes per population (30) clearly favoured the expression of within-population variations. However, several other studies on phenotypic trait variations in tree species reported similar patterns regarding within- and among-populations variations (Kremer 1994, Brendel *et al.* 2002, Aranda *et al.* 2010, Keller *et al.* 2011). Forest tree species are generally characterized by large population sizes, high gene flow within population and therefore high genetic diversity which typically facilitates rapid adaptation (Savolainen *et al.* 2007). Furthermore, the maintenance of high levels of within-population variation may be a characteristic inherent to pioneering riparian species, ensuring successful establishment and adaptation under the highly fluctuating nature of the riparian habitat (Weber *et al.* 1985).

The measured phenotypic traits displayed significant heritabilities (H^2), though values were highly variable among plots and populations. This is not surprising when considering that H^2 values reflect the expression of genotypic variability for one specific population under one given environment (Lynch & Walsh 1998). In spite of this, it may be worth to note that the highest H^2 values were consistently observed for the two most complex traits, *i.e.* growth performance and $\Delta^{13}\text{C}$, with values sometimes reaching more than 0.75. H^2 values for growth were paralleled by high CV_G values (21-57 %), as already observed for a *P. tremuloides* population (Kanaga *et al.* 2008). In contrast, H^2 values for $\Delta^{13}\text{C}$ were paralleled by a very low CV_G (always < 4%), a pattern that seems to be common across tree species (Lauteri *et al.* 2004) incl. in poplar (Kanaga *et al.* 2008, Monclus *et al.* 2009). Caution should be however taken when interpreting genetic and physiological significance of the low $\Delta^{13}\text{C}$ variations. A CV_G value of 4% referred to a general mean value of 21‰ (as observed when averaging data

across populations and plots) would imply a variation of $\Delta^{13}\text{C}$ of about 0.85‰, supposedly translating into a *ca.* 16.5% variation in intrinsic WUE based on Farquhar's model (Farquhar *et al.* 1982). Such a variation is therefore physiologically relevant.

Environmental-induced variations

Because of their tight dependency upon water availability, species of the *Populus* genus are generally considered as very sensitive to water deficit (Blake *et al.* 1996), and *P. nigra* is no exception. Indeed, although drought was relatively moderate in our study ($\Delta\Psi_{\text{pd}}$ never dropped below -0.45 MPa as compared to the control plot), $\Delta^{13}\text{C}$, SLA and annual shoot fresh mass decreased on average by 4%, 5% and 51% respectively, while N_M and C_M remained approx. constant. Similar variations in terms of magnitude have already been reported in other poplar species/hybrids under comparable water deficit intensities (*e.g.* Zhang *et al.* 2004, Monclus *et al.* 2006, 2009, Fichot *et al.* 2010). The lower $\Delta^{13}\text{C}$ values are in agreement with the well-known observation that WUE generally increases with increasing evaporative demand/water limitation (Ehleringer *et al.* 2002) and illustrate the poplar water-saving strategy resulting from the high drought sensitivity of stomata (Braatne *et al.* 1992, Silim *et al.* 2009). One of the most important results was that 'drought $\times$ genotype' interactions were only seldom and weakly significant while Spearman's rank coefficients between genotypic means were positive, moderately high and highly significant for each population, resulting in the maintenance of a rather constant range of within-population variations; hence, although genotypes could punctually differ in their response amplitude, there was no systematic trade-off in genotypic physiological behaviour, regardless of the provenance. Further, 'drought $\times$ population' interactions were also not significant (except for N_M), thereby highlighting the lack of differences in drought-induced plasticity between populations. Comparative data are lacking in poplar, but uniformity in the drought response has already been reported at the

population level for $\Delta^{13}\text{C}$ in *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws (Zhang *et al.* 1997, Olivas-García *et al.* 2000), *Castanea sativa* Mill. (Lauteri *et al.* 2004), and *Eucalyptus microtheca* F. Muell. (Li 2000), as well as for growth in *Pinus pinaster* Aiton (Aranda *et al.* 2010) or *Eucalyptus globulus* Labill. (Osório *et al.* 1998). In contrast, differences in drought sensitivity among populations have also been reported for $\Delta^{13}\text{C}$ in *Pinus pinaster* (Aranda *et al.* 2010) and for growth in *Pinus ponderosa* (Zhang *et al.* 1997).

In contrast to the drought effect, site-related variations were largely both genotype- and population-dependent, though they did not systematically translate into a different population ranking (see for $\Delta^{13}\text{C}$ and Biom_F). Therefore, we conclude that site-related variations were not predominantly explained by site differences in water availability. In fact, although the GMN site was not irrigated on a regular basis as in ORL_{WW}, water was punctually supplemented during the growing season partly explaining why Biom_F values at GMN were intermediate as compared to those obtained at ORL_{WW} and ORL_{WD}. In addition, the GMN site was fertilized, but not the others, a feature which was readily visible through the higher leaf N_M contents recorded at GMN. Fertilization has also been shown to improve WUE in poplar (Harvey & van den Driessche 1999, DesRochers *et al.* 2006), which is consistent with the low $\Delta^{13}\text{C}$ values recorded at GMN. Actually, fertilization may have exacerbated intrinsic differences between genotypes for nutrient-use efficiency and might be mainly responsible for the observed G×E and ultimately P×E interactions.

Relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth performance

We found no significant relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and Biom_F suggesting that WUE and growth performance are to a large extent uncoupled, which is consistent with previous works on inter-specific hybrids such *P. deltoides* × *P. nigra* (Monclus *et al.* 2006, Fichot *et al.* 2010) and *P. trichocarpa* × *P. deltoides* (Rae *et al.* 2004). There was only one exception for the

NOH population at the GMN site, for which a weak but significant negative relationship was observed. Differing relationship patterns between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth lie in differences for the primary source of genotypic variation in WUE_i . Variations in $\Delta^{13}\text{C}$ are fundamentally influenced by the balance between photosynthetic capacity and stomatal conductance; a negative relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth is generally interpreted as photosynthetic capacity driving WUE_i variations, while a lack of relationship between the two traits generally supports differences in stomatal conductance as the main driver for WUE_i (Farquhar *et al.* 1989). However, realized growth in poplar not only relies on photosynthetic capacity but also on leaf structure and relative carbon allocations between perennial compartments (Barigah *et al.* 1994), which may be also partly responsible for WUE and growth to be uncoupled. Actually, previous work undertaken on *P. deltoides* $\times$ *P. nigra* hybrids, among which WUE and growth were not related, demonstrated both that (i) stomatal conductance was the main driver for WUE_i and $\Delta^{13}\text{C}$ genotypic variations, and (ii) photosynthetic capacity and net assimilation rate were not a significant determinant of growth performance (Monclus *et al.* 2006). Improved understanding of the physiological controls acting on WUE_i and growth is necessary and will provide the functional basis for the lack of relationship between these two complex traits.

CONCLUSION

To conclude, (a) this study evidenced variations in ecophysiological performance both within and among three French *P. nigra* populations; (b) populations were consistently different for $\Delta^{13}\text{C}$ and growth though these two complex traits were not related to each other, ultimately indicating that the environmental factors driving genetic structuration for $\Delta^{13}\text{C}$ and growth act independently; (c) drought-induced acclimation was neither genotype- nor population-dependant, while site-related variations were. Taken together, these results underline the significant adaptive potential of *P. nigra* under the currently changing environmental conditions. Further research on more numerous populations originating from all over Europe will help revealing local adaptations and elucidating the links between climate, water-use efficiency and growth performance for this emblematic riparian species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Michel Chantereau (Natural Reserve of Saint-Mesmin), Jean-Michel Faton (Natural Reserve of Ramières) and Alain Mangeot (Natural Reserve of Nohèdes) for the access to the riparian habitat and the wild *Populus nigra* trees; Olivier Forestier and his team (Forest State nursery of Guémené-Penfao), Patrick Poursat and Ludovic Pasquier (experimental unit of INRA-Orléans) for the establishment and the logistic support of experimental trials; Isabelle Le Jan, Jean-Michel Petit, Didier Delay and Gilles Moreau (LBLGC, University of Orléans) for their helpful assistance in data collection. We also thank Claude Bréchet and Christian Hossann at the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at INRA-Nancy for passing carbon isotope samples on the IRMS.

FUNDING

This work is part of the PhD work of SC. SC was supported by a PhD grant from the '*Conseil Régional, Région Centre, France*'. RF was supported by a PhD grant from the '*French Ministry of Higher Education and Research*'. This study has been carried out with financial support from the '*Délégation Régionale de la Recherche et de la Technologie de la Région Centre, France*' (ANR-07-CPER-063-01), from the UE-FP6 Network of Excellence EVOLTREE 'Evolution of Trees as drivers of Terrestrial Biodiversity', N°016322).

REFERENCES

- Aletà** N, Vilanova A, Díaz R, Voltas J (2009) Genetic variation for carbon isotope composition in *Juglans regia* L.: relationships with growth, phenology and climate of origin. *Ann For Sci* 66:413.
- Aranda** I, Alía R, Ortega U, Dantas AK, Majada J (2010) Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genet Genomes* 6:169–178.
- Barigah** TS, Saugier B, Mousseau M, Guittet J, Ceulemans R (1994) Photosynthesis, leaf area and productivity of 5 poplar clones during their establishment year. *Ann For Sci* 51:613–625.
- Blake** TJ, Sperry JS, Tschaplinski TJ, Wang SS (1996) Water relations. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM (eds) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Canada. pp 401–422.
- Braatne** JH, Hinckley TM, Stettler RF (1992) Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their F₁ hybrids. *Tree Physiol* 11:325–339.
- Bradshaw** AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13:115–155.
- Brendel** O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl JM (2002) Genetic parameters and QTL analysis of $\delta^{13}\text{C}$ and ring width in maritime pine. *Plant Cell Environ* 25:945–953.
- Craig** H (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* 12:133–149.
- DesRochers** A, van den Driessche R, Thomas BR (2006) NPK fertilization at planting of three hybrid poplar clones in the boreal region of Alberta. *For Ecol Manag* 232:216–225.

- Dickmann** DI, Kuzovkina J (2008) Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species. *In*: Isebrands JG, Richardson J (eds) Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment. FAO/IPC, Rome, Italy, 135 p-Chapter 2.
- Ducrey** M, Huc R, Ladjal M, Guehl JM (2008) Variability in growth, carbon isotope composition, leaf gas exchange and hydraulic traits in the eastern Mediterranean cedars *Cedrus libani* and *C. brevifolia*. *Tree Physiol* 28:689–701.
- Ehleringer** J, Bowling D, Flanagan L, Fessenden J, Helliker B, Martinelli L, Ometto J (2002) Stable isotopes and carbon cycle processes in forests and grasslands. *Plant Biol* 4:181–189.
- Farquhar** GD, O’Leary MH, Berry JA (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust J Plant Physiol* 9:121–137.
- Farquhar** GD, Richards RA (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust J Plant Physiol* 11:539–552.
- Farquhar** GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:503–537.
- Fichot** R, Barigah TS, Chamaillard S, Le Thiec D, Laurans F, Cochard H, Brignolas F (2010) Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant Cell Environ* 33:1553–1568.
- Fichot** R, Chamaillard S, Depardieu C, Le Thiec D, Cochard H, Barigah TS, Brignolas F (2011) Hydraulic efficiency and coordination with xylem resistance to cavitation, leaf function and growth performance among eight unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *J Exp Bot* 62:2093–2106.

- Gornall** JL, Guy RD (2007) Geographical variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Can J Bot* 85:1202–1213.
- Harvey** HP, van den Driessche R (1999) Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiol* 19:943–950.
- IPCC**, Climate change (2007) The physical science basis: working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kanaga** MK, Ryel RJ, Mock KE, Pfrender ME (2008) Quantitative-genetic variation in morphological and physiological traits within a quaking aspen (*Populus tremuloides*) population. *Can J For Res* 38:1690–1694.
- Karrenberg** S, Blaser S, Kollmann J, Speck T, Edwards PJ (2003) Root anchorage of saplings and cuttings of woody pioneer species in a riparian environment. *Funct Ecol* 17:170–177.
- Keller** SR, Soolanayakanahally R, Guy RD, Silim SN, Olson M, Tiffin P (2011) Climate-driven local adaptation of ecophysiology and phenology in balsam poplar, *Populus balsamifera* L. (Salicaceae). *Am J Bot* 98:99–108.
- Kremer** A (1994) Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genet Sel Evol* 26:105–123.
- Lauteri** M, Pliura A, Monteverdi MC, 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. *J Evol Biol* 17:1286–1296.
- Lefèvre** F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (2001) EUFORGEN Technical Bulletin: *In situ* conservation of *Populus nigra*. IPGRI, Rome, Italy.
- Leffler** AJ, Evans AS (1999) Variation in carbon isotope composition among years in the riparian tree *Populus fremontii*. *Oecologia* 119:311–319.

- Leffler** AJ, Evans AS (2001) Physiological variation among *Populus fremontii* populations: short- and long-term relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and water availability. *Tree Physiol* 21:1149–1155.
- Li** C (2000) Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiol Plant* 108:134–139.
- Luquez** V, Hall D, Albrechtsen BR, Karlsson J, Ingvarsson P, Jansson S (2008) Natural phenological variation in aspen (*Populus tremula*): the SwAsp collection. *Tree Genet Genomes* 4:279–292.
- Lynch** M, Walsh JB (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Marchin** RM, Sage EL, Ward JK (2008) Population-level variation of *Fraxinus americana* (white ash) is influenced by precipitation differences across the native range. *Tree Physiol* 28:151–159.
- Messaoud** Y, Chen HYH (2011) The influence of recent climate change on tree height growth differs with species and spatial environment. *Plos One* 6:e14691.
- Monclus** R, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Petit J-M, Barbaroux C, Le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytol* 169:765–777.
- Monclus** R, Villar M, Barbaroux C, Bastien C, Fichot R, Delmotte FM, Delay D, Petit J-M, Bréchet C, Dreyer E, Brignolas F (2009) Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* × *Populus trichocarpa* F₁ progeny. *Tree Physiol* 29:1329–1339.
- Naiman** RJ, Décamps H, McClain ME (2005) Riparia: ecology, conservation, and management of streamside communities. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

- Nguyen-Queyrens A, Ferhi A, Loustau D, Guehl JM (1998)** Within-ring $\delta^{13}\text{C}$ spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Can J For Res* 28:766–773.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M (2010)** Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci* 15:1360–1385.
- Olivas-García JM, Cregg BM, Hennessey TC (2000)** Genotypic variation in carbon isotope discrimination and gas exchange of ponderosa pine seedlings under two levels of water stress. *Can J For Res* 30:1581–1590.
- Osório J, Osório ML, Chaves MM, Pereira JS (1998)** Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol* 18:363–373.
- Rae AM, Robinson KM, Street NR, Taylor G (2004)** Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. *Can J For Res* 34:1488–1498.
- Ripullone F, Lauteri M, Grassi G, Amato M, Borghetti M (2004)** Variation in nitrogen supply changes water-use efficiency of *Pseudotsuga menziesii* and *Populus* $\times$ *euroamericana*; a comparison of three approaches to determine water-use efficiency. *Tree Physiol* 24:671–679.
- Rohde A, Storme V, Jorge V, Gaudet M, Vitacolonna N, Fabbri F, Ruttink T, Zaina G, Marron N, Dillen S, Steenackers M, Sabatti M, Morgante M, Boerjan W, Bastien C (2011)** Bud set in poplar – genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytol* 189:106–121.
- Rood SB, Braatne JH, Hughes FMR (2003)** Ecophysiology of riparian cottonwoods: stream flow dependency, water relations and restoration. *Tree Physiol* 23:1113–1124.

- Rotach P** (2004) Poplars and Biodiversity. In: Koskela J, de Vries SMG, Kajba D, von Wühlisch G. *Populus nigra* Network, Report of seventh (25–27 October 2001, Osijek, Croatia) and eighth meetings (22–24 May 2003, Treppeln, Germany). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Ruffinoni C**, Tremolières M, Sanchez-Pérez JM (2003) Végétation alluviale et flux de nutriments: des liens interactifs. In: Piégay H, Pautou G, Ruffinoni C (eds) Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. Institut pour le Développement Forestier, Paris, France. pp 134–154.
- Savolainen O**, Pyhäjärvi T, Knurr T (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Ann Rev Ecol Evol S* 38:595–619.
- Silim S**, Nash R, Reynard D, White B, Schroeder W (2009) Leaf gas exchange and water potential responses to drought in nine poplar (*Populus* spp.) clones with contrasting drought tolerance. *Trees* 23:959–969.
- Singh M**, Ceccarelli S, Hamblin J (1993) Estimation of heritability from varietal trials data. *Theor Appl Genet* 83:437–441.
- Soolanayakanahally RY**, Guy RD, Silim SN, Drewes EC, Schroeder WR (2009) Enhanced assimilation rate and water use efficiency with latitude through increased photosynthetic capacity and internal conductance in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Plant Cell Environ* 32:1821–1832.
- Sparks JP**, Ehleringer JR (1997) Leaf carbon isotope discrimination and nitrogen content for riparian trees along elevational transects. *Oecologia* 109:362–367.
- Vanden Broeck A**, Villar M, Van Bockstaele E, Van Slycken J (2005) Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Ann For Sci* 62:601–613.

- Villar M**, Forestier O (2009) Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? *Revue Forestière Française* LXI – 5:457–466.
- Weber JC**, Stettler RF, Heilman PE (1985) Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* T. & G. and its hybrids. I. Morphology and phenology of 50 native clones. *Can J For Res* 15:376–383.
- Xu X**, Yang F, Xiao X, Zhang S, Korpelainen H, Li C (2008) Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant Cell Environ* 31:850–860.
- Zhang JW**, Feng Z, Cregg BM, Schumann CM (1997) Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiol* 17:461–466.
- 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 Sci* 166:791–797.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans le cadre d'une collaboration entre l'USC1328 INRA 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE) du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC-EA) de l'Université d'Orléans et l'Unité 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF) de l'INRA d'Orléans. Dans le contexte de la conservation des ressources génétiques françaises de *P. nigra* et dans le cadre des modifications climatiques actuelles, les objectifs de cette thèse visaient (i) à quantifier la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE), (ii) à juger de la plasticité phénotypique de WUE en réponse à des contraintes hydrique et thermique, et (iii) à juger des liens entre WUE, croissance et capacité de survie. Les expériences ont été réalisées à partir de semis en chambre de croissance (**Chapitre 2.1**) ou issus de leur milieu naturel (**Chapitre 2.2**) et à partir de populations installées en dispositifs de pépinière (**Chapitre 3**). Dans cette section finale, les principaux résultats sont restitués de façon synthétique au regard des objectifs initiaux. Certaines limites à l'étude sont ensuite présentées ainsi que les perspectives de ce travail de thèse à court et moyen termes.

1.SYNTHESE DES TRAVAUX

1.1 Variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau

Nos travaux ont permis d'étudier le caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau' via $\Delta^{13}\text{C}$ pour la première fois chez *P. nigra*. Quels que soient l'échelle d'étude, le fond génétique et les conditions de croissance, nous avons systématiquement montré d'importantes variations de $\Delta^{13}\text{C}$: (i) de 4‰ chez les semis cultivés en conditions contrôlées traduisant des différences de WUE de l'ordre de 78% (**Chapitre 2.1**), (ii) de 2‰ à plus de 5‰ chez les semis établis en milieu naturel traduisant des différences de WUE de l'ordre de 40% à plus de 90% (**Chapitre 2.2**), et (iii) de 2‰ à 3‰ chez les trois populations installées en dispositifs de pépinière traduisant des différences de WUE de l'ordre de 40% à 60% (**Chapitre 3**). La gamme de variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ observée chez *P. nigra* était similaire ou supérieure à celle observée chez des espèces pures de peuplier (Sparks & Ehleringer 1997, Leffler & Evans 2001, Zhang *et al.* 2004, Gornall & Guy 2007, Xu *et al.* 2008, Soolanayakanahally *et al.* 2009) et chez des hybrides interspécifiques (Rae *et al.* 2004, Ripullone *et al.* 2004, Marron *et al.* 2005, Monclus *et al.* 2005, 2006, 2009, Voltas *et al.* 2006, Bonhomme *et al.* 2008, Dillen *et al.* 2008, Fichot

et al. 2010). Néanmoins, les bases physiologiques précises à l'origine de cette variabilité de WUE restent à établir chez *P. nigra*.

Nos travaux ont également montré que la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ observée au sein de chaque population était très supérieure à celle observée entre populations (**Chapitres 2 & 3**). Le maintien d'une importante variabilité au sein des populations semble un phénomène fréquent chez les arbres de la ripisylve (Weber *et al.* 1985, Farmer 1996) et chez les arbres forestiers en général (Hamrick *et al.* 1992, Kremer 1994, Müller-Starck 1995, Petit 1999) pour permettre aux populations de s'adapter aux modifications environnementales locales ou à plus grande échelle. Le maintien de la variabilité au sein des populations à tous les stades du développement semble primordial pour la pérennité de l'espèce dans un contexte de variations de l'environnement.

Enfin nos travaux ont montré que le caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau' permettait de distinguer les trois populations (*cf.* **Chapitre 3**) et que le classement de ces populations était maintenu quelles que soient les conditions de croissance. De façon intéressante, la population originaire de l'environnement le plus chaud (Ramières – Drôme) présentait systématiquement la plus forte efficacité d'utilisation de l'eau et ceci en accord avec des résultats obtenus chez *P. trichocarpa* (Gornall & Guy 2007). Ainsi, des différences de températures de l'air entre les sites d'origine induiraient des différences de demande évaporative qui pourraient être par conséquent un facteur responsable de la structuration géographique chez les espèces de la ripisylve (Leffler & Evans 1999). La différenciation des trois populations par leur niveau d'efficacité d'utilisation de l'eau et le maintien du classement des populations pour ce caractère quel que soit l'environnement de croissance semblent souligner son importance dans de possibles processus d'adaptations locales. Toutefois, compte tenu du faible nombre de populations étudiées, des études de plus grande ampleur devront être réalisées dans le but de juger d'une structuration géographique de la variabilité de WUE et des facteurs à l'origine de cette structuration chez *P. nigra*.

1.2 Plasticité phénotypique de l'efficacité d'utilisation de l'eau

Les espèces ligneuses étant longévives, la plasticité phénotypique joue un rôle fondamental dans la capacité d'acclimatation des individus à l'environnement (Akerly *et al.* 2000, Valladares *et al.* 2007). Contrairement à l'approche *in situ*, l'utilisation de matériel végétal en chambre de croissance ou en dispositifs de pépinière dans notre étude a permis de dissocier les effets génétiques des effets environnementaux.

Nos travaux montrent que la contrainte thermique entraîne une augmentation moyenne des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ de 0,5‰ traduisant une diminution moyenne de 10% de l'efficacité d'utilisation de l'eau (cf. **Chapitre 2.1**). Cette augmentation de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à l'augmentation de la température est probablement due à une augmentation de la conductance stomatique. La plasticité observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à la contrainte thermique était toutefois ni provenance ni femelle-dépendante montrant une absence de variabilité génétique de la plasticité phénotypique, ce qui à notre connaissance n'a jamais été observé chez le peuplier noir.

Nos travaux montrent également que la contrainte hydrique entraîne une diminution moyenne des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ de 0,9‰ traduisant une augmentation moyenne de 17,5% de l'efficacité d'utilisation de l'eau (cf. **Chapitre 3**). Cette diminution de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à la contrainte hydrique est probablement due à une diminution de la conductance stomatique, ce qui est classiquement observé quand la disponibilité en eau du sol diminue ; des résultats similaires ont largement été rapportés au sein du genre *Populus* (Braatne *et al.* 1992, Zhang *et al.* 2004, Monclus *et al.* 2006, 2009, Silim *et al.* 2009, Fichot *et al.* 2010). Malgré la plasticité de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à la sécheresse, les classements des génotypes au sein des populations et entre les populations restaient maintenus, ce qui à notre connaissance n'a jamais été observé chez le peuplier noir, contrairement à d'autres espèces telles que *Pinus ponderosa* (Zhang *et al.* 1997), *Eucalyptus microtheca* (Li 2000) et *Castanea sativa* (Lauteri *et al.* 2004).

Au regard de ces résultats, une importante plasticité phénotypique de $\Delta^{13}\text{C}$ a été montrée quelle que soit la contrainte imposée. Sachant que la capacité d'acclimatation d'une espèce dépend à court terme de la plasticité phénotypique au niveau des individus, ces premiers résultats chez *P. nigra* semblent indiquer que les individus au sein des populations sont probablement en mesure de répondre à des contraintes environnementales de types hydrique ou thermique. Néanmoins, les bases physiologiques à l'origine de cette plasticité restent à établir chez *P. nigra*.

De façon intéressante, quelle que soit la contrainte imposée, thermique (**Fig. P1a**) ou hydrique (**Fig. P1b**), nos résultats semblent indiquer que dans les populations naturelles, les individus possédant des valeurs intrinsèques de $\Delta^{13}\text{C}$ les plus éloignées des valeurs de réponse à la contrainte sont toujours les plus plastiques ; ces résultats sont synthétisés dans la **Fig. P1**.

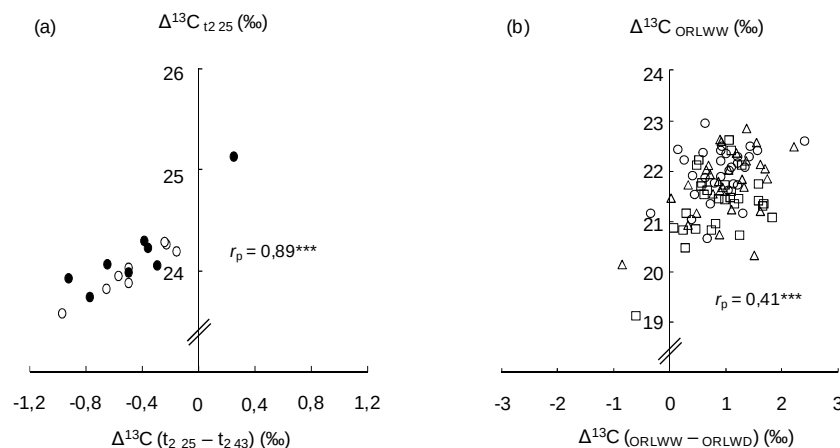


Figure P1. Relation entre la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰) mesurée en condition non limitante [(a) : $\Delta^{13}\text{C}_{t2\ 25}$; (b) : $\Delta^{13}\text{C}_{\text{ORLWW}}$] et la différence de $\Delta^{13}\text{C}$ calculée entre la condition non limitante et la condition de contrainte [(a) : $\Delta^{13}\text{C}_{t2\ 25} - \Delta^{13}\text{C}_{t2\ 43}$; (b) : $\Delta^{13}\text{C}_{\text{ORLWW}} - \Delta^{13}\text{C}_{\text{ORLWD}}$]. Abréviations : t2 25 pour la température de la chambre au temps t2 de 25°C (cf. **Chapitre 2.1**) ; t2 43 pour la température de la chambre au temps t2 de 43°C (cf. **Chapitre 2.1**) ; ORLWW pour Orléans en condition hydrique non limitante (cf. **Chapitre 3**) ; ORLWD pour Orléans en condition hydrique limitante (cf. **Chapitre 3**). (a) Les cercles blancs se réfèrent aux descendants des femelles françaises, les cercles noirs aux descendants des femelles italiennes, et (b) les cercles se réfèrent à la population de Nohèdes, les triangles à la population de Ramières et les carrés à la population de St-Pryvé St-Mesmin (cf. **Chapitre 3**). Les régressions linéaires (r_p) ont été calculées en utilisant les données (a) au niveau femelle et (b) au niveau génotypique. Le niveau de significativité est : *** $P < 0,001$.

Dans le cadre du **Chapitre 2.1**, nous avons montré que les individus capables de se maintenir sous de fortes températures étaient ceux présentant les plus fortes valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$, c'est-à-dire ceux présentant les plus faibles valeurs d'efficience d'utilisation de l'eau. Sur la **Fig. P1a**, selon le sens de variation de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à la contrainte thermique visant à augmenter les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$, les descendants des femelles présentant intrinsèquement les plus fortes valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ s'avèrent être les moins plastiques. Dans le cadre du **Chapitre 3**, nous avons montré que les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ diminuaient en réponse à une contrainte hydrique. Sur la **Fig. P1b**, selon le sens de variation de $\Delta^{13}\text{C}$ en réponse à la contrainte hydrique visant à diminuer les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$, quelle que soit la population étudiée, les génotypes présentant intrinsèquement les plus faibles valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ s'avèrent être les moins plastiques. Ainsi en conditions limitantes, les individus tendent vers un optimum qui correspond probablement à une limite structurale et/ou fonctionnelle. Savoir pourquoi certains individus fonctionnent déjà proche de cette limite en conditions non limitantes alors que d'autres non, ainsi que l'origine

des limites à la plasticité restent néanmoins des questions essentielles auxquelles il conviendra de répondre à l'avenir.

Enfin nos travaux ont également permis de mettre en évidence une plasticité de 'vieillissement' de $\Delta^{13}\text{C}$. L'efficacité d'utilisation de l'eau augmentait avec l'âge des individus (**Chapitres 2.1 & 2.2**). Cette augmentation au cours du temps est généralement attribuée à des modifications physiologiques au cours du vieillissement des individus qui peuvent être d'origine génétique et/ou environnementale (Donovan & Ehleringer 1991, Sandquist *et al.* 1993, Duquesnay *et al.* 1998, Leffler & Evans 2001). Toutefois les bases physiologiques à l'origine de cette plasticité de vieillissement restent à établir chez *P. nigra*.

1.3 Liens entre efficacité d'utilisation de l'eau, croissance et survie

Le dernier objectif de ce travail de thèse visait à évaluer les liens potentiels entre WUE, la croissance et la survie. Les résultats obtenus tant sur les semis *in situ* (**Chapitre 2.2**) que sur les trois populations installées en pépinière (**Chapitre 3**) n'ont pas permis de mettre en évidence de lien entre WUE et la croissance chez *P. nigra* suggérant que ces deux caractères complexes étaient en partie découplés chez *P. nigra*. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de lien entre WUE et survie sur les semis en milieu naturel puisqu'aucune mortalité importante lors du passage de la période estivale n'a été observée, malgré d'importantes différences de densités de régénération, de conditions hydrologiques et pédoclimatiques entre les deux sites d'étude sélectionnés (*cf.* **Chapitre 2.2**). Nos résultats ont également montré que les valeurs maximales pour $\Delta^{13}\text{C}$ étaient globalement comparables entre juin et septembre quel que soit le site; en revanche les valeurs minimales de $\Delta^{13}\text{C}$ étaient toujours plus élevées en juin qu'en septembre. Une plus forte température moyenne en juin pourrait alors conduire à une réduction de l'étendue de $\Delta^{13}\text{C}$ en diminuant notablement l'efficacité des individus présentant un plus faible $\Delta^{13}\text{C}$. Toutefois, au regard de ces résultats, les conditions environnementales actuelles ne semblent pas assez contraignantes pour induire une forte pression de sélection sur les semis lors de leur établissement. Il serait tout de même important de réitérer des mesures démographiques en milieu naturel sur ces mêmes sites mais également sur d'autres sites, deux ou trois années successives, pour avoir une vision plus large des processus de régénération sur une échelle de temps plus intégrée. Malgré cette absence de mortalité dans les conditions environnementales actuelles, nous avons montré que lorsque les individus sont soumis à des conditions de températures plus contraignantes, un compromis entre efficacité d'utilisation de l'eau, croissance et survie est observé

(**Chapitre 2.1**). En effet, les semis présentant une plus faible efficience d'utilisation de l'eau ainsi qu'une plus faible croissance aérienne juvénile s'avéraient être de meilleurs compétiteurs lorsque la demande évaporative était forte mais la ressource en eau non limitante. Toutefois, une réserve peut être émise quant au lien entre WUE et survie puisque rien ne permettait de juger de la causalité de ce lien (*cf.* discussion **Chapitre 2.1**). Enfin nous avons montré que WUE était liée négativement avec la densité de régénération montrant ainsi qu'en moyenne les valeurs absolues d'efficience d'utilisation de l'eau les plus faibles étaient observées sous de fortes densités de semis (**Chapitre 2.2**). Ainsi nous supposons que la partie de la population présentant la plus faible efficience d'utilisation de l'eau (au stade juvénile) sera en mesure de se maintenir sous de fortes températures d'autant plus que la densité de régénération sera importante. (*cf.* conclusion **Chapitre 2**).

Ainsi, si on remet en perspective les résultats obtenus dans le cadre des **Chapitre 2** et **3** les fortes températures sélectionneraient des populations adultes plutôt efficaces alors qu'elles sélectionneraient préférentiellement des individus faiblement efficaces au stade juvénile. Compte tenu de l'importante plasticité phénotypique observée en réponse aux contraintes hydrique et thermique mais également de l'importante plasticité développementale observée pour le caractère 'efficience d'utilisation de l'eau', rien n'indique que les individus les moins efficaces au stade juvénile le resteront, tout comme rien n'indique que les individus moins efficaces au stade juvénile ne seront pas les plus efficaces au stade adulte. Des travaux réalisés sur des espèces désertiques montraient un changement du niveau d'efficience d'utilisation de l'eau entre les différentes classes d'âge (Donovan & Ehleringer 1991, Sandquist *et al.* 1993), les semis étant moins efficaces que les individus adultes, ce qui va dans le sens de nos résultats.

Au regard de l'ensemble de ces résultats et pour répondre à notre question de départ, le caractère 'efficience d'utilisation de l'eau' semble donc être un caractère pouvant être limitant de la régénération sous de fortes températures mais également un caractère potentiellement adaptatif compte tenu des premiers résultats observés dans le cadre du **Chapitre 3** sur les trois populations. Des travaux complémentaires sur WUE au sein et entre un plus grand nombre de populations issues d'environnements différents couplés à une étude de diversité *via* des marqueurs génétiques de type moléculaire sont nécessaires pour juger si WUE est un caractère adaptatif chez *P. nigra*.

1.4 Bilan des apports scientifiques

D'un point de vue fondamental, ce travail a contribué à faire un état de l'art de la variabilité de WUE et de sa plasticité à différentes échelles et dans différents fonds génétiques, pour la première fois chez *P. nigra*. Une importante variabilité de WUE au sein des populations et une importante capacité de réponse à des contraintes thermique et hydrique au niveau individuel ont été détectées. De plus, ce travail a permis de montrer que dans les conditions environnementales actuelles et sans limite de la ressource en eau, les semis étaient capables de s'installer et de passer la période estivale. En revanche, si les températures venaient à augmenter, une pression de sélection pourrait opérer dont l'origine reste à préciser. Il semble qu'une faible efficience d'utilisation de l'eau confère un avantage pour les semis sous de fortes conditions de température et que ce maintien de plus faibles valeurs absolues soit possible grâce aux fortes densités de régénération. Enfin les résultats observés sur les trois populations suggéraient un lien entre le niveau d'efficience d'utilisation de l'eau et la température de l'environnement d'origine ce qui laissait penser à des possibles adaptations locales des populations. Dans ce contexte et dans le but de donner une portée plus générale à nos résultats, il est nécessaire (i) de juger des bases physiologiques à l'origine de la variabilité de WUE et de sa plasticité, (ii) d'approfondir la compréhension de la relation entre WUE et survie, (iii) d'augmenter le nombre de populations pour étudier une possible structuration géographique de la variabilité de WUE et (iv) étudier d'autres facteurs pouvant être limitant de la régénération de *P. nigra* au regard de nos résultats.

2. LIMITES ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE

Nous présentons ici un certain nombre de limites à l'étude auxquelles il nous paraît essentiel de remédier pour conclure de façon définitive sur les questions posées et pour donner une portée plus générale à nos conclusions. Ces limites sont associées à des perspectives ouvertes par le travail de thèse qui peuvent être envisagées à court et moyen termes.

2.1 Quelles sont les bases physiologiques, structurales et fonctionnelles à l'origine de la variabilité de WUE chez *P. nigra* ?

Au cours de ce travail, nous avons montré une importante variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ traduisant une importante variabilité du caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau'. L'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i) se dissocie en deux composantes: l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s). De ce fait, à l'échelle foliaire, la variabilité de WUE_i peut être liée soit à des variations de A , soit à des variations de g_s , soit aux deux. Il est donc nécessaire à court terme de juger des bases physiologiques à l'origine de la variabilité de $\Delta^{13}\text{C}$ observée chez *P. nigra*. Il sera également intéressant de juger des bases structurales et fonctionnelles à l'origine de la variabilité de A ou de g_s . L'assimilation nette de CO_2 se décompose en quatre processus : l'absorption de la lumière, la diffusion du CO_2 vers les cellules assimilatrices, le flux d'électrons et les réactions biochimiques dans les cellules mésophylliennes. Il existe des limites biochimiques imposées par deux processus, l'activité de la RuBisCO et sa régénération dépendante du transport d'électrons ; ainsi les variations de la capacité photosynthétique sont classiquement estimées à travers des mesures de vitesse maximale de carboxylation (V_{cmax} $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et de flux maximal d'électron (J_{max} $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La morphologie des stomates, leur anatomie et leur densité influencent la conductance stomatique. Ainsi à court terme, des mesures de V_{cmax} , J_{max} , de la taille des stomates, de leur densité et de leur sensibilité (au VPD, à la lumière, à la disponibilité en eau) pourraient être envisagées chez *P. nigra* afin de juger de la variabilité de ces traits entre individus, entre populations mais également entre classes d'âge.

2.2 Existe-t-il de la variabilité pour la thermotolérance chez *P. nigra* ?

Dans le cadre des modifications climatiques, nous avons vu que plusieurs caractères fonctionnels dont la thermotolérance pourraient permettre de prédire si *P. nigra* sera capable d'ajuster sa période de croissance tout en évitant/tolérant les contraintes estivales (cf. **Introduction générale**). En effet, au-delà d'une certaine température, la conductance

stomatique va chuter, entraînant ainsi une augmentation de la température au niveau foliaire pouvant entraîner une altération de l'appareil photosynthétique. Sachant que le photosystème II (PSII) est la composante de l'appareil photosynthétique la plus sensible à l'augmentation des températures, des mesures de sa fonctionnalité nous renseigneraient sur la température au-delà de laquelle le PSII est altéré irréversiblement chez *P. nigra*. Ainsi, dans le cadre de ce travail de thèse une étude visant à étudier le maintien de la fonctionnalité de l'appareil photosynthétique sous de fortes températures a été initiée. L'objectif de ce travail était d'évaluer la variabilité de la température critique de fonctionnement du photosystème II entre des géotypes de *P. nigra* contrastés pour leur niveau d'efficacité d'utilisation de l'eau et de juger de la plasticité du caractère en fonction de la température de croissance. Dans le but d'apporter des éléments de réponse à ces objectifs, quatre géotypes efficaces et quatre géotypes peu efficaces vis-à-vis de l'utilisation de l'eau issus de la population de Loire (SPM) ont été sélectionnés sur la base des résultats obtenus en condition hydrique non limitante sur le dispositif de pépinière d'Orléans (*cf.* **Chapitre 3**). Cinq boutures de chaque géotype ont été installées dans deux phytotrons à l'INRA de Nancy ; l'un à une température de 25°C; l'autre à une température de 35°C. La photopériode était de 16 heures de jour, l'intensité lumineuse d'environ $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et les conditions hydriques non limitantes.

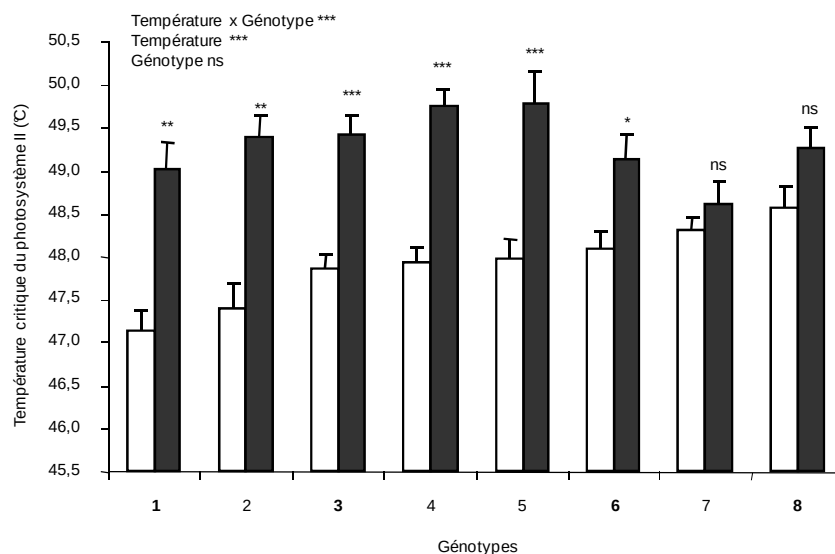


Figure P2. Histogramme montrant la température critique du photosystème II (°C) sur les huit géotypes (les géotypes 1, 3, 6, 8 présentent des forts $\Delta^{13}\text{C}$ alors que les géotypes 2, 4, 5 et 7 présentent des faibles $\Delta^{13}\text{C}$) dans les deux conditions de température 25°C (blanc) et 35°C (noir). Les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (var = Température + Géotype + Température x Géotype, où 'Température' est l'effet température de croissance, 'Géotype' est l'effet du géotype, 'Température x Géotype' est l'interaction entre les effets 'Température' et 'Géotype') sont indiqués. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les deux conditions de températures pour chaque géotype. Les niveaux de significativité sont : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns = non significatif.

Après une période d'acclimatation d'un mois, des mesures de température critique du photosystème II ont été effectuées. Une large gamme de variabilité génotypique pour la température critique du photosystème II a été observée à 25°C, allant de $47,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ à $48,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$. A 35°C, les valeurs de température critique oscillent entre $48,6 \pm 0,4^\circ\text{C}$ et $49,8 \pm 0,4^\circ\text{C}$ (**Fig. P2**). En moyenne, la température critique est de $47,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ dans la chambre à 25°C et de $49,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ dans la chambre à 35°C ; soit une augmentation moyenne de $1,4^\circ\text{C}$ en réponse à une augmentation de température de l'air de 10°C . Ces résultats étaient proches des températures critiques de fonctionnement du photosystème II (PSII) enregistrées (46°C) chez la formule hybride *P. deltoïdes* × *P. nigra* (Marron *et al.* 2008). De plus, ces premiers résultats ont montré une importante variabilité génétique de la plasticité phénotypique de la température critique ; certains géotypes augmentent de façon plus importante leur température critique entre les deux modalités d'acclimatation (comme cela a été observé pour WUE, *cf.* partie 1.2). Au regard de ces premiers résultats, des mesures de thermotolérance seraient également intéressantes à effectuer chez des semis de *P. nigra* à la fois lors

d'approches en conditions contrôlées mais également en milieu naturel pour juger des capacités d'adaptation et de survie de l'espèce *ex situ* et *in situ*.

2.3 Existe-t-il une structuration géographique de la variabilité de WUE chez *P. nigra* et quels pourraient être les facteurs à l'origine ?

Les résultats obtenus dans le cadre du **Chapitre 3** suggéraient de possibles adaptations locales des populations sur la base du niveau d'efficacité d'utilisation de l'eau. Toutefois, le faible nombre de populations étudié dans le cadre de ce travail n'a pas permis de conclure sur une structuration géographique de la variabilité de WUE. Ainsi à court terme, il est raisonnable d'envisager l'extension de ce travail de thèse, à un plus grand nombre de populations réparties sur une aire géographique plus large telles que des populations naturelles européennes réparties sur des bassins hydrographiques différents. Dans le cadre d'un projet européen NovelTree coordonné par l'unité AGPF de l'INRA d'Orléans, une telle étude est réalisée sur la phénologie de la croissance (débourrement et arrêt du fonctionnement des bourgeons) et sur WUE en collaboration avec l'équipe universitaire ARCHE. Deux dispositifs identiques, regroupant 34 populations naturelles de peuplier noir échantillonnées aux Pays-Bas, en Allemagne, en France, en Italie et en Espagne ont été installés l'un en France, l'autre en Italie. Cette étude permettra (i) d'étudier, au sein d'une large collection de peupliers noirs, la variabilité génétique de WUE, via $\Delta^{13}\text{C}$ et sa plasticité phénotypique (ii) de juger de la structuration géographique de cette variabilité afin de mettre en évidence de possibles adaptations locales et (iii) d'étudier la nature des relations entre WUE, phénologie de la croissance et production de biomasse aérienne.

2.4 Vers l'étude des facteurs pouvant limiter l'établissement de *P. nigra*.

A moyen terme, sur la base des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse il serait intéressant d'étudier d'autres facteurs ou des interactions entre facteurs tels que la densité, la fertilité du sol, la disponibilité en eau du sol, la température, pouvant limiter la régénération de *P. nigra*. En effet, nous avons montré que la température pouvait s'avérer être un facteur limitant pour l'établissement des semis de *P. nigra* (**Chapitre 2.1**). Dans le cadre du **Chapitre 2.2**, nous avons montré que la densité de régénération était liée de façon positive à la valeur absolue de $\Delta^{13}\text{C}$. Nous avons supposé que les fortes valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ (traduisant une faible WUE) pourraient être expliquées par l'existence d'une compétition pour les nutriments ou par le maintien d'une atmosphère humide favorable au maintien d'une conductance

stomatique élevée. Nous avons également montré que les individus présentant un faible niveau d'efficacité d'utilisation de l'eau seraient capables de survivre si les conditions de températures devenaient de plus en plus contraignantes (comme nous avons vu dans le cadre du **Chapitre 2.1**). Ainsi, il serait intéressant de faire des expériences complémentaires en conditions contrôlées sur les semis, en faisant varier (i) la densité de régénération, (ii) la fertilité, et (iii) la disponibilité en eau du sol, afin de valider les hypothèses émises dans le cadre de ces travaux. Il serait ensuite intéressant de regarder l'impact des interactions entre ces facteurs sur la régénération des semis comme cela a été étudié entre la température et la sécheresse chez *Castanea sativa* (Lauteri *et al.* 2004). Des mesures d'efficacité d'utilisation de l'eau, de ses traits foliaires associés et de la croissance seraient alors intéressantes pour juger des liens entre ces variables et les capacités de survie des semis sous ces potentielles contraintes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Ackerly** DD, Dudley SA, Sultan SE, Schmitt J, Coleman JS, Linder CR, Sandquist DR, Geber MA, Evans AS, Dawson TE, Lechowicz MJ (2000) The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *Bioscience* 50:979–995.
- Aletà** N, Vilanova A, Díaz R, Voltas J (2009) Genetic variation for carbon isotope composition in *Juglans regia* L.: relationships with growth, phenology and climate of origin. *Ann For Sci* 66:413.
- Aphalo** PJ, Rikala R (2006) Spacing of silver birch seedlings grown in containers of equal size affects their morphology and its variability. *Tree Physiol* 26:1227–1237.
- Aranda** I, Alía R, Ortega U, Dantas AK, Majada J (2010) Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genet Genomes* 6:169–178.
- Atkin** OK, Loveys BR, Atkinson LJ, Pons TL (2006) Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *J Exp Bot* 57:267–281.

B

- Bacon** MA (2004) Water use efficiency in plant biology. In: Bacon MA, (eds) Water use efficiency in plant biology. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp 1–26.
- Barigah** TS, Saugier B, Mousseau M, Guittet J, Ceulemans R (1994) Photosynthesis, leaf area and productivity of 5 poplar clones during their establishment year. *Ann For Sci* 51:613–625.
- Barsoum** N, Hughes FMR (1998) Regeneration response of black poplar to changing river levels. In: Wheeler WH, Kirkby C, Harding R, Gilvear D (eds) Hydrology in a changing environment. British Hydrological Society and Wiley's, Chichester, UK. pp 397–412.
- Bastien** C, Chenault N, Dowkiw A, Villar M, Frey P, Klein E (2009) Interactions entre populations naturelles et cultivées : l'exemple du peuplier. *Biofutur* 305:31–34.

- Bert** D, Leavitt SW, Dupouey JL (1997) Variations of wood $\delta^{13}\text{C}$ and water-use efficiency of *Abies alba* during the last century. *Ecology* 78:1588–1596.
- Bessey** DE (1904) The number and weight of cottonwood seeds. *Science* 20:118–119.
- Bhattacharjee** J, Taylor JP, Smith LM, Spence LE (2008) The importance of soil characteristics in determining survival of first-year cottonwood seedlings in altered riparian habitats. *Restor Ecol* 16:563–571.
- Blake** TJ, Sperry JS, Tschaplinski TJ, Wang SS (1996) Water relations. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM (eds) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Canada. pp 401–422.
- Bonal** D, Sabatier D, Montpied P, Tremeaux D, Guehl JM (2000) Interspecific variability of $\delta^{13}\text{C}$ among trees in rainforest of French Guiana: functional groups and canopy interactions. *Oecologia* 124:454–468.
- Bonhomme** L, Barbaroux C, Monclus R, Morabito D, Berthelot A, Villar M, Dreyer E, Brignolas F (2008) Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. *Ann For Sci* 65:1–9.
- Bower** AD, Aitken SN (2008) Genetic diversity and geographic differentiation in quantitative traits, and seed transfer guidelines for *Pinus albicaulis* (Pinaceae) *Am J Bot* 95:66–76.
- Braatne** JH, Hinckley TM, Stettler RF (1992) Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their F_1 hybrids. *Tree Physiol* 11:325–339.
- Bradley** EB, Smith DG (1986) Plains cottonwood recruitment and survival on a prairie meandering river floodplain, Milk River, southern Alberta and northern Montana. *Can J Bot* 64:1433–1442.
- Bradshaw** AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13:115–155.
- Bravard** JP, Amoros C, Pautou G, Bornette G, Bournaud M, Creuzé des Châtelliers M, Gibert J, Peiry JL, Perrin JF, Tachet H (1997) River incision in South-East France: morphological phenomena and ecological effects. *Regul River* 13:75–90.
- Brendel** O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl J (2002) Genetic parameters and QTL analysis of $\delta^{13}\text{C}$ and ring width in maritime pine. *Plant Cell Environ* 25:945–953.

Brinkman KA (1974) *Salix* L. Willow. In: Seeds of woody plants in the United States. Agriculture Handbook n°450. Forest Service, US Department of Agriculture, Washington DC. pp 746–750.

C

Cagelli L, Lefèvre F (1995) The conservation of *Populus nigra* L. and gene flow with cultivated poplars in Europe. *For Genet* 2:135–144.

Cernusak LA, Aranda J, Marshall JD, Winter K (2007) Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytol* 173:294–305.

Cernusak LA, Winter K, Aranda J, Turner BL (2008) Conifers, angiosperm trees, and lianas: growth, whole-plant water and nitrogen use efficiency, and stable isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) of seedlings grown in a tropical environment. *Plant Physiol* 148:642–659.

Chenault N, Arnaud-Haond S, Juteau M, Valada R, Alameida JL, Villar M, Bastien C, Dowkiw A (2011) SSR-based analysis of clonality, spatial genetic structure, and introgression from the Lombardy poplar in a natural population of *Populus nigra* L. along the Loire river. *Tree Genet Genome*, in press.

Cook RE (1979) Patterns of juvenile mortality and recruitment in plants. In: Solbrig OT, Jain S, Johnson GB, Raven PH (eds) Topics in plant population biology. Columbia University press, New York, USA. pp 207–234.

Cooper DJ, Merritt DM, Andersen DC, Chimner RA (1999) Factors controlling the establishment of Fremont Cottonwood seedlings on the Upper Green River, USA. *Regul River* 15:419–440.

Craig H (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* 12:133–149.

Craufurd PQ, Wheeler TR, Ellis RH, Summerfield RJ, Williams JH (1999) Effect of temperature and water deficit on water-use efficiency, carbon isotope discrimination, and specific leaf area in peanut. *Crop Sci* 39:136–142.

Cregg B, Olivás-García J, Hennessey T (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.

Cregg BM, Zhang JW (2001) Physiology and morphology of *Pinus sylvestris* seedlings from diverse sources under cyclic drought stress. *For Ecol Manag* 154:131–139.

D

Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annu Rev Ecol Syst* 33:507–559.

De Lucia EH, Schlesinger WH (1991) Resource-use efficiency and drought tolerance in adjacent great basin and sierra plants. *Ecology* 72:51–58.

DesRochers A, van den Driessche R, Thomas BR (2006) NPK fertilization at planting of three hybrid poplar clones in the boreal region of Alberta. *For Ecol Manag* 232:216–225.

Dickmann DI, Liu Z, Nguyen PV, Pregitzer KS (1992) Photosynthesis, water relations, and growth of two hybrid *Populus* genotypes during a severe drought. *Can J For Res* 22:1094–1106.

Dickmann DI, Kuzovkina J (2008) Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species. In: Isebrands JG, Richardson J (eds) Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment. FAO/IPC, Rome, Italy, 135 p-Chapter 2.

Dillen SY, Marron N, Koch B, Ceulemans R (2008) Genetic variation of stomatal traits and carbon isotope discrimination in two hybrid poplar families (*Populus deltoides* ‘S9-2’ × *P. nigra* ‘Ghoy’ and *P. deltoides* ‘S9-2’ × *P. trichocarpa* ‘V24’). *Ann Bot* 102:399–407.

Donovan LA, Ehleringer JR (1991) Ecophysiological differences among pre-reproductive and reproductive classes of several woody species. *Oecologia* 86:594–597.

Ducrey M, Huc R, Ladjal M, Guehl JM (2008) Variability in growth, carbon isotope composition, leaf gas exchange and hydraulic traits in the eastern Mediterranean cedars *Cedrus libani* and *C. brevifolia*. *Tree Physiol* 28:689–701.

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

Dynesius M, Nilsson C (1994) Fragmentation and flow regulation of river systems in the northern third of the world. *Science* 26:753–762.

E

- Ehleringer** JR (1988) Carbon isotope ratios and physiological processes in arid land plants. *In*: Rundel PW Ehleringer JR and Nagy KA (eds) Stable isotopes in ecological research. Ecological studies series. Springer-Verlag, New York, USA. pp 41–54.
- Ehleringer** JR (1993) Carbon and water relations in desert plants: an isotopic perspective. *In*: Ehleringer J, Hall A, Farquhar G (eds) Stable isotopes and plant carbon-water relations. Academic Press, San Diego, USA. pp 155–172.
- Ehleringer** J, Bowling D, Flanagan L, Fessenden J, Helliker B, Martinelli L, Ometto J (2002) Stable isotopes and carbon cycle processes in forests and grasslands. *Plant Biol* 4:181–189.
- Engstrom** A (1948) Growing cottonwood from seeds. *J Forest* 46:130–132.
- EUFORGEN** (2009) Distribution map of Black poplar (*Populus nigra* L.). www.euforgen.org.
- European Commission** (1992) Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. EC, Brussels, Belgium.
- Evans** JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78:9–19.

F

- Farmer** RE (1996) The genecology of *Populus*. *In*: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM (eds) Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. NRC Research Press, Ottawa, Canada. pp 33–56.
- Farquhar** GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149:78–90.
- Farquhar** GD, O’Leary MH, Berry JA (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust J Plant Physiol* 9:121–137.
- Farquhar** GD, Richards RA (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust J Plant Physiol* 11:539–552.

- Farquhar** GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Phys Mol Biol* 40:503–537.
- Fichot** R, Barigah TS, Chamaillard S, Le Thiec D, Laurans F, Cochard H, Brignolas F (2010) Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant Cell Environ* 33:1553–1568.
- Fichot** R, Chamaillard S, Depardieu C, Le Thiec D, Cochard H, Barigah TS, Brignolas F (2011) Hydraulic efficiency and coordination with xylem resistance to cavitation, leaf function and growth performance among eight unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *J Exp Bot* 62:2093–2106.
- Field** C, Mooney HA (1986) The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: Givnish TJ (eds) On the economy of plant form and function. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 25–55.
- Flexas** J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 31:602–621.
- Foussadier R.** (2003) Les systèmes racinaires des arbres de la ripisylve : effets des contraintes physiques et exemples. In: Piégay H, Pautou G, Ruffinoni C (eds) Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. Institut pour le Développement Forestier, Paris, France. pp 124–133.
- Friedman** JM, Osterkamp WR, Scott ML, Auble GT (1998) Downstream effects of dams on channel geometry and bottomland vegetation: regional patterns in the great plains. *Wetlands* 18:619–633.
- Froux** F, Huc R, Ducrey M, Dreyer E (2002) Xylem hydraulic efficiency versus vulnerability in seedlings of four contrasting Mediterranean tree species (*Cedrus atlantica*, *Cupressus sempervirens*, *Pinus halepensis* and *Pinus nigra*). *Ann For Sci* 59:409–418.

G

- Galmés** J, Ribas-Carbó M, Medrano H, Flexas J (2011) Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J Exp Bot* 62:653–665.

- Gates DM, Aderfer R, Taylor E (1968)** Leaf temperature of desert plants. *Science* 159:994–995.
- Gornall JL, Guy RD (2007)** Geographical variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Can J Bot* 85:1202–1213.
- Griffiths H (1996)** Evaluation and integration of environmental stress using stable isotopes. In: Baker NR (eds) *Advances in photosynthesis: photosynthesis and environment*. Vol 5. Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 451–468.
- Grossnickle S, Fan S, Russell J (2005)** Variation in gas exchange and water use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees-Struct Funct* 19:32–42.
- Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P (1994)** Interactive effects of elevated CO₂ and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiol* 14:707–724.
- Guehl JM, Fort C, Ferhi A (1995)** Differential response of leaf conductance, carbon isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak. *New Phytol* 131:149–157.
- Guehl JM, 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 ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$). *Oecologia* 116:316–330.
- Guilloy-Froget H (2002)** Evaluation des conditions favorables à l'établissement de *Populus nigra* et *Salix alba* en milieu riverain. Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Guilloy-Froget H, Muller E, Barsoum N, Hughes FMR (2002)** Dispersal, germination, and survival of *Populus nigra* L. (Salicaceae) in changing hydrologic conditions. *Wetlands* 22:478–488.

H

- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992)** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6:95–124.
- Harvey HP, van den Driessche R (1999)** Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiol* 19:943–950.

Heinze B (1997) A PCR marker for a *Populus deltoides* allele and its use in studying introgression with native European *Populus nigra*. *Belg J Bot* 129:123–130.

Horton JL, Clark JL (2001) Water table decline alters growth and survival of *Salix gooddingii* and *Tamarix chinensis* seedlings. *For Ecol Manag* 140:239–247.

I

IPCC, Climate change (2007) The physical science basis: working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Israeli Y, Schwartz A, Plaut Z, Yakir D (1996) Effects of light regime on $\delta^{13}\text{C}$, photosynthesis and yield of field-grown banana (*Musa* sp, Musaceae). *Plant Cell Environ* 19:225–230.

J

Johnson WC (1994) Woodland expansion in the Platte River, Nebraska: patterns and causes. *Ecol Monogr* 64:45–84.

Johnson WC (1998) Adjustment of riparian vegetation to river regulation in the great plains, USA. *Wetlands* 18:608–618.

K

Kanaga MK, Ryel RJ, Mock KE, Pfreder ME (2008) Quantitative-genetic variation in morphological and physiological traits within a quaking aspen (*Populus tremuloides*) population. *Can J For Res* 38:1690–1694.

Karrenberg S, Blaser S, Kollmann J, Speck T, Edwards PJ (2003) Root anchorage of saplings and cuttings of woody pioneer species in a riparian environment. *Funct Ecol* 17:170–177.

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 Environ* 26:1157–1168.

- Keller** SR, Soolanayakanahally R, Guy RD, Silim SN, Olson M, Tiffin P (2011) Climate-driven local adaptation of ecophysiology and phenology in balsam poplar, *Populus balsamifera* L. (Salicaceae). *Am J Bot* 98:99–108.
- Knox** RG, Harcombe PA, Elsik IS (1995) Contrasting patterns of resource limitation in tree seedlings across a gradient in soil texture. *Can J For Res* 25:1583–1594.
- Kranjcec** J, Mahoney JM, Rood SB (1998) The responses of three riparian cottonwood species to water table decline. *For Ecol Manag* 110:77–87.
- Kremer** A (1994) Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genet Sel Evol* 26:105–123.

L

- Langlade** LR, Décamps O (1995) Effets de l'accumulation de limon sur la colonisation végétale d'un banc de galets en rivière. *Compte-rendu de l'Académie des Sciences, Paris, France*. 318:1073–1082.
- 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. *Funct Ecol* 11:675–683.
- Lauteri** M, Pliura A, Monteverdi MC, 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. *J Evol Biol* 17:1286–1296.
- Lee** C, Mahoney JM, Rood SB (1991) Poplar seeds and seedlings along the St Mary, Belly and Waterton Rivers, Alberta. In: Rood SB, Mahoney JM (eds) *The biology and management of Southern Alberta's cottonwoods*. Proc. of the University of Lethbridge conference, May 4-6 1990. pp 85–90.
- Lefèvre** F, Legionnet A, de Vries SMG, Turok J (1998) Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. *Genet Sel Evol* 30:S181–S196.
- Lefèvre** F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (2001) EUFORGEN Technical Bulletin: *In situ* conservation of *Populus nigra*. IPGRI, Rome, Italy.
- Leffler** AJ, Evans AS (1999) Variation in carbon isotope composition among years in the riparian tree *Populus fremontii*. *Oecologia* 119:311–319.

- Leffler** AJ, Evans AS (2001) Physiological variation among *Populus fremontii* populations: short- and long-term relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and water availability. *Tree Physiol* 21:1149–1155.
- Légionnet** A, Faivre-Rampant P, Villar M, Lefèvre F (1997) Sexual and asexual reproduction in natural stands of *Populus nigra*. *Bot Acta* 110:257–263.
- Li** HL (1996) Shade and ornamental trees: their origin and history. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, USA.
- Li** C (2000) Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiol Plant* 108:134–139.
- Lu** Y, Duan B, Zhang X, Korpelainen H, Berninger F, Li C (2009) Intraspecific variation in drought response of *Populus cathayana* grown under ambient and enhanced UV-B radiation. *Ann For Sci* 66:613.
- Luomala** EM, Laitinen K, Sutinen S, Kellomäki S, Vapaavuori E (2005) Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO_2 and temperature. *Plant Cell Environ* 28:733–749.
- Luquez** V, Hall D, Albrechtsen BR, Karlsson J, Ingvarsson P, Jansson S (2008) Natural phenological variation in aspen (*Populus tremula*): the SwAsp collection. *Tree Genet Genomes* 4:279–292.
- Lynch** M, Walsh JB (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, USA.

M

- Madhavan** S, Treichel I, O'Leary MH (1991) Effects of relative humidity on carbon isotope fractionation in plants. *Bot Acta* 104:292–294.
- Mahoney** JM, Rood SB (1991) A device for studying the influence of declining water table on poplar growth and survival. *Tree Physiol* 8:305–314.
- Mahoney** JM, Rood SB (1998) Streamflow requirements for cottonwood seedling recruitment: an integrative model. *Wetlands* 18:634–645.

- Marchin** RM, Sage EL, Ward JK (2008) Population-level variation of *Fraxinus americana* (white ash) is influenced by precipitation differences across the native range. *Tree Physiol* 28:151–159.
- Marron** N, Dreyer E, Boudouresque E, Delay D, Petit J-M, Delmotte FM, Brignolas F (2003) Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus* × *canadensis* (Moench) clones, ‘Dorskamp’ and ‘Luisa_Avanzo’. *Tree Physiol* 23:1225–1235.
- Marron** N, Villar M, Dreyer E, Delay D, Boudouresque E, Petit J-M, Delmotte FM, Guehl JM, Brignolas F (2005) Diversity of leaf traits related to productivity in 31 *Populus deltoides* × *Populus nigra* clones. *Tree Physiol* 25:425–435.
- Marron** N, Ceulemans R (2006) Genetic variation of leaf trait related to productivity in a *Populus deltoides* × *Populus nigra* family. *Can J For Res* 36:390–400.
- Marron** N, Brignolas F, Delmotte FM, Dreyer E (2008) Modulation of leaf physiology by age and in response to abiotic constraints in young cuttings of two *Populus deltoides* × *P. nigra* genotypes. *Ann For Sci* 65:404.
- Marshall** JD, Monserud RA (1996) Homeostatic gas-exchange parameters inferred from $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in tree rings of conifers. *Oecologia* 105:13–21.
- Martin** TA, Hinckley TM, Meinzer FC, Sprugel DG (1999) Boundary layer conductance, leaf temperature and transpiration of *Abies amabilis* branches. *Tree Physiol* 19:435–443.
- Mc Bride** JR, Strahan J (1984) Establishment and survival of woody riparian species on gravel bars on an intermittent stream. *Am Midl Nat* 112:235–245.
- Meehl** GA, Tebaldi C (2004) More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science* 305:994–997.
- Meinzer** FC, Goldstein G, Grantz DA (1990) Carbon isotope discrimination in coffee genotypes grown under limited water supply. *Plant Physiol* 92:130–135.
- Messaoud** Y, Chen HYH (2011) The influence of recent climate change on tree height growth differs with species and spatial environment. *Plos One* 6:e14691.
- Moatar** F, Ducharme A, Thiery D, Bustillo V, Sauquet E, Vidal JP (2010) La Loire à l’épreuve du changement climatique. *Geosciences* 12:78–87.

- Monclus** R, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Boudouresque E, Petit J-M, Marron N, Bréchet C, Brignolas F (2005) Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytol* 167:53–62.
- Monclus** R, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Petit J-M, Barbaroux C, Le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytol* 169:765–777.
- Monclus** R, Villar M, Barbaroux C, Bastien C, Fichot R, Delmotte FM, Delay D, Petit J-M, Bréchet C, Dreyer E, Brignolas F (2009) Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* × *Populus trichocarpa* F₁ progeny. *Tree Physiol* 29:1329–1339.
- Morris** DM, Farmer RE (1985) Species interactions in seedling populations of *Populus tremuloides* and *Populus balsamifera*: effects of density and species ratios. *Can J For Res* 15:593–595.
- Müller-Starck** G (1995) Protection of genetic variability in forest trees. *For Genet* 2:121–124.

N

- Naiman** RJ, Décamps H, McClain ME (2005) Riparia: ecology, conservation, and management of streamside communities. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Nguyen-Queyrens** A, Ferhi A, Loustau D, Guehl JM (1998) Within-ring $\delta^{13}\text{C}$ spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Can J For Res* 28:766–773.
- Nicotra** AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci* 15:1360–1385.
- Nier** AO, Gulbransen EA (1939) Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J Am Chem Soc* 61:697–698.
- Nilsson** C, Berggren K (2000) Alterations of riparian ecosystem caused by river regulation. *Bioscience* 50:783–792.

Nobel PS (1999) Resistances and conductances: transpiration. *In: Physicochemical and environmental plant physiology* (2nd edn). Academic Press, San Diego, USA. pp 301–303.

Noble MG (1979) The origin of *Populus deltoides* and *Salix* interior zones on point bars along the Minnesota River. *Am Midl Nat* 102:59–67.

O

O’Leary MH (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20:553–567.

O’Leary MH (1988) Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience* 38:328–336

O’Leary MH, Madhvan S, Paneth P (1992) Physical and chemical basis of carbon isotope fractionation in plants. *Plant Cell Environ* 15:1099–1104.

Olivas-García JM, Cregg BM, Hennessey TC (2000) Genotypic variation in carbon isotope discrimination and gas exchange of ponderosa pine seedlings under two levels of water stress. *Can J For Res* 30:1581–1590.

Osório J, Osório ML, Chaves MM, Pereira JS (1998) Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol* 18:363–373.

P

Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu Rev Ecol Evol S* 37:637–669.

Pathre U, Sinha AK, Shirke PA, Sane PV (1998) Factors determining the midday depression of photosynthesis in trees under monsoon climate. *Trees* 12:472–481.

Pautou G (1983) Répercussions des aménagements hydroélectriques sur le dynamisme de la végétation (L’exemple du Haut-Rhône français). *Rev Geogr Alp* 71:331–342.

Petit RJ (1999) Diversité génétique et histoire des populations d'arbres forestiers. Université Paris-Sud, Orsay, France.

Picon C, Guehl J, Ferhi A (1996) 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 CO₂ concentrations. *Plant Cell Environ* 19:182–190.

Piegay H, Pautou G, Ruffinoni C (2003) Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. Institut pour le Développement Forestier, Paris, France.

Pita P, Soria F, Canas I, Toval G, Pardos JA (2001) Carbon isotope discrimination and its relationship to drought under field conditions in genotypes of *Eucalyptus globulus* Labill. *For Ecol Manag* 141:211–221.

Pliura A, Eriksson G (2002) Genetic variation juvenile height and biomass of open pollinated families of six *Castanea sativa* Mill. populations in a 2 × 2 factorial temperature × watering experiment. *Silvae Genet* 51:152–160.

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 Environ* 24:861–868

Ponton S, Dupouey J, Breda N, Dreyer E (2002) Comparison of water use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype × environment interactions. *Tree Physiol* 22:413–422.

R

Rae AM, Robinson KM, Street NR, Taylor G (2004) Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. *Can J For Res* 34:1488–1498.

Ratmacher G, Niggemann M, Kohnen M, Ziegenhagen B, Bialozyt R (2010) Short-distance gene flow in *Populus nigra* L. accounts for small-scale spatial genetic structures: implications for *in situ* conservation measures. *Conserv Genet* 11:1327–1338.

Reddy KR, Robana RR, Hodges HF, Liu XJ, McKinion JM (1998) Interactions of CO₂ enrichment and temperature on cotton growth and leaf characteristics. *Environ Exp Bot* 39:117–129.

Reich PB, Grigal DF, Aber JD, Gower ST (1997) Nitrogen mineralization and productivity in 50 hardwood and conifer stands on diverse soils. *Ecology* 78:335–347.

- Reich** PB, Ellsworth DS, Walters MB (1998) Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Funct Ecol* 12:948–958.
- 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 Physiol* 24:671–679.
- Robinson** DE, Wagner RG, Bell FW, Swanton CJ (2001) Photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and water-use efficiency of jack pine seedlings in competition with four boreal forest plant species. *Can J For Res* 31:2014–2025.
- Rodrigues** S, Bréhéret J-G, Macaire J-J, Greulich S, Villar M (2007) In-channel woody vegetation controls on sedimentary processes and the sedimentary record within alluvial environments: a modern example of an anabranch of the River Loire, France. *Sedimentology* 54:223–242.
- Rohde** A, Storme V, Jorge V, Gaudet M, Vitacolonna N, Fabbri F, Ruttink T, Zaina G, Marron N, Dillen S, Steenackers M, Sabatti M, Morgante M, Boerjan W, Bastien C (2011) Bud set in poplar: genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytol* 189:106–121.
- Rood** SB, Mahoney JM (1990) The collapse of river valley forest downstream from dams in the western prairies: probable causes and prospects for mitigation. *Environ Manag* 14:451–464.
- Rood** SB, Mahoney JM, Reid DE, Zilm L (1995) Instream flows and the decline of riparian cottonwoods along the St Mary River, Alberta. *Can J Bot* 73:1250–1260.
- Rood** SB, Kalischuk AR, Mahoney JM (1998) Initial cottonwood seedling recruitment following the flood of the century of the Oldman River, Alberta, Canada. *Wetlands* 18:557–570.
- Rood** SB, Taboulchanas K, Bradley CE, Kalischuk AR (1999) Influence of flow regulation on channel dynamics and riparian cottonwoods along the Bow River, Alberta. *Rivers* 7:33–48.
- Rood** SB, Braatne JH, Hughes FMR (2003) Ecophysiology of riparian cottonwoods: stream flow dependency, water relations and restoration. *Tree Physiol* 23:1113–1124.

- Rotach P** (2004) Poplars and Biodiversity. In: Koskela J, de Vries SMG, Kajba D, von Wühlisch G (compilers). *Populus nigra* Network, Report of seventh (25–27 October 2001, Osijek, Croatia) and eighth meetings (22–24 May 2003, Treppeln, Germany). IPGRI, Rome, Italy.
- Roupsard O** (1997) Écophysiologie et diversité génétique de *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. (syn. *Acacia albida* Del.), un arbre à usages multiples d'Afrique semi-aride. Fonctionnement hydrique et efficience d'utilisation de l'eau d'arbres adultes en parc agroforestier et de juvéniles en conditions semi-contrôlées. Université H Poincaré, Nancy 1, France.
- Roupsard O**, Joly HI, 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 effects. *Ann Sci For* 55:329–348.
- Roussel M**, Dreyer E, Montpied P, Le Provost G, Guehl JM, Brendel O (2009) 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. *J Exp Bot* 60:2419–2431.
- Ruffinoni C**, Tremolières M, Sanchez-Pérez JM (2003) Végétation alluviale et flux de nutriments: des liens interactifs. In: Piégay H, Pautou G, Ruffinoni C (eds) Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. Institut pour le Développement Forestier, Paris, France. pp 134–154.

S

- Sacchi CF**, Price PW (1992) The relative roles of abiotic and biotic factors in seedling demography of Arroyo Willow (*Salix lasiolepis*, Salicaceae). *Am J Bot* 79:395–405.
- Sandquist DR**, Schuster WSF, Donovan LA, Philips SL, Ehleringer JR (1993) Differences in carbon isotope discrimination between seedlings and adults of southwestern desert perennial plants. *Southwest Nat* 38:212–217.
- Savolainen O**, Pyhäjärvi T, Knurr T (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Ann Rev Ecol Evol S* 38:595–619.

- Schär C**, Vidale PL, Lüthi DL, Frei C, Häberli C, Liniger MA, Appenzeller C (2004) The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature* 427:332–336.
- Schnitzler-Lenoble A.** (2007) Forêts alluviales d'Europe. Lavoisier, Paris, France.
- Scott ML**, Auble GT, Friedman JM (1997) Flood dependency of cottonwood establishment along the Missouri River, Montana, USA. *Ecol Appl* 7:677–690.
- Scott ML**, Lines GC, Auble GT (2000) Channel incision and pattern of cottonwood stress and mortality along the Mojave River, California. *J Arid Environ* 44:399–414.
- Segelquist CA**, Scott ML, Auble GT (1993) Establishment of *Populus deltoides* under simulated alluvial groundwater declines. *Am Midl Nat* 130:274–285.
- Shafroth PB**, Scott ML, Friedman JM, Laven RD (1994) Establishment, sex structure and breeding system of an exotic riparian willow, *Salix rubens*. *Am Midl Nat* 132:159–172.
- Shafroth PB**, Auble GT, Scott ML (1995) Germination and establishment of the native plains cottonwood (*Populus deltoides* Marshall subsp. *monilifera*) and the exotic Russian-olive (*Eleagnus angustifolia* L.). *Conserv Biol* 9:1169–1175.
- Shafroth PB**, Auble GT, Stromberg JC, Patten DT (1998) Establishment of woody riparian vegetation in relation to annual pattern of streamflow, Bill Williams river, Arizona. *Wetlands* 18:577–590.
- Sher AA**, Marshall DL (2003) Competition between native and exotic floodplain tree species across water regimes and soil textures. *Am J Bot* 90:413–423.
- Shipley B** (2002) Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Funct Ecol* 16:682–689.
- Silim S**, Nash R, Reynard D, White B, Schroeder W (2009) Leaf gas exchange and water potential responses to drought in nine poplar (*Populus* spp.) clones with contrasting drought tolerance. *Trees* 23:959–969.
- Singh M**, Ceccarelli S, Hamblin J (1993) Estimation of heritability from varietal trials data. *Theor Appl Genet* 83:437–441.
- Soolanayakanahally RY**, Guy RD, Silim SN, Drewes EC, Schroeder WR (2009) Enhanced assimilation rate and water use efficiency with latitude through increased photosynthetic

- capacity and internal conductance in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Plant Cell Environ* 32:1821–1832.
- Sparks** JP, Ehleringer JR (1997) Leaf carbon isotope discrimination and nitrogen content for riparian trees along elevational transects. *Oecologia* 109:362–367.
- Sprenger** MD (1999) Restoration of riparian wildlife habitat in the middle Rio Grande Valley following historical river hydrographs. Texas Tech University, Lubbock, USA.
- Steiger** J, Gurnell AM, Ergenzinger P, Snelder D (2001) Sedimentation in the riparian zone of an incising river. *Earth Surf Proc Land* 26:91–108.
- Stella** JC, Battles JJ (2010) How do riparian woody seedlings survive seasonal drought? *Oecologia* 164:579–590.
- Stella** JC, Battles JJ, McBride JR, Orr BK (2010) Riparian seedling mortality from simulated water table recession, and the design of sustainable flow regimes on regulated rivers. *Restor Ecol* 18:284–294.
- Stromberg** JC (1993) Instream flow models for mixed deciduous riparian vegetation within a semiarid region. *Regul River* 8:225–235.
- Stromberg** JC, Tiller R, Richter B (1996) Effects of groundwater decline on riparian vegetation of semiarid regions: The San Pedro, Arizona. *Ecol Appl* 6:113–131.
- Sun** Z, Livingston N, Guy R, Ethier G (1996) Stable carbon isotopes as indicators of increased water use efficiency and productivity in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings. *Plant Cell Environ* 19:887–894.

T

- Tjoelker** MG, Oleksyn J, Reich PB (1998) Seedlings of five boreal tree species differ in acclimation of net photosynthesis to elevated CO₂ and temperature. *Tree Physiol* 18:715–726.
- Turner** NC, Schulze ED, Nicolle D, Kuhlmann I (2010) Growth in two common gardens reveals species by environment interaction in carbon isotope discrimination of *Eucalyptus*. *Tree Physiol* 30:741–747.

V

- Valladares** F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *Tansley Review New Phytol* 176:749–763.
- Vanden Broeck** A, Villar M, Van Bockstaele E, Van Slycken J (2005) Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Ann For Sci* 62:601–613.
- Van Splunder** I, Coops H, Voeselek LACJ, Blom CWPM (1995) Establishment of alluvial forest species in floodplains: the role of dispersal timing, germination characteristics and water level fluctuations. *Acta Bot Neerl* 44:269–278.
- Villar** M, Le Boulenger H, Forestier O (2004) Le Peuplier noir: un patrimoine naturel à conserver. *Biofutur* 247:24–27.
- Villar** M, Forestier O (2009) Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser? *Rev For Fr LXI* – 5:457–466.
- Virginillo** M, Mahoney JM, Rood SB (1991) Establishment and survival of poplar seedlings along the Oldman River, Southern Alberta. In: Rood SB, Mahoney JM (eds) The biology and management of Southern Alberta's cottonwoods. Proc. of the University of Lethbridge Conference, May 4-6 1990. pp 55-61.
- Voltas** J, Serrano L, Hernandez M, Peman J (2006) Carbon isotope discrimination, gas exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering regimes. *New Forest* 31:435–451.

W

- Walker** LR, Zasada JC, Chapin FS (1986) The role of history processes in primary succession on an alaskan floodplain. *Ecology* 67:1243–1253.
- 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 Environ* 29:192–201.
- Weber** JC, Stettler RF, Heilman PE (1985) Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* T. & G. and its hybrids. I. Morphology and phenology of 50 native clones. *Can J For Res* 15:376–383.

Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier Eric, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas ML, Niinemets U, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428:821–827.

X

Xu X, Yang F, Xiao X, Zhang S, Korpelainen H, Li C (2008) Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant Cell Environ* 31:850–860.

Y

Yin C, Peng Y, Zang R, Zhu Y, Li C (2005) Adaptive responses of *Populus kanddingensis* to drought stress. *Physiol Plantarum* 123:445–451.

Z

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 Physiol* 14:531–539.

Zhang JW, Feng Z, Cregg BM, Schumann CM (1997) Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiol* 17:461–466.

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 Sci* 166:791–797.

Zhang X, Wu N, Li C (2005) Physiological and growth responses of *Populus davidiana* ecotypes to different soil water contents. *J Arid Environ* 60:567–579.

Zimmerman J, Ehleringer JR (1990) Carbon isotope ratios are correlated with irradiance levels in the Panamanian orchid *Catasetum viridiflavum*. *Oecologia* 83:247–249.

Zsuffa L (1974) The genetics of *Populus nigra* L. *Ann For* 6:29–49.

VALORISATION DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

VALORISATION DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS SOUMISES OU ACCEPTEES DANS DES REVUES INTERNATIONALES

A COMITE DE LECTURE

S. CHAMAILLARD, R. FICHOT, C. VINCENT-BARBAROUX, C. BASTIEN, C. DEPIERREUX, E. DREYER, M. VILLAR & F. BRIGNOLAS. Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related traits among three *Populus nigra* L populations. *Soumis pour publication à la revue Tree Physiology* (15 Avril 2011).

S. CHAMAILLARD, M. VILLAR, R. FICHOT, F. BRIGNOLAS & C. VINCENT-BARBAROUX. Variability of bulk leaf carbon isotope discrimination among *Populus nigra* L. seedlings and relationship with leaf survival under elevated temperature. *Soumis pour publication à la revue Oecologia* (24 Février 2011).

R. FICHOT, **S. CHAMAILLARD**, C. DEPARDIEU, D. LE THIEC, H. COCHARD, T.S. BARIGAH & F. BRIGNOLAS. 2011. Hydraulic efficiency and coordination with xylem resistance to cavitation, leaf function and growth performance among eight unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Journal of Experimental Botany* 62, 2093-2106.

R. FICHOT, T.S. BARIGAH, **S. CHAMAILLARD**, D. LE THIEC, F. LAURANS, H. COCHARD & F. BRIGNOLAS. 2010. Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant, Cell & Environment* 33, 1553-1568.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES COLLOQUES INTERNATIONAUX (le nom de l'auteur ayant présenté est souligné)

S. CHAMAILLARD, M. VILLAR., R. FICHOT, M. SABATTI., F. VILLANI, F. BRIGNOLAS & C. BARBAROUX. (2010) Genetic variability of carbon isotope discrimination in seedlings from *Populus nigra* L. populations grown under contrasting temperatures. *Fifth International Poplar Symposium*. 20-25 September 2010, Orvieto, Italy.

R. FICHOT, **S. CHAMAILLARD**, D. DEPARDIEU., D. LE THIEC, F. LAURANS, H. COCHARD, T.S. BARIGAH & F. BRIGNOLAS. (2010) Xylem hydraulics in poplar: insights gained from *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Fifth International Poplar Symposium*. 20-25 September 2010, Orvieto, Italy.

C. LAFON-PLACETTE, D. GOURCILLEAU, **S. CHAMAILLARD**, R. FICHOT, M.B. BOGEAT-TRIBOULOT, D. LE THIEC, A. DELAUNAY, M. VILLAR, F. BRIGNOLAS & S. MAURY. (2010) Epigenetic, water deficit and productivity in poplars. *Fifth International Poplar Symposium*. 20-25 September 2010, Orvieto, Italy.

M. VILLAR, **S. CHAMAILLARD**, C. BARBAROUX, C. BASTIEN, F. BRIGNOLAS, P. FAIVRE-RAMPANT, R. FICHOT, O FORESTIER, V. JORGE & S. RODRIGUES. (2010) *Populus nigra* as a keystone species able to cope with the ongoing climate change. *Fifth International Poplar Symposium*. 20-25 September 2010, Orvieto, Italy.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. (2009). Genetic variability of ecophysiological factors controlling the establishment of natural black poplar populations (*Populus nigra* L.) in Loire river in the global change context. *Réunion de travail de la plate-forme Recherche/Données/Information - Plan Loire Grandeur Nature*, 26-28 September 2010, Bruxelles, Belgium.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, C. BASTIEN, V. JORGE, M. SABATTI, F. VILLANI, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. (2009). Plasticity of genetic variability of carbon isotope discrimination in response to high temperature of *Populus nigra* seedlings. *Workshop Evoltree*, 2-6 February 2009, Vienna, Austria.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES COLLOQUES NATIONAUX (le nom de l'auteur ayant présenté est souligné)

R. FICHOT, T.S. BARIGAH, **S. CHAMAILLARD**, D. LE THIEC, F. LAURANS, H. COCHARD & F. BRIGNOLAS. 2009. Do common trade-offs between xylem resistance to cavitation, xylem structure, leaf function and growth performances hold at the intra-specific level? A case study in *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *Colloque annuel du groupe de travail "Xylème – Eau – Croissance"*, 23-25 Novembre 2009, Bordeaux, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. 2009. Variabilité génétique de facteurs écophysologiques contrôlant la régénération du peuplier noir (*Populus nigra* L.) en Loire moyenne dans le cadre du changement climatique. *Plan Loire Grandeur Nature*, 24 Février 2009, Orléans, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. 2008. Variabilité génétique de facteurs écophysologiques contrôlant la régénération du peuplier noir (*Populus nigra* L.) en Loire moyenne dans le cadre du changement climatique. *Séminaire des doctorants INRA EFPA*, 6-8 Octobre 2008, Dinard, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. 2008. Régénération du peuplier noir en Loire. Séminaire Sciences en Sologne, 4-5 Juin 2008, Orléans, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. 2008. Variabilité génétique de facteurs écophysiologiques contrôlant la régénération du peuplier noir (*Populus nigra* L.) en Loire moyenne dans le cadre du changement climatique. Plan Loire Grandeur Nature, 1^{er} Avril, Orléans, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. 2008. Variabilité génétique de facteurs écophysiologiques contrôlant la régénération du peuplier noir (*Populus nigra* L.) en Loire moyenne dans le cadre du changement climatique. Journées Jeunes Chercheurs, 12-13 Mars 2008, Orléans, France.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

S. CHAMAILLARD, R. FICHOT, C. BARBAROUX, M. VILLAR & F. BRIGNOLAS (2010) Variabilité de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 chez trois populations de peuplier noir. *Forum pour une gestion durable des ressources naturelles : eau, sols, forêts et biodiversité*. 14 décembre 2010, Orléans, France.

S. CHAMAILLARD, M. VILLAR, R. FICHOT, F. BRIGNOLAS & C. BARBAROUX (2010) Variabilité de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 et plasticité en réponse à une augmentation de la température chez des semis de peuplier noir. *Forum pour une gestion durable des ressources naturelles : eau, sols, forêts et biodiversité*. 14 décembre 2010, Orléans, France.

R. FICHOT, T.S. BARIGAH, **S. CHAMAILLARD**, D. LE THIEC, F. LAURANS, H. COCHARD & F. BRIGNOLAS (2010) Architecture hydraulique du xylème, efficience d'utilisation de l'eau et croissance chez le peuplier. 1. Résistance à la cavitation. *Forum pour une gestion durable des ressources naturelles : eau, sols, forêts et biodiversité*. 14 décembre 2010, Orléans, France.

R. FICHOT, **S. CHAMAILLARD**, C. DEPARDIEU, D. LE THIEC, H. COCHARD, T.S. BARIGAH, & F. BRIGNOLAS (2010) Architecture hydraulique du xylème, efficience d'utilisation de l'eau et croissance chez le peuplier. 1. Efficience hydraulique. *Forum pour une gestion durable des ressources naturelles : eau, sols, forêts et biodiversité*. 14 décembre 2010, Orléans, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, M. VILLAR & F. BRIGNOLAS (2010) Variabilité de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 et plasticité en réponse à une augmentation de la température chez des semis de peuplier noir. 23^{ème} Colloque Biotechnocentre. 21-22 octobre 2010, Seillac, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR (2008). Variabilité génétique de facteurs écophysiologiques contrôlant la régénération du peuplier noir (*Populus nigra* L.) en Loire moyenne dans le cadre du changement climatique. *Séminaire des doctorants INRA du département EFPA*, 6-8 octobre 2008, Dinard, France.

C. BARBAROUX, L. BONHOMME, R. MONCLUS, N. MARRON, **S. CHAMAILLARD**, R. FICHOT, E. DREYER & F. BRIGNOLAS. 2008. Genetic variability of water-use efficiency in poplar: a review. *Joint European Stable Isotope User Meeting*, 31 août -5 septembre 2008, Presqu'île de Giens, France.

S. CHAMAILLARD, C. BARBAROUX, C. BASTIEN, V. JORGE, C. DEPIERREUX, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR (2008). Genetic variability of growth parameters and carbon isotope discrimination in three natural populations of *Populus nigra* L. originating from contrasting habitats in France. *Joint European Stable Isotope User Meeting*, 31 août -5 septembre 2008, Presqu'île de Giens, France.

C. BARBAROUX, **S. CHAMAILLARD**, V. JORGE, F. BRIGNOLAS & M. VILLAR. 2006. Facteurs écophysiologiques contrôlant la régénération naturelle de peuplier noir le long de la Loire. 19^{ème} *Colloque Biotechnocentre*, 9-10 novembre, Seillac, France.

Sylvain CHAMAILLARD

Efficiencia d'utilización de l'ea en el pópulo negro (*Populus nigra* L.) : variabilidad y plasticidad en respuesta a las variaciones de l'entorno

Cette thèse visait (i) à quantifier la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.), (ii) à juger de sa plasticité phénotypique en réponse à des contraintes hydrique et thermique et (iii) à juger des liens entre WUE, croissance et survie. A cette fin, des études à partir de semis, en chambre de croissance et en milieu naturel, ainsi qu'à partir de populations installées en dispositifs de pépinière ont été réalisées. Nos travaux ont permis de montrer une importante variabilité et une importante plasticité du caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau' quels que soient l'échelle d'étude, le fond génétique et les conditions de croissance. Une diminution de WUE a été observée en réponse à la contrainte thermique alors qu'une augmentation de WUE a été observée en réponse à un déficit hydrique modéré. Nos travaux démontrent également un lien entre WUE et la survie sous de fortes températures suggérant que sous ces conditions, une faible efficacité d'utilisation de l'eau conférerait un avantage pour les individus. De plus *in situ*, un lien négatif entre WUE et la densité de régénération a été observé démontrant que les plus faibles valeurs de WUE sont observées pour les plus fortes densités. Le caractère 'efficacité d'utilisation de l'eau' pourrait donc s'avérer un caractère limitant de la régénération de l'espèce dans des conditions d'augmentation de température ; une telle augmentation pourrait alors avoir une conséquence directe sur la structuration génétique des populations futures. Ces travaux suggèrent enfin une structuration géographique de la variabilité de WUE qui reste à confirmer à partir d'un plus grand nombre de populations. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour l'identification des bases physiologiques à l'origine des variations de WUE, de sa plasticité et de sa structuration géographique.

Mots clés : discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, croissance, efficacité d'utilisation de l'eau, peuplier noir, plasticité phénotypique, populations naturelles, température, survie, sécheresse, variabilité génétique

Water-use efficiency in black poplar (*Populus nigra* L.) : variability and plasticity in response to environmental variations

This work aimed (i) to quantify variability of water-use efficiency (WUE) on black poplar (*Populus nigra* L.), (ii) to quantify the phenotypic plasticity in response to water deficit and increase of temperature and (iii) to precise the relationships between WUE, growth and leaf survival. Studies on seedlings in growth chambers and in natural conditions, and on populations established in common garden studies were realized. Significant variations and significant plasticity of water-use efficiency were observed on seedlings and adults whatever growth conditions and genetic background. A significant decrease of WUE was observed in response to increase of temperature while an increase of WUE was observed in response to moderate water deficit. Under elevated temperature a significant relationship was observed between WUE and leaf survival suggesting that low WUE confers an advantage for individuals under these conditions. Moreover *in situ*, a negative relationship between WUE and seedlings density was detected suggesting that low WUE are observed under high seedlings densities. The complex trait 'water-use efficiency' should be a limiting character of species establishment under increase of temperatures; this temperature elevation should have consequences on genetic structuration of populations in the future. Our results suggest a geographical structuration of WUE variability but results must be confirmed on several others populations. This present work opens prospects for identification of physiological bases of WUE variations, its plasticity and its geographical structuration.

Keywords: black poplar, carbon isotope discrimination, drought, genetic variability, growth, natural populations, phenotypic plasticity, survival, temperature, water-use efficiency



Sylvain CHAMAILLARD

Efficiencia d'utilización de l'au chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.) : variabilidad y plasticidad en réponse aux variaciones de l'environnement

Cette thèse visait (i)    quantifier la variabilité de l'efficience d'utilisation de l'eau (WUE) chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.), (ii)    juger de sa plasticité phénotypique en réponse à des contraintes hydrique et thermique et (iii)    juger des liens entre WUE, croissance et survie. A cette fin, des études à partir de semis, en chambre de croissance et en milieu naturel, ainsi qu'à partir de populations installées en dispositifs de pépinière ont été réalisées. Nos travaux ont permis de montrer une importante variabilité et une importante plasticité du caractère 'efficience d'utilisation de l'eau' quels que soient l'échelle d'étude, le fond génétique et les conditions de croissance. Une diminution de WUE a été observée en réponse à la contrainte thermique alors qu'une augmentation de WUE a été observée en réponse à un déficit hydrique modéré. Nos travaux démontrent également un lien entre WUE et la survie sous de fortes températures suggérant que sous ces conditions, une faible efficience d'utilisation de l'eau conférerait un avantage pour les individus. De plus *in situ*, un lien négatif entre WUE et la densité de régénération a été observé démontrant que les plus faibles valeurs de WUE sont observées pour les plus fortes densités. Le caractère 'efficience d'utilisation de l'eau' pourrait donc s'avérer un caractère limitant de la régénération de l'espèce dans des conditions d'augmentation de température ; une telle augmentation pourrait alors avoir une conséquence directe sur la structuration génétique des populations futures. Ces travaux suggèrent enfin une structuration géographique de la variabilité de WUE qui reste à confirmer à partir d'un plus grand nombre de populations. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour l'identification des bases physiologiques à l'origine des variations de WUE, de sa plasticité et de sa structuration géographique.

Mots clés : discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, croissance, efficience d'utilisation de l'eau, peuplier noir, plasticité phénotypique, populations naturelles, température, survie, sécheresse, variabilité génétique

Water-use efficiency in black poplar (*Populus nigra* L.) : variability and plasticity in response to environmental variations

This work aimed (i) to quantify variability of water-use efficiency (WUE) on black poplar (*Populus nigra* L.), (ii) to quantify the phenotypic plasticity in response to water deficit and increase of temperature and (iii) to precise the relationships between WUE, growth and leaf survival. Studies on seedlings in growth chambers and in natural conditions, and on populations established in common garden studies were realized. Significant variations and significant plasticity of water-use efficiency were observed on seedlings and adults whatever growth conditions and genetic background. A significant decrease of WUE was observed in response to increase of temperature while an increase of WUE was observed in response to moderate water deficit. Under elevated temperature a significant relationship was observed between WUE and leaf survival suggesting that low WUE confers an advantage for individuals under these conditions. Moreover *in situ*, a negative relationship between WUE and seedlings density was detected suggesting that low WUE are observed under high seedlings densities. The complex trait 'water-use efficiency' should be a limiting character of species establishment under increase of temperatures; this temperature elevation should have consequences on genetic structuration of populations in the future. Our results suggest a geographical structuration of WUE variability but results must be confirmed on several others populations. This present work opens prospects for identification of physiological bases of WUE variations, its plasticity and its geographical structuration.

Keywords: black poplar, carbon isotope discrimination, drought, genetic variability, growth, natural populations, phenotypic plasticity, survival, temperature, water-use efficiency

