

**ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU
VIVANT**

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures
Institut National de la Recherche Agronomique

THÈSE présentée par :
Justine GUET

soutenue le : 01 avril 2015

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

Discipline/ Spécialité : Biologie Forestière

**Expression d'une variabilité génétique pour la phénologie de
croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la
cavitation au sein de populations naturelles de peuplier noir
(*Populus nigra* L.)**

THÈSE dirigée par :

Franck BRIGNOLAS
Catherine BASTIEN

Professeur, Université Orléans
Directrice de recherche, INRA Orléans

RAPPORTEURS :

Reinhart CEULEMANS
François LEFÈVRE

Professeur, Université Anvers, Belgique
Directeur de recherche, INRA Avignon

JURY

Catherine BASTIEN
Franck BRIGNOLAS
Reinhart CEULEMANS
Sylvain DELZON
François LEFÈVRE
Daniel PRAT

Directrice de recherche, INRA Orléans
Professeur, Université Orléans
Professeur, Université Anvers, Belgique
Directeur de recherche, INRA Bordeaux
Directeur de recherche, INRA Avignon
Professeur, Université Lyon 1 – Président du jury

**ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU
VIVANT**

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures
Institut National de la Recherche Agronomique

THÈSE présentée par :
Justine GUET

soutenue le : 01 avril 2015

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

Discipline/ Spécialité : Biologie Forestière

**Expression d'une variabilité génétique pour la phénologie de
croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la
cavitation au sein de populations naturelles de peuplier noir
(*Populus nigra* L.)**

THÈSE dirigée par :

Franck BRIGNOLAS
Catherine BASTIEN

Professeur, Université Orléans
Directrice de recherche, INRA Orléans

RAPPORTEURS :

Reinhart CEULEMANS
François LEFÈVRE

Professeur, Université Anvers, Belgique
Directeur de recherche, INRA Avignon

JURY

Catherine BASTIEN
Franck BRIGNOLAS
Reinhart CEULEMANS
Sylvain DELZON
François LEFÈVRE
Daniel PRAT

Directrice de recherche, INRA Orléans
Professeur, Université Orléans
Professeur, Université Anvers, Belgique
Directeur de recherche, INRA Bordeaux
Directeur de recherche, INRA Avignon
Professeur, Université Lyon 1 – Président du jury

REMERCIEMENTS

Il y a maintenant quatre ans, la Région Centre et mes directeurs de thèse, **CATHERINE BASTIEN** et **FRANCK BRIGNOLAS**, m'accordaient leur confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Si j'en suis aujourd'hui à écrire ces quelques lignes c'est que nous avons réussi. Je dis bien 'nous' car cette réussite est le fruit d'un véritable travail d'équipe. C'est donc tout naturellement que je souhaite profiter des quelques lignes qui vont suivre pour remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à faire de ces trois années de thèse une formidable aventure, autant sur le plan scientifique qu'humain.

~ Merci aux financeurs ~

Je remercie la **RÉGION CENTRE** d'avoir financé ce travail de thèse. Je souhaite également remercier le projet européen **NOVELTREE** d'avoir contribué au financement des analyses isotopiques.

~ Merci aux membres du jury ~

Je remercie chaleureusement les membres du jury, Messieurs **REINHART CEULEMANS**, **SYLVAIN DELZON**, **FRANÇOIS LEFÈVRE** et **DANIEL PRAT** d'avoir lu mon (long) manuscrit et d'être venus juger mon travail un 1^{er} avril Eh non, ce n'était pas une blague ... enfin je l'espère !

~ Merci à mes directeurs de thèse ~

Je remercie mes directeurs de thèse, **CATHERINE BASTIEN** et **FRANCK BRIGNOLAS**, d'avoir accepté de partager cette aventure avec moi. Catherine, Franck, il m'est difficile de trouver les mots qui seront à la hauteur de ce que vous m'avez apporté durant ces quatre années, du stage de Master 2 à la thèse. Certains diront que j'ai été un peu (voire complètement) folle de me lancer dans cette aventure sous votre codirection. Avec du recul, je me dis que j'ai probablement été un peu folle mais je mesure surtout la chance inestimable d'avoir réalisé cette thèse à vos côtés. Indéniablement, vous avez été la clé de voûte de ma réussite. Malgré vos emplois du temps ministériels, vous avez toujours pris le temps de m'enseigner la génétique et l'écophysio, de répondre à mes questions, de me pousser à toujours donner le meilleur de moi-même ou encore me redonner la force d'avancer pour finaliser ce travail de thèse.

Catherine, tout d'abord merci d'avoir partagé le bureau avec moi pendant plus de deux ans. Tu as été une enseignante hors pair aussi bien en génétique, en statistiques que pour l'utilisation du logiciel R. Tu m'as appris la rigueur et tu t'es battue pendant ces trois années de thèse pour essayer de me faire sortir de ce mode « noir ou blanc » dans lequel j'étais plongée. Aujourd'hui, je commence à me dire que les choses peuvent être grises !

Franck, je repars avec l'immense honneur d'avoir été ta première thésarde en écophy, j'espère avoir été à la hauteur des gars ! Je te remercie sincèrement d'avoir toujours cru en moi, d'avoir pris le temps de répondre à mes questions, que ce soit en écophy ou autre, d'avoir toujours regardé avec attention mes présentations, d'avoir partagé avec moi ces phases de soumission d'article que l'on déteste autant tous les deux (quelle galère !) et surtout d'avoir toujours su trouver les mots pour faire redescendre la pression et me remonter le moral dans les moments difficiles.

Catherine, Franck, on ne va pas non plus se mentir (et on ne va pas non plus mentir aux autres), la vie à deux est déjà compliquée mais alors la vie à trois ... quelle épreuve ! Malgré cela, j'ai été et je resterai une thésarde heureuse. Vous m'avez donné tout ce dont un thésard peut attendre de la thèse

pour se lancer dans le monde tumultueux de la recherche. Soyez donc sans crainte, si l'expérience était à refaire, je la referais sans aucune hésitation !

~ *Merci à tous ceux qui ont directement contribué à ce travail de thèse* ~

Je remercie **GILLES PILATE** de m'avoir accueillie, depuis mon stage de Master 1 jusqu'à la thèse, au sein de l'Unité 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' de l'INRA d'Orléans. Gilles, je te remercie de m'avoir ouvert les portes de la recherche.

Un grand merci à **RÉGIS FICHOT** pour son aide ô combien précieuse tout au long de la thèse. Régis, toi aussi tu as toujours été présent pour m'aider à avancer, que ce soit sur les manip [les mesures d'échanges de gaz sous un soleil de plomb, les mesures de potentiels de jour comme de nuit, les mesures au Cavitron (souvenir d'un séjour Clermontois à Home Dome ...)] ou sur la rédaction des articles. Merci également d'avoir accepté de partager ton bureau avec moi pendant ma dernière année de thèse, vos petites histoires à toi et Sylvain m'auront bien fait rire. Bref, tout ça pour dire que tu es quelqu'un d'exceptionnel sur le plan scientifique et humain. Merci pour tout Régis.

Un grand merci également à **VINCENT SEGURA** pour son aide précieuse sur la partie « spectroscopie infrarouge » et pour l'intérêt qu'il a toujours montré envers mon travail de thèse. Vincent, mon expérience en recherche a débuté avec toi (et Gilles) lors de mon stage de Master 1 ; la gentillesse, la disponibilité, la motivation et la grande pédagogie dont tu as fait preuve lors de ce stage m'ont sans aucun doute donné l'envie de continuer sur cette voie.

Merci à **MARC VILLAR** d'avoir toujours répondu aux questions que je pouvais me poser sur ce fameux peuplier noir.

Merci aux membres du plateau technique GénoBois et, en particulier, à **JEAN-PAUL CHARPENTIER** et **KÉVIN ADER** pour leur contribution à l'acquisition des spectres infrarouge.

Merci à **ISABELLE LE JAN** d'avoir accepté de s'enfermer des journées entières dans la petite pièce au fond du bureau de Stéphane pour m'aider sur les micropesées, certes répétitives et ennuyeuses mais indispensables

Merci à **HERVÉ COCHARD** de nous avoir accueillis, Régis et moi, lors de notre séjour « Cavitron », de nous avoir formés à l'utilisation de la version améliorée du Cavitron et pour les relectures de l'article. Merci également à **SYLVAIN DELZON** et **GAËLLE CAPDEVILLE** de m'avoir chaleureusement accueillie à Bordeaux, pour l'aide apportée sur les mesures au Cavitron et pour l'analyse des données.

Merci à **CAMILLE LÉDÉE** d'avoir contribué à l'avancement de ce travail de thèse lors de son stage de Master 2. Camille, tu as effectué un travail remarquable qui nous a permis de disposer de données de qualité, aujourd'hui publiées, tu peux en être fière ! Merci Camille et surtout bonne continuation ! Merci également à **FRANÇOISE LAURANS** et **VÉRONIQUE LAINE-PRADE** pour leur disponibilité, leur gentillesse et l'aide qu'elles ont apportée sur l'acquisition des données anatomiques.

Merci aux membres de mon comité de thèse, **HERVÉ COCHARD**, **SYLVAIN DELZON**, **PATRICIA FAIVRE-RAMPANT**, **RÉGIS FICHOT**, **MARTIN LASCOUX** et **VINCENT SEGURA** d'avoir jugé le travail effectué à mi-parcours et de m'avoir conseillée sur les orientations à suivre durant la fin de la thèse.

Et enfin, un grand merci aux membres de l'unité expérimentale GBFor, **PATRICK POURSAT**, **GUILLAUME BODINEAU**, **JOSÉ ALMEIDA**, **LUDOVIC PASQUIER**, **BERNADETTE GUÉRIN**, **MATHIEU BLIARD**, **CHRISTOPHE BOREL** et **BENJAMIN DIMOURO**, pour les nombreux soins apportés aux plants en pépinière et pour leur investissement sur de nombreuses campagnes de mesures.

~ *Merci à tous ceux qui ont fait de ces trois années de thèse une superbe aventure humaine* ~

Merci aux membres de l'INRA et de l'ONF

Merci notamment à **JEAN-CHARLES BASTIEN**, **VÉRONIQUE JORGE**, **MARIE-ANNE LELU WALTER** et **MICHEL VALLANCE** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, leurs conseils ou tout simplement leurs encouragements. Merci à **FRANCK ROGEON** pour sa grande réactivité et efficacité à la documentation. Merci à **JEAN-LÉANDRE HATON** d'avoir toujours répondu à mes nombreuses requêtes et de m'avoir toujours sortie de mes problèmes informatiques. Merci à **YVES ROUSSELLE** et **CÉLINE RIDEL** ('Yvon et Yvette') pour leur gentillesse et leur bonne humeur (quoi que, Yves pas toujours ... je dis ça je dis rien ;)). Merci à tous les deux pour les nombreuses discussions que l'on a pu avoir, les pauses cafés qui font du bien et les repas du midi où vous avez du supporter bien des fois mon humour quelque peu ... douteux (pour ne pas dire autre chose ...). Bonne continuation à tous les deux ! Enfin, un 'very special thanks' à mon ami de karaoké (:P) pour les excellents moments passés et ceux à venir (:)).

Merci aux membres du LBLGC pour leurs encouragements, leur soutien et pour avoir fait des pauses repas et des pauses cafés d'agréables moments – **STÉPHANE MAURY** (pour ta gentillesse et tes conseils), **ALAIN DELAUNAY**; **SABINE CARPIN**, **DOMENICO MORABITO** et **LAURENT JEAN-ALPHONSE** (des voisins de palier fort sympathiques); **MURIEL FEINARD-DURANCEAU** (pour ton aide avec le Li-Cor), **CÉCILE VINCENT-BARBAROUX**; **FRANÇOIS HÉRICOURT** (pour l'intérêt que tu as toujours porté envers mon travail), **CHRISTIANE DEPIERREUX**; **FRANÇOISE CHEFDOR**, **SYLVAIN BOURGERIE**; **AURÉLIEN SALLÉ** (pour tes petites phrases magiques comme 'alors la rédaction ? ça avance ?'); **MATHILDE BAUDE**; **STÉPHANIE BANKHEAD-DRONNET**; **XAVIER PINEAU**; **FRANÇOIS LIEUTIER** (merci d'avoir toujours suivi mon travail, depuis le Master 1 jusqu'à la thèse) et **STEEVE THANY**. Enfin, je ne manquerai pas d'avoir une pensée pour notre collègue parti trop tôt, **ALAIN GUICHARD**.

Merci à mes amis et acolytes

Merci à **RICHARD BOUCEFFA** ('Mic Givère', 'Mique Jiver' ou 'Miqueue Jy'Vert') d'avoir toujours été là pour moi, que ce soit dans les bons comme dans les mauvais moments. Mic, je voudrais simplement te dire que ce fût un réel plaisir de faire ta connaissance. Je garderai un souvenir impérissable de nos discussions sur tout et n'importe quoi, de ce fameux 'dégivrage de pare-brise' (nous aussi on peut faire des trucs pour rire), des prises de drogues dures (Ibuprofène 400 mg pour les douleurs d'oreille, n'est-ce pas Régis !) et de nos fous rires souvent déclenchés par un simple regard. En quittant le labo, je perds un collègue formidable mais j'ai gagné un ami exceptionnel. Merci pour tout Mic !

Merci à **DANIEL AUGUIN** d'avoir toujours cru en moi, parfois plus que moi d'ailleurs. Daniel, je te suis infiniment reconnaissante d'avoir toujours pris de ton temps pour m'écouter et me redonner l'envie d'avancer dans les moments difficiles. Merci pour les cafés (en fait t'as raison le café vanille est bon !), les madeleines et les anecdotes scientifiques, ou pas, qui ont toujours eu le don de me faire sourire.

Merci à **PATRICIA MONTES** d'avoir été bien plus qu'une secrétaire efficace ! Patricia, je tiens à te remercier du fond du cœur de m'avoir prise sous ton aile à l'INRA dès mon arrivée, de m'avoir toujours écoutée, soutenue et reboostée dans les moments où il le fallait ... mais surtout je te remercie d'avoir accepté de partager avec moi ton calendrier des dieux du stade (Morgan Paraaaaaaaaa !) ... Un grand merci Pat !

Merci à **CLAIRE LE METTÉ** ('la vieille bique' mais aussi 'ma ptite poulette') d'avoir été une amie exceptionnelle. Il y aurait tellement de choses à dire qu'il m'est difficile de résumer en quelques mots ce que tu m'as m'apporté durant ces années de thèse. Je te remercie pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton humour (parfois, même souvent, douteux ... Oui, c'est moi qui dis ça :)), tes petites attentions (les chocolats périmés ...) et ton soutien sans faille. Tu es une battante et s'il y a bien une chose que j'ai apprise à tes côtés, c'est de ne jamais perdre espoir. Claire, je te remercie d'être mon

amie, une amie comme beaucoup aimerait en avoir. Et sinon, trêve de plaisanterie, quand est-ce qu'on se marie ? Sois heureuse ma poule !

Merci à **OPHÉLIE MOREL** ('la vieille bourrique') pour son incroyable bonne humeur et son soutien. On a partagé des moments inoubliables toutes les deux, je pense notamment à cette extraordinaire semaine à Bordeaux, riche en péripéties (4x4 urbain, coups de tête manqués, coups et blessures involontaires) et en fous rires (les voisins nous en veulent encore je pense ...). Cette semaine a marqué le début d'une belle amitié qui, je l'espère, durera dans le temps.

Merci à tous les doctorants, post-doctorants, stagiaires et CDD qui ont également contribué à faire de ces années de thèse un moment agréable. Merci à **ALEXANDRE MOREL** pour sa gentillesse, sa patience (il lui en a fallu pour nous supporter Claire et moi), son incroyable capacité à relativiser (comment tu fais ???) et surtout pour les missions nocturnes. Merci à **FRANCE DARDEAU** ('Franzzzz' mais aussi 'Super Pignon') d'avoir été une super compagne de galère doctorale. Merci à **LUCIE BERTHEAU** ('Lulu') pour sa gentillesse et son humour (aussi douteux que le mien ...). Merci également aux autres compagnons de galère de l'INRA, **FERNANDA GUEDES**, **MAXIME NARDIN**, **REDOUANE EL MALKI**, et du LBLGC, **CLAIRE HÉBRARD**, **CLÉMENT LAFON-PLACETTE**, **JULIEN TOILLON**, la toute jeune **ANNE-LAURE LE GAC** (merci pour tout ce que tu as fait et bon courage pour la fin !) et **INÈS DJEGHDIR**. Et enfin, merci aux nombreux stagiaires, CDD et post-doctorants qui ont contribué à faire régner une ambiance plus que conviviale : **ÉLISE ALBERT** ('la ponette'), **EMNA BAIRAM**, **SYLVAIN BART**, **SYLVAIN CHAMAILLARD**, **ADRIEN COROT** ('ptit mouton'), **DELPHINE GOURCILLEAU** ('la vieille gource'), **KÉVIN KINKEL**, **GUILLAUME MASSON**, **ADELAÏDE MALARDIER**, **MATHIEU MIGEON**, **NICOLAS RICHEL**, **ÉLISE SERIN** et **VANESSA RONG**.

Merci à ma famille et à mes proches

Merci à **ma mère, mon père, mon frère et ma belle-sœur** d'avoir vécu les hauts et les bas de cette aventure avec moi et de m'avoir toujours soutenue à leur manière et autant qu'ils le pouvaient. Merci maman et papa d'avoir toujours fait l'impossible pour me permettre d'avancer. Merci à mon frère et ma belle-sœur de m'avoir donné un neveu et une nièce magnifiques qui m'ont, eux aussi et à leur manière, toujours donné l'envie d'avancer.

Et pour finir, le plus grand des mercis à **JULIEN** pour m'avoir écoutée, rassurée, soutenue, fait relativiser et surtout pour les nombreux sacrifices Merci également à mon fidèle compagnon à quatre pattes, **DEX**, qui m'a bien souvent permis de penser à autre chose qu'au peuplier noir.

SOMMAIRE

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
1. Modifications climatiques	15
2. Potentiel de réponse des populations naturelles forestières	18
2.1. Plasticité phénotypique	19
2.2. Capacité d'adaptation génétique.....	22
3. Étude de caractères fonctionnels	24
3.1. Phénologie de croissance	25
3.2. Gestion des flux d'eau et de carbone.....	26
4. Présentation du modèle d'étude : le peuplier noir	27
4.1. Une espèce pionnière des ripisylves	27
4.2. Une espèce d'intérêt écologique et économique	29
4.3. Menaces sur la diversité génétique de l'espèce et programmes de conservation	30
5. Objectifs de la thèse et stratégie de recherche.....	30
CHAPITRE 1 – ÉTAT DES CONNAISSANCES ' <i>Variabilité génétique pour la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation chez les espèces forestières</i> '	37
1. Concepts de génétique quantitative : composantes de la variabilité phénotypique	39
1.1. Rappels : décomposition de la variabilité phénotypique	39
1.2. Échantillonnage des populations naturelles et des individus et lecture de la variabilité génétique en tests de provenances	40
1.3. Estimation de paramètres génétiques	41
2. Variabilité génétique pour la phénologie de croissance	45
2.1. Déroulement du cycle annuel de développement végétatif et influence des facteurs environnementaux : rappels	45
2.2. Variabilité génétique intra- et inter-populations	47
3. Variabilité génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau	57
3.1. L'efficacité d'utilisation de l'eau : définitions et échelles de mesure	57
3.2. Variabilité génétique intra- et inter-populations	58

4. Variabilité génétique pour la résistance à la cavitation	64
4.1. Mesurer et quantifier la résistance à la cavitation : courbes de vulnérabilité et paramètres descriptifs	64
4.2. Un niveau de variabilité génétique encore peu documenté	67
5. Relations entre caractères fonctionnels d'intérêt	68
CHAPITRE 2 – Structuration géographique de la variabilité génétique pour la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir	71
Présentation générale du chapitre	73
CHAPITRE 2.1 – Structuration géographique de la variabilité génétique chez le peuplier noir : la phénologie de croissance	75
1. Introduction	77
2. Matériel et méthodes	79
2.1. Constitution et caractérisation d'une collection européenne de ressources naturelles de peuplier noir	79
2.2. Un test clonal installé en France et en Italie	86
2.3. Suivis phénologiques et prétraitement des données	89
2.4. Analyses statistiques	92
3. Résultats	94
3.1. Variabilité phénotypique exprimée dans les deux sites expérimentaux	94
3.2. Variabilité génétique intra-métapopulation et interactions $G \times S$	98
3.3. Différenciation génétique entre métapopulations	101
3.4. Relations phénotypiques entre caractères	105
4. Discussion.....	106
4.1. Variabilité génétique et patrons de différenciation génétique pour la phénologie de croissance chez <i>P. nigra</i>	106
4.2. Stabilité de l'expression de la variabilité génétique intra-métapopulation entre sites expérimentaux	110
4.3. Relations entre caractères phénologiques	113
5. Conclusions	114
CHAPITRE 2.2 – Structuration géographique de la variabilité génétique chez le peuplier noir : l'efficacité d'utilisation de l'eau	115
Présentation synthétique de l'article	117

Article : ‘ <i>Genetic variation for leaf morphology, leaf structure and leaf carbon isotope discrimination in European populations of black poplar (Populus nigra L.)</i> ’	121
Résultats complémentaires : relations entre la phénologie de croissance, l’efficacité d’utilisation de l’eau et les performances de croissance	159
1. Composantes de la variabilité phénotypique pour les performances de croissance	160
2. Relations phénotypiques entre la phénologie de croissance, WUE et les performances de croissance	162
Conclusions et transition	166
CHAPITRE 3 – Résistance à la cavitation chez <i>P. nigra</i> : variabilité génétique et relations avec la structure du xylème, la croissance, la phénologie de croissance et l’efficacité d’utilisation de l’eau au niveau intra-population’	169
Présentation synthétique de l’article	171
Article : ‘ <i>Stem xylem resistance to cavitation is related to xylem structure but not to growth and water-use efficiency at the within-population level in Populus nigra L.</i> ’	174
Transition	184
CHAPITRE 4 – Pertinence de la spectroscopie infrarouge comme méthode de phénotypage indirecte de caractères fonctionnels complexes chez <i>P. nigra</i>	185
1. Introduction	187
2. Matériel et méthodes	190
2.1. Matériel végétal, sites expérimentaux et acquisition des données phénotypiques	190
2.2. Acquisition des spectres et prétraitements statistiques	193
2.3. Établissement des modèles de calibration	195
3. Résultats	196
3.1. Variabilité phénotypique et relations entre caractères dans l’échantillon d’étude	196
3.2. Modèles de calibration pour les caractères structuraux et fonctionnels foliaires	198
3.3. Modèles de calibration pour la densité du xylème et la résistance à la cavitation	201

4. Discussion	202
4.1. Calibration par spectroscopie infrarouge de caractères en lien avec la structure des feuilles et du xylème	202
4.2. Calibration par spectroscopie infrarouge de l'efficacité d'utilisation de l'eau et de la résistance à la cavitation	204
5. Conclusions	205
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	207
1. Phénologie de croissance et efficacité d'utilisation de l'eau : variabilité génétique et plasticité phénotypique	210
1.1. Maintien d'une variabilité génétique intra-métapopulation pour la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau	210
1.2. Plasticité phénotypique et stabilité de l'expression de la variabilité génétique intra-métapopulation entre conditions expérimentales contrastées	211
1.3. Différenciation génétique entre métapopulations et phénomènes d'adaptation locale	214
2. Maintien d'une diversité de combinaisons fonctionnelles au sein des métapopulations de peuplier noir	219
3. Identification de prédicteurs indirects de caractères fonctionnels complexes chez <i>P. nigra</i>	221
4. La résistance à la cavitation chez <i>P. nigra</i> : connaissances actuelles et perspectives d'étude	222
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227
VALORISATION DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES	247

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

δ	Composition isotopique
$\Delta^{13}\text{C}$	Discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C
η	Viscosité dynamique de l'eau
ρ	Densité de l'eau
ρ_x	Densité du xylème
σ^2_A	Variance génétique additive
σ^2_e	Variance résiduelle
σ^2_G	Variance génétique
$\sigma^2_{G \times S}$	Variance d'interaction Génotype \times Site
σ^2_M	Variance génétique au niveau inter-métapopulations
σ^2_P	Variance phénotypique
Ψ	Potentiel hydrique
Ψ_{12}	Tension xylémienne induisant 12 % de perte de conductivité hydraulique
Ψ_{50}	Tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique
Ψ_{88}	Tension xylémienne induisant 88 % de perte de conductivité hydraulique
$\Psi_{x\text{min}}$	Potentiel hydrique minimum du xylème
A	Assimilation nette de CO_2
Ad	Métapopulation de l'Adour
$Alt.$	Altitude
ACP	Analyse en Composantes Principales
$AFLP$	Polymorphisme de longueur de fragments d'amplification (<i>'Amplified Fragment Length Polymorphism'</i>)
$AGPF$	Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières
$ANOVA$	Analyse de variance (<i>'ANalysis Of VAriance'</i>)
$ARCHE$	Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales
ATR	Réflexion totale atténuée (<i>'Attenuated Total Reflection'</i>)
A_v	Pourcentage de surface xylémienne allouée à la conduction
$BIOGECO$	BIOdiversité, GÈnes et COmmunautés
C	Carbone
^{12}C	Carbone 12
^{13}C	Carbone 13
C_{Mass}	Teneur massique en carbone
CIR	Circonférence à 1 m du sol
CO_2	Dioxyde de carbone
CV_A	Coefficient de variation génétique additive
CV_G	Coefficient de variation génétique totale
d	Diamètre des vaisseaux du xylème

d_h	Diamètre hydraulique des vaisseaux du xylème
d_{mean}	Diamètre moyen des vaisseaux du xylème
date_{1,5}.doy	Date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal en jour calendaire
date_{1,5}.cni	Date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en durée de nuit cumulée
date₃.doy	Date du stade 3 de débourrement en jour calendaire
date₃.cat0	Date du stade 3 de débourrement exprimée en somme de températures journalières positives
DIBAF	<i>'Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest systems'</i>
DNC	Durée de nuit cumulée
DOY	Day Of the Year
Dr	Métapopulation de la Dranse
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i>
EA	Équipe d'Accueil
ES	Erreur standard
EUFORGEN	EUropean FORest GENetic resources network
FF	Nombre de jours dans l'année pour lesquels la température moyenne est inférieure à 0°C
F_{ST}	Coefficient de différenciation génétique de populations naturelles estimé à partir de marqueurs moléculaires neutres
$G \times S$	Intéactions Génotype \times Site
GIEC	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (IPCC : <i>'Intergovernmental Panel on Climate Change'</i>)
g_s	Conductance stomatique à la vapeur d'eau
h^2	Héritabilité au sens strict
H^2	Héritabilité au sens large
H^2_{ind}	Héritabilité individuelle au sens large
IA	Indice d'aridité
IC	Indice de continentalité
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
k_{max}	Conductance hydraulique maximale
Kh	Métapopulation allemande 'Kuhkopf'
$K_{S-(t)}$	Conductivité hydraulique spécifique théorique du xylème
Lat.	Latitude
Long.	Longitude
LA	Surface du limbe (<i>'Lamina Area'</i>)
LBLGC	Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures
LL	Longueur du limbe (<i>'Lamina Length'</i>)
LW	Largeur du limbe (<i>'Lamina Width'</i>)
LL : PL	Ratio entre la longueur du limbe et la longueur de pétiole
LSV	Longueur de la saison de végétation
MIR	Moyen InfraRouge
n	Nombre d'individus

N	Azote
Nh	Population distribuée le long de la rivière Nohèdes
Nt	Métapopulation des Pays-Bas ‘Netherlands’
N_{Mass}	Teneur massique en azote foliaire
OM	Matière organique (‘ <i>Organic matter</i> ’)
ORL	Orléans (Loiret)
P	Périmètre du limbe
Pg	Métapopulation distribuée le long de la rivière Paglia
P : LA	Ratio entre le périmètre et la surface du limbe
PIAF	Physique et Physiologie Intégratives de l’Arbre Fruitier et Forestier
PIR	Proche InfraRouge
PLC	Pourcentage de perte de conductivité hydraulique (‘ <i>Percent Loss of hydraulic Conductance</i> ’)
Q_{ST}	Coefficient de différenciation génétique de populations naturelles pour un caractère quantitatif
QTL	Loci impliqué dans le contrôle d’un caractère quantitatif (‘ <i>Quantitative Trait Loci</i> ’)
r_p	Coefficient de corrélation de Pearson
r_s	Coefficient de corrélation de Spearman
R^2	Coefficient de détermination
R^2_{CV}	Coefficient de détermination de validation croisée
R^2_{train}	Coefficient de détermination d’apprentissage
R_{sample}	Ratio entre $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ de l’échantillon
R_{standard}	Ratio entre $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ du standard
REML	Méthode du maximum de vraisemblance restreint (‘ <i>REstricted Maximum Likelihood</i> ’)
RMSE_{CV}	Erreur moyenne de validation croisée (‘ <i>Root Mean Square Error</i> ’)
Rm	Métapopulation ‘Ramières’
Rn	Métapopulation distribuée le long du Rhin
RPD_{CV}	Ratio entre l’écart-type et l’erreur moyenne de validation croisée (‘ <i>Residual Predictive Deviation</i> ’)
s	Pente au point d’inflexion des courbes de vulnérabilité à la cavitation
SAV	Savigliano (Italie)
SLA	Surface massique foliaire (‘ <i>Specific Leaf Area</i> ’)
SMIR	Spectroscopie Moyen InfraRouge
SNP	Variation d’un nucléotide à un locus entre individus (‘ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ’)
SPIR	Spectroscopie Proche InfraRouge
SPM	Population distribuée dans la Réserve Naturelle Nationale de Saint-Pryvé Saint-Mesmin
Sp	Population distribuée dans la Réserve Naturelle Nationale de Saint-Pryvé Saint-Mesmin
St	Métapopulation italienne ‘Stura’

$(t/b)_h^2$	Indice de résistance au collapsus pariétal des vaisseaux du xylème dont le diamètre est proche du diamètre hydraulique
t_h	Épaisseur de la double paroi entre couples de vaisseaux appariés dont au moins un des vaisseaux a un diamètre proche du diamètre hydraulique
Tc	Métapopulation distribuée le long de la rivière Ticino
T_{Max}	Température annuelle moyenne maximale
T_{Min}	Température annuelle moyenne minimale
T_{Moy}	Température annuelle moyenne
TMC₁₀	Somme de températures journalières moyennes inférieures à 10°C
TMMC	Température moyenne du mois le plus chaud
TMMF	Température moyenne du mois le plus froid
UFR	Unité de Formation et de Recherche
UMR	Unité Mixte de Recherche
UPRES	Unité PROpre Enseignement Supérieur
UR	Unité de Recherche
USC	Unité Sous Contrat
vs.	<i>Versus</i>
Va	Métapopulation du Val d'Allier
VL	Variable Latente
VPD	Déficit de pression de vapeur d'eau (<i>'Vapour Pressure Deficit'</i>)
W	Test de Mann-Whitney-Wilcoxon
WUE	Efficienc e d'utilisation de l'eau (<i>'Water-Use Efficiency'</i>)
WUE_i	Efficienc e intrinsèque d'utilisation de l'eau
WUE_p	Efficienc e d'utilisation de l'eau à l'échelle de la plante entière

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Modifications climatiques

Depuis 1988, les travaux réalisés par le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) témoignent de l'évolution rapide et globale du climat. Dans son dernier rapport, le GIEC montre que la température annuelle moyenne du globe a augmenté de 0,85°C au cours de la période 1880-2012 (GIEC, 2013). Les années 1983 à 2012 se classent vraisemblablement parmi les 30 années les plus chaudes qu'ait connu l'hémisphère Nord depuis 1400 ans (GIEC, 2013). Des modifications du régime de précipitations et une augmentation en fréquence des événements climatiques extrêmes, de type canicule et sécheresse, ont également été observées depuis 1950 dans différentes régions du globe (Easterling et al., 2000; Schär et al., 2004; GIEC, 2013). Bien que les observations réalisées par le GIEC aient permis de mettre en évidence une évolution moyenne des paramètres climatiques, une forte variabilité de la nature et de l'intensité des changements est observée sur des échelles de temps plus ou moins importantes (Luterbacher et al., 2004; GIEC, 2013). Cette variabilité climatique est notamment illustrée par les oscillations interannuelles et décennales que décrit l'évolution de la température moyenne de surface à l'échelle du globe depuis les années 1850 (**Fig. IG1**).

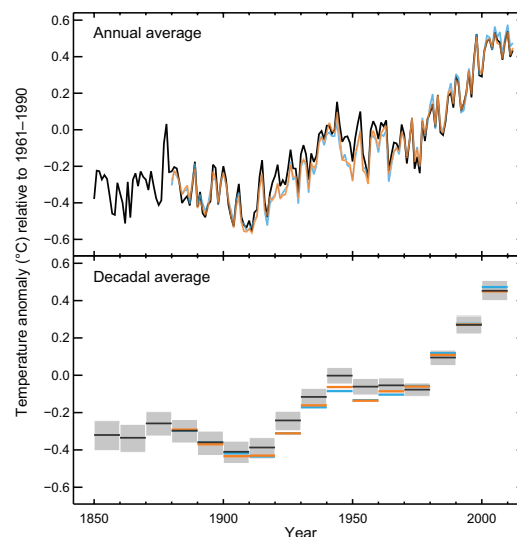


Figure IG1. Anomalie de température moyenne de surface du globe à l'échelle annuelle et décennale pour la période 1850-2012. Les anomalies de température ont été calculées par rapport à la normale 1961-1990 en utilisant trois modèles de calculs de la température de surface : HadCRUT4 (en noir), GISS (en orange) et MLOST (en bleu). Extrait du 5^{ème} rapport du GIEC (2013).

Les modifications climatiques résultent, en grande partie, des émissions croissantes de gaz à effet de serre imputables aux activités humaines. En l'absence d'une réduction notable et durable de ces émissions, les modifications climatiques se poursuivront, mais selon une direction et une intensité variables selon les régions du globe. Dans la partie occidentale de l'Europe, les modèles de prévision climatique prévoient une augmentation de la température annuelle moyenne comprise entre 1°C et 5°C, avec une augmentation plus marquée dans les régions alpines et les régions d'influence méditerranéenne (**Fig. IG2**). Cette hausse de température devrait également s'accompagner d'une modification du régime de précipitations, mais de nature variable à l'échelle régionale. En effet, les précipitations devraient diminuer jusqu'à 15 % dans les régions méditerranéennes, alors qu'elles pourraient augmenter jusqu'à 25 % dans les régions septentrionales (**Fig. IG2**). Enfin, les périodes de canicule et de sécheresse, qui touchaient jusqu'alors les régions méridionales de l'Europe occidentale, devraient s'étendre vers les régions septentrionales. Les projections climatiques prévoient donc une banalisation des événements climatiques extrêmes, tels que l'épisode de canicule survenu en Europe au cours de l'été 2003.

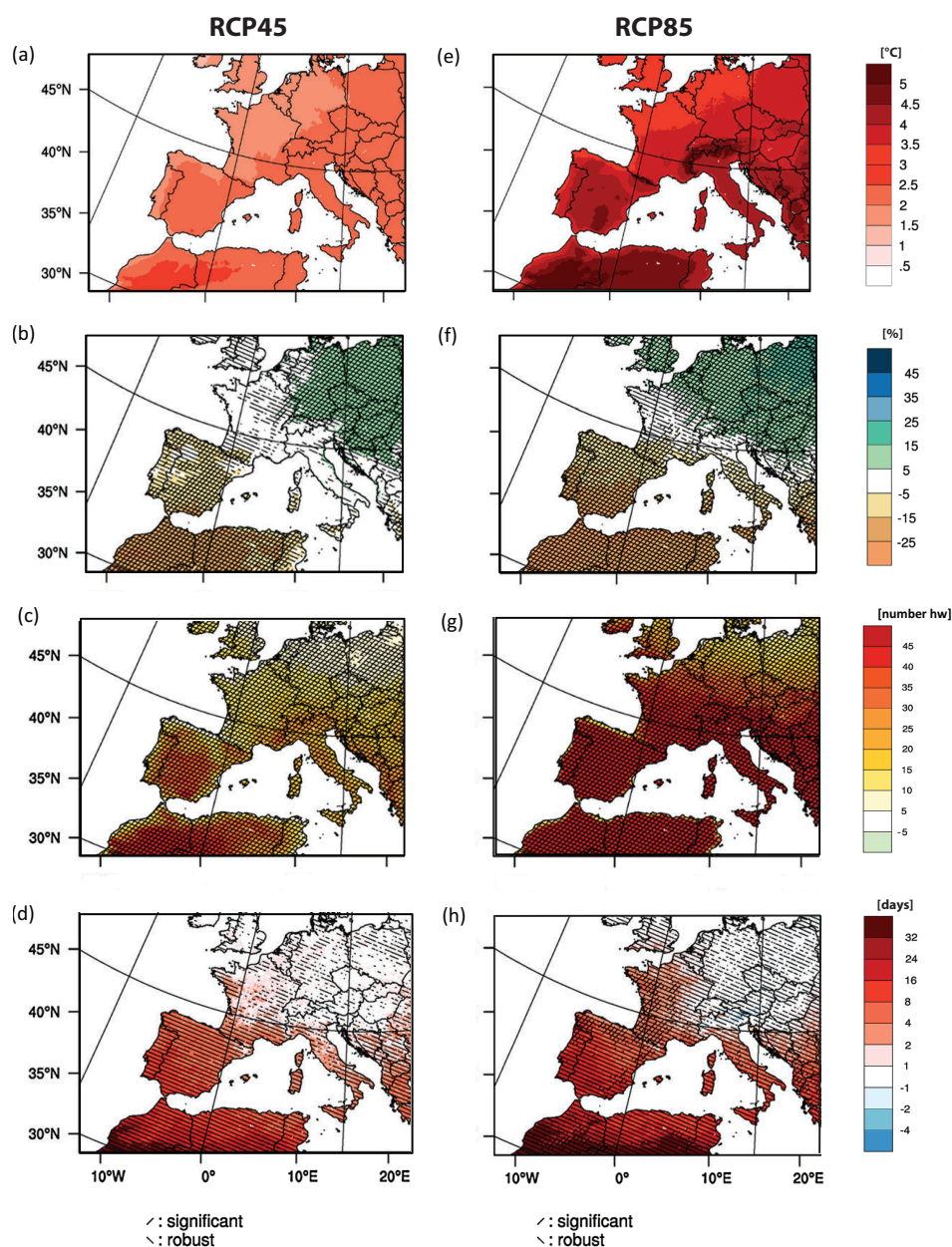


Figure IG2. Modifications de la température annuelle moyenne (en °C, a et e), des précipitations annuelles totales (b et f), du nombre moyen de canicules survenant entre mai et septembre (c et g) et du nombre de jours avec des précipitations journalières inférieures à 1 mm (d et h) pour la partie occidentale de l'Europe. L'évolution des paramètres climatiques est illustrée pour la période 2071-2100 par rapport à la période 1971-2000 pour deux scénarios d'émission carbonée (RCP45 et RCP85). Les scénarios RCP45 et RCP85 impliquent des émissions croissantes de gaz à effet de serre induisant respectivement une augmentation du forçage radiatif de $4,5 \text{ W.m}^{-2}$ et $8,5 \text{ W.m}^{-2}$ d'ici 2100 par rapport à l'ère préindustrielle. Une canicule est définie comme une période de cinq jours consécutifs durant laquelle la température moyenne journalière dépasse de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ la température maximale moyenne calculée sur la période de mai à septembre pour les années 1971-2000. Les zones hachurées indiquent les régions pour lesquelles des changements robustes et/ou significatifs ont été détectés. *Adapté de Jacob et al. (2014).*

2. Potentiel de réponse des populations naturelles forestières

Par le passé, les espèces forestières ont été régulièrement exposées à des variations climatiques de grande ampleur. En particulier, l'alternance des périodes de glaciation et des périodes interglaciaires au Quaternaire a induit de fortes variations de la température de l'air et des régimes de précipitations. Ces variations climatiques ont entraîné de profondes modifications de l'aire de répartition des espèces. L'histoire migratoire de nombreuses espèces forestières au cours de la dernière glaciation et lors du passage à la période interglaciaire actuelle a pu être reconstituée à partir d'analyses rétrospectives basées sur l'étude du pollen fossile ou de la distribution géographique des variants génétiques. Ainsi, les périodes de glaciation ont contraint les espèces forestières à restreindre leur aire de répartition au niveau de refuges glaciaires, à partir desquels étaient initiées les phases de recolonisation durant les périodes interglaciaires (Davis and Shaw, 2001; Petit et al., 2003; Petit et al., 2008). En Europe, ces zones refuges se trouvaient principalement dans la partie méridionale, en Italie, sur la péninsule Ibérique et dans la région balkanique (e.g., Bennett et al., 1991; Petit et al., 2002, 2003; Carrión et al., 2003; Cottrell et al., 2005; Cheddadi et al., 2006; Magri, 2008). La nouveauté des modifications climatiques actuelles, par rapport à celles passées, réside dans la rapidité avec laquelle elles s'effectuent, ce qui devrait limiter la capacité des populations à suivre leur optimum climatique par migration naturelle. Une combinaison des scénarios climatiques et des modèles de dispersion connus indiquent que la vitesse de migration des espèces forestières devra être égale ou supérieure à 1000 mètres par an pour leur permettre de suivre leur optimum climatique (Aitken et al., 2008). Au cours de la dernière recolonisation post-glaciaire, la vitesse de migration des espèces forestières a été estimée à un peu moins de 100 mètres par an (Aitken et al., 2008). Parallèlement aux modifications climatiques, les espèces forestières doivent faire face à une réduction et une fragmentation de leur habitat qui constituent un véritable frein à la migration (Schwartz, 1993). À titre d'exemple, la modélisation de la vitesse de migration d'une espèce à dispersion anémogame, *Tilia cordata* Mill., a mis en évidence qu'au-delà d'une diminution de 70 % de l'habitat, la vitesse de migration de l'espèce diminuait exponentiellement (Collingham and Huntley, 2000). La capacité des espèces forestières à faire face à la rapidité des modifications climatiques actuelles pourrait alors dépendre de l'aptitude des populations à se maintenir dans leur milieu par une combinaison de réponses reposant sur la plasticité phénotypique et l'adaptation génétique. La nature et la multiplicité des réponses mises en œuvre par les

populations pour se maintenir dans leur milieu est alors susceptible de varier à l'échelle de l'aire de répartition des espèces et entre caractères phénotypiques.

2.1. Plasticité phénotypique

Un même génotype peut produire une diversité de phénotypes en fonction des conditions environnementales dans lesquelles il s'exprime. La capacité d'un organisme à modifier sa physiologie, sa morphologie et/ou son développement en fonction des conditions environnementales est définie sous le terme de 'plasticité phénotypique' (Callahan et al., 1997). En tant que réponse rapide, sous-entendue à l'échelle de la vie d'un individu, la plasticité phénotypique pourrait jouer un rôle central dans le maintien des individus et des populations d'arbres forestiers face aux modifications climatiques. Cependant, les réponses plastiques ne sont pas toujours favorables aux individus. Ainsi, Ghalambor et al. (2007) distinguent trois types de plasticité phénotypique en fonction de leur effet sur la valeur sélective¹ d'un individu. Lorsque la réponse plastique d'un individu permet d'approcher le phénotype de l'optimum dans les nouvelles conditions environnementales, la plasticité phénotypique permet d'augmenter la valeur sélective de l'individu et est alors qualifiée d' 'adaptative'. En revanche, si le phénotype produit par un individu dans les nouvelles conditions environnementales est loin de l'optimum phénotypique, alors la valeur sélective de l'individu sera diminuée et la plasticité phénotypique est qualifiée de 'maladaptative'. Enfin, la plasticité phénotypique peut n'avoir aucun effet sur la valeur sélective et est alors qualifiée de 'neutre'. L'existence d'une variabilité génétique de la plasticité phénotypique (*i.e.*, interactions Génotype × Environnement) au sein des populations peut alors permettre d'augmenter la probabilité qu'un ou plusieurs individus aient un phénotype proche de l'optimum dans les nouvelles conditions environnementales.

D'un point de vue théorique, la plasticité phénotypique d'un individu est évaluée par la construction de normes de réaction qui correspondent à la fonction permettant de relier la gamme de phénotypes produits par un individu aux variations continues de paramètres environnementaux, tels que la température de l'air, la disponibilité en nutriments ou en eau du sol (Schlichting and Pigliucci, 1998). Les normes de réaction sont relatives à chaque

¹ La valeur sélective d'un individu (également appelée valeur adaptative, succès reproducteur ou encore '*fitness*') décrit la capacité d'un individu à survivre et à engendrer un maximum de descendants, capables de survivre et de se reproduire à leur tour.

caractère qui concoure à l'élaboration du phénotype et peuvent être décrites par deux principaux attributs susceptibles de varier entre caractères phénotypiques :

- i)* la forme de la norme de réaction qui peut être non-plastique, si le caractère reste figé malgré les variations de paramètres environnementaux, ou plastique linéaire ou non-linéaire (**Fig. IG3**).
- ii)* l'amplitude de la norme de réaction qui permet de juger du degré de plasticité phénotypique. Dans le cas d'une norme de réaction linéaire, l'amplitude de la réponse plastique est simplement évaluée par la pente de la droite.

De Kroon et al. (2005) ont défini les réponses des différentes composantes du phénotype (appelées 'modules') à des variations de paramètres environnementaux comme des réponses modulaires qui interagissent entre elles et concourent à une réponse intégrée à l'échelle de la plante entière.

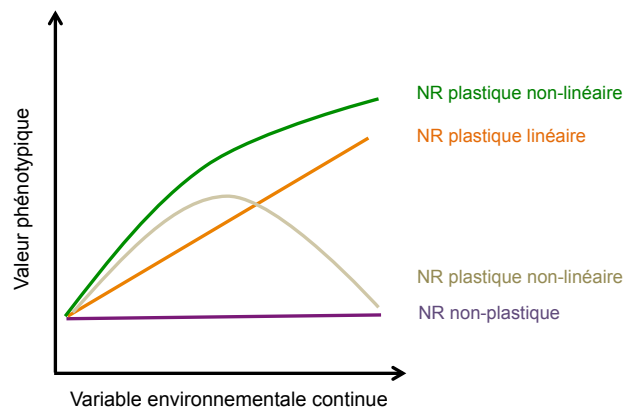


Figure IG3. Représentation schématique de différentes formes de normes de réaction (NR).

La plasticité phénotypique pour un caractère donné est définie comme la propriété d'un génotype qui, pour être évaluée chez les organismes hétérozygotes, nécessite de disposer de matériel cloné et d'observer les performances pour ce caractère dans différentes conditions environnementales. Cependant, chez certaines espèces forestières (*e.g.*, *Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L., *Quercus petraea* Liebl., *Pinus pinaster* Ait.), il est impossible de reproduire à l'identique les individus et la plasticité est alors évaluée au niveau population

(e.g., Rehfeldt et al., 1999, 2002; Balaguer et al., 2001; Vitasse et al., 2014). Ce niveau d'étude permet de juger de la capacité d'une population à répondre et à se maintenir face à des variations environnementales. Afin d'avoir une lecture aussi précise que possible de la plasticité populationnelle, il est nécessaire de disposer d'un échantillon d'individus représentatifs du réservoir de variabilité génétique présent dans la population et qui soit comparable dans les différentes conditions environnementales (Valladares et al., 2006). Ainsi, la plasticité populationnelle est généralement étudiée à partir de descendances maternelles (e.g., Balaguer et al., 2001). À titre d'exemple, Vitasse et al. (2010) ont décrit chez deux espèces forestières tempérées, *Fagus sylvatica* et *Quercus petraea*, les normes de réaction de populations naturelles pour le débourrement, la sénescence foliaire et la longueur de la saison de végétation en réponse à des variations de température le long de gradients altitudinaux (**Fig. IG4**). Ces travaux permettent, par ailleurs, d'illustrer la variabilité de forme de réponse plastique entre caractères phénotypiques : les normes de réaction observées pour le débourrement étaient linéaires, quelle que soit la population ou l'espèce étudiée, alors qu'elles étaient curvilinéaires pour la sénescence foliaire et la longueur de la saison de végétation (**Fig. IG4**).

Que ce soit au niveau individuel ou populationnel, peu d'études ont à ce jour décrit des normes de réaction pour des caractères phénotypiques chez les espèces forestières sur une large gamme de conditions environnementales. Cette situation découle probablement de la complexité de la construction de normes de réaction qui nécessite de découpler les variables environnementales pouvant agir sur un même caractère et d'apprécier les variations de ce caractère en réponse à une variation continue de paramètres environnementaux. Les normes de réaction décrites dans la littérature ont été construites à partir de variables environnementales discrètes ou le plus souvent par une combinaison de variables caractérisant un nombre fini de lieux ou d'années contrastés. Dans le cadre de la thèse, la stratégie expérimentale adoptée visait à maximiser le nombre d'individus étudiés au détriment des environnements dans lesquels les performances de ces individus ont été évaluées. La plasticité phénotypique n'a donc été qu'effleurée dans le cadre de la thèse.

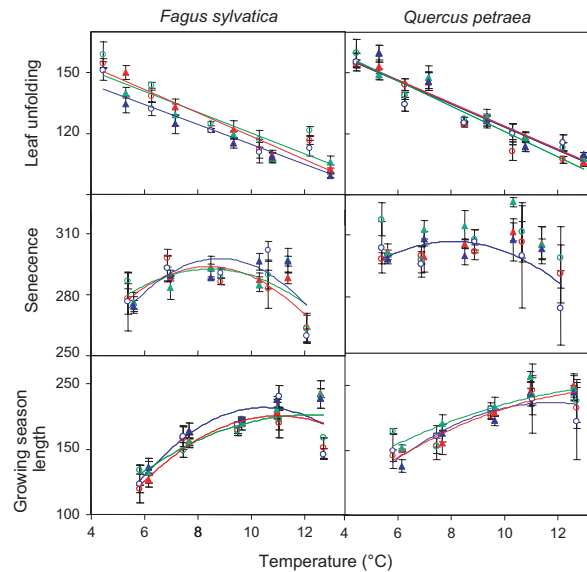


Figure IG4. Normes de réaction pour la date de débournement, la date de sénescence foliaire et la longueur de la saison de végétation pour trois populations de hêtre et de chêne sessile en réponse à une variation de température moyenne entre sites expérimentaux distribués sur un gradient altitudinal. La couleur de la norme de réaction est propre à chaque population. Chaque point représente la moyenne de chaque population dans chaque site expérimental et son erreur standard. Les normes de réaction ont été construites par régression linéaire ou quadratique. *Extrait de Vitasse et al. (2010).*

2.2. Capacité d'adaptation génétique

L'adaptation génétique est définie comme une modification de la composition génétique des populations en réponse à des pressions de sélection naturelle. La sélection naturelle augmente la fréquence des phénotypes les plus favorables à la survie et la reproduction dans un environnement donné et favorise la transmission des combinaisons alléliques codant pour leur phénotype aux générations successives. Par élimination des individus les moins adaptés à leur environnement, la sélection naturelle permet d'augmenter la valeur sélective moyenne de la population. Lorsque la population présente dans son environnement d'origine une valeur sélective moyenne plus importante que celle évaluée dans un autre environnement, on parle d'adaptation locale (Kawecki and Ebert, 2004). L'adaptabilité, ou la capacité des populations à répondre à des pressions de sélection naturelle par adaptation génétique, dépend du niveau de variabilité génétique exprimé pour des caractères phénotypiques en lien avec la valeur sélective, tels que les caractères de résistance au froid (Howe et al., 2003).

La variabilité génétique est façonnée par l'action respective de quatre forces évolutives qui peuvent interagir les unes avec les autres : la mutation, la dérive génétique, les

flux de gènes et la sélection naturelle. Dans la suite de ce paragraphe est présentée l'action de ces différentes forces sur l'adaptabilité et l'adaptation des populations. Les mutations n'ont pas été considérées car, en tant qu'évènements rares, leur action sur la variabilité génétique se produit sur des pas de temps relativement longs. Chaque événement de reproduction sexuée permet de générer de nouveaux individus caractérisés par des combinaisons génétiques uniques, parmi lesquelles certaines seront éliminées par la sélection naturelle ou bien par des processus stochastiques, tels que la dérive génétique. La sélection naturelle fait le tri entre des individus présentant des différentiels de survie et de reproduction au sein des populations. Par élimination des individus les moins adaptés à leur environnement, la sélection naturelle réduit, à plus ou moins long terme, le réservoir de variabilité génétique présent au sein des populations naturelles. Cependant, la sélection naturelle est une force évolutive complexe dans le sens où la nature et l'intensité des pressions de sélection exercées sur les populations sont susceptibles de varier considérablement dans le temps. Cette hétérogénéité temporelle de la nature et de l'intensité des pressions de sélection peut permettre de limiter l'érosion de la variabilité génétique au sein des populations.

La dérive génétique est à l'origine de l'érosion de la variabilité génétique dans les populations naturelles de petite taille en l'absence d'autres forces évolutives (*i.e.*, mutation, flux de gènes et sélection naturelle). En réduisant le 'pool' de variabilité génétique présent au sein des populations naturelles, la dérive génétique peut ainsi réduire l'adaptabilité et l'adaptation locale des populations (Alleaume-Benharira et al., 2006; Aitken et al., 2008; Bridle et al., 2010). Les espèces forestières sont généralement caractérisées par des tailles de populations importantes, ces dernières restant interconnectées par des flux de gènes ce qui permet de limiter l'érosion de la variabilité génétique par la dérive (Hamrick et al., 1992; Petit and Hampe, 2006; Savolainen et al., 2007). Bien que les flux de gènes puissent permettre d'augmenter le niveau de variabilité génétique intra-population, ils peuvent également avoir une influence délétère sur l'adaptation locale. À l'échelle de l'aire de répartition des espèces, la densité de population décrit un gradient décroissant du centre vers la périphérie de l'aire de répartition (Brown, 1984; Lönn and Prentice, 2002). Ce gradient de densité se traduit par des flux de gènes asymétriques s'effectuant majoritairement des populations centrales vers les populations périphériques. Le modèle établi par García-Ramos and Kirkpatrick (1997) suggère que ces flux de gènes asymétriques sont un frein à l'adaptation locale des populations distribuées en périphérie de l'aire de répartition en favorisant l'introduction de combinaisons génétiques non-adaptées. Dans un contexte de

modifications climatiques, l'influence des flux de gènes sur l'adaptabilité et l'adaptation des populations pourrait varier en fonction du sens de ces flux (Kremer et al., 2012). Dans l'hypothèse où les flux de gènes s'effectuent des populations situées dans la partie Sud de l'aire de répartition d'une espèce vers les populations situées à des latitudes plus élevées, les flux de gènes pourraient accélérer l'adaptation locale en favorisant l'introduction de combinaisons alléliques pré-adaptées à des climats plus chauds. En revanche, si les flux de gènes s'effectuent de populations situées à de hautes latitudes vers les populations de basses latitudes, ils pourraient diminuer la valeur sélective des populations (notion de 'maladaptation génétique') en favorisant l'introduction de combinaisons alléliques non adaptées.

La variabilité génétique exprimée dans les populations naturelles forestières est en constante évolution sous l'action principale des forces évolutives présentées dans le paragraphe précédent. La lecture de la variabilité génétique présente dans les populations naturelles à un instant t s'effectue dans des tests de provenances également appelés '*common gardens*'. Ces tests consistent à installer, dans un même environnement, des individus échantillonnés dans différentes populations naturelles. L'accès à la variabilité génétique exprimée au sein des populations nécessite alors de disposer de matériel cloné ou de descendances maternelles, permettant respectivement d'estimer la variabilité génétique totale ou la composante additive de la variabilité génétique. Depuis plusieurs décennies, des populations naturelles de nombreuses espèces forestières ont été installées en tests de provenances ce qui a permis de développer nos connaissances quant au niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour des caractères phénotypiques chez les essences forestières. Les modèles de génétique quantitative ainsi que les paramètres génétiques estimés pour décrire la variabilité génétique présente au sein des populations naturelles seront présentés dans le **Chapitre 1**.

3. Étude de caractères fonctionnels

De manière générale, les caractères phénotypiques réfèrent à l'ensemble des caractéristiques morphologiques, phénologiques ou physiologiques estimées à l'échelle de l'individu. Le terme 'fonctionnel' indique que le caractère mesuré renseigne, de façon plus ou moins directe, sur le fonctionnement de la plante. Les caractères fonctionnels sont généralement des

composantes de caractères phénotypiques plus complexes qui concourent aux performances de la plante dans son environnement (Violle et al., 2007).

Les modifications climatiques actuelles risquent d'imposer d'importantes contraintes sur le cycle annuel de développement végétatif des arbres forestiers. Ce cycle est délimité dans sa durée par la phénologie de croissance, qui détermine la période durant laquelle s'effectue la mise en place de l'appareil végétatif de la plante. La croissance de la plante est, par ailleurs, influencée par les flux d'eau et de carbone au sein de la plante. Dans un contexte de modifications climatiques, l'étude de caractères fonctionnels en lien avec la phénologie de croissance et la gestion des flux d'eau et de carbone au sein de la plante peut nous permettre d'évaluer si les populations naturelles seront capables d'ajuster leur cycle de développement tout en évitant ou tolérant les contraintes hydriques et thermiques estivales.

3.1. Phénologie de croissance

La phénologie de croissance est définie comme l'étude des événements qui rythment la phase de croissance des plantes. De manière générale, elle est appréciée par l'estimation des dates de débourrement, d'arrêt de croissance primaire et de formation du bourgeon ainsi que par la date de défeuillaison pour les espèces tempérées à feuilles caduques. La phénologie de croissance secondaire est, quant à elle, plus complexe à suivre dans le temps et nécessite l'installation de capteurs de croissance radiale permettant de détecter les variations micrométriques du diamètre des arbres. Le bourgeon végétatif est un organe protecteur de la tige embryonnaire vis-à-vis des conditions hivernales défavorables. Au printemps, la date de débourrement marque dans le temps l'ouverture du bourgeon végétatif et l'apparition des ébauches foliaires sensibles aux gelées printanières tardives. Les études réalisées sur la phénologie de débourrement ont mis en évidence que ce caractère est, en grande partie, contrôlé par le régime de températures hivernales et printanières chez les espèces forestières des régions tempérées (Chuine and Cour, 1999; Vitasse et al., 2009a; Cooke et al., 2012; Guy, 2014). La formation du bourgeon a lieu en été et est précédée d'un arrêt de croissance primaire de la plante, sous contrôle de la photopériode et de la température (Howe et al., 2003; Rohde et al., 2011a, b; Cooke et al., 2012). L'arrêt de croissance primaire marque alors le début de la mise en réserve des composés carbonés issus de la photosynthèse. D'un point de vue adaptatif, les dates de débourrement et d'arrêt de croissance primaire jouent un rôle clé chez les espèces tempérées dans le sens où elles traduisent un véritable compromis entre l'exploitation de la saison de végétation et l'évitement des gelées printanières et automnales.

Une forte différenciation des populations naturelles selon des gradients de température et/ou de photopériode a généralement été mise en évidence pour la date de débourrement et d'arrêt de croissance chez les espèces forestières de régions tempérées, suggérant une adaptation locale des populations (Savolainen et al., 2007). Dans les régions tempérées, l'impact des modifications climatiques sur la phénologie de croissance des populations naturelles forestières est d'ores et déjà perceptible. Depuis quelques années, un nombre croissant d'études fait état d'une avancée des dates de débourrement et d'un allongement de la saison de végétation en réponse à l'augmentation des températures annuelles moyennes (Menzel and Fabian, 1999; Menzel et al., 2006; Parmesan, 2006; Cleland et al., 2007). Ces résultats soulignent l'importance de la phénologie de croissance pour la réponse des populations aux modifications climatiques.

3.2. Gestion des flux d'eau et de carbone

L'augmentation en fréquence et en intensité des événements climatiques extrêmes, de type canicule et sécheresse, risque d'imposer d'importantes contraintes sur la gestion des flux d'eau et de carbone au sein des plantes. Fondamentalement, les flux d'eau et de carbone au sein de la plante peuvent être évalués de manière intégrée *via* l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE), qui est définie à l'échelle de la plante entière comme le rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau consommée dans le même laps de temps. La feuille est généralement considérée comme le niveau d'étude privilégié de WUE puisqu'elle est à la fois le site des processus de transpiration et de photosynthèse. Lors d'épisodes de sécheresse intense, la survenue d'événements de cavitation dans les vaisseaux du xylème induit de l'embolie gazeuse, qui conduit à une diminution de la circulation de l'eau dans la plante et à une réduction des flux d'eau et de carbone (Tyree and Sperry, 1989). À terme, l'embolie peut compromettre la survie des arbres. Lors d'épisodes de sécheresse intense, la capacité des arbres à se maintenir pourrait donc dépendre de la vulnérabilité du xylème à la cavitation.

La caractérisation d'un grand nombre d'espèces pour leur degré de vulnérabilité à la cavitation a permis de mettre en évidence que les espèces xérophiles étaient généralement moins vulnérables que les espèces mésophiles (Maherali et al., 2004; Choat et al., 2012). À l'échelle individuelle, les expériences de sécheresse extrême et de réhydratation ont mis en évidence que le degré de vulnérabilité à la cavitation était étroitement lié au niveau de résilience (Brodribb and Cochard, 2009; Brodribb et al., 2010; Barigah et al., 2013; Urli et

al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggère que la résistance à la cavitation est un caractère clé des relations hydriques chez les plantes en situation de sécheresses extrêmes et pourrait donc jouer un rôle central dans l'adaptation des populations. À ce jour, seule une étude réalisée par Lamy et al. (2011) a permis de caractériser le niveau de variabilité génétique exprimée pour la résistance à la cavitation au sein de populations naturelles de pin maritime. Cette étude n'a pas permis de révéler de différenciation génétique adaptative des populations pour ce caractère. De façon comparable, aucune étude n'a réussi à démontrer le rôle de WUE dans l'adaptation des populations à leur environnement (Ramírez-Valiente et al., 2009; Keller et al., 2011; Lamy et al., 2011). La caractérisation à large échelle de la variabilité génétique exprimée au niveau intra- et inter-populations pour WUE et la résistance à la cavitation a été limitée à un faible nombre d'espèces forestières et nécessitent d'être étendue à d'autres essences afin de déterminer si ces résultats peuvent être généralisés chez les arbres forestiers. Cependant, le coût et/ou les capacités de phénotypage limitées pour ces caractères restreignent la lecture de la variabilité génétique à des effectifs de populations et d'individus limités. L'identification de méthodes de phénotypage indirectes haut-débit pour ces caractères phénotypiques pourrait alors permettre de lever ces verrous méthodologiques (Fichot et al., 2014).

4. Présentation du modèle d'étude : le peuplier noir

4.1. Une espèce pionnière des ripisylves

Le peuplier noir (*Populus nigra* L.) est une espèce de la famille des Salicacées et du genre *Populus*. Cette espèce est naturellement distribuée le long des cours d'eau sur une aire géographique qui s'étend de l'Europe de l'Ouest jusqu'à l'extrémité Ouest de la Chine en passant par une étroite frange nord-africaine (**Fig. IG5**). Le peuplier noir est une espèce pionnière qui colonise les sédiments alluviaux. Comme la plupart des espèces pionnières, *P. nigra* est exigeant en lumière. Cette espèce est également caractérisée par une forte croissance juvénile qui lui permet de coloniser rapidement son habitat. Cette croissance rapide s'effectue, cependant, au détriment d'une forte consommation en eau. Le peuplier noir est une espèce dioïque dont le pollen et les graines sont transportés par le vent et, dans une moindre mesure, par l'eau sur des distances pouvant atteindre plusieurs centaines de mètres voire plusieurs kilomètres (Imbert and Lefèvre, 2003; Rathmacher et al., 2010). Au sein d'un même bassin versant, les populations naturelles de peuplier noir sont interconnectées par des flux de gènes et forment des métapopulations (Lefèvre et al., 2001).

En colonisant les sédiments alluviaux, le peuplier noir contribue à la formation des forêts alluviales, communément appelées 'ripisylves'. Les ripisylves occupent un habitat particulier, l'habitat riparien, situé à l'interface des milieux terrestre et aquatique. La dynamique de l'habitat riparien est intimement liée à la dynamique hydrogéomorphologique qui est à l'origine de l'hétérogénéité spatiale et temporelle de l'habitat riparien (Karrenberg et al., 2002; Naiman et al., 2005). Cette hétérogénéité permet le maintien de la dynamique démographique des populations naturelles de peuplier noir. Par exemple, les peuplements vieillissants de peuplier noir doivent être perturbés pour permettre l'installation de nouveaux peuplements, ou bien ils seront remplacés par d'autres essences forestières de la ripisylve, telles que l'érable ou le frêne.

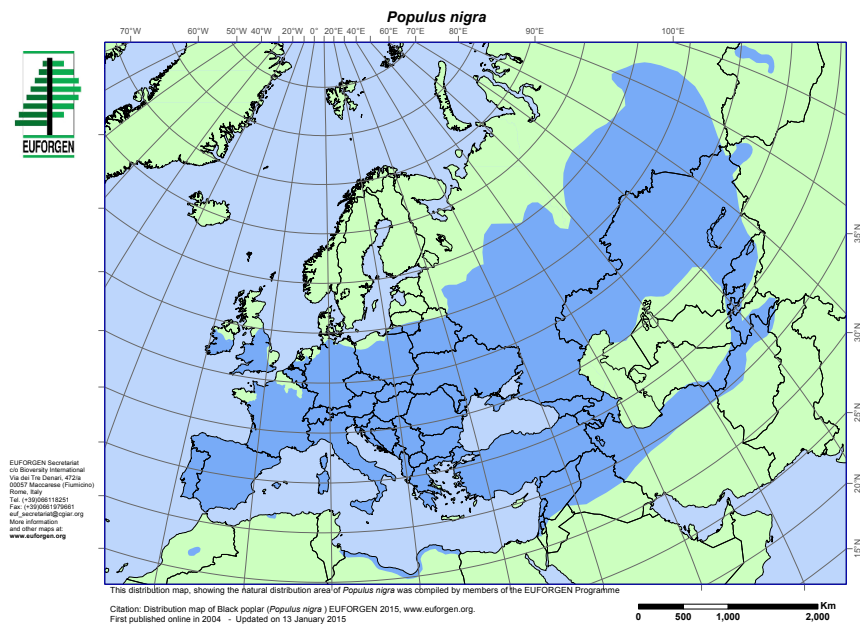


Figure IG5. Limites de répartition du peuplier noir (*Populus nigra* L.) d'après EUFORGEN 2015. Contrairement à ce que semble indiquer la carte, le peuplier noir ne présente pas une distribution uniforme mais est strictement inféodé aux zones alluviales.

4.2. Une espèce d'intérêt écologique et économique

Lorsque la dynamique des populations naturelles de peuplier noir est maintenue par la dynamique hydrogéomorphologique, le peuplier noir est généralement représenté par des cohortes d'âges différents au sein des ripisylves (**Fig. IG6**). Ces cohortes contribuent à la création d'une mosaïque d'habitats et favorisent le maintien d'une diversité faunistique remarquable (Rotach, 2004). Par ailleurs, le système racinaire du peuplier noir, particulièrement développé, joue un rôle central dans le maintien et la cohésion des matériaux sédimentaires, permettant ainsi de limiter l'érosion des berges (Foussadier, 2003; Rodrigues et al., 2007). Le système racinaire de *P. nigra* joue également un rôle épurateur remarquable en piégeant les nutriments excédentaires, tels que l'azote ou le phosphate, issus des zones agricoles (Ruffinoni et al., 2003).

Au-delà de son importance écologique, le peuplier noir présente un intérêt économique par son utilisation dans les programmes d'amélioration des hybrides interspécifiques euraméricains (*Populus deltoides* (Bartr.) Marsh. × *P. nigra*), commercialisés et cultivés en Europe pour la production de bois. Le peuplier noir apporte aux hybrides interspécifiques sa tolérance vis-à-vis d'une diversité de conditions pédoclimatiques ainsi qu'un bon niveau de résistance aux rouilles foliaires. Parmi les 332 cultivars inscrits au catalogue international des cultivars de peuplier, 147 correspondent à des hybrides euraméricains (<http://www.populus.it/ipccloni.php>).



Fig. IG6. Photographie illustrant la présence de différentes classes d'âge au sein des populations naturelles de peuplier noir. Au premier plan, jeunes individus de peuplier noir ; à l'arrière-plan, individus de peuplier noir plus âgés.

4.3. Menaces sur la diversité génétique de l'espèce et programmes de conservation

Au sein de son aire de répartition naturelle, le peuplier noir est sous la menace de deux phénomènes majeurs : *i*) la réduction, l'altération et la fragmentation de son habitat résultant de l'aménagement et de l'exploitation des cours d'eau (Dynesius and Nilsson, 1994; Nilsson et al., 2005) et *ii*) le risque de pollution génétique de ses peuplements naturels par les clones de peuplier cultivés, la variété ornementale *P. nigra* var. '*italica*' et les hybrides interspécifiques, caractérisés par une base génétique étroite (Cagelli and Lefèvre, 1995; Vanden Broeck et al., 2004; Smulders et al., 2008a). Ces deux menaces 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. Pour ces raisons, des programmes de conservation des ressources génétiques du peuplier noir ont été développés à l'échelle nationale, par la Commission des Ressources Génétiques Forestières (CRGF), et à l'échelle européenne par la création du réseau EUFORGEN (EUropean FORest GENetic resources network) (Villar and Forestier, 2009). Ces programmes reposent sur la mise en place de deux stratégies de conservation des ressources génétiques : la conservation *in situ* et la conservation *ex situ*. La conservation *in situ* vise à maintenir la diversité génétique de l'espèce en favorisant un fonctionnement en population et en permettant à la diversité d'évoluer dans son milieu naturel en phase avec les modifications de l'environnement (Lefèvre et al., 2001). En France, sept unités conservatoires distribuées sur la Loire et sur le Rhône ont été retenues. La conservation *ex situ* consiste à maintenir en pépinière ou en *populetum* une collection d'individus représentative de la diversité génétique de l'espèce. En France, la collection nationale regroupe 2000 individus de peuplier noir couvrant l'ensemble des bassins hydrographiques français et conservés en parc à pieds-mères à la pépinière forestière d'État de Guémené-Penfao.

5. Objectifs de la thèse et stratégie de recherche

Les travaux présentés dans cette thèse peuvent être replacés dans le cadre général de la thématique des deux équipes de recherche dans lesquelles ils ont été développés :

- (i)* l'équipe 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales' (ARCHE, USC 1328) du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures de l'Université d'Orléans (LBLGC, UPRES-EA 1207) et

- (ii) l'équipe 'Prédiction et gestion de la diversité des génomes et des populations' de l'unité de recherche 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF, UR0588) du centre INRA Val de Loire.

La thématique de recherche de l'équipe **ARCHE** s'intéresse à deux caractères majeurs pour la réponse des arbres aux modifications climatiques : WUE et la tolérance à la sécheresse. Les travaux de recherche entrepris au sein de cette équipe visent à identifier les bases écophysiologiques et moléculaires de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique de ces deux caractères afin de renseigner des questions relevant de deux problématiques : *i*) une problématique agronomique de production de bois et *ii*) une problématique écologique d'adaptation des espèces aux modifications climatiques. Les questions d'ordre agronomique visent à évaluer, chez les hybrides interspécifiques de peuplier [*P. deltoides* × *P. nigra* (*P. ×euramericana*) et *P. deltoides* × *P. trichocarpa* (*P. ×interamericana*)], les relations entre WUE, la production de bois et les capacités hydrauliques, ainsi que l'influence d'une sécheresse hydrique modérée sur ces relations, à des fins d'amélioration de ces hybrides. Les questions d'ordre écologique visent à évaluer au sein des populations naturelles de peuplier noir, en cours d'installation ou déjà établies, les relations entre la capacité de survie, WUE et les capacités hydrauliques afin de juger de leur potentiel de réponse face aux modifications climatiques.

Les travaux de recherche entrepris dans l'axe écophysiologie de l'équipe ARCHE sur les hybrides interspécifiques de peuplier ont fait l'objet de six thèses de doctorat (Marron, 2003 ; Monclus 2006 ; Bonhomme, 2009 ; Fichot, 2010 ; Rasheed, 2012 ; Toillon, 2013). La majorité de ces travaux ont porté sur des hybrides euraméricains. Les travaux de recherche sur les populations naturelles de peuplier noir ont fait l'objet d'une thèse de doctorat (Chamaillard, 2011). L'efficacité d'utilisation de l'eau a été évaluée au niveau foliaire à deux échelles d'intégration distinctes : *i*) à l'échelle instantanée *via* l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i), définie comme le rapport entre l'assimilation nette de CO₂ (A) et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) et *ii*) à une échelle de temps plus intégrée *via* la discrimination isotopique vis-à-vis du ¹³C ($\Delta^{13}C$). L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence une importante variabilité de WUE, des capacités hydrauliques, du potentiel de croissance et de la tolérance à la sécheresse, et ce quels que soient le fond génétique, l'âge des arbres et l'environnement de croissance (Marron et al., 2005, 2008; Monclus et al., 2005, 2006; Bonhomme et al., 2008; Fichot et al., 2010, 2011; Chamaillard et al., 2011; Toillon et al., 2013). Les résultats obtenus chez le peuplier noir ont mis en évidence

que la variabilité génétique exprimée pour WUE se structurait selon des effets génétiques intra- et inter-populations (Chamaillard et al., 2011). Cependant, la variabilité génétique exprimée au niveau intra-population était supérieure à celle exprimée au niveau inter-populations. Les travaux réalisés sur les hybrides euraméricains ont permis de mettre en évidence une forte relation linéaire et négative entre $\Delta^{13}\text{C}$, WUE_i et l'efficacité de transpiration à l'échelle de la plante entière² (Monclus et al., 2006; Fichot et al., 2011; Rasheed et al., 2013). La variabilité observée pour WUE_i et $\Delta^{13}\text{C}$ était davantage contrôlée par des variations de g_s que de A . Chez les hybrides euraméricains, aucune relation n'a été mise en évidence entre WUE et le potentiel de croissance (Marron et al., 2005; Monclus et al., 2005, 2006; Bonhomme et al., 2008; Fichot et al., 2010, 2011). De même, aucun lien évident n'a été détecté entre, d'une part, le potentiel de croissance et la tolérance à la sécheresse, et d'autre part WUE et la tolérance à la sécheresse (Monclus et al., 2006). En revanche, des relations ont été mises en évidence entre le potentiel de croissance et les capacités hydrauliques (Fichot et al., 2010, 2011). Au sein des populations naturelles de peuplier noir, aucune relation n'a été détectée entre WUE et potentiel de croissance (Chamaillard et al., 2011).

Une des thématiques de recherche de l'équipe '**Prédiction et gestion de la diversité des génomes et des populations**' vise à caractériser la diversité génétique de différentes essences forestières, dont le peuplier noir. Le niveau de diversité génétique au sein des populations naturelles de peuplier noir, ainsi qu'entre populations, est évalué pour des marqueurs moléculaires neutres vis-à-vis de la sélection naturelle et qui reflètent l'histoire démographique des populations. Par ailleurs, le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour des caractères phénotypiques, tels que la croissance, la phénologie de croissance ou de floraison et la tolérance à la rouille foliaire à *Melampsora larici-populina* (*Mlp*), sont également évalués, soit *in situ* soit dans des dispositifs expérimentaux mono- ou multi-sites dans lesquels différentes populations naturelles sont représentées par un échantillon d'individus clonés. Sur le plan appliqué, les travaux de recherche menés au sein de l'équipe contribuent à l'avancée des programmes de conservation des ressources génétiques du peuplier noir en développant les connaissances quant à la dynamique de la diversité génétique du peuplier noir dans des populations de tailles variées et soumises à des régimes hydromorphologiques et des conditions climatiques variées. Dans le

² L'efficacité de transpiration à l'échelle de la plante entière est définie comme le rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau consommée dans le même laps de temps.

cadre du projet européen FP7-NovelTree (2008 – 2012, <http://www.noveltree.eu>), une collection européenne de ressources naturelles de peuplier noir a été constituée. Cette collection a été établie avec pour objectifs contractuels de caractériser les niveaux de variabilité génétique et les patrons de structuration géographique pour deux caractères d'intérêt, la tolérance à la rouille foliaire à *Mlp* et la phénologie de croissance, et d'associer cette variabilité au niveau de polymorphisme de gènes ou régions génomiques candidats pour ces deux caractères. Elle rassemble 1085 génotypes de peuplier noir échantillonnés dans 30 populations naturellement présentes dans des forêts alluviales aux Pays-Bas, en Allemagne, en France et en Italie. Ces populations sont distribuées sur une grande partie du gradient latitudinal de l'aire de répartition de l'espèce. Cette collection européenne a été installée en 2008 au sein de deux tests clonaux distribués selon un axe Nord-Sud. Les travaux réalisés dans le cadre de la thèse ont été, en partie, réalisés à partir de données acquises dans ces deux tests clonaux. La collection de ressources naturelles de peuplier noir a également été mise à disposition de différents partenaires européens. Ainsi, la variabilité génétique exprimée pour la date d'arrêt de croissance primaire et la date de formation du bourgeon terminal a été évaluée au sein de 14 populations naturelles noir distribuées sur un gradient latitudinal allant des Pays-Bas jusqu'au Nord de l'Italie (Rohde et al., 2011b). Cette étude a permis de révéler une différenciation latitudinale des populations pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal, suggérant une adaptation locale aux conditions de photopériode. Une partie des travaux développés au sein de l'équipe 'Prédiction et gestion de la diversité des génomes et des populations' de l'UR AGPF de l'INRA d'Orléans visent également à développer des modèles de prédiction de caractères phénotypiques complexes par la spectroscopie proche et moyen infrarouge. Ces travaux sont menés par Vincent Segura en collaboration avec Jean-Paul Charpentier et Kévin Ader de la plateforme régionale GENOBOIS de l'INRA d'Orléans. Cette plateforme regroupe un ensemble d'appareillages pour le phénotypage des caractéristiques physico-chimiques du bois.

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse visaient à acquérir de meilleures connaissances quant au contrôle génétique et environnemental et la structuration géographique de la variabilité phénotypique pour des caractères fonctionnels chez *P. nigra*. À brèves échéances, elles devraient permettre de rechercher, par génétique d'association, des signatures sélectives dans différentes régions génomiques candidates et de mettre en évidence des adaptations locales. Les objectifs spécifiques de la thèse visaient à :

- (i) évaluer le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique pour

la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation au sein de populations naturelles de peuplier noir,

- (ii) juger des relations entre la phénologie de croissance, WUE, la résistance à la cavitation et la production de biomasse aérienne. L'étude de ces relations doit permettre de renseigner des questions relevant de deux problématiques : 1- une problématique écologique d'adaptation des populations de peuplier noir aux modifications climatiques et 2- une problématique économique et agronomique mettant en jeu l'utilisation des ressources génétiques du peuplier noir pour l'amélioration des hybrides de peuplier euraméricain.
- (iii) Identifier des outils de phénotypage indirects haut-débit des caractères fonctionnels afin d'augmenter les performances de phénotypage pour ces caractères.

Afin de répondre à ces objectifs, la stratégie de recherche choisie dans cette thèse a reposé sur la mise en place de trois approches complémentaires.

La première approche visait à évaluer le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour les caractères fonctionnels d'intérêt au sein de populations naturelles de peuplier noir. Les capacités de phénotypage pour la phénologie de croissance et WUE nous ont permis d'optimiser la lecture de la variabilité génétique exprimée pour ces caractères en considérant un niveau individuel suffisant pour décomposer la variabilité phénotypique en effets génétiques intra- et inter-populations. La variabilité génétique exprimée pour ces deux caractères a été évaluée au sein de la collection européenne de peuplier noir constituée dans le cadre du projet NovelTree et installée en test clonal dans deux sites expérimentaux, en France et en Italie. Cette approche multi-sites nous a permis d'évaluer l'importance relative des effets génétiques et environnementaux sur l'expression de la variabilité phénotypique et de juger de la robustesse d'éventuels patrons de structuration géographique.

Contrairement à la phénologie de croissance et WUE, les capacités de phénotypage pour la résistance à la cavitation ne nous permettaient pas de disposer d'un niveau individuel suffisant pour différencier la variabilité génétique exprimée au niveau intra- et inter-populations. La variabilité génétique exprimée pour ce caractère a donc été évaluée au sein d'une population naturelle de peuplier noir. Ce niveau d'étude nous a, par ailleurs, permis de nous affranchir des effets de structuration géographique de la variabilité génétique afin

d'approfondir l'étude des relations fonctionnelles entre caractères. Deux types de relation ont été étudiés : *i*) les relations entre la résistance à la cavitation et les propriétés structurales du xylème en lien avec l'efficacité de conduction hydraulique et le renforcement mécanique et *ii*) les relations entre la résistance à la cavitation et la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la production de biomasse aérienne. La population sélectionnée pour cette étude a été choisie parmi les 30 populations naturelles de peuplier noir qui constituaient la collection européenne établie dans le cadre du projet NovelTree. Il s'agit de la population Saint-Pryvé qui est naturellement présente en bord de Loire dans la Réserve Naturelle Nationale de Saint-Pryvé Saint-Mesmin. Cette population a été installée en test clonal en pépinière à l'INRA d'Orléans. L'étude des relations entre la résistance à la cavitation et les propriétés structurales du xylème a fait l'objet d'un stage de Master 2 (Camille Lédée, janvier 2014 – juin 2014) réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe 'ARCHE' du LBLGC et l'équipe 'Prédiction et gestion de la diversité des génomes et des populations' de l'UR AGPF de l'INRA d'Orléans.

Mettant à profit les compétences et les moyens techniques disponibles au sein de l'UR AGPF de l'INRA d'Orléans, la troisième approche développée dans le cadre de la thèse visait à juger de la pertinence de la spectroscopie proche et moyen infrarouge comme technique de phénotypage indirecte haut-débit de caractères fonctionnels complexes chez *P. nigra*, WUE et la résistance à la cavitation.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

Chapitre 1 *État des connaissances - Variabilité génétique pour la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation chez les espèces forestières.* Ce chapitre correspond à une revue de la littérature visant à préciser les connaissances actuelles quant au niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique pour la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation au sein de populations naturelles forestières des régions tempérées.

Chapitre 2 *Structuration géographique de la variabilité génétique pour la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir.* L'objectif de ce chapitre est d'évaluer le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE au sein d'une collection européenne de peuplier noir. Ce chapitre est subdivisé en deux sous-parties respectivement axées sur la phénologie de croissance et WUE et se présentent sous la forme d'un chapitre académique et d'un article accepté pour publication dans la revue '*Tree Physiology*'. À l'issue de ces deux

sous-parties, les relations entre la phénologie de croissance, WUE et les performances de croissance au sein des populations naturelles de peuplier noir sont présentées.

Chapitre 3 *Vulnérabilité à la cavitation : variabilité génétique et relations avec la structure du xylème, la croissance, la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation au niveau intra-population.* Ce chapitre est axé sur la résistance à la cavitation et vise à évaluer sa variabilité génétique et ses relations avec d'une part, la structure du xylème et, d'autre part, la phénologie de croissance, WUE et la production de biomasse aérienne au sein d'une population naturelle de peuplier noir. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article publié dans la revue '*Journal of Experimental Botany*'.

Chapitre 4 *Pertinence de la spectroscopie infrarouge comme outil de prédiction de caractères complexes chez le peuplier noir.* Sont présentés dans ce chapitre les modèles de calibration proche et moyen infrarouge développés pour WUE et la résistance à la cavitation chez *P. nigra*.

À l'issue de ces quatre chapitres, les résultats principaux sont discutés au regard des objectifs initiaux. Au terme de cette partie, les perspectives de recherche ouvertes par le travail de thèse et envisageables à court et moyen termes sont présentées.

CHAPITRE 1

– ÉTAT DES CONNAISSANCES –

*‘Variabilité génétique pour la phénologie de croissance,
l’efficience d’utilisation de l’eau et la résistance à la cavitation
chez les espèces forestières’*

ÉTAT DES CONNAISSANCES

L'objectif de ce premier chapitre est de préciser les connaissances actuelles quant au niveau et à la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance (dates de débourrement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon), WUE et la résistance à la cavitation chez les espèces forestières des zones tempérées. Ce chapitre se divise en cinq parties. La première partie consiste en une brève présentation des concepts de génétique quantitative permettant l'estimation de la variabilité génétique au sein des populations naturelles. Les trois parties suivantes s'attachent à décrire de manière indépendante le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour les caractères fonctionnels d'intérêt. Enfin, nous adoptons, dans une dernière partie, une vision multivariée visant à préciser les relations entre la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation.

1. Concepts de génétique quantitative : composantes de la variabilité phénotypique

1.1. Rappels : décomposition de la variabilité phénotypique

La caractérisation des ressources génétiques pour des caractères à variation quantitative s'appuie sur des modèles de génétique quantitative. La valeur phénotypique d'un individu pour un caractère quantitatif (P) peut être décomposée selon l'équation suivante :

$$P = G + E \quad (1)$$

où G est la part de ce caractère liée au génotype et E est la part due à des effets environnementaux. La génétique quantitative s'attache à dissocier les parts génétiques et environnementales de la variabilité phénotypique observée pour un caractère dans une population donnée. Ainsi, la variabilité phénotypique pour un caractère quantitatif (V_P) peut être décomposée selon l'équation suivante :

$$V_P = V_G + V_E + V_{G \times E} \quad (2)$$

où V_G représente la variabilité génétique, V_E représente la variabilité environnementale et $V_{G \times E}$ représente la part de variabilité expliquée par l'interaction entre la composante génétique et environnementale.

1.2. Échantillonnage des populations naturelles et des individus et lecture de la variabilité génétique en tests de provenances

La variabilité génétique exprimée pour un caractère quantitatif dans des populations naturelles (V_G) résulte à la fois de la variabilité génétique exprimée au niveau intra- (V_{WP}) et inter-populations (V_{BP}). La nature du matériel génétique échantillonné au sein des populations donne accès à différentes composantes de la variabilité génétique. On distingue alors deux situations :

- (i) lorsque les individus d'une espèce hétérozygote ne peuvent pas être reproduits à l'identique par multiplication végétative (e.g., *Pinus pinaster* Ait., *Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L.), des descendances maternelles sont échantillonnées au sein des populations et donnent accès à la variabilité génétique additive (V_A) (e.g., Rehfeldt, 1983; Billington and Pelham, 1991; Li et al., 1993; Alberto et al., 2011). Elle représente la part de variabilité génétique totale qui peut être expliquée par les effets additifs des allèles à tous les loci qui contrôlent le caractère quantitatif.
- (ii) Lorsque les individus d'une espèce peuvent être reproduits à l'identique par multiplication végétative (e.g., espèces du genre *Populus*), l'échantillonnage d'individus au sein des populations donne accès à la variabilité génétique totale (e.g., Weber et al., 1985; Farmer, 1993; Chamaillard et al., 2011; Rohde et al., 2011b), qui résulte des effets additifs mais également des effets de dominance (i.e., interaction entre allèles à un même locus) et d'épistasie (i.e., interaction entre allèles à différents loci).

Les populations présentant des caractéristiques différentes en termes de taille, de distribution spatiale et de dynamique démographique, aucune règle générale ne peut être établie quant à la stratégie d'échantillonnage à adopter pour caractériser la variabilité génétique présente au sein des populations naturelles. Cependant, quels que soient l'espèce et le matériel génétique échantillonnés, l'échantillonnage doit être réalisé de manière à disposer d'un niveau individuel suffisant pour permettre une estimation aussi précise que possible de la variabilité génétique exprimée au niveau intra- et inter-populations. Par ailleurs, afin d'obtenir des estimations non biaisées des composantes de la variance génétique, l'échantillonnage est généralement réalisé de manière à sélectionner, si possible, des individus non-apparentés. Le choix des individus est alors effectué par appréciation visuelle en essayant de maximiser la variabilité phénotypique observée tous critères confondus et/ou en sélectionnant des

individus séparés par une certaine distance géographique (*e.g.*, Rehfeldt, 1983; St Clair et al., 2005; Luquez et al., 2008; Chamaillard et al., 2011). Enfin, selon le caractère quantitatif étudié, les populations sont échantillonnées de manière à maximiser l'amplitude de variation géographique (*i.e.*, latitudinale, longitudinale, altitudinale) et/ou climatique entre sites d'origine des populations. À titre d'exemple, la variabilité génétique exprimée pour l'arrêt de croissance primaire et la formation du bourgeon chez les espèces forestières est généralement évaluée au sein de populations distribuées le long de gradients latitudinaux afin de maximiser l'amplitude de variation photopériodique entre sites d'origine des populations (*e.g.*, Luquez et al., 2008; Rohde et al., 2011b).

Les études qui visent à caractériser les différences de comportement phénotypique reposent sur des tests de provenances, également appelés '*common gardens*', dans lesquels les performances phénotypiques sont observées en environnement commun. Depuis plusieurs décennies, des populations naturelles de nombreuses espèces forestières ont ainsi été échantillonnées et installées en tests de provenances afin de caractériser la variabilité génétique pour des caractères phénotypiques principalement liés à la résistance au froid et à la croissance de l'arbre (Langlet, 1971; Morgenstern, 1996; Alberto et al., 2013a).

1.3. Estimation de paramètres génétiques

Ce dernier paragraphe est centré sur la présentation des paramètres génétiques utilisés pour décrire la variabilité génétique exprimée dans les populations naturelles. Ainsi, dans ce dernier paragraphe, nous utiliserons à la fois la notion de variabilité et la notion de variance en tant qu'estimateur de la variabilité.

La part génétique de la variabilité phénotypique exprimée pour un caractère quantitatif est estimée selon des modèles de génétique quantitative. Les populations naturelles peuvent présenter des dynamiques démographiques différentes et être exposées à des forces évolutives différentes dans leur milieu d'origine. Le niveau de variabilité génétique exprimée au sein de chaque population naturelle est donc susceptible de varier. Afin de tenir compte de cette éventualité, il est recommandé d'évaluer la variabilité génétique exprimée au sein de chaque population naturelle (Visscher et al., 2008). La variance phénotypique d'un caractère quantitatif au sein de chaque population ($\sigma^2_{P(WP)}$) est alors décomposée selon l'équation suivante :

$$\sigma^2_{P(WP)} = \sigma^2_{G(WP)} + \sigma^2_e \quad (3)$$

où $\sigma^2_{G(WP)}$ est la variance génétique d'un caractère quantitatif au sein d'une population et σ^2_e est la variance résiduelle, *i.e.*, la variance qui ne peut être attribuée à l'effet génétique. La part de variance phénotypique imputable à des effets génétiques, additifs ou totaux, peut être appréciée pour chaque population par l'estimation de l'héritabilité. En fonction de la composante génétique d'intérêt (variance génétique additive ou totale), on distingue deux types d'héritabilité : l'héritabilité au sens strict (h^2) et l'héritabilité au sens large (H^2), respectivement calculées à partir de la variance génétique additive ($\sigma^2_{A(WP)}$) et de la variance génétique totale ($\sigma^2_{G(WP)}$) :

$$h^2 = \sigma^2_{A(WP)} / \sigma^2_{P(WP)} \quad (4)$$

$$H^2 = \sigma^2_{G(WP)} / \sigma^2_{P(WP)} \quad (5)$$

Les valeurs d'héritabilité, que ce soit au sens strict ou sens large, sont spécifiques à chaque population dans un environnement donné (Visscher et al., 2008).

La variabilité génétique exprimée au niveau inter-populations est évaluée à partir d'un modèle hiérarchique qui décompose la variabilité génétique en une composante intra-population et une composante inter-populations :

$$\sigma^2_P = \sigma^2_{G(WP)} + \sigma^2_{G(BP)} + \sigma^2_e \quad (6)$$

où σ^2_P est la variance phénotypique d'un caractère quantitatif dans une collection de populations naturelles, $\sigma^2_{G(WP)}$ est la variance génétique intra-population, $\sigma^2_{G(BP)}$ est la variance génétique inter-populations et σ^2_e est la variance résiduelle. Ce modèle suppose que les variances génétiques intra-population sont homogènes pour permettre l'estimation de la variance génétique inter-populations. Le niveau de différenciation génétique des populations pour un caractère quantitatif est apprécié par le coefficient de différenciation génétique (Q_{ST}). À l'origine, le Q_{ST} a été défini comme étant la proportion de variabilité génétique additive pouvant être attribuée à des différences entre populations (Spitze, 1993). Il est calculé selon l'équation suivante :

$$Q_{ST} = \sigma^2_{A(BP)} / (\sigma^2_{A(BP)} + 2 \times \sigma^2_{A(WP)}) \quad (7)$$

où $\sigma^2_{A(BP)}$ est la variance génétique additive inter-populations, $\sigma^2_{A(WP)}$ est la variance génétique additive moyenne intra-population. Dans le cas où le matériel génétique échantillonné ne permet pas d'accéder à la variabilité génétique additive, le Q_{ST} peut être

estimé comme la part de variabilité génétique totale expliquée par des différences entre populations :

$$Q_{ST} = \sigma^2_{G(BP)} / (\sigma^2_{G(BP)} + 2 \times \sigma^2_{G(WP)}) \quad (8)$$

où $\sigma^2_{G(WP)}$ et $\sigma^2_{G(BP)}$ sont respectivement les variances génétiques totales intra- et inter-populations. Lorsque la variabilité génétique exprimée pour un caractère quantitatif est essentiellement expliquée par des effets additifs, les valeurs de Q_{ST} estimées à partir de la variance génétique additive et totale sont comparables. Dans le cas contraire, où la variabilité génétique est expliquée par de forts effets non-additifs (*i.e.*, de dominance et d'épistasie), les valeurs de Q_{ST} estimées à partir de la variance génétique totale seront probablement biaisées.

Afin d'inférer les forces évolutives à l'origine de la différenciation génétique des populations, les valeurs de Q_{ST} peuvent être comparées au niveau de différenciation génétique observé à l'aide de marqueurs moléculaires supposés neutres (F_{ST}). Les valeurs de F_{ST} permettent d'évaluer la part de diversité génétique observée pour des marqueurs neutres qui peut être attribuée à des différences de fréquences alléliques entre populations (Wright, 1951; Nei, 1987) :

$$F_{ST} = v_{BP} / (v_{BP} + v_{WP}) \quad (9)$$

où v_{WP} et v_{BP} correspondent respectivement à la part de diversité génétique pour des marqueurs moléculaires pouvant être expliquée par des différences de fréquences alléliques au niveau intra- et inter-populations. Dans l'hypothèse où le taux de mutation est comparable entre populations, les valeurs de F_{ST} estimées à l'aide de marqueurs moléculaires neutres reflètent l'action conjointe de la dérive génétique et des flux de gènes sur le niveau de différenciation des populations. Si un caractère quantitatif est uniquement sous déterminisme additif et est sélectivement neutre, alors la valeur de Q_{ST} estimée pour ce caractère est supposée égale à la valeur de F_{ST} estimée à l'aide de marqueurs moléculaires neutres (Wright, 1951). Cette hypothèse est utilisée comme modèle nul dans les comparaisons Q_{ST} - F_{ST} et correspond à la situation où la différenciation génétique de populations naturelles pour un caractère quantitatif résulte essentiellement de l'action de la dérive génétique (Spitze, 1993; Merilä and Crnokrak, 2001). Ainsi, la comparaison Q_{ST} - F_{ST} amène à trois résultats possibles :

- (i) lorsque la valeur de Q_{ST} est comparable à la valeur de F_{ST} ($Q_{ST} \approx F_{ST}$), alors la différenciation génétique observée pour un caractère quantitatif résulte de l'effet de la dérive génétique,
- (ii) lorsque la valeur de Q_{ST} est supérieure à la valeur de F_{ST} ($Q_{ST} > F_{ST}$), alors la différenciation observée pour le caractère quantitatif résulte de l'action de la sélection diversifiante : les optima phénotypiques sélectionnés dans chaque population sont différents,
- (iii) lorsque la valeur de Q_{ST} est inférieure à la valeur de F_{ST} ($Q_{ST} < F_{ST}$), alors la différenciation observée pour le caractère quantitatif résulte de la sélection uniformisante : les optima phénotypiques sélectionnés dans chaque population sont identiques.

La comparaison des valeurs de Q_{ST} et de F_{ST} présente un certain nombre de limites qui découlent de l'estimation de ces deux coefficients de différenciation génétique. Tout d'abord, l'estimation des valeurs de F_{ST} repose sur l'hypothèse que les marqueurs moléculaires utilisés sont neutres vis-à-vis de la sélection naturelle. De manière générale, les marqueurs microsatellites sont distribués dans des régions non-codantes du génome et semblent donc être les plus appropriés pour l'estimation des valeurs de F_{ST} . Cependant, certains auteurs suggèrent que les valeurs de F_{ST} estimées à partir de marqueurs microsatellites sous-estiment le niveau de différenciation génétique des populations en raison de leurs taux élevés de mutation (Ritland, 2000; Edelaar and Björklund, 2011; Edelaar et al., 2011; Whitlock, 2011). Ainsi, certains de ces auteurs prônent l'utilisation des marqueurs SNP³ qui présentent un taux de mutation plus faible (Edelaar and Björklund, 2011; Edelaar et al., 2011; Whitlock, 2011). De son côté, l'estimation des valeurs de Q_{ST} repose sur l'hypothèse que le déterminisme des caractères quantitatifs est purement additif. Or, l'architecture génétique des caractères quantitatifs est souvent complexe et met en jeu des effets additifs mais également des effets de dominance et d'épistasie qui peuvent entraîner une surestimation ou une sous-estimation des valeurs de Q_{ST} et biaiser l'interprétation de la comparaison Q_{ST} - F_{ST} (Merilä and Crnokrak, 2001; Leinonen et al., 2013).

³Les SNP_s ('Single Nucleotide Polymorphisms') correspondent à des variations de la séquence nucléotidique entre individus.

2. Variabilité génétique pour la phénologie de croissance

2.1. Déroulement du cycle annuel de développement végétatif et influence des facteurs environnementaux : rappels

Les espèces forestières des zones tempérées se distinguent des autres espèces par leur capacité à interrompre et à reprendre leur cycle de développement végétatif saisonnièrement en fonction des conditions environnementales. À la fin de l'été, avant que se produise la sénescence foliaire, les arbres stoppent leur croissance primaire et procèdent à une mise en réserve des composés carbonés issus de la photosynthèse. La croissance secondaire se produit alors jusqu'à ce que les feuilles entrent dans leur dernière phase de développement, la sénescence, au cours de laquelle les pigments photosynthétiques sont détruits et les nutriments foliaires remobilisés *via* le phloème vers les tissus de réserve de la plante. L'arrêt de croissance primaire précède la mise en place des écailles rugueuses (étape communément appelée 'formation du bourgeon') qui permettront de protéger les méristèmes caulinaires des dommages provoqués par le froid et qui ne s'ouvriront qu'au printemps suivant. Chez le peuplier noir, l'arrêt de croissance primaire et la formation du bourgeon sont appréciés par observation du bourgeon terminal en utilisant une échelle de notation à sept classes variant de 3 à 0, qui correspondent respectivement à un stade d'élongation des entrenœuds et un stade où le bourgeon est en dormance (Rohde et al., 2011b; Fabbrini et al., 2012; **Fig. 1.1**). Sur cette échelle de notation, les stades 2,5 et 1,5 correspondent respectivement à l'arrêt de croissance primaire et à la formation du bourgeon terminal (**Fig. 1.1**).



Figure 1.1. Échelle de notation de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal chez le peuplier noir. Stade 3, plus de deux feuilles enroulées, baume recouvrant plusieurs entrenœuds ; stade 2,5, présence de deux feuilles enroulées au même niveau, apex et plusieurs entrenœuds couverts de baume ; stade 2, présence d'une feuille enroulée, apex et dernier entrenœud couverts de baume ; stade 1,5, présence d'une feuille en partie enroulée, baume limité à l'apex ; stade 1, plus de feuille enroulée, bourgeon non-fermé vert, bourgeon non-recouvert de baume ; stade 0,5, plus de feuille enroulée, bourgeon vert fermé, bourgeon collant et brillant de baume ; stade 0, bourgeon fermé rouge-marron, plus de baume visible. *Adapté de Fabbrini et al. (2012).*

Chez les espèces forestières des zones tempérées, l'arrêt de croissance primaire et la formation du bourgeon sont principalement initiés en réponse à une diminution de la longueur du jour (Howe et al., 2003). Toutefois, il est admis que d'autres facteurs environnementaux, tels que la température de l'air, la disponibilité en eau du sol ou en éléments nutritifs ou encore l'attaque par des agents pathogènes, peuvent interagir avec le signal photopériodique (Dunlap and Stettler, 1996; Howe et al., 2003; Rohde et al., 2011a). Pendant l'hiver, les méristèmes se situent dans un état de dormance : ils ont cessé toute activité physiologique. Trois types de dormance vont se succéder dans le temps (Lang et al., 1987) :

- (i) la paradormance, qui correspond à une inhibition de l'activité des méristèmes par un organe distinct et éloigné du tissu dormant. La paradormance a lieu à la fin de l'été et est généralement induite par la diminution de la photopériode.
- (ii) l'endodormance, qui correspond à un état de dormance profond induit par des facteurs endogènes aux bourgeons qui bloquent l'activité physiologique des méristèmes même si les conditions environnementales deviennent favorables. Une accumulation de températures froides (appelées températures de 'chilling') est alors nécessaire pour lever l'endodormance.
- (iii) l'écodormance, qui correspond à un état de dormance où l'activité physiologique des méristèmes est inhibée par les conditions environnementales défavorables. La reprise d'activité ne pourra se faire que lorsqu'une certaine somme de

températures chaudes (appelées températures de '*forcing*') sera atteinte. La levée de l'écodormance se traduit par l'ouverture des bourgeons végétatifs, qui s'achève par l'émergence des feuilles et l'initiation d'un nouveau cycle de croissance.

D'un point de vue adaptatif, le calage des événements phénologiques dans le temps joue un rôle crucial puisqu'il conditionne la sensibilité des arbres aux gelées printanières et automnales et détermine la période durant laquelle l'arbre va effectuer sa croissance. Ainsi, la phénologie de croissance a fait l'objet de nombreuses études chez les espèces forestières de par sa forte valeur adaptative. À l'échelle de l'aire de répartition des espèces, les populations sont exposées à des régimes thermiques et photopériodiques très différents. Les populations naturelles doivent donc ajuster avec précision leur phénologie de croissance afin de maximiser leur croissance tout en évitant les dommages causés par le froid.

2.2. Variabilité génétique intra- et inter-populations

2.2.1. Importance de la part génétique dans l'expression de la variabilité phénotypique au niveau intra-population

Afin de juger de l'intensité du contrôle génétique de la date de débournement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon chez les espèces forestières des régions tempérées, les études ayant estimé les valeurs d'héritabilité au sens strict (h^2) ou au sens large (H^2) pour ces caractères au sein de population naturelles ont été recensées (**Tableau 1.1**). Cette revue de la littérature rassemble dix études réalisées chez 11 espèces forestières différentes. Parmi les dix études répertoriées, sept ont estimé les valeurs d'héritabilité pour la date de débournement ainsi que pour la date d'arrêt de croissance et/ou de formation du bourgeon. Ces études permettent de comparer la part relative des effets génétiques et environnementaux sur l'expression de la variabilité phénotypique pour les différents caractères phénologiques chez une même espèce. De manière générale, une héritabilité au sens large faible à forte ($0,08 \leq H^2 \leq 0,98$) a été reportée pour les dates de débournement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon chez les différentes espèces forestières étudiées. Ces résultats suggèrent que l'expression de la variabilité phénotypique pour les caractères phénologiques est sous contrôle génétique dont l'intensité semble toutefois varier entre caractères, entre espèces et entre environnements de lecture de cette variabilité. Par ailleurs, des valeurs d'héritabilité au sens strict, couvrant de la même façon la gamme de variation possible ($0,17 \leq h^2 \leq 0,97$), ont été rapportées pour les caractères phénologiques, suggérant qu'une part du

déterminisme génétique est expliqué par des effets additifs. Certaines études suggèrent que la variabilité phénotypique exprimée pour les dates d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon est sous une plus forte influence environnementale que la date de débourrement, en raison de la multitude des facteurs environnementaux qui peuvent les influencer (Howe et al., 2003). La grande variabilité des estimations d'héritabilité obtenues permet surtout de souligner l'importance à accorder aux conditions expérimentales d'évaluation de cette variabilité : environnement moyen, précision de l'échelle de mesure et intervention de perturbations biotiques et abiotiques.

Des études ayant pour objectif d'identifier les régions génomiques impliquées dans le contrôle du débourrement, de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon indiquent que ces caractères sont sous un déterminisme polygénique. En fonction des espèces et des caractères étudiés, 4 à 35 QTL⁴ ont été détectés et expliquent 1,2 à 29,0 % de la variabilité phénotypique (voir revue dans Howe et al., 2003; Casasoli et al., 2004; Rohde et al., 2011b). Depuis une dizaine d'années, plusieurs gènes à l'origine du contrôle des événements phénologiques ont été identifiés (Frewen et al., 2000; Howe et al., 2003; Böhlenius et al., 2006; Evans et al., 2014; McKown et al., 2014b). Parmi ces gènes, le gène PHYB2, qui code pour un phytochrome impliqué dans la réponse aux stimuli lumineux rouge et rouge-lointain, jouerait un rôle central dans la perception du signal photopériodique en fin de saison de végétation (Howe et al., 2003).

⁴ Un QTL (*'Quantitative Trait Loci'*) correspond à une région du génome impliquée dans le contrôle d'un caractère quantitatif. Son identification repose sur la détection d'association significative entre les marqueurs moléculaires et les variations d'un caractère quantitatif au sein d'une population ou d'une espèce.

Tableau 1.1. Revue de la littérature des études ayant estimé les valeurs d'héritabilité au sens strict (h^2) ou sens large (H^2) pour la phénologie de croissance (date de débournement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon) chez différentes espèces forestières des zones tempérées.

Phénologie	Matériel	Espèce	Populations	Effectif	Test(s)	Caractère	Héritabilité		Référence
							H^2 ou h^2	Valeur	
Printanière									
Descendances maternelles									
		<i>Betula pendula</i>	3	112 - 160 fam.	1	Débournement	h^2	0,27 (0,19 - 0,35)	Billington and Peiham (1991)
		<i>Betula pubescens</i>	7	78 - 160 fam.	1	Débournement	h^2	0,34 (0,28 - 0,39)	Billington and Peiham (1991)
		<i>Pinus sitchensis</i>	17	n.i.	1	Débournement	h^2	0,17	Mimura and Aitken (2007)
		<i>Pinus sylvestris</i>	4	19 - 21 fam.	1	Débournement	h^2	0,64	Notivol et al. (2007)
		<i>Pseudotsuga mienziensis</i>	3	30 fam.	1	Débournement	h^2	0,52	Rehfeldt (1983)
		<i>Quercus petraea</i>	10	7 - 33 fam.	3	Débournement	h^2	0,97 (0,87 - 1,07)	Alberto et al. (2011)
		<i>Ulmus laevis</i>	5	19 - 23 fam.	1	Débournement	h^2	0,29 (0,18 - 0,43)	Whiteley et al. (2003)
Individus non-apparentés									
		<i>Populus balsamifera</i>	20	12 - 15 ind.	1	Débournement	h^2	0,25	Keller et al. (2011)
		<i>Populus tremula</i>	12	10 ind.	2	Débournement	H^2	0,55 (0,49 - 0,60)	Luquez et al. (2008)
		<i>Populus trichocarpa</i>	10	10 ind.	1	Débournement	H^2	0,08	Weber et al. (1985)
Automnale									
Descendances maternelles									
		<i>Picea glauca</i>	57	5 fam.	1	Formation du bourgeon	h^2	0,16	Li et al. (1993)
		<i>Picea sitchensis</i>	17	n.i.	1	Formation du bourgeon	h^2	0,32	Mimura and Aitken (2007)
		<i>Pinus sylvestris</i>	4	19 - 21 fam.	1	Arrêt de croissance	h^2	0,71	Notivol et al. (2007)*
		<i>Pinus sylvestris</i>	4	19 - 21 fam.	1	Formation du bourgeon	h^2	0,66	Notivol et al. (2007)*
		<i>Pseudotsuga mienziensis</i>	3	30 fam.	1	Formation du bourgeon	h^2	0,25	Rehfeldt (1983)
		<i>Ulmus laevis</i>	5	19 - 23 fam.	1	Formation du bourgeon	h^2	0,19	Whiteley et al. (2003)
Individus non-apparentés									
		<i>Populus balsamifera</i>	20	12 - 15 ind.	1	Formation du bourgeon	h^2	0,98	Keller et al. (2011)
		<i>Populus tremula</i>	12	10 ind.	2	Formation du bourgeon	H^2	0,34 (0,32 - 0,36)	Luquez et al. (2008)
		<i>Populus trichocarpa</i>	10	10 ind.	1	Arrêt de croissance	H^2	0,50	Weber et al. (1985)
		<i>Populus trichocarpa</i>	10	10 ind.	1	Formation du bourgeon	H^2	0,62	Weber et al. (1985)

Une gamme de valeurs d'héritabilité est donnée lorsqu'elles ont été estimées pour plusieurs années ou dans plusieurs dispositifs expérimentaux. Le nombre de populations étudiées, le matériel végétal échantillonné et l'effectif pour chaque population ainsi que le nombre de dispositifs expérimentaux dans lesquels les populations ont été installées sont indiqués. *Abréviations* : fam., famille ; ind., individu ; n.i., non-indiqué dans l'étude. *Études réalisées en serre. Toutes les autres études ont été réalisées en pépinière.

2.2.2. Une forte différenciation génétique des populations

De nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'une importante variabilité génétique entre populations pour les dates de débourrement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon. Dans le cadre de cette thèse, les études ayant quantifié le niveau de différenciation génétique des populations (Q_{ST}) pour ces caractères phénologiques ont été répertoriées (**Tableau 1.2**). Par ailleurs, les études ayant estimé la variance génétique intra- et inter-populations, permettant d'estimer les valeurs de Q_{ST} , ont également été intégrées. Cette revue de la littérature rassemble 16 études réalisées chez 13 espèces forestières dont la majorité sont des gymnospermes (sept espèces sur 13). Pour la plupart des espèces étudiées (dix espèces sur 13), les études ont évalué le niveau de différenciation génétique des populations pour la date de débourrement ainsi que pour la date d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon. Par ailleurs, six études ont comparé le niveau de différenciation génétique pour les caractères phénologiques avec celui estimé à l'aide de marqueurs moléculaires supposés neutres (F_{ST}). Enfin, parmi les 16 études recensées, 12 ont évalué les relations entre le calage des événements phénologiques dans le temps et les paramètres géographiques ou climatiques des sites d'origine des populations.

Les valeurs de Q_{ST} estimées pour la phénologie de croissance indiquent que le niveau de différenciation génétique des populations varie en fonction de l'espèce et des caractères étudiés (**Tableau 1.2**). Cependant, les valeurs de Q_{ST} estimées pour les dates de débourrement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon sont généralement supérieures aux valeurs de F_{ST} estimées à l'aide de marqueurs moléculaires (**Tableau 1.2**). La différenciation génétique observée pour ces caractères phénologiques résulte donc d'une adaptation des populations aux conditions environnementales auxquelles elles sont exposées dans leur milieu d'origine. Pour la plupart des espèces forestières étudiées (neuf espèces sur 10), la date de débourrement présente un niveau de différenciation génétique inférieur à celui observé pour la date d'arrêt de croissance et/ou de formation du bourgeon. Cependant, le niveau de différenciation génétique des caractères phénotypiques est fortement influencé par le niveau d'échantillonnage (Howe et al., 2003). Plus les populations sont issues d'environnements contrastés, plus la probabilité de mettre en évidence une forte différenciation des populations augmente. L'arrêt de croissance et la formation du bourgeon sont principalement influencés par la photopériode qui varie selon un gradient géographique simple et continue, la latitude. En revanche, le débourrement est un caractère influencé par la

température, dont la variabilité à l'échelle de l'aire de répartition des espèces peut difficilement être résumée par des gradients géographiques simples de type latitude, longitude ou altitude. Pour optimiser la lecture de la différenciation génétique des populations pour la date de débourrement, il peut donc être nécessaire d'avoir des connaissances préalables quant à la diversité des conditions climatiques, en particulier la fréquence et les risques de gelées, à l'échelle de l'aire de répartition d'une espèce. Certaines études suggèrent également que la température est un signal beaucoup plus variable que la photopériode d'une année à l'autre. La nature et l'intensité des pressions de sélection exercées sur les populations sont donc susceptibles de varier dans le temps et peuvent ainsi favoriser le maintien d'une variabilité génétique au sein des populations pour la date de débourrement et diminuer leur niveau de différenciation génétique (Böhlenius et al., 2006; Keller et al., 2011; Alberto et al., 2013a).

Les études réalisées ont également mis en évidence que les populations se différenciaient selon des gradients géographiques simples, de type latitude, longitude ou altitude, ou selon les paramètres climatiques de leur site d'origine (**Tableau 1.2**). De manière générale, la structuration de la variabilité génétique pour la date de débourrement décrit des patrons plus ou moins complexes faisant intervenir la température comme principal facteur à l'origine de la différenciation des populations (**Tableau 1.2**). Cependant, le sens de la relation entre la date de débourrement et la température dans les sites d'origine des populations varie entre espèces. La majorité des études recensées a mis en évidence que les populations issues de climats relativement cléments avaient un débourrement plus précoce (Morgenstern, 1969; St Clair et al., 2005; Mimura and Aitken, 2007; Alberto et al., 2011; Evans et al., 2014). Une étude réalisée chez *Populus balsamifera* L. a cependant détecté une relation inverse (Keller et al., 2011). Ces résultats contrastés peuvent être en partie expliqués par des différences de compromis entre l'évitement des gelées printanières tardives et l'exploitation de la saison de végétation entre espèces (Alberto et al., 2013a). La variabilité génétique exprimée pour la date d'arrêt de croissance et la date de formation du bourgeon se structure selon des gradients latitudinaux et altitudinaux suggérant une adaptation des populations aux conditions de photopériode et/ou de température (**Tableau 1.2**). Contrairement à la date de débourrement, les patrons de différenciation des populations pour ces caractères sont conservés d'une espèce à l'autre. Le long des gradients latitudinaux, les populations de hautes latitudes arrêtent leur croissance primaire et forment leurs bourgeons plus tôt que les populations de basses latitudes (Morgenstern, 1969; Li et al., 1997a; Li et al.,

1997b; Hall et al., 2007; Mimura and Aitken, 2007; Notivol et al., 2007; Keller et al., 2011; Rohde et al., 2011b). De même, les populations issues de climats relativement cléments ont un arrêt de croissance et une formation du bourgeon plus tardive que les populations issues de climats froids (St Clair et al., 2005; Evans et al., 2014). Le développement des marqueurs moléculaires et des méthodes de génotypage a permis l'identification de signatures sélectives dans les gènes ou régions génomiques impliqués dans le contrôle des caractères phénologiques. Ainsi, des études réalisées au sein de populations naturelles de *Populus tremula* L., *Picea abies* (L.) H. Karst ou encore *Quercus petraea*, ont permis de révéler des gradients latitudinaux ou altitudinaux de fréquence allélique dans les gènes candidats pour le débourrement et l'arrêt de croissance (Ingvarsson et al., 2006; Chen et al., 2012; Alberto et al., 2013b). Chez *Populus trichocarpa*, le génotypage de 544 génotypes non apparentés issus de 16 populations naturelles a fourni plus de 17 millions de marqueurs SNP_s polymorphes dans cette collection. L'analyse de ce polymorphisme à l'aide de cinq métriques différentes, dont la mesure de différenciation (F_{ST}), et la pente de la relation entre fréquences alléliques et des covariables environnementales, telles que la température ou les précipitations, a permis d'identifier 397 régions génomiques, d'une largeur de 1 kb, considérées comme des régions candidates pour des traces de sélection diversifiante récente (Evans et al., 2014).

Tableau 1.2. Revue de la littérature des études ayant estimé le niveau de différenciation génétique (Q_{ST}) des populations naturelles forestières de régions tempérées pour la date c débournement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon.

Phénologie	Division	Espèce	Pop.	Matériel	Effectif	Gradient	Amplitude	Test(s)	Caractère	Q_{ST}	Q_{ST} vs. F_{ST}	Corrélations avec paramètres géographiques ou climatiques		Référence
												Paramètres géographiques ou climatiques	Signe de la corrélation	
Primitière														
Anglo.														
		<i>Populus balsamifera</i>	4	ind. non-apparentés	50	Lat. Long. Alt.	45,00 - 54,00 -90,00 - -91,00 n.i.	1	Débournement	0,15	n.i.	n.i.	n.i.	Famer (1993)
		<i>Populus balsamifera</i>	20	ind. non-apparentés	12 - 15	Lat. Long. Alt.	46,67 - 66,63 -64,62 - -149,03 7 - 915	1	Débournement	0,66	$Q_{ST} > F_{ST}$	Latitude Nombre de jours sans gelée	Négative Positive	Keller et al. (2011)
		<i>Populus tremula</i>	12	ind. non-apparentés	10	Lat. Long. Alt.	56,00 - 66,00 12,9 - 22,4 10 - 500	2	Débournement	0,23 (0,175 - 0,275)	$Q_{ST} > F_{ST}$	Latitude	ns	Hall et al. (2007)
		<i>Populus tremuloides</i>	5	ind. non-apparentés	5 - 6	Lat. Long. Alt.	50,83 - 59,5 -111,55 - -117,00 320 - 1112	1	Débournement	0,14	n.i.	n.i.	n.i.	Thomas et al. (1997)
		<i>Populus trichocarpa</i>	10	ind. non-apparentés	100	Lat. Long. Alt.	n.i. n.i. n.i.	3	Débournement	0,30 (0,25 - 0,33)	$Q_{ST} > F_{ST}$	Température annuelle moyenne Température moyenne du mois le plus froid Indice de continentalité Nombre de jours sans gelée	Négative Négative Positive Négative	Evans et al. (2014)
		<i>Quercus petraea</i>	10	descendances mat.	7 - 33	Lat. Long. Alt.	n.i. n.i. 131 - 1630	3	Débournement	0,20 (0,16 - 0,23)	$Q_{ST} > F_{ST}$	Altitude	Positive	Alberto et al. (2011)

Le résultat des comparaisons du niveau de différenciation génétique observé pour les caractères phénologiques et pour les marqueurs moléculaires (F_{ST}) est précisé si la comparaison a été effectuée dans l'étude. Les corrélations entre les dates des événements phénologiques et les paramètres géographiques ou climatiques des sites d'origines des populations sont également renseignées. Le nombre de populations étudiées, le matériel génétique échantillonné dans chaque population, l'effectif et le nombre de tests expérimentaux dans lesquels ont été installées les populations sont précisés pour chaque étude. Une gamme de Q_{ST} est donnée lorsqu'ils ont été estimés sur plusieurs années ou dans plusieurs sites expérimentaux. *Abbreviations* : *Anglo.*, angiosperme ; *Gymno.*, gymnosperme ; *alt.*, altitude (m) ; *ind.*, individus ; *lat.*, latitude (degré décimal) ; *long.*, longitude (degré décimal) ; *mat.*, maternelles ; *n.i.*, non-indiqué dans l'étude ; *n.s.*, non-significatif au risque d'erreur de 5 %.* Études réalisées en serre. Toutes les autres études ont été réalisées en pépinière.

Tableau 1.2. Suite.

Phénologie	Division	Espèce	Pop.	Matériel	Effectif	Gradient	Amplitude	Test(s)	Caractère	Q _{ST}	Q _{ST} vs. F _{ST}	Corrélations avec paramètres géographiques ou climatiques		Référence
												Paramètres géographiques ou climatiques	Signe de la corrélation	
Primitaire														
Gymno.														
		<i>Picea glauca</i>	57	descendances mat.	5	Lat. Long. Alt.	43,50 - 49,60 -84,25 - -94,60 15 - 842	1	Débournement	1,0	n.i.	n.i.	n.i.	Li et al. (1993)
		<i>Picea glauca</i>	63	descendances mat.	1 - 5	Lat. Long. Alt.	43,73 - 49,35 -84,25 - -84,75 15 - 460	1	Débournement	0,17	n.i.	n.i.	n.i.	Li et al. (1997a)
		<i>Picea glauca</i>	6	descendances mat.	12 - 32	Lat. Long. Alt.	45,00 - 48,00 -71,00 - -80,00 n.i.	2	Débournement	0,054	Q _{ST} > F _{ST}	Latitude, longitude, altitude, index d'aridité, précipitations	n.s.	Jaramillo-Correa et al. (2011)
		<i>Picea mariana</i>	24	descendances mat.	2 - 9	Lat. Long. Alt.	42,70 - 60,05 -77,00 - -112,00 50 - 800	1	Débournement	0,67	n.i.	Température annuelle moyenne	Négative	Morgenstem (1969)
		<i>Picea pungens</i>	41	descendances mat.	7	Lat. Long. Alt.	32,00 - 44,00 -105,00 - -112,00 n.i.	1	Débournement	0,01	n.i.	n.i.	n.i.	Bongarten and Hanover (1986)
		<i>Picea sitchensis</i>	17	descendances mat.	n.i.	Lat. Long. Alt.	32,00 - 68,00 -110,00 - -138,00 < 70	1	Débournement	0,29	Q _{ST} > F _{ST}	Température moyenne du mois le plus chaud	Négative	Mimura & Aitken (2007)
		<i>Pinus strobus</i>	66	descendances mat.	1 - 8	Lat. Long. Alt.	45,35 - 47,68 71,23 - 79,22 15 - 366	1	Débournement	0,44	n.i.	Latitude	Positive	Li et al. (1997b)
		<i>Pinus sylvestris</i>	4	descendances mat.	19 - 21	Lat. Long. Alt.	40,82 - 67,33 n.i. n.i.	1	Débournement	0,19	n.i.	Latitude	Positive	Notivol et al. (2007)*
		<i>Pseudotsuga mienziensis</i>	1048	descendances mat.	n.i.	Lat. Long. Alt.	42,00 - 49,00 -120,00 - -124,00 1 - 2250	1	Débournement	0,28	n.i.	Latitude Température moyenne maximale de juin à août Précipitations de juin à août	Positive Négative Positive	St. Clair et al. (2005)

* Études réalisées en serre. Toutes les autres études ont été réalisées en pépinière.

Tableau 1.2. Suite.

Phénologie	Division	Espèce	Pop.	Matériel	Effectif	Gradient	Amplitude	Tes(s)	Caractère	Q_{ST}	Q_{ST} vs. F_{ST}	Corrélations avec paramètres géographiques ou climatiques	Signe de la corrélation	Référence
Angio.														
Automnale														
		<i>Populus balsamifera</i>	20	ind. non-apparentés	12-15	Lat. Long. Alt.	46,67-66,63 -64,62 - -149,03 7-915	1	Formation du bourgeon	0,83	$Q_{ST} > F_{ST}$	Latitude	Négative	Keller et al. (2011)
		<i>Populus nigra</i>	14	ind. non-apparentés	7-63	Lat. Long. Alt.	41,00-52,00 n.i. n.i.	1	Arrêt de croissance	0,59	n.i.	Latitude	Négative	Ronde et al. (2011)
		<i>Populus nigra</i>	14	ind. non-apparentés	7-63	Lat. Long. Alt.	41,00-52,00 n.i. n.i.	1	Formation du bourgeon	0,60	n.i.	Latitude	Négative	Ronde et al. (2011)
		<i>Populus tremula</i>	12	ind. non-apparentés	10	Lat. Long. Alt.	56,00-66,00 12,9-22,4 10-500	2	Formation du bourgeon	0,75 (0,70-0,80)	$Q_{ST} > F_{ST}$	Latitude	Négative	Hall et al. (2007)
		<i>Populus trichocarpa</i>	10	ind. non-apparentés	100	Lat. Long. Alt.	n.i. n.i. n.i.	3	Formation du bourgeon	0,47 (0,30-0,60)	$Q_{ST} > F_{ST}$	Température annuelle moyenne Température moyenne du mois le plus froid Indice de continentalité Nombre de jours sans gelée	Positive Positive Négative Positive	Evans et al. (2014)
		<i>Picea glauca</i>	57	descendants mat.	5	Lat. Long. Alt.	43,50-49,60 -64,25 - -94,60 15-842	1	Formation du bourgeon	0,25	n.i.	n.i.	n.i.	Li et al. (1993)
		<i>Picea glauca</i>	63	descendants mat.	1-5	Lat. Long. Alt.	43,73-49,35 -64,25 - -84,75 15-460	1	Formation du bourgeon	0,22	n.i.	Latitude	Négative	Li et al. (1997a)

* Études réalisées en serre. Toutes les autres études ont été réalisées en pépinière.

Tableau 1.2. Suite.

Plénologie	Division	Espèce	Pop.	Matériel	Effectif	Gradient	Amplitude	Test(s)	Caractère	Q_{ST}	Q_{ST} vs. F_{ST}	Corrélations avec paramètres géographiques ou climatiques Paramètres géographiques ou climatiques	Signe de la corrélation	Référence
Gymno.														
		<i>Picea glauca</i>	6	descendances mat.	12-32	Lat. Long. Alt.	45,00-48,00 -71,00 - -80,00 n.i.	2	Formation du bourgeon	0,25	$Q_{ST} > F_{ST}$	Latitude, longitude, altitude, index d'aridité, VPD Précipitation durant la saison de végétation	n.s. Négative	Jaramillo-Correa et al. (2001)
		<i>Picea mariana</i>	24	descendances mat.	2-9	Lat. Long. Alt.	42,70-60,05 -77,00 - -112,00 50-800	1	Formation du bourgeon	0,96 (0,94-0,97)	n.i.	Latitude	Négative	Morgenstern (1969)
		<i>Picea sitchensis</i>	17	descendances mat.	n.i.	Lat. Long. Alt.	32,00-68,00 -110,00 - -138,00 < 70	1	Formation du bourgeon	0,89	$Q_{ST} > F_{ST}$	Latitude	Négative	Mimura & Aitken (2007)
		<i>Pinus strobus</i>	66	descendances mat.	1-8	Lat. Long. Alt.	45,35-47,68 71,23-79,22 15-386	1	Formation du bourgeon	0,18	n.i.	Latitude	Négative	Li et al. (1997b)
		<i>Pinus sylvestris</i>	4	descendances mat.	19-21	Lat. Long. Alt.	40,82-67,33 n.i. n.i.	1	Arrêt de croissance	0,66	n.i.	Latitude	Négative	Noivoi et al. (2007)*
		<i>Pinus sylvestris</i>	4	descendances mat.	19-21	Lat. Long. Alt.	40,82-67,33 n.i. n.i.	1	Formation du bourgeon	0,77	n.i.	Latitude	Négative	Noivoi et al. (2007)*
		<i>Pseudotsuga mienziensis</i>	1048	descendances mat.	n.i.	Lat. Long. Alt.	42,00-49,00 -120,00 - -124,00 1-2250	1	Formation du bourgeon	0,38 (0,37-0,39)	n.i.	Altitude Température annuelle moyenne Nombre de jours sans gel	Négative Positive Positive	St Clair (2016)

* Études réalisées en serre. Toutes les autres études ont été réalisées en pépinière.

2.2.3. Maintien d'une variabilité génétique intra-population

Bien que les caractères phénologiques jouent un rôle central dans l'adaptation des populations naturelles aux contraintes thermiques (en particulier au froid), un certain niveau de variabilité génétique semble être maintenu au sein des populations pour ces caractères ($Q_{ST} < 1$, **Tableau 1.2**). Or, il serait légitime de supposer que, pour de tels caractères adaptatifs, la sélection naturelle ait favorisé un optimum phénotypique dans chaque population. Ce paradoxe peut être expliqué par l'hypothèse de Jump et al. (2009) selon laquelle l'hétérogénéité temporelle des conditions environnementales induirait un changement dans la nature et/ou l'intensité des pressions de sélection qui s'exercent sur les populations et permettrait ainsi de maintenir un certain niveau de variabilité génétique intra-population. Le débourrement est influencé par les températures hivernales et printanières qui peuvent décrire des oscillations inter-annuelles et ainsi permettre le maintien d'une variabilité génétique au sein des populations (Keller et al., 2011). L'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal sont des caractères sous forte influence photopériodique. Cependant, de nombreux facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques, tels que la température de l'air, la disponibilité en eau du sol et l'attaque par des agents pathogènes, peuvent interagir avec le signal photopériodique pour induire l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal (Dunlap and Stettler, 1996; Howe et al., 2003; Rohde et al., 2011a). D'une année à l'autre, la nature et l'intensité des pressions de sélection exercées sur les populations sont donc susceptibles de varier et de favoriser le maintien d'une variabilité génétique au sein des populations.

3. Variabilité génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau

3.1. L'efficacité d'utilisation de l'eau : définitions et échelles de mesure

Dans le domaine forestier, le terme d'efficacité d'utilisation de l'eau ('*water-use efficiency*', WUE) rend compte du rapport entre les flux entrants de carbone (gain) et les flux sortants d'eau (perte). À l'échelle de la plante entière, l'efficacité d'utilisation de l'eau est définie comme le rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau consommée dans le même laps de temps (WUE_p). À l'échelle foliaire, elle peut être évaluée de manière directe ou indirecte et selon deux pas de temps d'intégration différents :

- (i) de manière directe et instantanée *via* l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i), qui est définie comme le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), et
- (ii) de manière indirecte et sur un pas de temps plus intégré *via* la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}C$).

Le $\Delta^{13}C$ de la matière organique foliaire a été montré comme étant linéairement et négativement corrélé à WUE_i chez différentes espèces forestières (Zhang et al., 1994; Lauteri et al., 1997; Cregg et al., 2000; Grossnickle et al., 2005; Roussel et al., 2009) et notamment au sein du genre *Populus* (Ripullone et al., 2004; Zhang et al., 2004; Monclus et al., 2006; Soolanayakanahally et al., 2009; Fichot et al., 2010; Cao et al., 2012; McKown et al., 2014a). Plus récemment, une étude réalisée chez des hybrides de peuplier euraméricain a mis en évidence une relation linéaire et négative entre $\Delta^{13}C$ et l'efficacité de transpiration à l'échelle de la plante entière (Rasheed et al., 2013). La caractérisation à large échelle de la variabilité exprimée pour WUE est généralement réalisée *via* l'étude de $\Delta^{13}C$ qui permet d'évaluer WUE sur un pas de temps plus intégré et permet d'augmenter les performances de phénotypage par rapport à WUE_i (e.g., Zhang et al., 1993; Soolanayakanahally et al., 2009; Chamillard et al., 2011; Lamy et al., 2011).

3.2. Variabilité génétique intra- et inter-populations

3.2.1. Contribution des effets génétiques sur l'expression de la variabilité phénotypique au niveau intra-population

Afin de juger de la contribution relative des effets génétiques sur l'expression de la variabilité phénotypique pour $\Delta^{13}C$ au niveau intra-population, les études ayant estimé les valeurs d'héritabilité au sens strict ou au sens large pour ce caractère ont été répertoriées (**Tableau 1.3**). Cette revue de la littérature rassemble 12 études qui ont été réalisées chez huit espèces forestières des régions tempérées. Parmi ces études, deux ont évalué l'effet d'une contrainte thermique et/ou hydrique sur les valeurs d'héritabilité pour $\Delta^{13}C$. En l'absence de contrainte, seulement deux études ont évalué les valeurs d'héritabilité au sens large pour $\Delta^{13}C$ et ont rapporté des valeurs d'héritabilité modérées ($H^2 = 0,36$ et $0,42$). Les valeurs d'héritabilité au sens strict estimées pour $\Delta^{13}C$, en l'absence de contrainte, varient considérablement entre espèces ($0,07 \leq h^2 \leq 0,66$). Ces résultats indiquent qu'une part du déterminisme génétique de

la variabilité phénotypique exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ peut être attribué à des effets additifs, dont l'intensité semble toutefois varier entre espèces. L'étude réalisée par Lauteri et al. (2004) a permis de juger de l'effet d'une contrainte hydrique et/ou thermique sur les valeurs d'héritabilité au sens strict pour $\Delta^{13}\text{C}$. Les résultats obtenus ont mis en évidence une augmentation des valeurs d'héritabilité avec l'augmentation de la température ou la diminution de la disponibilité en eau du sol (**Tableau 1.3**). En revanche, une diminution des valeurs d'héritabilité a été observée lorsque les contraintes étaient combinées (**Tableau 1.3**). Chamaillard et al. (2011) ont mis en évidence une diminution de l'héritabilité au sens large pour $\Delta^{13}\text{C}$ en situation de contrainte hydrique, suggérant que l'importance relative des effets génétiques sur l'expression de la variabilité phénotypique était diminuée (**Tableau 1.3**).

Les études visant à identifier les régions génomiques impliquées dans le contrôle de la variabilité phénotypique exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ ont mis en évidence que ce caractère est sous déterminisme polygénique. Quatre à dix QTL_s ont été identifiés selon les espèces étudiées et ont des effets mineurs sur l'expression de la variabilité phénotypique : ils expliquent généralement moins de 30 % de la variabilité phénotypique pour $\Delta^{13}\text{C}$ (Brendel et al., 2002; Casasoli et al., 2004; Rönnberg-Wästljung et al., 2005; Brendel et al., 2007; Rae et al., 2009; Monclus et al., 2012). Récemment, une étude réalisée chez le pin maritime a permis de détecter un QTL à effet fort expliquant 67 % de la variabilité phénotypique exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ (Marguerit et al., 2014)

Tableau 1.3. Revue de la littérature des études ayant estimé les valeurs d'héritabilité au sens strict (h^2) ou sens large (H^2) pour la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 chez différentes espèces forestières des régions tempérées.

Matériel	Espèce	Populations	Effectif	Test(s)	Milieu de croissance	Conditions de croissance	Tissu	Héritabilité		Référence	
								H^2 ou h^2	Valeur		
Descendances maternelles	<i>Castanea sativa</i>	6	8 fam.	1	Chambre climatique	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,29	Lauteri et al. (2004)	
	<i>Castanea sativa</i>	6	8 fam.	1	Chambre climatique	Contrainte thermique	Feuille	h^2	0,43	Lauteri et al. (2004)	
	<i>Castanea sativa</i>	6	8 fam.	1	Chambre climatique	Contrainte hydrique	Feuille	h^2	0,52	Lauteri et al. (2004)	
	<i>Castanea sativa</i>	7	9 fam.	2	Chambre climatique	Contrainte thermique + hydrique	Feuille	h^2	0,15	Lauteri et al. (2004)	
	<i>Pinus pinaster</i>	6	8 fam.	1	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,21	Lamy et al. (2011)	
	<i>Pinus pinaster</i>	4	5 fam.	2	Serre	Contrainte hydrique	Feuille	h^2	0,07	Aranda et al. (2010)	
	<i>Quercus suber</i>	13	20 - 30 fam.	1	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,47	Ramirez-Valiente et al. (2009)	
	<i>Quercus suber</i>	3	22 fam.	1	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,66 (0,43 - 0,83)	Ramirez-Valiente et al. (2011)	
	Individus non-apparentés	<i>Populus balsamifera</i>	20	10 ind.	1	Serre	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,19	Keller et al. (2011)
		<i>Populus balsamifera</i>	20	10 ind.	1	Serre	Aucun traitement	Bois	h^2	0,21	Keller et al. (2011)
<i>Populus nigra</i>		3	30 ind.	1	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	H^2	0,42 (0,32 - 0,60)	Chamallara et al. (2011)	
<i>Populus nigra</i>		3	30 ind.	1	Pépinière	Contrainte hydrique	Feuille	H^2	0,23 (0,18 - 0,28)	Chamallara et al. (2011)	
<i>Populus tremuloides</i>		1	13 ind.	1	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	H^2	0,36	Kanaga et al. (2008)	
Croisements contrôlés		<i>Picea mariana</i>	-	820 ind.	3	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,54	Johnsen et al. (1989)
		<i>Pinus pinaster</i>	-	564 ind.	1	Pépinière	Aucun traitement	Bois	h^2	0,17	Brendel et al. (2002)
	<i>Pinus pinaster</i>	-	631 - 636 ind.	3	Pépinière	Aucun traitement	Bois	h^2	0,29	Marguerit et al. (2014)	
	<i>Quercus robur</i>	-	170 - 207 ind.	2	Pépinière	Aucun traitement	Feuille	h^2	0,65 (0,55 - 0,74)	Brendel et al. (2008)	

Une gamme de valeurs d'héritabilité est donnée lorsqu'elles ont été estimées pour plusieurs années, plusieurs populations ou dans plusieurs dispositifs expérimentaux. Pour certaines études, seule une valeur moyenne d'héritabilité a été rapportée. Le nombre de populations étudiées, le matériel génétique échantillonné et l'effectif pour chaque population, le nombre de dispositifs expérimentaux et les conditions de croissance dans lesquelles les plants ont été installés sont également indiqués. Le tissu échantillonné pour les mesures de discrimination isotopique est également précisé. *Abréviations* : *fam.*, famille ; *ind.*, individus.

3.2.2. Une faible différenciation génétique des populations pour $\Delta^{13}\text{C}$

Afin de juger de l'amplitude de la variabilité génétique exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ au niveau inter-populations chez les espèces forestières des régions tempérées, nous avons recensé les études ayant quantifié le niveau de différenciation génétique des populations (Q_{ST}) pour ce caractère (**Tableau 1.4**). Les études ayant estimé la variance génétique intra- et inter-populations, permettant de calculer les valeurs de Q_{ST} , ont également été intégrées. De manière générale, le niveau de différenciation génétique des populations pour $\Delta^{13}\text{C}$ reste très peu documenté chez les espèces forestières des régions tempérées. En effet, la revue de littérature effectuée dans le cadre de la thèse ne rassemble que sept études qui ont été réalisées chez cinq espèces forestières différentes, dont la majorité appartiennent au genre *Populus* (trois espèces sur cinq). Parmi ces études, deux ont permis d'évaluer l'effet d'une contrainte hydrique sur le niveau de différenciation génétique des populations. En l'absence de contrainte hydrique, six études ont mis en évidence une différenciation génétique significative des populations pour $\Delta^{13}\text{C}$. Cependant, les valeurs de Q_{ST} estimées pour $\Delta^{13}\text{C}$ sont généralement modérées voire faibles ($Q_{\text{ST}} < 0,30$), quels que soient l'espèce et le nombre de populations étudiées. Ces résultats indiquent que l'essentiel de la variabilité génétique exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ se trouve au niveau intra-population. L'effet d'une contrainte hydrique sur le niveau de différenciation génétique des populations semble varier entre espèces. En effet, Corcuera et al. (2010) ont mis en évidence une diminution du Q_{ST} en situation de contrainte hydrique chez *Pinus pinaster* Ait. alors que les valeurs de Q_{ST} étaient comparables entre conditions hydriques (limitantes vs. non-limitantes) chez *Populus nigra*. Parmi les sept études réalisées, trois ont comparé le niveau de différenciation génétique estimé pour $\Delta^{13}\text{C}$ à celui estimé à l'aide de marqueurs moléculaires supposés neutres (F_{ST}). Ces études ont mis en évidence que les valeurs de Q_{ST} étaient comparables aux valeurs de F_{ST} . À ce jour, aucune n'a donc réussi à démontrer que la différenciation des populations naturelles pour $\Delta^{13}\text{C}$ résultait d'une adaptation génétique des populations.

Les variations de $\Delta^{13}\text{C}$ reflètent une balance entre les capacités photosynthétiques de la plante et la conductance stomatique à la vapeur d'eau. Ces composantes fonctionnelles peuvent avoir été la cible de pressions de sélection naturelle et présenter une forte différenciation entre populations sans que cela soit reflété par $\Delta^{13}\text{C}$. Ainsi, des études précédemment réalisées au sein de populations naturelles de *Populus trichocarpa* et *Populus balsamifera* ont mis en évidence une forte différenciation latitudinale des populations pour l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) alors

qu'aucune tendance n'a pu être observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ (Gornall and Guy, 2007; Keller et al., 2011). Au contraire, Bresson et al. (2011) n'ont pas réussi à mettre en évidence de différenciation génétique significative des populations de chêne et de hêtre pour A et g_s et ont émis l'hypothèse que ces composantes fonctionnelles étaient davantage sous contrôle environnemental que génétique.

Tableau 1.4. Revue de la littérature des études ayant estimé le niveau de différenciation génétique (Q_{ST}) de populations naturelles forestières de régions tempérées pour la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C ($\Delta^{13}C$).

Division	Espèce	Pop.	Matériel	Effectif	Gradient	Amplitude	Test(s)	Milieu de croissance	Tissu	Q_{ST}	Q_{ST} vs. F_{ST}	Référence												
Anglo.	<i>Populus balsamifera</i>	20	ind. non-apparentés	12 - 15	Lat. Long. Alt.	46,67 - 68,63 -64,62 - -149,03 7 - 915	1	Serre Aucun traitement	Feuille	< 0,30	$Q_{ST} \approx F_{ST}$	Keller et al. (2011)												
													20	ind. non-apparentés	12 - 15	Lat. Long. Alt.	46,67 - 68,63 -64,62 - -149,03 7 - 915	1	Serre Aucun traitement	Bois	< 0,30	$Q_{ST} \approx F_{ST}$	Keller et al. (2011)	
																								3
	3	ind. non-apparentés	30	Lat. Long. Alt.	42,62 - 47,87 1,82 - 4,90 91 - 1000	1	Pépinière Contrainte hydrique	Feuille	0,13	n.i.	Chamaillard et al. (2011)													
	5	ind. non-apparentés	4	Lat. Long. Alt.	44,00 - 56,00 -120,00 - -130,00 n.i.	1	Pépinière Aucun traitement	Feuille	n.s.	-	Gonnal and Guy (2007)													
	Gymno.	<i>Quercus suber</i>	13	familles	20 - 30	Lat. Long. Alt.	36,37 - 43,15 -2,50 - -7,22 25 - 1300	1	Pépinière Aucun traitement	Feuille	0,062	$Q_{ST} \approx F_{ST}$	Ramirez-Valiente et al. (2009)											
														3	familles	6 - 10	Lat. Long. Alt.	37,50 - 44,13 -1,17 - -4,40 37 - 1359	1	Pépinière Aucun traitement	Feuille	0,44	n.i.	Corcuera et al. (2010)
														6	familles	8	Lat. Long. Alt.	33,66 - 44,13 -1,30 - -8,70 37 - 1760	1	Pépinière Aucun traitement	Feuille	0,197	$Q_{ST} \approx F_{ST}$	Lamy et al. (2011)
														5	familles	5	Lat. Long. Alt.	33,33 - 42,12 -2,33 - 8,37 364 - 1750	1	Serre Aucun traitement	Feuille	0,07	n.i.	Corcuera et al. (2012)
	5	familles	5	Lat. Long. Alt.	33,33 - 42,12 -2,33 - 8,37 364 - 1750	1	Serre Contrainte hydrique	Feuille	n.s.	n.i.	Corcuera et al. (2012)													

Les valeurs de $\Delta^{13}C$ ont été déterminées à partir d'échantillons de feuilles ou de bois. Le résultat des comparaisons du niveau de différenciation génétique observé pour ($\Delta^{13}C$) et pour les marqueurs moléculaires (F_{ST}) est précisé. Le nombre de populations échantillonnées et le gradient latitudinal, longitudinal et altitudinal couvert par ces populations sont précisés. Le matériel génétique échantillonné et l'effectif pour chaque population ainsi que le nombre de tests de provenance et les conditions environnementales dans lesquelles ont été installées les populations sont également indiqués. *Abréviations* : *Anglo.*, angiosperme ; *alt.*, altitude (m) ; *Gymno.*, gymnosperme ; *lat.*, latitude (degré décimal) ; *long.*, longitude (degré décimal) ; *n.i.*, non-indiqué dans l'étude ; *n.s.*, non-significatif au risque d'erreur de 5 %.

4. Variabilité génétique pour la résistance à la cavitation

4.1. Mesurer et quantifier la résistance à la cavitation : courbes de vulnérabilité et paramètres descriptifs

La résistance du xylème à la cavitation est classiquement évaluée au travers de courbes de vulnérabilité à la cavitation qui représentent l'évolution du pourcentage de perte de conductivité hydraulique (PLC) en fonction des valeurs de tensions xylémiennes (**Fig. 1.2**). Une courbe de vulnérabilité à la cavitation présente généralement un aspect sigmoïdal et comporte typiquement trois phases distinctes. Au cours de la première phase, l'augmentation de la tension xylémienne n'induit aucune variation significative de PLC jusqu'à une valeur seuil critique de tension. Au cours de la deuxième phase, l'augmentation de la tension xylémienne induit une augmentation importante et brutale de la PLC jusqu'à 100 %. La troisième phase correspond à un état de rupture hydraulique totale.

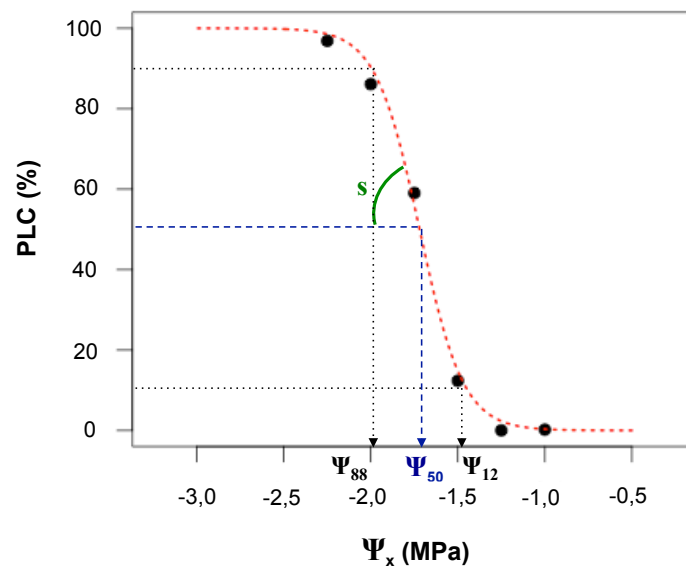


Figure 1.2. Courbe type de vulnérabilité du xylème à l'embolie estivale et principaux paramètres descriptifs déduits de la courbe. La courbe de vulnérabilité à la cavitation représente l'évolution du pourcentage de perte de conductivité hydraulique (PLC) en fonction de la tension xylémienne (Ψ_x). Les données de PLC pour chaque tension xylémienne mesurée sont ajustées à une fonction logistique à deux paramètres. Le premier paramètre (Ψ_{50}) correspond à la tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique et est utilisé comme indicateur du niveau de résistance. Le deuxième paramètre (s) correspond à la pente au point d'inflexion et représente la gamme de tensions xylémiennes dans laquelle se développe l'embolie. D'autres paramètres descriptifs peuvent être déduits des courbes de vulnérabilité : la valeur de tension xylémienne au point d'entrée (Ψ_{12}) et la valeur de tension xylémienne au point de rupture (Ψ_{88}).

Les courbes de vulnérabilité à la cavitation sont généralement très bien décrites par des fonctions logistiques. Le modèle le plus souvent utilisé est celui de Pammenter and Willigen (1998) :

$$PLC = 100 / [1 + \exp (s / 25 + (\Psi_x - \Psi_{50}))]$$

où Ψ_x représente la tension xylémienne (MPa), Ψ_{50} représente la tension xylémienne induisant 50 % de PLC (MPa) et s est la pente de la courbe au niveau de Ψ_{50} (% MPa⁻¹). Les valeurs de s reflètent la gamme de tensions xylémiennes dans laquelle se développe l'embolie. De son côté, Ψ_{50} est de loin le paramètre le plus utilisé dans la littérature comme indicateur du niveau de résistance à la cavitation (*e.g.*, Maherali et al., 2004; Choat et al., 2012). Néanmoins, Ψ_{50} ne présente aucune signification physiologique. D'autres paramètres descriptifs ayant une signification physiologique avérée sont déduits des courbes de vulnérabilité à la cavitation. La valeur de tension xylémienne induisant 12 % de PLC (Ψ_{12}) est considérée comme le point d'entrée alors que la tension xylémienne induisant 88 % de PLC (Ψ_{88}) est considérée comme le point de non retour et correspond à la rupture du système hydraulique (**Fig. 1.2**).

La construction de courbes de vulnérabilité à la cavitation nécessite de mesurer le PLC pour chaque valeur de tension xylémienne. Différentes techniques existent pour construire les courbes de vulnérabilité à la cavitation. La plus connue, la méthode de déshydratation, consiste à laisser déshydrater différents segments de xylème à différentes valeurs de tensions xylémiennes et de mesurer ensuite le pourcentage de PLC (Sperry et al., 1988). Cette technique présente toutefois deux inconvénients majeurs : elles nécessitent une quantité importante d'échantillons (un échantillon pour chaque valeur de tension xylémienne) et est chronophage. De son côté, le Cavitron repose sur l'utilisation de la force centrifuge pour générer des pressions négatives au sein d'un segment de xylème (Cochard, 2002; **Fig. 1.3**). Des segments de tige de longueur et de diamètre calibrés sont centrés sur un rotor dont la vitesse de rotation peut être contrôlée en temps réel. La tension au sein de l'échantillon de xylème est ajustée de façon précise en contrôlant la vitesse de rotation du rotor et la conductance hydraulique de l'échantillon et le PLC sont alors mesurés en temps réel. Bien que le Cavitron ait permis de diminuer le nombre d'échantillons (1 seul par courbe) et le temps (30-40 minutes par courbe) nécessaire pour l'obtention d'une courbe de vulnérabilité à la cavitation, les capacités de phénotypage pour la résistance à la cavitation restent limitées

par rapport à des caractères phénotypiques directement observables ou mesurables, tels que la phénologie de croissance. Étant donné que, chez les Angiospermes, le niveau de résistance à la cavitation est en partie déterminée par la composition chimique de la membrane⁵ au niveau des ponctuations entre vaisseaux, la spectroscopie infrarouge, qui repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge par la matière organique, pourrait permettre d'évaluer de façon indirect et à haut débit la variabilité observée pour ce caractère fonctionnel (Fichot et al., 2014).

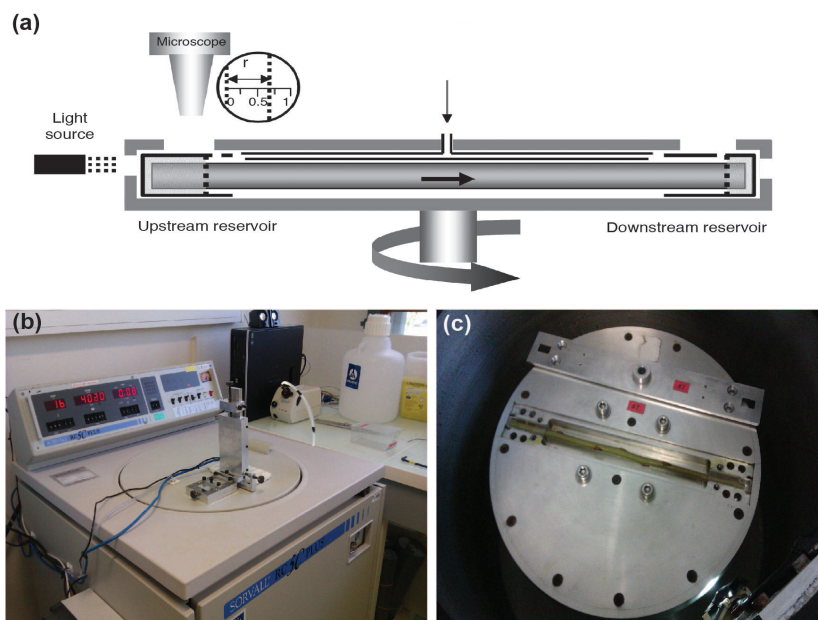


Figure 1.3. Présentation du Cavitron utilisé pour la construction de courbes de vulnérabilité à la cavitation. (a) Schéma illustrant le principe de fonctionnement du Cavitron. L'échantillon de tige est centré sur l'axe d'une centrifugeuse. Les extrémités de l'échantillon sont immergées dans de l'eau contenue dans deux réservoirs en plastique. Chaque réservoir est percé à une certaine hauteur qui détermine le niveau d'eau maximal dans chaque échantillon. Le réservoir en amont est percé à un niveau plus haut que le réservoir en aval ce qui permet de créer une différence de pression au cours de la centrifugation et la circulation de l'eau du réservoir en amont au réservoir en aval. Le niveau d'eau dans le réservoir en amont diminue selon une vitesse qui est déterminée par observation de la distance entre les ménisques air-eau des deux réservoirs. La source lumineuse permet d'apprécier la position du ménisque. *Extrait de Cochard et al. (2005)* (b) Photographie d'un Cavitron. (c) Photographie d'un échantillon de tige centré sur le rotor utilisé pour la centrifugation.

⁵ L'utilisation du terme 'membrane' est confus puisque, dans ce cas, il ne réfère pas à une membrane biologique classique (*i.e.*, une bicouche lipidique) mais à l'ensemble formé par la paroi primaire et la lamelle moyenne.

4.2. Un niveau de variabilité génétique encore peu documenté

Bien que les modèles de prévision climatique prévoient une augmentation en fréquence et en intensité des événements extrêmes, de type canicule et sécheresse, très peu d'études ont caractérisé la variabilité génétique pour la résistance à la cavitation chez les espèces forestières. Cette situation découle probablement du fait que les capacités de phénotypage pour ce caractère ne permettent pas de maximiser la lecture de la variabilité génétique en considérant un grand nombre de populations représentées par des effectifs d'individus importants. Parmi les espèces forestières des régions tempérées, seulement deux études réalisées par Lamy et al. (2011, 2014) ont permis d'évaluer la variabilité génétique exprimée pour Ψ_{50} au niveau intra- et inter-populations chez le pin maritime. Ces études ont mis en évidence qu'un faible niveau de variabilité génétique était exprimé pour la résistance à la cavitation chez le pin maritime. Bien que les populations aient été échantillonnées dans des milieux caractérisés par des régimes thermiques et pluviométriques contrastés, le niveau de différenciation génétique estimé pour Ψ_{50} était faible ($Q_{ST} = 0,027$) et même inférieur à celui observé pour les marqueurs moléculaires supposés neutres (F_{ST}). Au niveau intra-population, le coefficient de variation génétique additive (CV_A) estimé pour Ψ_{50} n'excédait pas 5 %, indiquant donc qu'un faible niveau de variabilité génétique additive était exprimé pour la résistance à la cavitation. Bien que la variabilité génétique additive exprimée pour Ψ_{50} au niveau intra-population était faible, l'héritabilité au sens strict était forte ($0,51 \leq h^2 \leq 0,61$) suggérant que l'expression de la variabilité phénotypique pour ce caractère était sous une faible influence micro-environnementale (Lamy et al., 2011, 2014). D'autres études réalisées en tests de provenances à partir de populations naturelles de hêtre et de pins des Canaries ont mis en évidence l'existence d'une importante variabilité au niveau intra et inter-populations pour Ψ_{50} (Wortemann et al., 2011; López et al., 2013). Cependant, ces études ont été réalisées à partir de matériel génétique non cloné et dont les liens de parenté étaient inconnus ; en conséquence, ces études n'ont pas permis d'estimer la part de variabilité phénotypique expliquée par des effets génétiques.

5. Relations entre caractères fonctionnels d'intérêt

Les relations entre caractères phénotypiques peuvent être appréhendées à deux niveaux d'études chez les espèces forestières :

- (i) au niveau intra-population ; ce niveau d'étude permet de s'affranchir des effets de structuration de la variabilité génétique afin de détecter des relations fonctionnelles entre caractères. La connaissance de ces relations peut alors s'avérer indispensable pour déchiffrer les patrons de différenciation observés pour différents caractères phénotypiques.
- (ii) au niveau inter-populations qui permet de révéler des similitudes dans les patrons de différenciation observés pour différents caractères phénotypiques. Les relations détectées à ce niveau d'étude peuvent alors refléter des relations fonctionnelles entre caractères ou une évolution indépendante des caractères phénotypiques en réponse à des forces évolutives.

De manière générale, les relations entre la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation ont été très peu documentées chez les espèces forestières des régions tempérées, que ce soit au niveau intra- ou inter-populations. À ce jour, seule une étude réalisée par Aletà et al. (2009) a détecté une corrélation génétique négative entre la date de débourrement et le $\delta^{13}\text{C}$ de la matière organique foliaire au sein des provenances de noyer ; les génotypes les plus précoces en termes de débourrement étaient alors les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau. Cette relation était principalement expliquée par le fait que les génotypes les plus précoces en terme de débourrement évitaient les contraintes hydriques estivales en réduisant la conductance stomatique à la vapeur d'eau permettant ainsi de réduire les pertes en eau (Aletà et al., 2009). Une autre étude réalisée chez *Populus balsamifera* L. a mis en évidence que la phénologie de croissance et WUE, évaluée via $\Delta^{13}\text{C}$, différaient pour leur niveau et leur patron de différenciation génétique au sein des populations, suggérant que ces caractères étaient découplés (Keller et al., 2011).

Les études ayant évalué les relations entre WUE et la résistance à la cavitation semblent indiquer que la nature et l'intensité de la relation entre ces caractères varient entre espèces. Chez le pin sylvestre, une corrélation phénotypique positive a été mise en évidence entre $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} au niveau inter-populations : les populations les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau étaient alors les plus résistantes à la cavitation (Martínez-Vilalta et al.,

2009). Au contraire, une corrélation phénotypique négative a été détectée entre $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} chez le pin maritime (Lamy et al., 2011). Enfin, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre ces caractères fonctionnels chez le peuplier faux-tremble (Schreiber et al., 2011). L'efficacité d'utilisation de l'eau est un caractère plastique qui reflète une balance entre les flux d'eau et de carbone en situation de fonctionnement. De son côté, la résistance à la cavitation définit les limites de fonctionnement hydraulique et est liée aux propriétés structurales du xylème. Le niveau de résistance à la cavitation peut être modulé par les conditions environnementales mais la réponse plastique pour ce caractère présente une certaine inertie imposée par la mise en place de nouvelles assises cellulaires dont les propriétés structurales seront ajustées aux nouvelles conditions environnementales. D'un point de vue théorique, il n'existe donc aucune raison physiologique pour que WUE soit directement reliée à la résistance à la cavitation. L'intensité et le sens de la relation entre $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} dépendent donc essentiellement (Fichot et al., 2014): **i)** de l'existence d'une relation entre la résistance à la cavitation et les propriétés hydrauliques de la plante qui influencent les flux d'eau à l'échelle foliaire et **ii)** de l'intensité de la relation entre la conductance stomatique à la vapeur d'eau et l'assimilation nette de CO_2 et dans quelle mesure ces composantes pilotent les variations observées pour WUE_i et $\Delta^{13}\text{C}$.

CHAPITRE 2

***Structuration géographique de la variabilité génétique pour
la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de
l'eau chez le peuplier noir***

PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU CHAPITRE

Le réservoir de variabilité génétique présent dans les populations naturelles est le moteur de l'adaptation génétique des populations aux variations des conditions environnementales. À l'échelle de l'aire de répartition d'une espèce, la structuration géographique de la variabilité génétique témoigne de l'histoire évolutive des populations et peut être, dans certains cas, le reflet de phénomènes d'adaptation locale. L'importance de la phénologie de croissance dans l'adaptation des populations d'arbres forestiers aux contraintes thermiques semble être clairement établie (**Chapitre 1**). En revanche, la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) chez différentes espèces forestières ne semble pas refléter des phénomènes d'adaptation des populations à leur environnement (**Chapitre 1**). L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est un caractère dynamique qui reflète une balance entre des processus physiologiques qui varient constamment en fonction des conditions environnementales. Partant de ce constat, il est légitime de supposer que WUE est davantage un caractère d'ajustement du fonctionnement hydrique et carboné des plantes face aux variations des conditions environnementales. La variabilité phénotypique exprimée pour ce caractère serait alors principalement expliquée par des effets environnementaux et des effets d'interaction $G \times E$ que par des effets génétiques. L'objectif de ce premier chapitre expérimental visait à développer une vision multivariée de la structuration géographique de la variabilité génétique chez le peuplier noir. Afin d'apporter des éléments de réponse à cet objectif, la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE a été évaluée au sein d'une même collection européenne de peuplier noir installée dans deux tests clonaux. Cette collection a été constituée dans le cadre du projet européen NovelTree. L'approche multi-sites distingue nos travaux de ceux précédemment réalisés chez les espèces forestières en permettant d'évaluer l'importance relative des effets génétiques et environnementaux dans l'expression de la variabilité phénotypique pour la phénologie de croissance et WUE. Les travaux présentés dans ce chapitre sont organisés en deux sous-chapitres distincts. Ces deux sous-chapitres s'attachent respectivement à décrire le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance (**Chapitre 2.1**) et WUE (**Chapitre 2.2**) au sein de la collection européenne de peuplier noir installée dans des conditions de croissance contrastées.

CHAPITRE 2.1

***Structuration géographique de la variabilité génétique chez
le peuplier noir : la PHÉNOLOGIE DE CROISSANCE***

1. Introduction

Au cours des dernières décennies, la phénologie de croissance a fait l'objet de nombreuses études réalisées chez différentes espèces forestières du fait de son importance pour l'adaptation au froid (Howe et al., 2003). La revue de la littérature présentée dans le **Chapitre 1** a mis en évidence que de nombreuses populations naturelles forestières sont génétiquement différenciées pour la date de débourrement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon, selon des patrons plus ou moins complexes, faisant intervenir la photopériode et la température comme principaux facteurs à l'origine de la différenciation. Ces résultats soulignent l'importance de ces caractères phénologiques pour l'adaptation locale des populations forestières. Bien que ces caractères soient sous un fort contrôle génétique, la variabilité phénotypique exprimée peut être modulée, à court terme, par des variations environnementales. À titre d'exemple, le débourrement est connu pour être plastique en réponse à des variations de température. L'avancée de la date de débourrement des arbres forestiers, accompagnant les modifications climatiques, constitue l'illustration la plus flagrante de la plasticité phénotypique de ce caractère en réponse à des variations de température (Menzel and Fabian, 1999; Menzel et al., 2006; Parmesan, 2006; Cleland et al., 2007). Bien que la photopériode soit le principal signal environnemental à l'origine de l'arrêt de croissance primaire et de la formation du bourgeon chez les arbres forestiers, de nombreuses études ont mis en évidence que la température (Tanino et al., 2010; Rohde et al., 2011a), la disponibilité en eau du sol (Dunlap and Stettler, 1996; Howe et al., 2003) ou encore l'attaque par des agents pathogènes (Dunlap and Stettler, 1996; Pellis et al., 2004) pouvaient interagir avec le signal photopériodique. Cependant, peu d'études ont quantifié la plasticité phénotypique et sa variabilité génétique pour les caractères phénologiques au sein de populations naturelles forestières. Trois études réalisées au sein de populations naturelles de chêne, de hêtre, de frêne et de sapin gracieux ont permis de quantifier la plasticité phénotypique du débourrement en réponse à des variations de température le long de gradients altitudinaux (Worrall, 1983; Vitasse et al., 2009b; Vitasse et al., 2010). Ces études ont mis en évidence une avancée de la date de débourrement variant de deux à huit jours selon l'espèce étudiée. L'amplitude et les patrons de réponse plastique étaient alors comparables entre populations, quelle que soit l'espèce étudiée.

Jusqu'à présent, les études réalisées chez le peuplier noir se sont essentiellement attachées à décrire et à décomposer la variabilité phénotypique exprimée pour la date d'arrêt

de croissance et la date de formation du bourgeon terminal. Ainsi, dans une étude réalisée au sein de 14 populations naturelles de peuplier noir, Rohde et al. (2011b) ont mis en évidence une différenciation latitudinale des populations pour la date d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon, suggérant une adaptation locale aux conditions de photopériode. Fabbrini et al. (2012) ont démontré, au sein d'une famille de plein-frères de peuplier noir, que la formation du bourgeon était un caractère plastique en réponse à des variations de températures entre sites expérimentaux. Une variabilité de la plasticité phénotypique avait alors été observée entre géotypes mais sa contribution dans la variabilité phénotypique restait inférieure à celle des effets génétiques. À notre connaissance, aucune étude n'a évalué, au sein de populations naturelles de peuplier noir, la plasticité phénotypique pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon. Enfin, à ce jour, aucune étude n'a évalué ou caractérisé la structuration géographique et la plasticité phénotypique pour la date de débourrement chez le peuplier noir.

L'objectif général de cette étude était de développer nos connaissances quant à la plasticité phénotypique et le niveau de différenciation génétique de populations naturelles de peuplier noir pour la phénologie de croissance. Les objectifs spécifiques visaient à : *i*) évaluer le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique pour les caractères phénologiques et donner une interprétation éventuelle de cette structuration géographique par les paramètres climatiques des sites d'origine des populations, *ii*) évaluer l'amplitude de la plasticité phénotypique des géotypes de peuplier noir, et sa variabilité génétique au sein des populations, pour le débourrement, l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon en réponse à des variations des conditions de croissance, et *iii*) juger des relations phénotypiques et génétiques entre caractères phénologiques. Afin d'apporter des éléments de réponse à ces objectifs, les observations ont été réalisées au sein d'une collection européenne de peuplier noir rassemblant 1085 individus échantillonnés dans 13 métapopulations naturelles et installés en test clonal dans deux sites expérimentaux situés à des latitudes différentes. Les observations ont été réalisées en conditions hydriques non-limitantes sur des tiges âgées de un an.

2. Matériel et méthodes

2.1. Constitution et caractérisation d'une collection européenne de ressources naturelles de peuplier noir

2.1.1. Présentation de la collection

Cette étude a été réalisée à partir d'une collection européenne de peuplier noir constituée dans le cadre du projet européen NovelTree. Cette collection a été établie avec pour objectifs contractuels de caractériser les niveaux de variabilité génétique et les patrons de structuration géographique pour deux caractères d'intérêt, la tolérance à la rouille foliaire à *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) et la phénologie de croissance, et d'associer cette variabilité au niveau de polymorphisme de gènes ou régions génomiques candidats pour ces deux caractères.

Cette collection rassemble 30 populations naturelles de peuplier noir distribuées dans la partie occidentale de l'aire naturelle de répartition de l'espèce. Plus précisément, des individus, juvéniles ou adultes, ont été échantillonnés dans des forêts alluviales aux Pays-Bas, en Allemagne, en France et en Italie. Au sein des populations, des boutures ont été prélevées sur un ensemble de 1085 individus représentatifs de la variabilité phénotypique observée tous critères confondus. Ces boutures ont permis l'installation d'un parc à pied-mères de référence à la pépinière forestière d'État de Guémené-Penfao (Loire-Atlantique, France) dans lequel toutes les boutures à l'origine des plantations expérimentales ont été prélevées. Suivant les populations, l'échantillonnage a été concentré sur une zone restreinte (maximum 10 km de rive) ou a été, au contraire, réalisé le long d'un parcours amont-aval pouvant dépasser 30 km. Les populations présentant des caractéristiques différentes, l'échantillonnage a été réalisé de manière à disposer d'au moins 30 individus par population. Les populations présentant un effectif inférieur à 30 individus et suffisamment proches géographiquement pour faire l'objet de flux de gènes, ou celles pour lesquelles des analyses de diversité génétique neutre ne révélaient aucune structuration par la distance, ont été regroupées en métapopulations. Treize métapopulations de peuplier noir ont ainsi été constituées à partir des 30 populations initiales (**Tableau 2.1.1**). Ces métapopulations sont présentes au sein de 11 bassins hydrographiques, pour la plupart déconnectés, et sont distribuées selon un gradient géographique de 12° de latitude, 17° de longitude et 1500 m d'altitude. Cette population d'association, construite à l'échelle d'une partie de l'aire naturelle, a été volontairement structurée selon des gradients géographiques Nord-Sud et Est-Ouest en conservant une représentation individuelle intra-

métapopulation suffisante pour différencier la variabilité génétique exprimée au niveau intra- et inter-métapopulations. Elle contraste en ce sens avec les populations d'association récemment étudiées pour d'autres espèces du genre *Populus*, telles que *P. trichocarpa* Torr. & Gray (McKown et al., 2014a) et *P. tremula* L. (Hall et al., 2007; Luquez et al., 2008), pour lesquelles une telle structuration n'a pas été prise en compte. Aux Pays-Bas, le peuplier noir n'étant représenté que par des populations de faibles effectifs, fragmentées et souvent constituées d'arbres vieillissants, la population étudiée est constituée d'un ensemble d'individus isolés échantillonnés dans différentes régions des Pays-Bas. Après collecte des boutures, un génotypage réalisé à l'aide de 48 marqueurs SNP_s spécifiques à *P. deltoides* et à *P. nigra* a permis de tester la présence d'éventuels hybrides interspécifiques au sein de la collection. Seulement deux hybrides ont été identifiés et retirés de la collection.

Tableau 2.1.1.1. Localisation géographique, dynamique hydrologique des bassins hydrographiques et nombre de génotypes installés en test clonal en pépinière à Orléans (ORL) et Savigliano (SAV) pour les 13 métapopulations naturelles de peuplier noir.

Pays	Bassin hydrographique		Metapopulation	Latitude	Longitude	Altitude	Cohortes ^a	Dynamique hydrologique		Nombre de génotypes	
								ORL	SAV	Commun	
France	Adour	Adour	42°53' N - 43°23' N	00°56' O - 00°04' E	52 - 902	Mature	Partiellement régulée	63	52	49	
France	Dranse	Dranse	46°23' N	06°30' E	374	Juvenile/mature	Dynamique	40	42	39	
France	Loire	Loire	47°00' N - 47°51' N	00°44' O - 02°58' E	29 - 154	Juvenile/mature	Dynamique	217	200	183	
France	Nohèdes	Nohèdes	42°37' N	02°17' E	820	Mature	Dynamique	43	40	37	
France	Drôme	Ramières	44°41' N - 44°45' N	04°55' E - 05°24' E	145 - 470	Juvenile/mature	Dynamique	183	100	93	
France	Rhin	Rhin	48°16' N - 48°37' N	07°41' E - 07°49' E	135 - 160	Mature	Régulée	66	50	48	
France	Allier	ValAllier	46°24' N	03°19' E	220	Juvenile/mature	Dynamique	149	40	40	
Allemagne	Rhin	Kuhkopf	49°49' N	08°30' E	91	Juvenile/mature	Régulée	54	46	45	
Italie	Basento	Basento	40°24' N - 40°38' N	15°56' E - 16°39' E	37 - 286	Juvenile/mature	Partiellement régulée	25	23	19	
Italie	Paglia	Paglia	42°45' N - 42°52' N	11°45' E - 11°55' E	235 - 358	Juvenile/mature	Dynamique	45	49	45	
Italie	Stura	Stura	44°17' N - 44°23' N	06°56' E - 07°12' E	825 - 1699	Juvenile/mature	Dynamique	25	29	25	
Italie	Ticino	Ticino	45°12' N - 45°16' N	08°59' E - 09°04' E	60 - 70	Juvenile/mature	Dynamique	103	82	76	
Pays-Bas	Rhin	Pays-Bas	50°31' N - 52°37' N	03°35' E - 06°23' E	0 - 287	Mature	Régulée	47	42	40	

Lorsque les métapopulations ont été constituées à partir d'un ensemble d'individus échantillonnés dans différentes populations présentes au sein d'un même bassin hydrographique, un intervalle de latitudes, de longitudes et d'altitudes est donné. L'altitude est exprimée en mètres. ^a Les arbres juvéniles ont été définis comme des arbres n'ayant pas atteint la maturité sexuelle.

2.1.2. Historique des études menées sur les populations de la collection

La plupart des populations qui constituent la collection européenne ont déjà fait l'objet de travaux dans le cadre du projet européen EUROPOP (1997-2001) qui visait à caractériser la diversité génétique des populations naturelles de peuplier noir présentes au sein de différents bassins hydrographiques en Europe (van Dam and Bordács, 2002). Avec le développement des marqueurs moléculaires, les études visant à étudier la diversité génétique du peuplier noir en Europe se sont multipliées et ont permis de compléter les travaux menés dans le cadre du projet EUROPOP. Ces travaux ont mis en évidence que les populations du Sud de l'Europe présentent de forts niveaux de diversité génétique maintenus par des flux de gènes importants à assez grande distance (Storme et al., 2004; Smulders et al., 2008b). Au contraire, en Allemagne et aux Pays-Bas, le peuplier noir n'est présent qu'à l'état de relique avec des populations de faibles effectifs, fragmentées et souvent constituées d'un grand nombre de copies végétatives maintenues par l'Homme (Smulders et al., 2008b). À titre d'exemple, près de 41 % des effectifs d'une population de peuplier noir aux Pays-Bas correspondaient à des copies végétatives (Smulders et al., 2008b). Par ailleurs, la caractérisation du niveau de diversité génétique avec des marqueurs AFLP⁵ et microsatellites⁶ a mis en évidence que plus de 72 % de la diversité génétique était présente au niveau intra-population. Ainsi, les populations distribuées le long d'une même rivière sont proches génétiquement ($0,02 \leq F_{ST} \leq 0,14$) et le niveau de différenciation génétique entre rivières de bassins hydrographiques déconnectés est modéré voire faible ($0,07 \leq F_{ST} \leq 0,16$) (Smulders et al., 2008b). Dans une étude réalisée sur les populations distribuées le long de la Drôme, Imbert et Lefèvre (2003) ont confirmé, à l'aide de marqueurs microsatellites, un niveau de diversité globale élevé mais ont, quant à eux, mis en évidence une différenciation génétique des populations pouvant être expliquée par un isolement par la distance.

⁵Les marqueurs AFLP ('*Amplified Fragment Length Polymorphism*') permettent de révéler le polymorphisme de la séquence ADN à partir de fragments d'ADN qui ont été digérés par des enzymes de restriction et ensuite amplifiés par PCR ('*Polymerase Chain Reaction*').

⁶Les microsatellites correspondent à des séquences ADN formées par la répétition d'un motif constitué de deux à dix nucléotides.

Plus récemment, des travaux ont été entrepris afin de caractériser le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour des caractères fonctionnels au sein de populations naturelles de peuplier noir. Ainsi, dans une étude réalisée au sein de 14 populations naturelles de peuplier noir, Rohde et al. (2011b) ont mis en évidence une différenciation latitudinale des populations pour la date d'arrêt de croissance et la date de formation du bourgeon terminal, suggérant une adaptation locale aux conditions de photopériode. Parmi ces 14 populations étudiées, dix représentées par les mêmes géotypes clonés font partie de la collection constituée dans le cadre du projet NovelTree. Enfin, une étude réalisée par Chamillard et al. (2011) a mis en évidence, en situations hydriques limitantes et non-limitantes, une variabilité génétique significative pour WUE, évaluée *via* $\Delta^{13}\text{C}$, au sein de trois populations françaises de peuplier noir (*i.e.*, 'Saint-Pryvé', 'Nohèdes' et 'Ramières') ainsi qu'une différenciation génétique significative de ces trois populations pour ce même caractère.

2.1.3. Caractérisation climatique des sites d'origine des populations

Les données climatiques des sites d'origine des 30 populations naturelles de peuplier noir ont été déterminées à partir du logiciel New LocClim (http://www.fao.org/nr/climpag/pub/en3_051002en.asp). Ce logiciel a été développé par la FAO ('*Food and Agricultural Organization*') afin de permettre l'estimation de paramètres climatiques en différents points du globe. Il utilise la base de données FAOCLIM qui recense les données climatiques de plus de 30 000 stations météorologiques distribuées à l'échelle du globe. Les paramètres climatiques des sites d'origine des populations ont été déterminés pour la normale 1961-1990 à partir des enregistrements de stations météorologiques situées dans un rayon de 20 à 30 km autour du site d'origine et en appliquant, si nécessaire, une correction de l'effet altitudinal. Ainsi, neuf variables climatiques ont été utilisées pour caractériser chaque site : la température annuelle minimale et maximale (T_{Min} et T_{Max} , en °C), la température annuelle moyenne (T_{Moy} , en °C), la température moyenne du mois le plus froid et celle du mois le plus chaud (TMMF et TMMC, °C), le nombre de jours dans l'année pour lesquels la température moyenne est inférieure à 0°C (FF) ainsi que les précipitations annuelles (P , en mm). Un indice de continentalité (IC) a été calculé selon la formule développée par Gorczynski (1920) : $\text{IC} = 1,7 [A / \sin(\phi)] - 20,4$, où A correspond à la différence de température moyenne entre le mois le plus chaud et le mois le plus froid et ϕ

correspond à la latitude du site. Plus les valeurs de IC sont élevées, plus le degré de continentalité est important. L'indice d'aridité (IA) a également été calculé comme étant le rapport entre les précipitations et l'évapotranspiration potentielle annuelles. Plus les valeurs observées pour cet indice sont élevées, plus le niveau d'aridité d'un site est faible. La durée de nuit cumulée sur la période de juillet à septembre (DNC, en heures) a également été déterminée pour chaque site à partir des enregistrements du lever et du coucher du soleil accessibles sur le site de l'Observatoire Naval des États-Unis (*US Naval Observatory*, <http://aa.usno.navy.mil/index.php>). Compte-tenu de l'écologie du peuplier noir, la caractérisation du régime hydrologique des rivières ou des fleuves à proximité des populations fournit des informations quant à la disponibilité de la ressource en eau dans leur site d'origine ; cependant, cette caractérisation n'a pas pu être effectuée pour la thèse. Les moyennes climatiques et photopériodiques à l'échelle de la métapopulation ont été calculées à partir des données obtenues au niveau population en pondérant par le nombre d'individus présents dans chaque population.

Les différences climatiques entre sites d'origine des métapopulations ont été évaluées par approche multivariée reposant sur l'analyse en composantes principales (ACP) (**Fig. 2.1.1**). L'ACP a été réalisée à partir de l'ensemble des variables climatiques précédemment déterminées. Ayant des unités de mesure et des ordres de grandeur différents, les variables ont été standardisées avant de procéder à l'ACP. Le premier plan factoriel de l'ACP explique 80,9 % de la variabilité observée, dont 60,7 % sont expliqués par le premier facteur (F1) et 20,2 % sont expliqués par le deuxième facteur (F2) (**Fig. 2.1.1**). L'axe F1 est principalement défini par les variables thermiques (*i.e.*, T_{Moy} , T_{Min} , T_{Max} , TMMF, TMMC, FF) alors que l'axe F2 est défini par les précipitations (P) et l'indice d'aridité (IA). L'altitude et la durée de nuit cumulée sur la période de juillet à septembre ont été projetées en tant que variables supplémentaires dans le plan factoriel principal $F1 \times F2$ afin d'apprécier leurs covariations avec les variables climatiques (**Fig. 2.1.1**). Les résultats obtenus mettent en évidence que ces deux variables sont fortement corrélées avec les variables thermiques. La projection des métapopulations dans ce premier plan factoriel indique qu'elles couvrent une variabilité de conditions climatiques. De manière générale, les métapopulations de peuplier noir se distribuent sur l'axe F1, par pays, selon un gradient de température partiellement confondu avec un gradient de photopériode du fait de leur lien évident dans un contexte de gradient latitudinal (**Fig. 2.1.1**). Les métapopulations italiennes sont exposées aux températures les plus élevées, à l'exception de la métapopulation 'Stura' qui est issue de hautes altitudes. Au

contraire, les métapopulations septentrionales, d'Allemagne et des Pays-Bas, sont exposées aux plus faibles températures ; les métapopulations françaises occupent, quant à elles, une position intermédiaire. Au sein de chaque pays, les métapopulations se distribuent sur l'axe F2 selon un gradient de précipitations et d'aridité (Fig. 2.1.1).

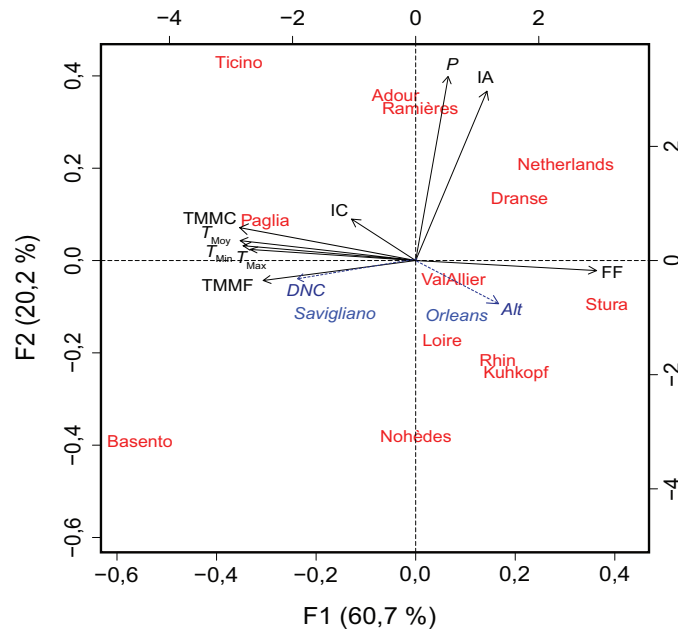


Figure 2.1.1. Distribution dans le plan factoriel F1 × F2 de l'analyse en composantes principales (ACP) des variables climatiques et des 13 métapopulations de peuplier noir. Les facteurs orthogonaux, F1 et F2, ont été construits comme des combinaisons linéaires des variables climatiques permettant de maximiser le pourcentage de variance observée. L'altitude (Alt.) et la durée de nuit cumulée sur la période de juillet à septembre (DNC) ont été projetées dans le premier plan factoriel comme variables supplémentaires. Les deux sites expérimentaux dans lesquels ont été observées les métapopulations ont également été projetés dans le plan factoriel comme individus supplémentaires. Les axes du premier plan factoriel de l'ACP ont été construits selon deux échelles représentant respectivement les coefficients de corrélation des variables avec les composantes principales (axes en bas et à gauche) et les coordonnées des individus sur les axes factoriels (axes en haut et à droite). *Abréviations* : FF, nombre de jours dans l'année pour lesquels la température moyenne est inférieure à 0°C ; IC, indice de continentalité ; IA, indice d'aridité ; P, précipitations annuelles ; TMMC, température moyenne du mois le plus chaud ; TMMF, température moyenne du mois le plus froid ; T_{Max}, température annuelle maximale ; T_{Min}, température annuelle minimale ; T_{Moy}, température annuelle moyenne.

2.2. Un test clonal installé en France et en Italie

Après homogénéisation en parc à pied-mères à la pépinière forestière d'État de Guéméné-Penfao, la collection européenne de peuplier noir a été installée en test clonal dans deux sites expérimentaux situés à Orléans (ORL, France, Vallée de la Loire, 47°50'N 01°54'E, 108 m d'altitude) et à Savigliano (SAV, Italie, Vallée du Pô, 44°36'N 07°37'E, 343 m d'altitude). L'ensemble de la collection a été installé à Orléans alors qu'un sous-échantillon de 815 génotypes, appartenant aux 13 métapopulations de peuplier noir, a été installé à Savigliano. Dans chaque site, le dispositif expérimental a été installé à partir de boutures lignifiées de 25 cm et était organisé en six blocs complets randomisés à parcelle unitaire mono-arbre (*i.e.*, chaque génotype était représenté par une bouture dans chaque bloc). Au sein des blocs, les boutures ont été plantées selon un espacement de 1,00 m sur la ligne et de 2,00 m entre deux lignes à Orléans et selon un espacement de 0,80 m sur la ligne et de 2,20 m entre deux lignes à Savigliano. Dans chaque site, une double rangée du cultivar *P. nigra* 'Jean Pourtet' a été installée autour du dispositif afin de limiter les effets de bordure. Après installation, les dispositifs n'ont bénéficié d'aucune fertilisation. Durant la saison de végétation, la qualité phytosanitaire des dispositifs a été assurée par des traitements insecticides et fongicides apportés selon les besoins. Aucun traitement fongicide n'a été effectué à Orléans après la première année d'installation, le dispositif expérimental étant également utilisé pour permettre l'étude de la sensibilité à la rouille foliaire à *Mlp*. Durant la saison de végétation, de mai à septembre, les dispositifs ont également bénéficié d'un apport en eau non-limitant, par irrigation en goutte-à-goutte à Orléans et par immersion de la parcelle à Savigliano. À la fin de la première année de croissance (2008), les plants installés à Savigliano ont été recépés ; les rejets de souche produits au printemps suivant ont été démarriés afin de ne conserver que le brin dominant pour chaque plant. À Orléans, la croissance réalisée en fin de première année étant relativement faible, le dispositif n'a pas été recépé.

Le climat moyen des deux sites expérimentaux a été défini pour la normale 1961-1990 à partir du logiciel New LocClim suivant la même procédure que celle utilisée pour les sites d'origine des populations. Les deux sites expérimentaux ont ensuite été projetés en tant qu'individus supplémentaires dans le premier plan factoriel de l'ACP réalisée à partir des données climatiques des sites d'origine des métapopulations (**Fig. 2.1.1**). Ainsi, les deux sites expérimentaux diffèrent essentiellement pour leur régime de températures : en moyenne,

SAV est caractérisé par des températures légèrement plus élevées qu'à ORL et présente un indice de continentalité légèrement plus élevé (**Fig. 2.1.1**). Les deux sites expérimentaux se différencient également pour leur régime photopériodique : en moyenne, la photopériode estivale (juillet à septembre) est légèrement plus longue à ORL qu'à SAV (929 heures vs. 909 heures). Les données climatiques de ces sites depuis l'année d'installation du dispositif (2008) jusqu'à l'année d'étude (2009 pour ORL et 2010 pour SAV) ont également été obtenues à partir de stations météorologiques situées à proximité (Saint-Cyr-en-Val pour ORL et Lagnasco pour SAV) (**Fig. 2.1.2**). Quelle que soit l'année considérée, l'amplitude de variation des températures était supérieure à SAV, confirmant le degré de continentalité plus élevé pour ce site (**Fig. 2.1.2**). À titre d'exemple, au cours de l'année 2010, la température moyenne mensuelle variait de 0 °C à 22 °C à ORL alors qu'elle variait de -2 °C à 25 °C à SAV (**Fig. 2.1.2**). De façon comparable, les précipitations annuelles étaient supérieures à SAV (*e.g.*, 968 mm vs. 665 pour l'année 2009) mais ces différences étaient compensées par le fait que les deux sites expérimentaux bénéficiaient d'un apport en eau non-limitant durant toute la saison de végétation.

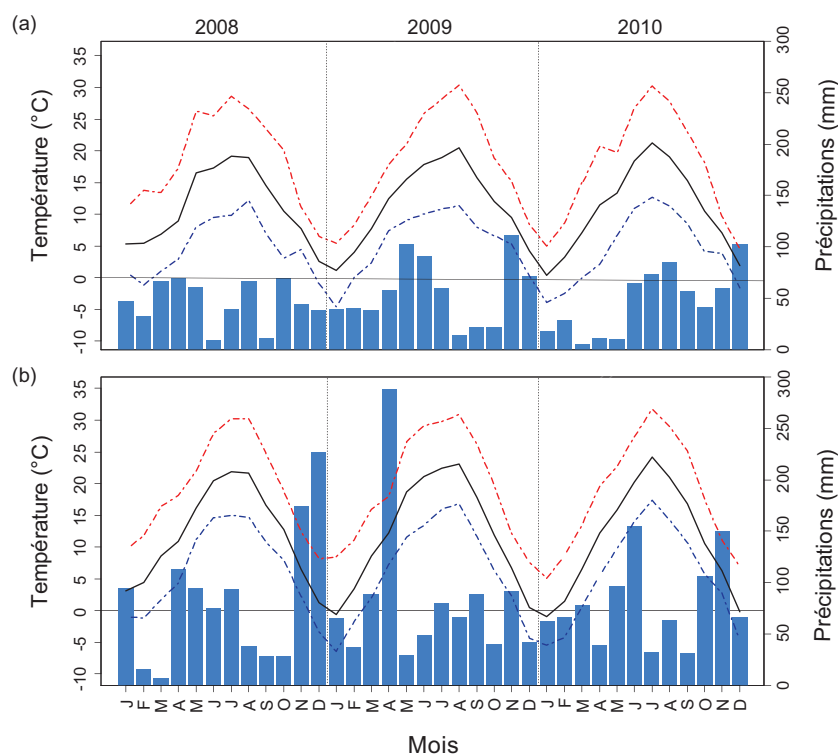


Figure 2.1.2. Caractéristiques climatiques des deux sites expérimentaux, Orléans (a) et Savigliano (b), depuis l'année d'installation du dispositif (2008) jusqu'à l'année d'étude (2009 pour ORL et 2010 pour SAV). Les barres d'histogramme représentent les précipitations mensuelles. La courbe noire représente l'évolution de la température moyenne mensuelle; les courbes rouge et bleue représentent respectivement l'évolution des températures mensuelles maximale et minimale. Les données climatiques des sites expérimentaux ont été obtenues à partir de stations météorologiques situées à proximité (Saint-Cyr-en-Val pour Orléans et Lagnasco pour Savigliano).

Les caractéristiques pédologiques des sites expérimentaux ont été déterminées, après plantation, à partir d'échantillons de sol prélevés en différents points du dispositif sur une profondeur de 40 cm. La texture du sol (% d'argiles, % de limons et % de sables), le pH ainsi que la teneur en matière organique, en carbone et en azote ont été déterminés pour chaque échantillon. À ORL, la texture du sol était de nature limono-sableuse (16,2 % d'argiles, 15,4 % de limons et 68,4 % de sables) alors qu'elle était limoneuse (21,6 % d'argiles, 36,7 % de limons et 41,7 % de sables) à SAV. Par ailleurs, à SAV, le sol était caractérisé par un pH (8,0 vs. 5,4), une teneur en matière organique (27,9 vs. 19,9 g kg⁻¹), en carbone (16,1 vs. 11,5 g kg⁻¹) et en azote (1,4 vs. 0,6 g kg⁻¹) plus élevés qu'à ORL. Les différences de texture et de fertilité du sol entre les deux sites expérimentaux ont induit des différences de potentiel de

croissance : à la fin de l'année 2008, la circonférence à 1 m du sol variait de 27 ± 4 à 110 ± 5 mm entre moyennes de géotypes extrêmes à SAV alors qu'elle variait de 17 ± 4 à 31 ± 2 mm à ORL. Le site à SAV a donc été considéré comme le site le plus favorable à la croissance.

2.3. Suivis phénologiques et prétraitement des données

Les observations de débourrement, d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon ont été effectuées sur l'ensemble des individus dans les deux dispositifs expérimentaux (**Tableau 2.1.2**). À ORL, les observations ont été réalisées au cours de la deuxième saison de végétation (2009). À SAV, l'observation de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon a été réalisée au cours de la deuxième saison de végétation (2009) alors que l'observation du débourrement a été réalisée au cours de la troisième saison de végétation (2010). Excepté pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon, les observations ont donc été réalisées sur des tiges de un an dans les deux sites expérimentaux.

À ORL, le suivi du débourrement végétatif a été réalisé du 03 (jour 93) au 24 avril (jour 114) 2009, à raison d'une observation tous les quatre jours. À SAV, ce suivi a été réalisé du 31 mars (jour 90) au 11 mai (jour 131) 2010, à raison d'une observation par semaine. Le stade de débourrement du bourgeon terminal de la tige principale a été apprécié en utilisant une échelle de notation à six classes, notées de 0 à 5, qui traduit l'évolution du stade où le bourgeon est en dormance au stade d'élongation des entrenœuds de la tige (**Fig. 2.1.3**; Castellani et al., 1967). À ORL, le suivi de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal a été réalisé entre le 07 août (jour 219) et le 02 octobre (jour 275) 2009, à raison d'une observation par semaine. À SAV, ce suivi a été réalisé entre le 18 août (jour 230) et le 07 octobre (jour 280) 2009, à raison d'une observation tous les 11 jours. Le stade d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon terminal a été apprécié en observant la pousse terminale et en utilisant une échelle de notation à sept classes, notées de 3 à 0, traduisant l'évolution du stade d'élongation des entrenœuds au stade où le bourgeon est en dormance (*cf. Chapitre 1* ; Rohde et al., 2011b; Fabbrini et al., 2012).

Tableau 2.1.2. Récapitulatif des caractères phénologiques étudiés, de l'année de mesure et du nombre de génotypes et de métapopulations sur lesquels les mesures ont été effectuées dans les deux sites expérimentaux, Orléans et Savigliano.

Caractère	Définition	Unité	Orléans		Savigliano	
			Année	$N_{\text{Métapop}} / N_{\text{Géno}}$	Année	$N_{\text{Métapop}} / N_{\text{Géno}}$
date ₃ .doy	date du stade 3 de débourrement	jour calendaire	2009	13 / 1085	2010	13 / 815
date ₃ .cat0	date du stade 3 de débourrement	somme de températures journalières positives depuis le 1 ^{er} janvier	2009	13 / 1085	2010	13 / 815
date _{1,5} .doy	date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal	jour calendaire	2009	13 / 1085	2009	13 / 815
date _{1,5} .crl	date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal	durée de nuit cumulée depuis le 1 ^{er} juillet	2009	13 / 1085	2009	13 / 815
LSV	longueur de la saison de végétation	jours	2009	13 / 1085	x	x

Abréviations : $N_{\text{Métapop}}$, nombre de métapopulations ; $N_{\text{Géno}}$, nombre de génotypes.

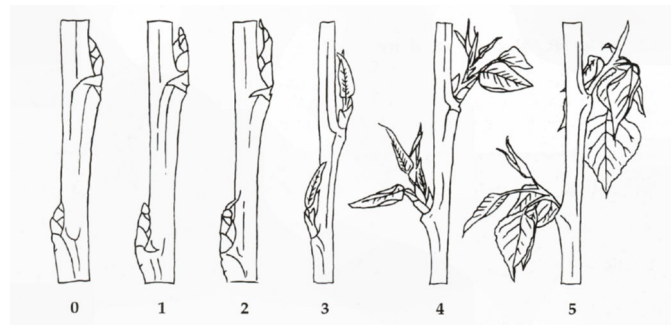


Figure 2.1.3. Échelle de notation du débourrement chez le peuplier noir. *Stade 0*, bourgeon dormant ; *stade 1*, les écailles du bourgeon commencent à diverger, présence de baume à l'extrémité du bourgeon ; *stade 2*, les écailles continuent de diverger, apparition d'une feuille entre les écailles ; *stade 3*, bourgeon totalement ouvert, les écailles sont toujours présentes, les feuilles sont apparentes mais toujours enroulées ; *stade 4*, les feuilles s'écartent les unes des autres et commencent à se dérouler ; *stade 5*, les feuilles sont totalement déroulées, les entrenœuds s'allongent. *Extrait de Turok et al. (1996) d'après Castellani et al. (1967).*

Les séries d'observation ont été ajustées à des modèles de régression polynomiale locale de degré deux, dont le régresseur est la date de mesure exprimée en jour calendaire. Pour l'ensemble des individus et des caractères étudiés, l'ajustement des modèles aux séries d'observation était de bonne qualité avec des coefficients de détermination (R^2) compris entre 0,924 et 0,999. Ces modèles ont ensuite été utilisés pour estimer les dates auxquelles se sont produits le stade 3 de débourrement, le stade 2,5 d'arrêt de croissance et le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal ($date_3$, $date_{2,5}$ et $date_{1,5}$ respectivement, en jour calendaire). D'un point de vue adaptatif, ces dates jouent un rôle clé puisqu'elles traduisent un véritable compromis entre l'exploitation maximale de la saison de végétation et l'évitement des dommages causés par les gelées printanières et automnales. Dans la suite de l'étude, la variable $date_{2,5}$ n'a pas été considérée car plus de 30 % des individus avaient atteint le stade 2,5 d'arrêt de croissance à la première journée de mesure dans les deux sites expérimentaux. Il paraissait donc impossible d'estimer de façon fiable la variabilité génétique exprimée pour ce caractère au sein de la collection européenne de peuplier noir. Afin de faciliter les comparaisons entre sites et permettre l'analyse des effets d'interaction Génotype \times Site ($G \times S$), la date du stade 3 de débourrement a également été exprimée en somme de températures journalières positives cumulées depuis le 01^{er} janvier ($date_3.cat0$). De façon similaire, la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal a été exprimée en durée de nuit cumulée depuis le 01^{er} juillet ($date_{1,5}.cnl$). La longueur de la saison de végétation (LSV, en jours) a été estimée, dans cette étude, comme étant la différence entre la date du stade 1,5 de formation

du bourgeon terminal et la date du stade 3 de débourrement. Les variables $date_{3,doy}$ et $date_{1,5,doy}$ ayant été déterminées pour des années différentes à SAV, la longueur de la saison de végétation n'a pas été estimée pour ce site.

2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2012). Un examen graphique préalable des données a permis un premier contrôle de la qualité des données ainsi que le choix des analyses statistiques ultérieures. Les tests statistiques ont été considérés significatifs au risque d'erreur de 5 % ($P < 0,05$). Les données individuelles ont été analysées selon les modèles linéaires d'analyse de variance (ANOVA) suivants :

- (i) la structure du dispositif expérimental en blocs complets randomisés a permis un contrôle des effets blocs grâce au modèle linéaire mixte suivant : $Y_{ijk} = \mu + B_i + G_{j(k)} + e_{ijk}$, où Y_{ijk} correspond aux données individuelles, μ est la moyenne générale, B_i est l'effet du bloc i considéré comme fixe, $G_{j(k)}$ est l'effet du génotype j dans la métapopulation k considéré comme aléatoire et e_{ijk} est l'erreur résiduelle. Après ajustement aux effets blocs, les génotypes représentés par moins de trois ramets ont été exclus pour la suite des analyses. En raison d'une forte mortalité dans les deux sites expérimentaux, plus de 50 % des génotypes de la métapopulation 'Basento' étaient représentés par moins de trois ramets. Cette métapopulation n'a donc pas été considérée pour les analyses suivantes.
- (ii) Pour l'analyse des effets génotypes propres à chaque métapopulation et à chaque variable dans chaque site, un modèle aléatoire d'ANOVA a été utilisé : $Y'_{ijk} = \mu + G_j + e'_{ijk}$, où Y'_{ijk} correspond aux données individuelles ajustées de l'effet bloc, G_j est l'effet du génotype j considéré comme aléatoire et e'_{ijk} est l'erreur résiduelle.
- (iii) Pour évaluer le niveau de différenciation génétique des métapopulations pour chaque variable et dans chaque site, le modèle aléatoire suivant a été utilisé : $Y''_{ijk} = \mu + M_k + G_{j(k)} + e''_{ijk}$, où M_k est l'effet de la métapopulation k considéré comme aléatoire, $G_{j(k)}$ est l'effet du génotype j dans la métapopulation k considéré comme aléatoire et e''_{ijk} est l'erreur résiduelle.
- (iv) Pour les variables mesurées dans les deux sites expérimentaux (*i.e.*, date du stade 3 de débourrement et date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal), l'effet

site et l'effet d'interaction $G \times S$ ont été testés. Avant de procéder aux analyses, un test de Levene a été réalisé et a permis de mettre en évidence que les variances génétiques et résiduelles n'étaient pas homogènes entre métapopulations et entre sites. En conséquence, l'effet site et l'effet d'interaction $G \times S$ ont été testés pour chaque métapopulation selon le modèle aléatoire suivant : $Y_{ijkl} = \mu + G_j + S_l + (G \times S)_{jl} + e_{ijkl}$, où G_j est l'effet du génotype j considéré comme aléatoire, S_l est l'effet du site l considéré comme aléatoire, $(G \times S)_{jl}$ est l'effet d'interaction $G \times S$ considéré comme aléatoire et e_{ijkl} est l'erreur résiduelle.

Les différentes composantes de la variance phénotypique ont été estimées selon la méthode du maximum de vraisemblance restreint ('*REstricted Maximum Likelihood*', REML). L'héritabilité individuelle au sens large (H^2_{ind}) a été calculée pour chaque variable et métapopulation selon l'expression suivante : $H^2_{ind} = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_e)$, où σ^2_G et σ^2_e représentent respectivement les variances génétique et résiduelle estimées pour chaque variable et métapopulation. De façon similaire, le coefficient de variation génétique (CV_G , %) a été estimé pour chaque variable et métapopulation comme étant le rapport entre l'écart-type génétique et la moyenne de la variable étudiée. Les valeurs de CV_G pour le débourrement et la formation du bourgeon terminal ayant été calculées à partir d'une date (date à laquelle se sont produits ces événements à partir du 1^{er} janvier de l'année étudiée), les différences de CV_G entre caractères phénologiques ne peuvent être interprétées car elles sont susceptibles de ne refléter qu'une simple différence dans la date à laquelle se produisent ces événements au cours de la saison de végétation (début et fin de saison de végétation). Dans cette étude, les valeurs de CV_G ont donc été estimées afin de comparer l'amplitude de variation génétique exprimée pour chaque caractère phénologique au sein de chaque métapopulation dans chaque site expérimental et d'évaluer l'influence des conditions environnementales sur l'amplitude de variation génétique. Le coefficient de différenciation génétique de populations naturelles pour un caractère phénotypique (Q_{ST}) est défini comme la proportion de variance génétique additive qui peut être expliquée par des différences entre métapopulations et est ainsi calculé selon l'expression suivante : $Q_{ST} = \sigma^2_{BP} / (\sigma^2_{BP} + 2 \times \sigma^2_{WP})$, où σ^2_{WP} et σ^2_{BP} représentent respectivement la variance génétique additive au niveau intra- et inter-populations (Wright, 1951; Spitze, 1993). Dans notre étude, le matériel génétique utilisé ne nous a pas permis d'estimer la variance génétique additive mais seulement d'avoir accès à la variance génétique totale. Ainsi, les valeurs de Q_{ST} rapportées dans notre étude représentent la part de variabilité génétique totale pouvant être attribuée à des différences entre métapopulations et ont été

estimées selon l'équation suivante : $Q_{ST} = \sigma_M^2 / (\sigma_M^2 + 2 \times \sigma_G^2)$, où σ_M^2 et σ_G^2 représentent les variances génétiques estimées au niveau intra- et inter-métapopulations. Lorsque la variabilité génétique exprimée pour un caractère quantitatif est essentiellement expliquée par des effets additifs, les valeurs de Q_{ST} estimées à partir de la variance génétique additive et totale sont comparables. Dans le cas contraire où la variabilité génétique est expliquée par de forts effets non-additifs, les valeurs de Q_{ST} estimées à partir de la variance génétique totale peuvent être biaisées.

Afin de juger de la stabilité du classement des génotypes et des métapopulations entre sites, le coefficient de corrélation de Spearman (r_s) a été calculé à partir des moyennes génotypiques et des moyennes des métapopulations. Les relations phénotypiques entre caractères et les relations entre caractères phénologiques et variables environnementales des sites d'origine des métapopulations ont été appréciées par examen graphique et par estimation du coefficient de corrélation linéaire de Pearson (r_p).

3. Résultats

Seule la métapopulation 'Netherlands' n'a pas été considérée pour l'étude de la variabilité exprimée pour la date de formation du bourgeon terminal à ORL et à SAV. À la première date de suivi de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal, plus de 30 % des individus de cette métapopulation avaient déjà atteint ou dépassé le stade 1,5. Il paraissait donc impossible d'évaluer avec précision la variabilité génétique exprimée pour la date de formation du bourgeon terminal au sein de cette métapopulation.

3.1. Variabilité phénotypique exprimée dans les deux sites expérimentaux

Une importante variabilité phénotypique était exprimée pour l'ensemble des caractères phénologiques au sein de la collection européenne de peuplier noir (**Fig. 2.1.4**). À ORL, l'amplitude de variation entre moyennes de génotypes extrêmes était de 26 jours pour le débourrement ($date_3.doy$), 50 jours pour la formation du bourgeon terminal ($date_{1.5}.doy$) et 39 jours pour la longueur de la saison de végétation (LSV) (**Fig. 2.1.4**). La date à laquelle le stade 3 de débourrement et le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal se sont produits variait entre sites expérimentaux (**Fig. 2.1.4a,b**). En moyenne, les métapopulations de peuplier noir ont atteint le stade 3 de débourrement plus tard à SAV qu'à ORL (jour 107 vs.

jour 104 ; **Fig. 2.1.4a**). Cependant, le stade 3 s'est produit après accumulation d'une somme de températures journalières positives plus faible à SAV qu'à ORL (**Fig. 2.1.5a**). En moyenne, le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal s'est également produit plus tard à SAV (jour 261 vs. jour 254 ; **Fig. 2.1.4b**). Par ailleurs, le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal a été atteint à SAV pour une durée de nuit cumulée supérieure et pour une plus faible somme de températures journalières inférieures à 10°C (**Fig. 2.1.5b, Fig. 2.1.6**). L'amplitude de variation entre moyennes de géotypes extrêmes pour la date de débourrement ($date_3.doy$) et la date de formation du bourgeon terminal ($date_{1.5.doy}$) à SAV était comparable à celle observée pour ces caractères à ORL (**Fig. 2.1.4a,b**).

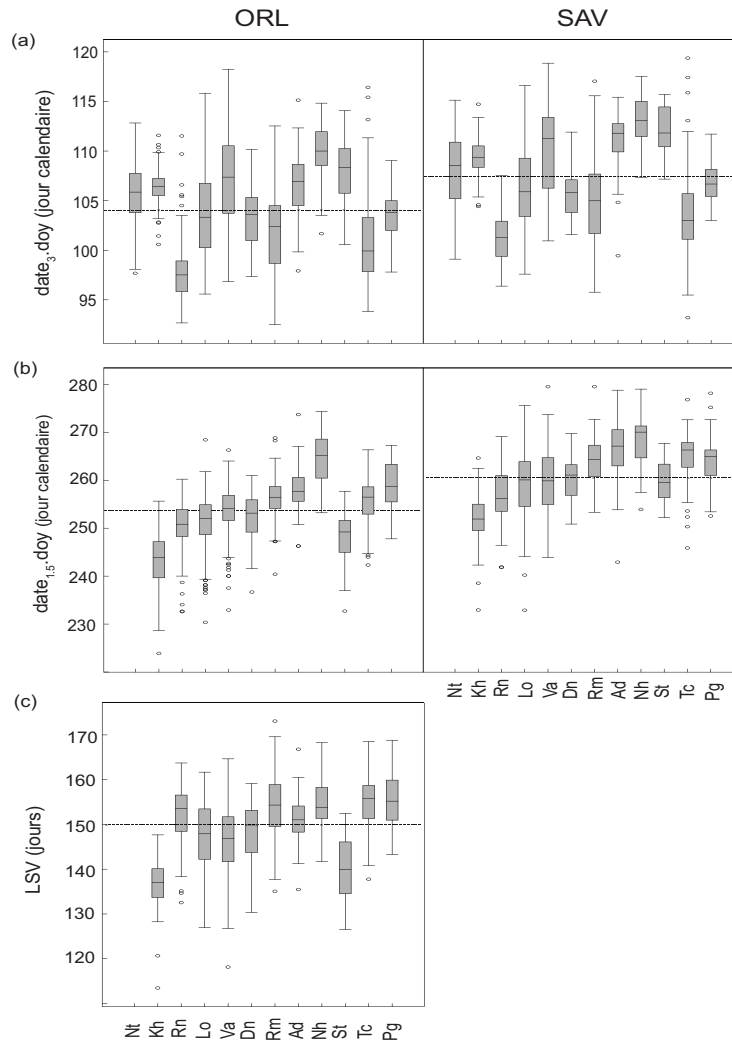


Figure 2.1.4. Variabilité phénotypique exprimée pour les caractères phénologiques au sein de 12 métapopulations de peuplier noir à Orléans (ORL) et Savigliano (SAV). Les résultats sont illustrés pour (a) la date du stade 3 de débourrement exprimée en jour calendaire ($date_{3.doy}$), (b) la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en jour calendaire ($date_{1,5.doy}$) et (c) la longueur de la saison de végétation (LSV). La longueur de la saison de végétation a été estimée comme étant la différence entre la date du stade 1,5 et la date du stade 3. À SAV, ces dates ont été déterminées pour des années différentes ; en conséquence, la longueur de la saison de végétation n'a pas pu être estimée. La métapopulation 'Netherlands' n'a pas été considérée pour la variable $date_{1,5}$ car plus de 30 % des individus de cette métapopulation avaient déjà atteint ou dépassé le stade 1,5 à la première date de mesure. Chaque boîte à pattes a été construite à partir des moyennes génotypiques et est constituée du quartile en dessous (Q1) et au-dessus (Q3) de la médiane. Les barres verticales représentent les valeurs minimales et maximales. Les valeurs extrêmes, supérieures à 1,5 fois l'espace interquartile ($Q3-Q1$), sont représentées par des cercles. Les boîtes à pattes ont été colorées en gris lorsque la variabilité génétique exprimée dans la métapopulation est significative. Les métapopulations ont été ordonnées de la gauche vers la droite par pays selon un gradient latitudinal décroissant. La ligne horizontale représente la moyenne générale pour chaque caractère dans chaque site. *Abbreviations* : Nt, Netherlands ; Kh, Kuhkopf ; Rn, Rhin ; Lo, Loire ; Va, ValAllier ; Dr, Dranse ; Rm, Ramières ; Ad, Adour ; Nh, Nohèdes ; St, Stura ; Tc, Ticino ; Pg, Paglia.

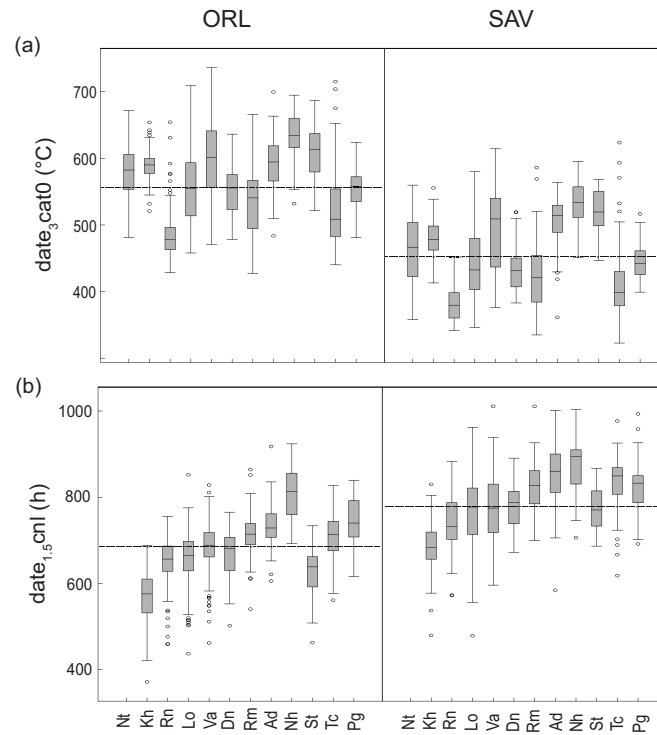


Figure 2.1.5. Variabilité phénotypique exprimée pour les caractères phénologiques au sein de 12 métapopulations de peuplier noir à Orléans (ORL) et Savigliano (SAV). Les résultats sont illustrés pour (a) la date du stade 3 de débournement exprimée en somme de températures journalières positives cumulées depuis le 1^{er} janvier ($date_{3,cat0}$) et (b) la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en durée de nuit cumulée depuis le 1^{er} juillet ($date_{1,5,cnl}$). La métapopulation ‘Netherlands’ n’a pas été considérée pour la variable $date_{1,5}$ car plus de 30 % des individus de cette métapopulation avaient déjà atteint ou dépassé le stade 1,5 à la première date de mesure. Chaque boîte à pattes a été construite à partir des moyennes génotypiques et est constituée du quartile en dessous (Q1) et au-dessus (Q3) de la médiane. Les barres verticales représentent les valeurs minimales et maximales. Les valeurs extrêmes, supérieures à 1,5 fois l’espace interquartile (Q3-Q1), sont représentées par des cercles. Les boîtes à pattes ont été colorées en gris lorsque la variabilité génétique exprimée dans la métapopulation est significative. Les métapopulations ont été ordonnées de la gauche vers la droite par pays selon un gradient latitudinal décroissant. La ligne horizontale représente la moyenne générale pour chaque caractère dans chaque site. *Abréviations* : Nt, Netherlands ; Kh, Kuhkopf ; Rn, Rhin ; Lo, Loire ; Va, ValAllier ; Dr, Dranse ; Rm, Ramières ; Ad, Adour ; Nh, Nohèdes ; St, Stura ; Tc, Ticino ; Pg, Paglia.

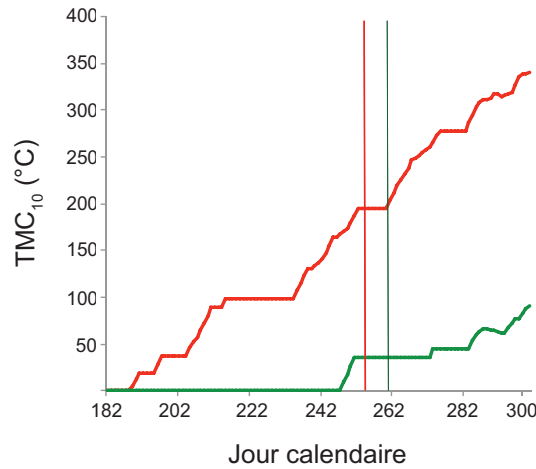


Figure 2.1.6. Évolution de la somme de températures moyennes journalières inférieures à 10°C (TMC₁₀) du 1^{er} juillet (jour 182) au 31 octobre (jour 304) 2009 pour les deux sites expérimentaux, Orléans (en rouge) et Savigliano (en vert). Les droites verticales indiquent la date à laquelle s’est produit le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal dans les deux sites expérimentaux.

3.2. Variabilité génétique intra-métapopulation et interactions $G \times S$

Des différences significatives entre génotypes ($P < 0,05$) ont été détectées pour l’ensemble des variables phénologiques au sein de chaque métapopulation étudiée (**Fig. 2.1.4**). Pour les variables $date_{3.doy}$ et $date_{1.5.doy}$, ces différences étaient significatives quel que soit le site expérimental étudié (**Fig. 2.1.4a,b**). Les valeurs d’héritabilité individuelle au sens large (H^2_{ind}) différaient entre caractères et entre métapopulations (**Fig. 2.1.7a**). De fortes valeurs d’héritabilité ont été estimées pour la date de débourrement ($date_{3.doy}$) ($0,60 \leq H^2_{ind} \leq 0,93$), alors que la date de formation du bourgeon terminal ($date_{1.5.doy}$) et la longueur de la saison de végétation (LSV) présentaient des valeurs d’héritabilité faibles à modérées ($0,23 \leq H^2_{ind} \leq 0,57$) (**Fig. 2.1.7a**). Pour le débourrement ($date_{3.doy}$), les plus fortes valeurs d’héritabilité ont été systématiquement observées pour les métapopulations ‘Netherlands’ et ‘Ticino’ ($0,83 \leq H^2_{ind} \leq 0,93$) alors que les plus faibles valeurs ont été observées pour ‘Kuhkopf’ ($H^2_{ind} \approx 0,65$). Pour la formation du bourgeon terminal ($date_{1.5.doy}$), la métapopulation ‘Kuhkopf’ présentait la plus faible valeur d’héritabilité ($H^2_{ind} = 0,23$) à ORL alors qu’elle présentait la plus forte valeur d’héritabilité à SAV ($H^2_{ind} = 0,61$). L’influence du site expérimental sur les valeurs d’héritabilité variait en fonction des caractères. En moyenne, les valeurs d’héritabilité pour $date_{3.doy}$ étaient comparables entre ORL et SAV alors qu’elles étaient supérieures à

SAV pour $\text{date}_{1,5.\text{doy}}$ (**Fig. 2.1.7a**). En moyenne, le coefficient de variation génétique (CV_G) pour la date de formation du bourgeon terminal ($\text{date}_{1,5.\text{doy}}$) était légèrement supérieur à SAV (**Fig. 2.1.7b**); cette différence, bien que minime, peut permettre d'expliquer les valeurs d'héritabilité plus élevées pour cette variable dans ce site. Pour le débourrement ($\text{date}_{3.\text{doy}}$), les valeurs de CV_G étaient comparables entre ORL et SAV, indiquant que l'amplitude de variation génétique était similaire entre sites (**Fig. 2.1.7b**).

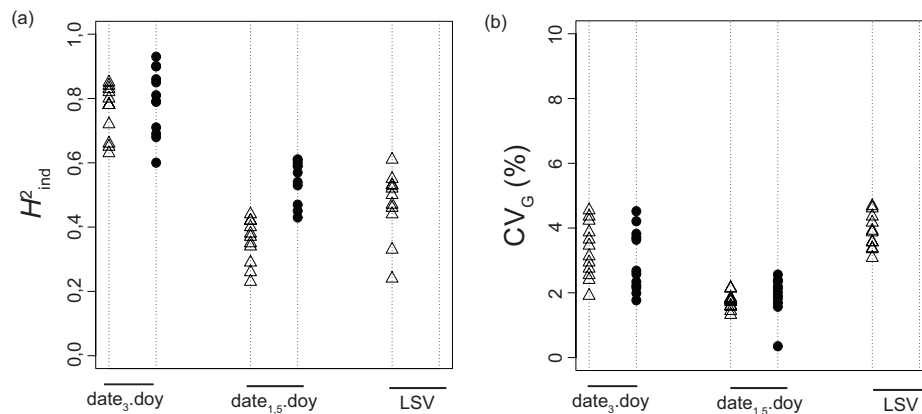


Figure 2.1.7. Héritabilité individuelle au sens-large (H^2_{ind}) (a) et coefficient de variation génétique (CV_G) (b) pour l'ensemble des variables phénologiques et des métapopulations étudiées. Pour $\text{date}_{3.\text{doy}}$ et $\text{date}_{1,5.\text{doy}}$, les valeurs de H^2_{ind} et de CV_G ont été estimées dans les deux sites expérimentaux : Orléans (triangles) et Savigliano (cercles). *Abréviations* : $\text{date}_{3.\text{doy}}$, date du stade 3 de débourrement exprimée en jour calendaire ; $\text{date}_{1,5.\text{doy}}$, date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en jour calendaire ; LSV, longueur de la saison de végétation calculée comme la différence entre $\text{date}_{1,5.\text{doy}}$ et $\text{date}_{3.\text{doy}}$.

Quelle que soit la métapopulation étudiée, des interactions $G \times S$ significatives ($P < 0,05$) ont été détectées pour la date de débourrement exprimée en somme de températures journalières positives ($\text{date}_{3.\text{cat0}}$) et la date de formation du bourgeon terminal exprimée en durée de nuit cumulée ($\text{date}_{1,5.\text{cni}}$). Pour ces deux variables, la contribution relative des effets $G \times S$ à la variabilité phénotypique était faible ($\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_P < 15 \%$) pour l'ensemble des métapopulations (**Tableau 2.1.3**). De manière générale, l'importance relative des effets $G \times S$ dans la variabilité phénotypique était inférieure aux effets génétiques (**Tableau 2.1.3**). Cependant, le rapport entre la variance d'interaction $G \times S$ et la variance génétique pour $\text{date}_{1,5.\text{cni}}$ ($0,2 \leq \sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_G \leq 1,1$) était supérieur à celui calculé pour $\text{date}_{3.\text{cat0}}$ ($0,1 \leq \sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_G \leq 0,4$) (**Tableau 2.1.3**). Le coefficient de corrélation de Spearman (r_s), calculé à partir des

moyennes génotypiques des deux sites pour $date_{3.cat0}$ et $date_{1.5.cnl}$, était significativement différent de zéro ($P < 0,05$) pour l'ensemble des métapopulations étudiées. Les valeurs prises par ce coefficient étaient fortes pour le débourrement ($date_{3.cat0}$) ($0,71 \leq r_s \leq 0,92$) alors qu'elles variaient considérablement entre métapopulations pour la formation du bourgeon terminal ($date_{1.5.cnl}$) ($0,27 \leq r_s \leq 0,71$) (**Tableau 2.1.3**). Pour les métapopulations 'Stura', 'Kuhkopf' et 'Dranse', le coefficient de corrélation de Spearman, calculé à partir des moyennes génotypiques pour $date_{1.5.cnl}$, était faible ($r_s < 0,35$) alors qu'il était modéré ou fort pour les autres métapopulations ($0,44 \leq r_s \leq 0,70$). Pour ces trois métapopulations, les patrons de plasticité phénotypique pour $date_{1.5.cnl}$ ont été appréciés par examen graphique (**Fig. 2.1.8**). Une importante variabilité des patrons de plasticité a été observée au sein de ces métapopulations (**Fig. 2.1.8**). Au sein de chaque métapopulation, seulement un génotype se différenciait des autres pour le sens de la réponse plastique en formant ses bourgeons plus précocement à SAV (**Fig. 2.1.8**). Ainsi, la majorité des génotypes ont formé leur bourgeon plus tard à SAV qu'à ORL et se différenciaient essentiellement pour l'amplitude de leur réponse plastique (**Fig. 2.1.8**). En fonction des génotypes, le bourgeon terminal s'est formé à SAV pour une durée de nuit cumulée supérieure de 3 à 261 h à celle observée à ORL.

Tableau 2.1.3. Composantes de la variabilité phénotypique et stabilité du classement des génotypes entre sites expérimentaux pour la date du stade 3 de débourrement exprimée en somme de températures journalières positives ($date_{3.cat0}$) et pour la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en durée de nuit cumulée ($date_{1.5.cnl}$).

Variable	Composantes de la variance / r_s	$N_{Metapop}$	Médiane	Min. - Max.
<i>date_{3.cat0}</i>				
	$\%(\sigma^2_s / \sigma^2_p)$	12	71,6	62,7 - 82,3
	$\%(\sigma^2_G / \sigma^2_p)$	12	21,5	8,7 - 29,6
	$\%(\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_p)$	12	3,5	1,6 - 5,2
	$\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_G$	12	0,2	0,1 - 0,4
	r_s	12	0,79	0,71 - 0,92
<i>date_{1.5.cnl}</i>				
	$\%(\sigma^2_s / \sigma^2_p)$	11	45,8	25,2 - 59,4
	$\%(\sigma^2_G / \sigma^2_p)$	11	14,3	7 - 23,2
	$\%(\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_p)$	11	7,9	4,4 - 12,4
	$\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_G$	11	0,6	0,2 - 1,1
	r_s	11	0,44	0,27 - 0,71

Abréviations : σ^2_s , variance expliquée par les différences entre sites ; σ^2_G , variance génétique ; $\sigma^2_{G \times S}$, variance d'interaction Génotype \times Site ; σ^2_p , variance phénotypique ; $N_{Metapop}$, nombre de métapopulations pour lesquelles les composantes de la variance et le coefficient de corrélation de Spearman (r_s) ont été estimés.

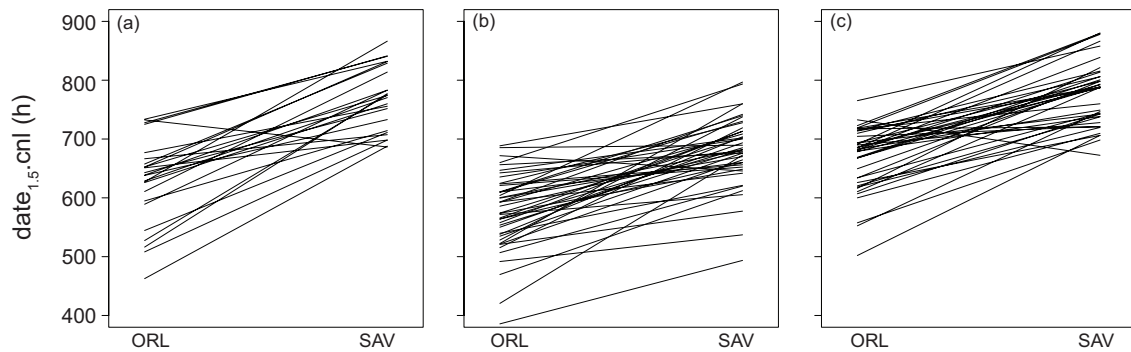


Figure 2.1.8. Patterns de plasticité phénotypique des génotypes pour la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en durée de nuit cumulée ($date_{1.5}.cnl$) en réponse à des variations de conditions de croissance entre Orléans (ORL) et Savigliano (SAV). Les résultats ont été illustrés pour trois métapopulations, (a) 'Stura', (b) 'Kuhkopf' et (c) 'Dranse', qui présentaient un faible coefficient de corrélation de Spearman pour la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal.

3.3. Différenciation génétique entre métapopulations

Des différences significatives entre métapopulations ($P < 0,05$) ont été détectées pour l'ensemble des variables phénologiques (**Fig. 2.1.4**). Pour le débourrement ($date_3.doy$) et la formation du bourgeon terminal ($date_{1.5}.doy$), ces différences étaient significatives dans les deux sites expérimentaux. Le pourcentage de variance phénotypique expliquée par ces différences variait de 33 % à 46 % en fonction des variables (**Fig. 2.1.9**). Pour le débourrement ($date_3.doy$) et la formation du bourgeon terminal ($date_{1.5}.doy$), le pourcentage de variance phénotypique expliquée par les différences entre métapopulations différait entre sites : il était supérieur à SAV pour le débourrement ($date_3.doy$) (46 % *vs.* 36 %) alors qu'il était inférieur à SAV pour la formation du bourgeon terminal ($date_{1.5}.doy$) (28 % *vs.* 36 %) (**Fig. 2.1.9**). Le coefficient de corrélation de Spearman, calculé à partir des moyennes des métapopulations dans les deux sites pour $date_3.cat0$ et $date_{1.5}.cnl$, était significativement différent de zéro ($P < 0,001$) et fort ($r_s \geq 0,90$), indiquant que le classement des métapopulations pour la date de débourrement et la date de formation du bourgeon terminal était fortement conservé entre sites expérimentaux (**Fig. 2.1.10**).

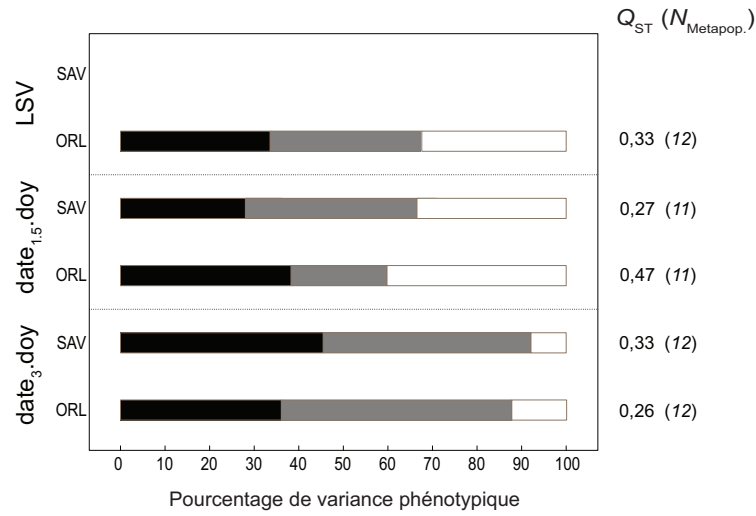


Figure 2.1.9. Décomposition de la variabilité phénotypique exprimée pour les caractères phénologiques à Orléans (ORL) et Savigliano (SAV). La longueur de la saison de végétation n'a pas été estimée à Savigliano. Les barres d'histogramme représentent les composantes de la variance phénotypique : la variance génétique (barres noires et grises) et variance résiduelle (barres blanches). La variance génétique a été décomposée en effets génétiques inter- et intra-métapopulations (barres noires et grises respectivement). Le coefficient de différenciation génétique des métapopulations (Q_{ST}) ainsi que le nombre de métapopulations ($N_{Metapop.}$) à partir desquelles ont été calculées les valeurs de Q_{ST} sont indiqués pour chaque caractère. *Abbreviations* : date₃.doy, date du stade 3 de débourrement exprimée en jour calendaire ; date_{1,5}.doy, date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en jour calendaire ; LSV, longueur de la saison de végétation.

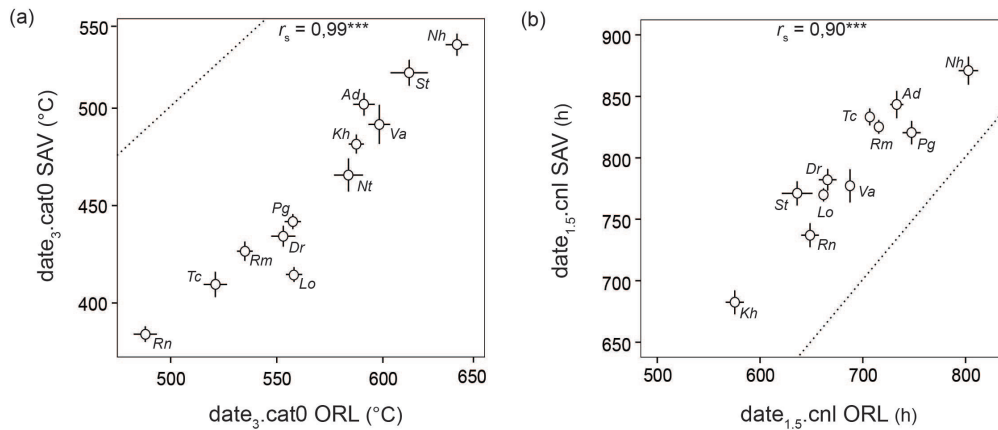


Figure 2.1.10. Stabilité du classement des métapopulations pour la date du stade 3 de débournement exprimée en somme de températures journalières positives (date_{3.cat0}) et la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en durée de nuit cumulée (date_{1.5.cnl}) entre sites expérimentaux, Orléans (ORL) et Savigliano (SAV). Chaque point représente la moyenne d'une métapopulation et son erreur standard. Le code lettre de chaque métapopulation est indiqué à côté de chaque point. La droite en pointillés représente la relation 1:1. Le coefficient de corrélation de Spearman (r_s) a été calculé à partir des moyennes des métapopulations. Le niveau de significativité est : *** $P < 0,001$. *Abréviations* : Ad, Adour ; Dr, Dranse ; Kh, Kuhkopf ; Lo, Loire ; Nh, Nohèdes ; Nt, Netherlands ; Pg, Paglia ; Rm, Ramières ; Rn, Rhin ; St, Stura ; Tc, Ticino ; Va, ValAllier.

Le coefficient de différenciation génétique des métapopulations (Q_{ST}) était modéré (0,26) à fort (0,47) selon les variables phénologiques étudiées (**Fig. 2.1.9**). Pour date_{3.doy} et date_{1.5.doy}, le niveau de différenciation génétique des métapopulations variait en fonction du site expérimental : le Q_{ST} était supérieur à SAV pour date_{3.doy} (0,33 vs. 0,26) alors qu'il était inférieur à SAV pour date_{1.5.doy} (0,27 vs. 0,47) (**Fig. 2.1.9**). Pour ces deux variables phénologiques, les patrons de différenciation génétique des métapopulations étaient fortement conservés entre sites expérimentaux (**Fig. 2.1.4a,b**). Pour la variable date_{1.5.doy}, les différences entre métapopulations se structuraient selon un gradient latitudinal : les métapopulations les plus méridionales, telles que 'Paglia' et 'Ticino', présentaient, à ORL et SAV, une formation du bourgeon terminal significativement plus tardive que les métapopulations septentrionales, telles que 'Kuhkopf', 'Rhin' ou encore 'Netherlands' qui n'avait pas été incluse dans l'analyse car plus de 30 % des individus avaient atteint le stade 1,5 à la première date de mesure (**Fig. 2.1.4b**). Une forte corrélation positive ($r_p \geq 0,85$, $P < 0,05$) a été détectée entre la durée de nuit cumulée sur la période de juillet à septembre dans les sites d'origine des métapopulations et la date du stade 1,5 de formation du bourgeon

terminal à ORL et SAV (**Tableau 2.1.4**). Une relation significative a également été observée, à Orléans uniquement, entre la date du stade 1,5 et, d'une part, la température du mois le plus froid ($r_p = 0,71$, $P < 0,05$) et, d'autre part, le nombre de jours dans l'année où la température moyenne est inférieure à 0°C ($r_p = -0,67$, $P < 0,05$) (**Tableau 2.1.4**). Pour la variable $date_{3,doy}$, le patron de différenciation génétique des métapopulations ne pouvait être résumé à des gradients environnementaux simples, de type latitude ou longitude (**Fig. 2.1.4a**, **Tableau 2.1.4**). Une corrélation positive ($r_p = 0,59$ à ORL et 0,63 à SAV, $P < 0,05$) a été détectée entre l'altitude d'origine des métapopulations et la date du stade 3 de débourrement à ORL et SAV (**Tableau 2.1.4**). Cependant, cette relation était essentiellement expliquée par le fait que les métapopulations issues de hautes altitudes (*i.e.*, 'Nohèdes' et 'Stura') présentaient systématiquement un débourrement tardif (**Fig. 2.1.4a**). Bien que ces relations ne soient pas significatives, la date du stade 3 de débourrement tendait à être négativement corrélée ($-0,44 \leq r_p \leq -0,47$, $P > 0,05$) avec les paramètres géographiques et climatiques en lien avec le degré de continentalité (*i.e.*, longitude, température moyenne du mois le plus chaud et indice de continentalité) des sites d'origine des métapopulations (**Tableau 2.1.4**, **Fig. 2.1.11**). Le débourrement le plus précoce était alors observé pour la métapopulation 'Ticino', alors que les métapopulations 'Netherlands' et 'Adour' présentaient le débourrement le plus tardif.

Tableau 2.1.4. Relations entre les paramètres géographiques et climatiques des sites d'origine des métapopulations et la date du stade 3 de débourrement ($date_{3,doy}$) et la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal ($date_{1,5,doy}$), exprimées en jour calendaire, à Orléans (ORL) et Savigliano (SAV).

	$date_{3,doy}$		$date_{1,5,doy}$	
	ORL	SAV	ORL	SAV
Lat.	-0,19	-0,28	-0,85	-0,90
Long.	-0,44	-0,45	-0,29	-0,33
Alt.	0,59	0,63	0,20	0,27
DNC	0,16	0,25	0,85	0,91
T_{Moy}	-0,30	-0,29	0,55	0,56
T_{Min}	-0,36	-0,35	0,55	0,53
T_{Max}	-0,24	-0,18	0,58	0,58
TMMF	0,12	0,16	0,71	0,60
TMMC	-0,47	-0,47	0,36	0,40
FF	0,28	0,28	-0,67	-0,59
IC	-0,45	-0,44	-0,03	0,12
P	-0,13	-0,11	0,27	0,50
IA	-0,22	-0,23	0,01	0,20

Les corrélations significatives au risque d'erreur de 5 % sont indiquées en gras. *Abréviations* : Lat., latitude ; Long., longitude ; Alt., altitude ; DNC, durée de nuit cumulée depuis le 1^{er} juillet ; T_{Moy} , température annuelle moyenne ; T_{Min} , température annuelle minimale ; T_{Max} , température annuelle maximale ; TMMF, température moyenne du mois le plus froid ; TMMC, température moyenne du mois le plus chaud ; FF, nombre de jours dans l'année où la température moyenne est inférieure à 0°C ; IC, indice de continentalité ; P , précipitations annuelles ; IA, indice d'aridité.

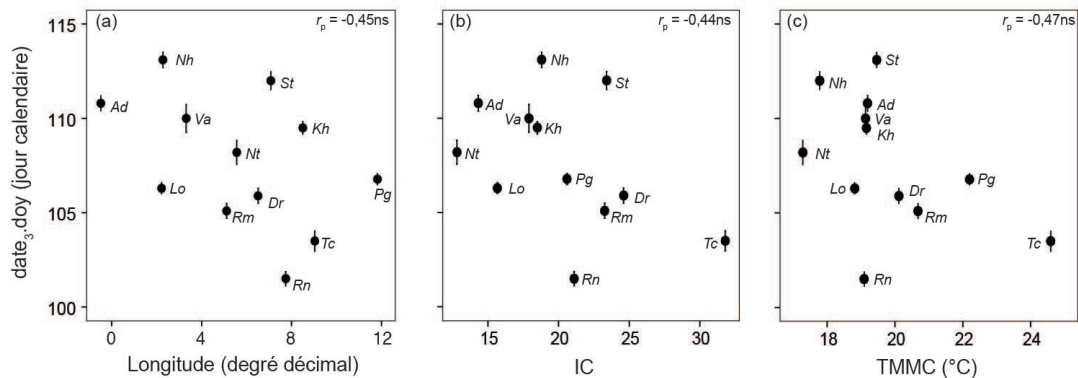


Figure 2.1.11. Relations entre la date du stade 3 de débourrement exprimée en jour calendaire ($date_{3,doy}$) et (a) la longitude, (b) l'indice de continentalité (IC) et (c) la température moyenne du mois le plus chaud (TMMC) des sites d'origine des métapopulations de peuplier noir. Les relations ont été évaluées à partir des moyennes de métapopulations observées dans le site expérimental à Savigliano, dans lequel le niveau de différenciation génétique des métapopulations pour la date du stade 3 était supérieur à celui observé à Orléans. Chaque point représente la moyenne d'une métapopulation et son erreur standard. Le coefficient de corrélation linéaire de Pearson (r_p) a été calculé à partir des moyennes des métapopulations. Le niveau de significativité est : ns, non-significatif au risque d'erreur de 5 %. Le code lettre des métapopulations est indiqué à côté de chaque point. *Abréviations* : Ad, Adour ; Dr, Dranse ; Kh, Kuhkopf ; Lo, Loire ; Nh, Nohèdes ; Nt, Netherlands ; Pg, Paglia ; Rm, Ramières ; Rn, Rhin ; St, Stura ; Tc, Ticino ; Va, ValAllier.

3.4. Relations phénotypiques entre caractères

Les relations phénotypiques entre caractères phénoLOGIQUES ont été évaluées à partir des moyennes génotypiques pour une même saison de végétation à ORL, correspondant à la deuxième année de croissance après plantation (**Fig. 2.1.12**). La relation entre la date de débourrement ($date_{3,doy}$) et la date de formation du bourgeon terminal ($date_{1,5,doy}$) était non-significative ($P > 0,05$) ou faible ($r_p = -0,31$, $P < 0,001$) pour l'ensemble des métapopulations étudiées (**Fig. 2.1.12a**). La longueur de la saison de végétation (LSV) était plus fortement corrélée à la date de formation du bourgeon terminal ($date_{1,5,doy}$) ($0,65 \leq r_p \leq 0,95$, $P < 0,001$; **Fig. 2.1.12c**) qu'à la date de débourrement ($date_{3,doy}$) ($-0,35 \leq r_p \leq -0,82$, $P < 0,05$; **Fig. 2.1.12b**). La relation entre LSV et $date_{3,doy}$ ou $date_{1,5,doy}$ ne décrivait aucune tendance selon la précocité ou la tardiveté du débourrement et de la formation du bourgeon terminal au sein des métapopulations (**Fig. 2.1.12b,c**).

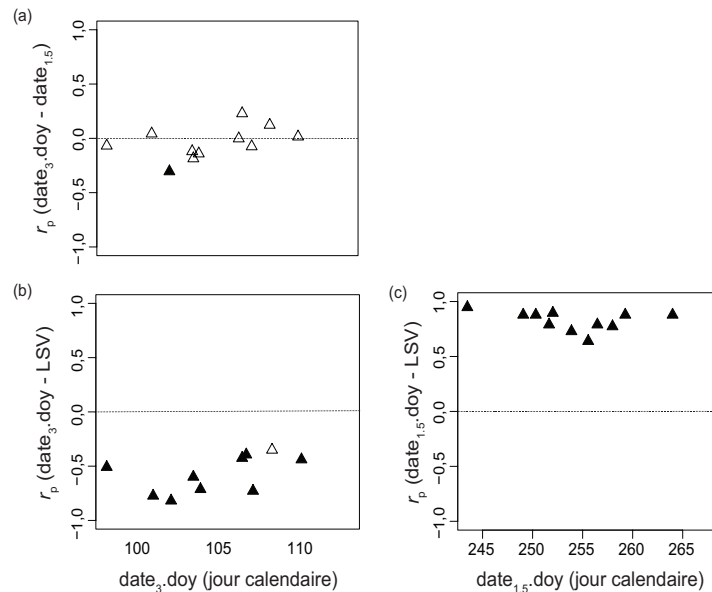


Figure 2.1.12. Relations phénotypiques entre caractères phénologiques pour l'ensemble des métapopulations étudiées dans le site expérimental d'Orléans. Les résultats sont illustrés pour (a) la relation entre la date du stade 3 de débourrement ($date_3.doy$) et la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimées en jour calendaire ($date_{1,5}.doy$), (b) et (c) la relation entre la longueur de la saison de végétation (LSV) et la date du stade 3 de débourrement et la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal. Chaque point représente la valeur prise par le coefficient de corrélation de Pearson (r_p) dans une métapopulation. Les valeurs de r_p ont été calculées à partir des moyennes génotypiques. Les relations significatives au risque d'erreur de 5 % sont indiquées par des triangles pleins noirs.

4. Discussion

4.1. Variabilité génétique et patrons de différenciation génétique pour la phénologie de croissance chez *P. nigra*

Pour l'ensemble des métapopulations étudiées, une variabilité génétique significative était exprimée pour la date de débourrement, la date de formation du bourgeon terminal et la longueur de la saison de végétation. L'importance relative des effets génétiques dans l'expression de la variabilité phénotypique distinguait clairement la phénologie printanière de la phénologie automnale. De fortes valeurs d'héritabilité individuelle au sens large ont été observées pour la date de débourrement, indiquant que ce caractère était sous un fort contrôle génétique et une faible influence micro-environnementale. En revanche, des valeurs d'héritabilité modérées ont été observées pour la date de formation du bourgeon terminal et

peuvent s'expliquer par une plus faible précision de la mesure et une plus forte influence micro-environnementale. L'échelle de notation utilisée pour le suivi de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal chez le peuplier noir utilise des stades particuliers choisis au cours d'un processus continu (Rohde et al., 2011b; Fabbrini et al., 2012). Ces stades se différencient par des variations subtiles de la morphologie du bourgeon qui peuvent être sujettes à des erreurs d'appréciation. Par ailleurs, l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon sont influencées par de nombreux facteurs biotiques, tels que la réduction de surface photosynthétique par des agents pathogènes ou la compétition entre individus voisins, ainsi que par des facteurs abiotiques, tels que la température de l'air ou la disponibilité en eau du sol (Dunlap and Stettler, 1996; Howe et al., 2003; Pellis et al., 2004; Rohde et al., 2011a). Dans une étude réalisée au sein de 14 populations naturelles de peuplier noir, Rohde et al. (2011b) ont rapporté une forte valeur d'héritabilité individuelle au sens large pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal ($H^2_{ind} = 0,85$). Cependant, cette valeur d'héritabilité a été obtenue en tenant compte de la variabilité génétique exprimée au niveau intra- et inter-populations et surestime, par rapport à notre étude, l'ampleur du contrôle génétique sur l'expression de la variabilité phénotypique intra-population.

Bien qu'une importante variabilité génétique a été détectée au niveau intra-métapopulation, nous avons mis en évidence une différenciation génétique significative des métapopulations de peuplier noir pour la date de débourrement et la date de formation du bourgeon terminal. La lecture du comportement des génotypes pour ces deux caractères phénologiques dans des conditions expérimentales contrastées nous a permis de juger de la robustesse des patrons de différenciation génétique.

Notre étude est la première à évaluer le niveau de différenciation génétique de populations naturelles de peuplier noir pour la date de débourrement. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence que les métapopulations étudiées présentaient un niveau de différenciation génétique modéré pour ce caractère phénologique ($Q_{ST} = 0,26$ pour ORL et 0,33 pour SAV). Bien que le niveau de différenciation génétique variait entre sites expérimentaux, le patron de différenciation génétique des métapopulations pour la date de débourrement était fortement conservé entre conditions expérimentales. Chez de nombreuses espèces forestières de régions tempérées, le débourrement a été montré comme étant, en partie, influencé par les températures printanières, dont la variabilité à l'échelle de l'aire de répartition des espèces ne peut être simplement décrite par un gradient environnemental simple de type latitude,

longitude ou altitude. Dans notre étude, le patron de différenciation génétique des métapopulations pour la date de débourrement ne pouvait être résumé à l'expression d'un gradient géographique simple. Cependant, nous avons pu mettre en évidence que la date de débourrement tendait à être corrélée avec les variables géographiques et climatiques décrivant le degré de continentalité (*i.e.*, la longitude, la température moyenne du mois le plus chaud et l'indice de continentalité) des sites d'origine des métapopulations. Ainsi, les métapopulations issues de sites continentaux (*e.g.*, 'Ticino'), caractérisés par une accumulation rapide de températures chaudes au printemps, présentaient un débourrement précoce. La difficulté de mettre en évidence des relations significatives entre la date de débourrement et les paramètres climatiques des sites d'origine des métapopulations repose sur le fait que ces paramètres climatiques ne reflètent que des moyennes annuelles et ne permettent donc pas d'avoir une vision précise des déterminismes environnementaux associés à la levée de l'endormance et de l'écodormance. Au sein du genre *Populus*, la relation entre la date de débourrement et les paramètres climatiques des sites d'origine des populations varie considérablement selon l'espèce étudiée et selon le nombre de populations et d'individus échantillonnés. Récemment, dans une étude réalisée au sein d'une collection de 544 génotypes appartenant à 16 populations naturelles de *P. trichocarpa*, Evans et al. (2014) ont mis en évidence une relation négative entre la date de débourrement et la température moyenne des sites d'origine des populations. Le débourrement le plus précoce était alors observé pour les populations issues de sites peu exposés aux risques de gelées printanières tardives. En revanche, McKown et al. (2014a) n'ont détecté aucune relation entre ces variables dans une collection de 431 génotypes échantillonnés dans 136 populations naturelles de *P. trichocarpa*. Chez *P. balsamifera*, une relation positive a été détectée entre la date de débourrement et les variables thermiques des sites d'origine de 20 populations naturelles (Keller et al., 2011). Chez les autres espèces forestières, les études réalisées ont également rapporté des résultats contrastés : certaines études mettent en évidence que les populations issus de climats relativement cléments ont un débourrement précoce alors que d'autres études mettent en évidence une tendance inverse (voir Alberto et al., 2013a pour une revue). Ces résultats contrastés peuvent être en partie expliqués par des différences de compromis entre l'évitement des gelées printanières tardives et l'exploitation maximale de la saison de végétation entre espèces (Alberto et al., 2013a).

Le niveau de différenciation génétique des métapopulations de peuplier noir pour la date de formation du bourgeon terminal variait considérablement entre sites expérimentaux.

De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence que la valeur de Q_{ST} pour ce caractère était nettement supérieure à ORL. Le site expérimental à ORL n'a bénéficié d'aucun traitement fongicide, le dispositif étant également utilisé pour l'étude de la sensibilité à la rouille foliaire à *Melampsora larici-populina* (*Mlp*). Chez le peuplier noir, la variabilité génétique exprimée pour la sensibilité à ce champignon phytopathogène décrit des patrons de différenciation comparables à ceux observés pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal : les populations les plus précoces pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal sont également les plus sensibles à la rouille foliaire à *Mlp* (C. Bastien, comm. pers.). L'attaque par la rouille foliaire à *Mlp* à ORL est donc susceptible d'avoir exacerbé les différences entre métapopulations pour la formation du bourgeon terminal, les premiers symptômes importants de cette attaque fongique apparaissant fin août-début septembre. Chez *P. trichocarpa*, Dunlap and Stettler (1996) ont également mis en évidence que l'infection par la rouille foliaire à *Melampsora occidentalis* accentuait les différences entre populations pour la date de formation du bourgeon terminal et la date de sénescence foliaire.

Dans une étude réalisée au sein de 14 populations naturelles de peuplier noir, distribuées sur une partie du gradient échantillonné dans notre étude, Rohde et al. (2011b) ont mis en évidence une forte différenciation génétique des populations pour la date d'arrêt de croissance et de formation du bourgeon terminal, avec des valeurs de Q_{ST} proches de 0,60. Ces valeurs de Q_{ST} sont supérieures à celle observée pour la date de formation du bourgeon terminal dans notre étude. Ces résultats contrastés peuvent être en partie expliqués par le fait que la métapopulation la plus précoce pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal (*i.e.*, 'Netherlands') n'a pas été considérée pour l'estimation du Q_{ST} car il avait été impossible, du fait de sa précocité, d'estimer avec précision la date à laquelle s'était produit le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal.

Comme pour le débourrement, le patron de différenciation génétique des métapopulations de peuplier noir pour la date de formation du bourgeon terminal était fortement conservé entre sites expérimentaux. Les différences entre métapopulations se structuraient selon un gradient latitudinal photopériodique. Ainsi, les métapopulations qui ont fait l'objet d'un transfert vers des latitudes plus basses formaient leur bourgeon terminal plus précocement que les métapopulations qui ont été transférées vers de plus hautes latitudes. Ces résultats s'ajoutent aux observations qui ont été réalisées chez des espèces du genre *Populus*,

ainsi que chez d'autres espèces forestières, qui mettent en évidence une différenciation latitudinale des populations pour la phénologie automnale, suggérant une adaptation locale aux conditions de photopériode (Morgenstern, 1969; Farmer, 1993; Li et al., 1997a; Mimura and Aitken, 2007; Notivol et al., 2007; Luquez et al., 2008; Keller et al., 2011; Rohde et al., 2011b). L'identification de signatures sélectives moléculaires dans des gènes ou régions génomiques impliqués dans le contrôle de la phénologie automnale a permis de confirmer, chez certaines espèces forestières, l'adaptation locale et d'explorer ses bases génétiques (Ingvarsson et al., 2006; Chen et al., 2012; Evans et al., 2014).

4.2. Stabilité de l'expression de la variabilité génétique intra-métapopulation entre sites expérimentaux

La lecture de la variabilité phénotypique exprimée pour le débourrement et la formation du bourgeon terminal dans des conditions expérimentales contrastées nous a permis d'évaluer et de décomposer la plasticité phénotypique en un effet 'site' et un effet d'interaction $G \times S$. D'un point de vue théorique, l'évaluation des interactions $G \times S$ au sein des populations naturelles permet de juger de l'influence des conditions expérimentales sur l'expression de la variabilité génétique.

Pour le débourrement, nous avons pu mettre en évidence que l'effet 'site' expliquait une part prépondérante de la variabilité phénotypique exprimée pour ce caractère au sein des métapopulations de peuplier noir (*i.e.*, 62,7 à 83,2 % de la variabilité phénotypique). Pour l'ensemble des métapopulations étudiées, le débourrement s'est produit à SAV après accumulation d'une plus faible somme de températures journalières positives. Ce résultat peut être en partie expliqué par les conditions climatiques qui caractérisent chacun des sites expérimentaux. En effet, SAV est caractérisé par un degré de continentalité plus élevé, ce qui se traduit par une accumulation rapide de températures chaudes au printemps, favorisant ainsi le débourrement. Deux études précédemment réalisées au sein de populations naturelles de *P. tremula* et *P. balsamifera* avaient déjà permis de révéler une forte plasticité du débourrement en réponse à des variations de température entre sites expérimentaux (Luquez et al., 2008; Soolanayakanahally et al., 2012). Ces études avaient alors mis en évidence une avancée de la date de débourrement avec l'augmentation de températures entre sites. Chez certaines espèces forestières, la plasticité du débourrement en réponse à des variations de température a été évaluée le long de gradients altitudinaux qui permettent de maximiser l'amplitude de

variation thermique sur une faible distance (Worrall, 1983; Vitasse et al., 2009b; Vitasse et al., 2010). Ces études ont toutes mis en évidence une forte plasticité du débournement en réponse à une augmentation de température, avec une avancée de la date de débournement variant entre deux à huit jours par degré selon l'espèce et les populations étudiées. De manière plus générale, l'avancée de la date de débournement des arbres forestiers en réponse à l'augmentation de la température annuelle moyenne accompagnant les modifications climatiques constitue l'illustration la plus flagrante de la plasticité phénotypique de ce caractère en réponse à des variations de température (Menzel and Fabian, 1999; Menzel et al., 2006; Parmesan, 2006; Cleland et al., 2007).

Nos résultats ont mis en évidence l'existence d'interactions $G \times S$ significatives pour la date de débournement au sein de l'ensemble des métapopulations étudiées, ce qui indique l'existence d'une variabilité génétique de la plasticité phénotypique. Toutefois, ces interactions expliquaient une faible part de la variabilité phénotypique pour le débournement ; cette part était inférieure à celle expliquée par les effets génétiques. Fondamentalement, les interactions $G \times S$ peuvent être expliquées par des modifications du classement des géotypes entre sites expérimentaux et/ou par une amplitude de réponse variable selon les géotypes. Dans notre étude, les fortes valeurs prises par le coefficient de corrélation de Spearman pour la date de débournement indiquent que le classement des géotypes était fortement conservé entre sites expérimentaux pour l'ensemble des métapopulations étudiées. Ainsi, le sens et l'amplitude de la réponse plastique pour la date de débournement variaient peu entre géotypes au sein des métapopulations. À ce jour, peu d'études ont évalué la variabilité génétique de la plasticité phénotypique pour le débournement au sein de populations naturelles de peuplier. À notre connaissance, seule une étude réalisée par Luquez et al. (2008) a mis en évidence que la variabilité génétique de la plasticité phénotypique expliquait une faible part de la variabilité phénotypique exprimée pour le débournement au sein de populations naturelles de *P. tremula*. Au niveau populationnel, les études réalisées par Worrall (1983) et Vitasse et al. (2010) au sein de populations de chêne, de hêtre, de frêne et de sapin gracieux ont mis en évidence que le sens et l'amplitude de la réponse plastique du débournement à des variations de température étaient comparables entre populations, quelle que soit l'espèce étudiée.

Dans notre étude, nous avons également pu mettre en évidence que la formation du bourgeon terminal s'était produite plus précocement à ORL, pour une durée de nuit cumulée

inférieure à celle observée à SAV. Ce résultat indique que, dans notre étude, la photopériode n'était pas le seul déterminant de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal au sein des métapopulations de peuplier noir. Le décalage de la date de formation du bourgeon terminal entre sites expérimentaux peut alors être expliquée par une interaction du régime photopériodique avec les conditions pédoclimatiques propres à chaque site expérimental au cours de l'année d'étude. Rohde et al. (2011a) ont mis en évidence chez des hybrides interspécifiques de peuplier que les températures chaudes en fin de saison de végétation diminuaient la sensibilité du méristème apical au signal photopériodique, retardant ainsi l'arrêt de croissance, mais qu'une fois l'arrêt de croissance induit, elles accélèrent la formation du bourgeon terminal. À la fin de l'été 2009, le site expérimental à SAV a bénéficié de températures journalières supérieures à celles observées à ORL. La date à laquelle la formation du bourgeon terminal s'est produite reflète à la fois la date à laquelle s'est produit l'arrêt de croissance mais également la durée nécessaire pour la formation du bourgeon terminal. Le décalage de la date de formation du bourgeon terminal à SAV peut donc être en partie expliquée par l'effet des températures chaudes en fin de saison de végétation qui sont susceptibles d'avoir retarder l'arrêt de croissance mais qui, une fois l'arrêt de croissance initié, ont accéléré la formation du bourgeon terminal. Les différences de calage de la phénologie automnale entre ORL et SAV peuvent également être expliquées par des différences de conditions de croissance et des différences de gestion des sites expérimentaux. En effet, l'absence de traitements fongicides à ORL a permis l'infection des plants par la rouille foliaire à *Mlp*. L'infection naturelle par cette rouille foliaire se développe de façon marquée fin août-début septembre lorsque les conditions de température et d'hygrométrie matinales sont favorables au développement du champignon. Les attaques par la rouille foliaire à *Mlp* sont connues pour induire un arrêt de croissance et une formation du bourgeon terminal précoces dans différents pedigrees de peuplier (C. Bastien, comm. pers.). Enfin, le faible niveau de fertilité du sol a également pu s'ajouter aux effets de température et d'attaque par la rouille foliaire à *Mlp* pour induire un arrêt de croissance et une formation du bourgeon terminal précoces (Howe et al., 2003).

Des interactions $G \times S$ significatives ont été détectées pour la date de formation du bourgeon terminal au sein des métapopulations, suggérant que les génotypes différaient dans leur réponse plastique. Contrairement à ce qui avait été observé pour le débourrement, la contribution relative de ces effets d'interaction $G \times S$ dans la variabilité phénotypique exprimée pour la formation du bourgeon terminal pouvait être supérieure à celle des effets

génétiques. Par ailleurs, les coefficients de corrélation de Spearman, calculés à partir des moyennes génotypiques des deux sites expérimentaux pour la date de formation du bourgeon terminal, prenaient des valeurs modérées voire faibles dans certaines métapopulations. Ceci indique l'existence d'une forte variabilité de l'amplitude de la réponse plastique entre génotypes au sein de ces métapopulations aboutissant à une modification des classements génotypiques entre sites. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par Fabbrini et al. (2012) qui avaient mis en évidence, au sein d'une famille de plein-frères de peuplier noir, une variabilité de l'amplitude de la réponse plastique pour l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal face à des variations de conditions climatiques entre sites expérimentaux. Chez *P. tremula*, Luquez et al. (2008) avaient mis en évidence que le classement génotypique pour la date de formation du bourgeon terminal était fortement conservé entre sites expérimentaux. Cependant, dans cette étude, les coefficients de corrélation de Spearman avaient été calculés à partir des moyennes génotypiques de l'ensemble des populations étudiées et confondaient donc le classement des génotypes au niveau intra-population et le classement des populations.

4.3. Relations entre caractères phénologiques

Le potentiel de réponse génétique des populations naturelles face à des variations environnementales dépend du réservoir de variabilité génétique présent dans les populations naturelles mais également des corrélations génétiques entre caractères phénotypiques qui peuvent contraindre ou, au contraire, faciliter la réponse des populations (Etterson and Shaw, 2001). Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence que la part relative des effets génétiques sur l'expression de la variabilité phénotypique au niveau intra-métapopulation, les patrons de différenciation génétique et les composantes de la plasticité phénotypique étaient différents pour le débourrement et la formation du bourgeon terminal. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que ces deux caractères phénologiques sont *a priori* découplés chez *P. nigra*. Cette hypothèse était davantage confirmée par l'absence de relations significatives entre le calage du débourrement et de la formation du bourgeon terminal au sein des métapopulations étudiées. Les métapopulations de peuplier noir maintenaient donc une importante variabilité génétique pour des caractères phénologiques, *a priori*, indépendants, ce qui permettait de maintenir une diversité de combinaisons phénologiques et une importante variabilité pour la longueur de la saison de végétation. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus chez différents hybrides interspécifiques de peuplier pour lesquels

aucune relation significative entre la phénologie printanière et la phénologie automnale n'avait pu être détectée (Marron et al., 2010; Toillon et al., 2013).

5. Conclusions

Cette étude a permis d'évaluer et de décomposer la variabilité phénotypique exprimée pour le débourrement et la formation du bourgeon terminal au sein d'une collection européenne de populations naturelles de peuplier noir distribuées sur un gradient latitudinal et couvrant une variabilité de conditions climatiques. Quelles que soient les conditions environnementales, les métapopulations de peuplier noir maintenaient une importante variabilité génétique pour la date de débourrement et la date de formation du bourgeon terminal. L'absence de relations phénotypiques significatives entre ces deux caractères phénologiques suggérait que ces caractères étaient, *a priori*, découplés au sein des métapopulations, permettant le maintien d'une diversité de combinaisons phénologiques et le maintien d'une variabilité génétique pour la longueur de la saison de végétation. Nos résultats ont permis de révéler une différenciation génétique robuste des métapopulations de peuplier noir pour les caractères phénologiques malgré les variations des conditions de croissance. Pour la formation du bourgeon terminal, le patron de différenciation génétique des métapopulations suggérait une adaptation locale aux conditions photopériodiques. En revanche, le patron observé pour le débourrement était plus complexe mais semblait suggérer une adaptation des métapopulations aux conditions de température auxquelles elles sont exposées dans leur site d'origine. L'identification de signatures sélectives dans des gènes ou régions génomiques candidats pour ces caractères phénologiques devrait permettre de confirmer la nature adaptative des différenciations observées. Enfin, nous avons pu mettre en évidence une forte plasticité phénotypique de la date de débourrement et de la date de formation du bourgeon terminal en réponse à des variations des conditions de croissance et des conditions climatiques entre sites expérimentaux. Les composantes de la plasticité phénotypique (*i.e.*, effet 'site' et effet d'interactions $G \times S$) étaient cependant différentes pour le débourrement et la formation du bourgeon terminal.

CHAPITRE 2.2

***Structuration géographique de la variabilité génétique chez
le peuplier noir: L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU***

Plasticité phénotypique et variabilité génétique pour des caractères morphologiques, structuraux et fonctionnels foliaires chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.)

JUSTINE GUET, FRANCESCO FABBRINI, RÉGIS FICHOT, MAURIZIO SABATTI,
CATHERINE BASTIEN & FRANCK BRIGNOLAS

Article accepté pour publication dans la revue 'Tree Physiology' le 15 mai 2015

PRÉSENTATION SYNTHÉTIQUE DE L'ARTICLE

•**Contexte** Le peuplier noir (*Populus nigra* L.) occupe un habitat particulier, l'habitat riparien, situé à l'interface des écosystèmes terrestre et aquatique. Cet habitat est caractérisé par une forte hétérogénéité spatiale et temporelle auxquelles sont confrontées les populations naturelles de peuplier noir. Cette forte hétérogénéité des conditions environnementales est susceptible d'avoir favorisé le maintien d'une importante plasticité phénotypique et variabilité génétique pour des caractères fonctionnels au sein des populations de peuplier noir. Afin de tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à un organe majeur pour le fonctionnement des arbres : la feuille. Cet organe est situé à l'interface plante-atmosphère et joue, de ce fait, un rôle central dans l'interception de la lumière et dans la régulation des flux d'eau et de carbone à l'échelle de la plante entière.

•**Objectifs** L'objectif général de cette étude était de juger, au sein d'une collection européenne de peuplier noir, des effets génétiques et environnementaux dans l'expression de la variabilité phénotypique pour des caractères morphologiques, structuraux et fonctionnels foliaires. Les objectifs spécifiques visaient à évaluer pour ces caractères : **i)** la plasticité phénotypique et sa variabilité entre génotypes de peuplier noir en réponse à des variations des conditions de croissance entre deux sites expérimentaux et **ii)** la variabilité génétique exprimée au niveau intra- et inter-populations afin d'identifier d'éventuels patrons de structuration géographique.

•**Stratégie expérimentale** L'étude a été réalisée à partir de la collection européenne de peuplier noir constituée dans le cadre du projet NovelTree et regroupant 1085 génotypes

échantillonnés dans 13 métapopulations naturelles de peuplier noir. Les capacités et le coût de phénotypage pour WUE, évaluée *via* $\Delta^{13}\text{C}$, ne nous permettaient pas d'évaluer la variabilité génétique exprimée pour ce caractère au sein de l'ensemble de la collection. Cette étude a donc été conduite à partir d'un sous-échantillon de 296 génotypes appartenant à neuf métapopulations naturelles de peuplier noir et présents dans les deux tests clonaux, en France et en Italie. Par ailleurs, l'échantillonnage a été réalisé de manière à disposer d'effectifs individuels comparables entre métapopulations. *In situ*, les neuf métapopulations de peuplier noir échantillonnées pour cette étude sont distribuées sur un gradient de 6° de latitude, 12° de longitude et 850 m d'altitude. Quel que soit le site d'étude, les mesures ont été effectuées en conditions hydriques non-limitantes sur la pousse de l'année de plançons enracinés depuis un an. Une à six feuilles matures et pleinement illuminées ont été prélevées sur l'ensemble des génotypes à Orléans et à Savigliano afin de déterminer des caractères morphologiques (longueur et largeur du limbe, surface foliaire individuelle, longueur du pétiole, circularité du limbe), structuraux (surface massique foliaire, teneur massique en carbone et en azote foliaire) et fonctionnels (discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C de la matière organique foliaire, $\Delta^{13}\text{C}$) foliaires.

•**Résultats** Nous avons mis en évidence une variation significative des caractères morphologiques, structuraux et fonctionnels foliaires entre sites expérimentaux. En moyenne, les génotypes de peuplier noir présentaient, à Savigliano, une surface foliaire individuelle plus importante (101 cm² vs. 34 cm²), un limbe plus circulaire et des valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ plus faibles (19,09 ‰ vs. 21,55 ‰), ces dernières suggérant une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'eau. Quelles que soient les conditions de croissance et les métapopulations, une variabilité génétique significative était exprimée pour les caractères morphologiques et fonctionnels foliaires. Des valeurs d'héritabilité faibles à fortes ont été observées pour la surface foliaire individuelle ($0,27 \leq H^2_{\text{ind}} \leq 0,77$) et $\Delta^{13}\text{C}$ ($0,18 \leq H^2_{\text{ind}} \leq 0,79$) en fonction des métapopulations et des conditions de croissance. Des interactions Génotype \times Site ($G \times S$) significatives ont été détectées mais représentaient moins de 10 % de la variabilité phénotypique pour la plupart des caractères étudiés. Pour la surface foliaire individuelle, la surface massique foliaire et $\Delta^{13}\text{C}$, l'importance relative de ces effets d'interaction était comparable voire même supérieure à celle des effets génétiques. Pour la surface foliaire individuelle, les effets d'interaction $G \times S$ étaient expliqués à plus de 20 % par une amplitude de variabilité génétique plus importante dans le site italien et par des changements de rangs génotypiques entre sites expérimentaux. En revanche, pour $\Delta^{13}\text{C}$, ces

effets étaient expliqués à plus de 90 % par des changements de rangs génotypiques entre sites expérimentaux. Les métapopulations naturelles de peuplier noir étaient fortement différenciées pour la surface foliaire individuelle, comme indiqué par le fort coefficient de différenciation génétique estimé pour ce caractère ($Q_{ST} \approx 0,50$). Le patron de différenciation génétique des métapopulations pour la surface foliaire individuelle était complexe dans le sens où il ne pouvait être résumé à un gradient géographique simple de type latitude, longitude ou altitude. Quel que soit le site expérimental, les métapopulations se structuraient en trois groupes. Les métapopulations 'Rhin', 'Dranse' et 'Ticino' présentaient les plus fortes valeurs de surface foliaire individuelle, alors que les métapopulations 'Nohèdes', 'StPryvé', et 'ValAllier' présentaient les plus faibles. Pour $\Delta^{13}C$, le niveau de différenciation génétique des métapopulations était modéré ($Q_{ST} \approx 0,25$) quelles que soient les conditions de croissance. Par ailleurs, le patron de différenciation génétique des métapopulations variait en fonction des conditions de croissance. Seules les métapopulations 'Rhin', 'Dranse' et 'Ticino' présentaient les plus faibles valeurs de $\Delta^{13}C$, et donc la plus forte efficacité d'utilisation de l'eau, dans les deux sites expérimentaux.

• **Conclusions** Nos résultats démontrent que les métapopulations européennes de peuplier noir disposent d'une importante plasticité phénotypique et variabilité génétique pour la morphologie, la structure et le fonctionnement foliaire. Cependant, l'influence des effets génétiques et environnementaux sur l'expression de la variabilité phénotypique variait en fonction des caractères foliaires. Pour la surface foliaire individuelle, nous avons pu mettre en évidence une forte différenciation génétique des métapopulations naturelles de peuplier noir, quelles que soient les conditions de croissance. Les patrons de différenciation étaient fortement conservés entre sites expérimentaux, ce qui suggère que les forces évolutives à l'origine de la différenciation observée ont laissé une empreinte suffisamment forte sur les métapopulations pour maintenir des patrons de différenciation génétique stables dans des conditions croissances contrastées. Les résultats obtenus pour $\Delta^{13}C$ démontrent une forte contribution des effets environnementaux et des effets d'interaction $G \times S$ sur l'expression de la variabilité phénotypique pour ce caractère. WUE semble donc être davantage un caractère d'ajustement à court terme du fonctionnement hydrique et carboné de la plante qu'un caractère ayant une influence directe sur la valeur sélective des individus. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que les métapopulations 'Rhin', 'Dranse' et 'Ticino' présentaient systématiquement une forte surface foliaire individuelle et une forte efficacité d'utilisation de l'eau, ce qui pourrait refléter une adaptation des populations pour des caractères

phénotypiques qui permettent de maximiser la valeur sélective dans des conditions environnementales spécifiques.

Genetic variation for leaf morphology, leaf structure and leaf carbon isotope discrimination in European populations of black poplar (*Populus nigra* L.)

JUSTINE GUET^{1,2*}, FRANCESCO FABBRINI^{3*}, RÉGIS FICHOT¹, MAURIZIO SABATTI³, CATHERINE BASTIEN² & FRANCK BRIGNOLAS^{1§}

¹ Université d'Orléans, INRA, EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, F-45067 Orléans, France

² INRA, UR 0588 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF), centre de recherche Val de Loire, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans Cedex 2, France

³ Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest systems, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italy

* These authors equally contributed to the work.

§ Corresponding author:

Franck Brignolas, Université d'Orléans, INRA, EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, 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

RUNNING HEAD: Genetic variation for leaf traits in black poplar

ABSTRACT

To buffer against the high spatial and temporal heterogeneity of the riparian habitat, riparian tree species, such as black poplar (*Populus nigra* L.), may display a high level of genetic variation and phenotypic plasticity for functional traits. Using a multisite common garden experiment, we estimated the relative contribution of genetic and environmental effects in the phenotypic variation expressed for individual leaf area (LA), leaf shape, leaf structure and leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) in natural populations of black poplar. Twenty-four to 62 genotypes were sampled in nine metapopulations covering a latitudinal range from 48°N to 42°N in France and in Italy and grown in two common gardens at Orléans (ORL) and at Savigliano (SAV). In the two common gardens, substantial genetic variation was expressed for leaf traits within all metapopulations, but its expression was modulated by the environment, as attested by the genotype \times environment ($G \times E$) interaction variance comparable or even greater than genetic effects. For LA, $G \times E$ interactions were explained by both changes in genotype ranking between common gardens and increased variation in SAV, while these interactions were mainly attributed to changes in genotype ranking for $\Delta^{13}\text{C}$. The nine *P. nigra* metapopulations were highly differentiated for LA, as attested by the high coefficient of genetic differentiation ($Q_{\text{ST}} = 0.50$ at ORL and 0.51 at SAV), and the pattern of metapopulation differentiation was highly conserved between the two common gardens. By contrast, they were moderately differentiated for $\Delta^{13}\text{C}$ ($Q_{\text{ST}} = 0.24$ at ORL and 0.25 at SAV) and the metapopulation clustering significantly changed between common gardens. Our results evidenced that the nine *P. nigra* metapopulations present substantial genetic variation and phenotypic plasticity for leaf traits which both represent potentially significant determinants of populations' capacities to respond, on a short-term basis and over generations, to environmental variations.

KEY WORDS: bulk leaf carbon isotope discrimination, common gardens, genetic variation, leaf traits, natural populations, phenotypic plasticity, population differentiation, *Populus nigra* L.

INTRODUCTION

Forest tree species generally have a broad geographical distribution encompassing a wide range of environmental conditions and large effective population sizes (Petit and Hampe 2006). Both of these characteristics are supposed to favor the maintenance of a high level of genetic variation for functional traits, such as bud phenology, growth rate or water-use efficiency (WUE) (Alberto et al. 2013). At the leaf level, leaf structure, leaf area and leaf shape vary tremendously between species, within species as well as in response to environmental conditions and these variations are known to play a key role in shaping plant functioning (Wright et al. 2004, 2005, Niinemets and Sack 2006, Reich et al. 2007, Nicotra et al. 2011, Niinemets 2014). Over generations and at the population level, a high amount of intraspecific genetic variation may offer possible adaptive responses of populations to directional selection involving these functional traits (Jump et al. 2009). On a short-term basis and at the whole-organism level, phenotypic plasticity, i.e. the ability of a genotype to produce different phenotypes depending on environmental conditions, is also regarded as a major way by which trees could withstand environmental heterogeneity (Bradshaw 1965). An enhanced knowledge of the interplay between genetic variation and phenotypic flexibility in responses of natural populations to environmental changes may increase our ability to develop informed management plans for *in-situ* or *ex-situ* conservation of endangered genetic resources (Forsman 2014).

Located at the interface between aquatic and terrestrial ecosystems, riparian zones are characterized by a high degree of spatial and temporal heterogeneity (Karrenberg et al. 2002) which may promote the maintenance of a high level of phenotypic plasticity and genetic variation in riparian tree species. Black poplar (*Populus nigra* L.) is one of the dominant pioneer tree species of riparian ecosystems in the temperate climatic zones of Europe, Northern Africa and Western Asia (Dickmann and Kuzovkina 2008). Pollen and seeds of black poplar are dispersed by wind and to a lesser extent by water over several kilometers. Thus, gene flow is likely to occur over long distances within river catchments and *P. nigra* populations generally form metapopulations, i.e. a network of local populations interconnected by significant gene flow (Lefèvre et al. 2001). Evaluating the expressed genetic variation and phenotypic plasticity for traits influencing plant functioning in different environmental conditions may help to gain insight into the geographical structuration of

phenotypic variation and the ability of natural populations to cope with environmental variations.

The phenotypic plasticity for leaf dimensions, specific leaf area (SLA) and leaf-level WUE (generally evaluated through bulk leaf carbon isotope discrimination, $\Delta^{13}\text{C}$), has been well documented in hybrid poplars. These traits have been found to be modulated by various environmental factors, including light (Larocque 1999, Casella and Ceulemans 2002, Al Afas et al. 2005, Benomar et al. 2011, Toillon et al. 2013), nutrient availability (Ibrahim 1997, Siegwolf et al. 2001, Cooke et al. 2005, DesRochers et al. 2006, 2007, Toillon et al. 2013) and water availability (Liu and Dickmann 1992, Ibrahim 1997, Marron et al. 2003, Monclus et al. 2006, DesRochers et al. 2007, Monclus et al. 2009, Toillon et al. 2013). In this regard, natural populations of pure poplar species have received much less attention (Zhang et al. 2004, Xu et al. 2008, Chamaillard et al. 2011). In other forest tree species, the phenotypic plasticity of leaf dimensions, SLA and $\Delta^{13}\text{C}$ has been widely documented and further confirmed the high plasticity of these traits in response to variations in light (e.g., Valladares et al. 2000, Aranda et al. 2007), nutrient availability (e.g., Curtis et al. 1995, Valladares et al. 2000, Ripullone et al. 2004) and water availability (e.g., Aranda et al. 2007, 2010, Corcuera et al. 2010, de Miguel et al. 2011).

Besides phenotypic plasticity, significant phenotypic variation has been reported for leaf area, SLA and $\Delta^{13}\text{C}$ among genotypes of different hybrid poplars (e.g., Marron et al. 2005, Monclus et al. 2005, Marron and Ceulemans 2006, Bonhomme et al. 2008, Toillon et al. 2013) as well as among genotypes within natural populations of different pure poplar species (Dunlap et al. 1995, Gornall and Guy 2007, Kanaga et al. 2008, Soolanayakanahally et al. 2009, Keller et al. 2011), including black poplar (Chamaillard et al. 2011). However, quantification of population differentiation for these leaf traits in poplar species remain much less documented at a large geographical scale. Only one study conducted on 20 natural populations of balsam poplar (*Populus balsamifera* L.), covering the entire distribution range over North America, evidenced that SLA was highly differentiated among populations, as estimated by the coefficient of genetic differentiation ($Q_{\text{ST}} = 0.47$), while $\Delta^{13}\text{C}$ was moderately differentiated among populations ($Q_{\text{ST}} = 0.21$ for leaf and wood $\Delta^{13}\text{C}$). In other forest tree species, several studies have reported significant geographical variation for SLA and $\Delta^{13}\text{C}$ (e.g. Zhang et al. 1993, Lauteri et al. 2004, Grossnickle et al. 2005, Ducrey et al. 2008, Aletà et al. 2009). However, only few reported Q_{ST} estimates (Ramírez-Valiente et al.

2009, Lamy et al. 2011). These values were low to moderate for leaf traits ($0.06 \leq Q_{ST} \leq 0.28$) (Ramírez-Valiente et al. 2009, Ramírez-Valiente et al. 2010, Lamy et al. 2011), with the exception of leaf size in *Quercus suber* L. for which natural populations were highly differentiated ($Q_{ST} = 0.46$) according to water availability at the sites of origin (Ramírez-Valiente et al. 2009, Ramírez-Valiente et al. 2010). Overall, studies examining the genetic variation expressed for leaf traits in forest tree species have been conducted under single environments. As a consequence, they did not enable to test either for the robustness of population differentiation over environments or the joint contribution of phenotypic plasticity and genetic variation in determining the phenotypic variation.

The aim of the present study was to evaluate the relative contribution of environmental and genetic effects in phenotypic variation expressed for leaf morphology, leaf structure and $\Delta^{13}\text{C}$ in natural populations of black poplar to provide a first insight into their ability to cope with environmental variations. Measurements were conducted on 24 to 62 *P. nigra* genotypes sampled in nine European metapopulations naturally distributed along nine river catchments covering a latitudinal range from 48°N to 42°N and grown in two common gardens in France and in Italy. This two-site common garden experiment allowed us to estimate the relative contribution of genetic, environment and genotype by environment ($G \times E$) interaction effects on the total phenotypic variation. Thus, the specific objectives of the study were to evaluate: i) the phenotypic plasticity of genotypes for the different leaf traits and its genetic variation in the *P. nigra* populations and ii) the level and the geographical patterns of genetic variation in the *P. nigra* populations. Additionally, a previous common garden experiment conducted on a set of 14 European *P. nigra* populations partially overlapping with the one studied here reported a strong latitudinal cline for growth cessation and bud set (Rohde et al. 2011). We therefore also checked whether the patterns observed for leaf traits here are comparable to those observed for growth cessation and bud set in this previous study.

MATERIALS AND METHODS

P. nigra collection and experimental design

This study makes use of a *P. nigra* collection composed of 1098 cloned individuals sampled in 14 natural metapopulations present in 11 river catchments in four European countries. In

this study, the term ‘metapopulation’ refers to a group of individual trees, sexually mature or not, that were sampled in one or several stands distributed along a same river and geographically close enough to be interconnected by gene flow (Lefèvre et al. 2001). This collection was established in common garden in 2008 at two experimental sites located in Central France (Orléans, ORL, Loire valley, 47°50’N 01°54’E, 108 m above sea level) and in Northern Italy (Savigliano, SAV, Po valley, 44°36’N 07°37’E, 343 m a.s.l.). The whole *P. nigra* collection was set up in ORL, while a subset of 815 genotypes from the 14 metapopulations was set up in SAV. For each site, plantations were established from 25 cm hardwood cuttings according to a completely randomized block design with a single tree per block and six replicates per genotype. An initial spacing within and between rows of 1.00 × 2.00 m in ORL and 0.80 × 2.20 m in SAV were used. A double border row of the *P. nigra* genotype “Jean Pourtet” was planted around the experimental plot to reduce border effects. The experimental plantations were regularly irrigated, without fertilizer addition, weed controlled and treated with insecticides as necessary throughout the two growing seasons considered in this study (2008 and 2009).

Meteorological data of each experimental site were obtained from the closest meteorological station (Saint-Cyr-en-Val for ORL; Lagnasco for SAV). In 2009, the growing season of main interest in this study, the range of temperatures was similar between the two experimental sites (**Fig. S2.2.1**), but annual precipitation was higher at SAV than at ORL (968 mm vs. 665 mm). Soil composition of the upper layers was analysed by collecting spatially distributed soil core samples across the two experimental sites at a 0 - 40 cm depth. Soil analyses were carried out after planting in both experimental sites. For each site, soil texture (% clay, % silt and % sand), pH and composition in organic matter (OM, g.kg⁻¹), organic carbon (C, g.kg⁻¹) and total nitrogen (N, g.kg⁻¹) were determined. Results indicated that in ORL the soil was a loamy-sandy type (16.2 % clay, 15.4 % silt and 68.4 % sand) while the soil was a loamy type in SAV (21.6 % clay, 36.7 % silt and 41.7 % sand). The soil in SAV was richer in OM (27.9 vs. 19.9 g.kg⁻¹), C (16.1 vs. 11.5 g.kg⁻¹) and N (1.4 vs. 0.6 g.kg⁻¹) and had a higher pH than in ORL (8.0 vs. 5.4). The loamy texture and the higher level of soil fertility characterizing SAV induced a substantial increase of tree growth potential when compared to ORL: at the end of the first growing season (2008), circumference at 1 m above ground level ranged from 27 ± 4 to 110 ± 5 mm between extreme genotypic means at SAV vs. 17 ± 4 to 31 ± 2 mm at ORL. To prevent mutual shading of trees during the year of

study (i.e., 2009), trees were cut back in February 2009 and only the most vigorous stem of each stool was preserved after resprouting.

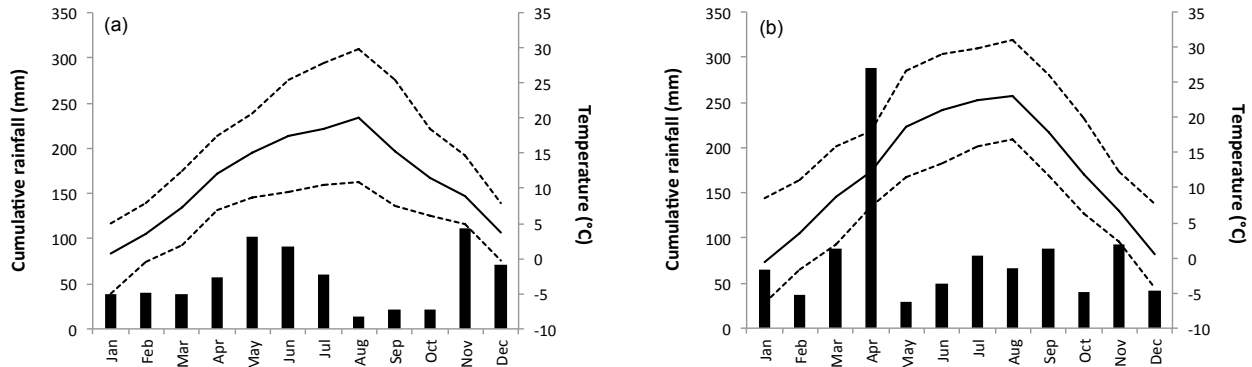


Figure S2.2.1. Meteorological characteristics in 2009 of the two experimental sites: Orléans (ORL, a) and Savigliano (SAV, b). The black bars represent monthly cumulative rainfall. The solid lines represent monthly mean temperatures; the dotted lines above and below the solid line represent the monthly mean maximum and minimum temperatures respectively. Meteorological data were obtained from the closest meteorological station at each site (Saint-Cyr-en-Val for ORL; Lagnasco for SAV).

For this study, we selected a subset of 308 and 307 genotypes from nine metapopulations in ORL and SAV, respectively; among them, 296 genotypes were common to both common gardens (**Table 2.2.1**). The selected metapopulations are naturally distributed along nine river catchments covering a latitudinal range from 48°N to 42°N in France and in Italy (**Table 2.2.1**). Most of these river catchments are highly dynamic and provide a constant supply of open area where different uneven-aged cohorts are established (**Table 2.2.1**). However, due to the lack of suitable area for spontaneous regeneration, three metapopulations no longer display a dynamical behaviour in terms of demography and only consist of old mature trees progressively being replaced by successional hardwood trees (**Table 2.2.1**). No introgression from interspecific cultivated poplar plantations detected within all selected metapopulations (data from molecular analyses not shown).

Table 2.2.1. Location, river management and number of studied genotypes in Orléans (ORL) and Savignano (SAV) for the nine *P. nigra* metapopulations.

River catchment	Metapopulation	Latitude	Longitude	Altitude	Cohorts ^a	River management ^b	Number of studied genotypes	
							ORL	SAV
Rhin	Rhin	48°16' N - 48°37' N	07°41' E - 07°49' E	135 - 160	Mature	Regulated	31	32
Loire	Saint-Pryvé	47°51' N	01°48' E	90	Juvenile/mature	Dynamic	27	26
Allier	ValAllier	46°24' N	03°19' E	220	Juvenile/mature	Dynamic	30	31
Dranse	Dranse	46°23' N	06°30' E	374	Juvenil/mature	Dynamic	30	30
Drôme	Ramières	44°41' N - 44°45' N	4°55' E - 5°24' E	145	Juvenile/mature	Dynamic	44	43
Adour	Adour	42°53' N - 43°23' N	0°02' W - 00°56' W	52 - 902	Mature	Partially regulated	30	31
Nohèdes	Nohèdes	42°37' N	02°17' E	820	Mature	Dynamic	28	28
Ticino	Ticino	45°12' N - 45°16' N	08°59' E - 09°04' E	60 - 70	Juvenile/mature	Dynamic	62	62
Paglia	Paglia	42°45' N - 42°52' N	11°45' E - 11° 55' E	235 - 358	Juvenile/mature	Dynamic	26	24

Where metapopulations were represented by individual trees sampled in different stands distributed along one river, a range of latitudes, longitudes and altitudes is given. Altitude is expressed in meters above sea level. ^ajuvenile trees were defined as non-reproductive trees. ^bregulated if water flows have been regulated to facilitate navigation or to prevent floods; dynamic if water flows are not regulated and allow some flooding events.

Phenotypic data collection

Measurements were carried out in 2009, one year after planting. The same traits were measured in the two common gardens but the number of studied trees per genotype differed between common gardens and traits (**Table 2.2.2**).

Table 2.2.2. List of traits measured in Orléans (ORL) and Savigliano (SAV) clonal experiments with their abbreviation used in the text, figures and tables and number of studied trees per genotype in each experimental site.

Trait	Definition	Unit	Number of studied trees per genotype	
			ORL	SAV
LA	Lamina area	cm ²	5	6
P : LA	Ratio between lamina perimeter and lamina area	cm ⁻¹	5	6
SLA	Specific leaf area	cm ² .g ⁻¹ _{DM}	3	6
N _{Mass}	Leaf nitrogen content on leaf dry mass basis	mg.g ⁻¹ _{DM}	3	3
C _{Mass}	Leaf carbon content on leaf dry mass basis	mg.g ⁻¹ _{DM}	3	3
Δ ¹³ C	Bulk leaf carbon isotope discrimination	‰	3	3

Dimensions and shape of mature leaves

At the end of July 2009, an average number of two neoformed mature and fully illuminated leaves (one to six according to their size) were collected on the terminal shoot of each tree in ORL and SAV. A digital picture of each collected leaf was immediately taken after sampling and analysed using LAMINA software (Bylesjö et al. 2008) to determine lamina length, lamina width, lamina perimeter (P , cm) and lamina area (LA , cm²). The ratio between lamina perimeter and lamina area ($P : LA$, cm⁻¹) was then calculated and used as a proxy of lamina shape (Sack et al. 2003). Petiole length was measured using ImageJ software (Abràmoff et al. 2004). All estimated values were averaged to give a single tree value.

Structure and function of mature leaves

Three (SAV) and four (ORL) calibrated discs (0.80 cm² and 2.0 cm², respectively) were punched from each lamina and oven-dried at 60°C for 72h before being weighed to compute SLA (cm².g_{DM}⁻¹). Carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) was measured from 1-mg dry

homogenous leaf powder using an elemental analyser (Carlo Erba, Milan, Italy) coupled with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Germany). Carbon isotope composition was expressed relative to the Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) standard as:

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 \text{ (‰)} \text{ (Craig 1957)}$$

where R_{sample} and R_{standard} refer to the $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ ratios of the sample and the standard, respectively. The accuracy of $\delta^{13}\text{C}$ measurements was $\pm 0.06 \text{ ‰}$.

$\Delta^{13}\text{C}$ between atmospheric CO_2 (δ_{air} assumed to be equal to -8 ‰) and plant material (δ_{plant}) was then calculated according to Farquhar and Richards (1984) as:

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

Total carbon and nitrogen contents were determined from the same samples and were expressed on a dry mass basis (C_{Mass} and N_{Mass} , $\text{mg.g}_{\text{DM}}^{-1}$).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the R software (R Development Core Team 2012). Data required no transformation to meet the assumption of homoscedasticity and normal distribution of residuals. All tests were considered significant at $P < 0.05$. Individual data were analysed using the following linear models:

- (i) for adjustment of individual data to block effects: $Y_{ijk} = \mu + B_i + G_{j(k)} + e_{ijk}$ where Y_{ijk} refers to individual performance, μ is the general mean, B_i is the effect of block i considered as fixed, $G_{j(k)}$ is the effect of the genotype j nested under metapopulation k considered as random and e_{ijk} is the residual error.
- (ii) To characterize genetic variation expressed within each metapopulation in each common garden, a random model was used: $Y'_{ijk} = \mu + G_j + e'_{ijk}$ where Y'_{ijk} refers to the individual tree performance adjusted to block effects, G_j is the effect of the genotype j considered as random and e'_{ijk} is the residual error.
- (iii) To evaluate metapopulation differentiation in each common garden, the following random model was used: $Y''_{ijk} = \mu + M_k + G_{j(k)} + e''_{ijk}$ where M_k is the effect of the

metapopulation k considered as random, $G_{j(k)}$ is the effect of the genotype j nested under metapopulation k considered as random and e''_{ijk} is the residual error.

- (iv) Prior to exploring $G \times E$ interactions, a Levene's test was performed and indicated that genetic and residual variances were not homoscedastic between metapopulations and common gardens. Therefore, $G \times E$ interactions were investigated for each metapopulation separately using the following random model: $Y_{ijkl} = \mu + G_j + E_l + (G \times E)_{jl} + e_{ijkl}$ where G_j is the effect of the genotype j considered as random, E_l is the effect of the environment l considered as random, $(G \times E)_{jl}$ is the genotype by environment interaction effect considered as random and e_{ijkl} is the residual error.

All the variance components from within and between common gardens models were estimated using Restricted Maximum Likelihood (REML) method. Broad-sense heritability was calculated on an individual basis (H^2_{ind}) for each metapopulation in each common garden according to the following equation: $H^2_{ind} = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_e)$ where σ^2_G and σ^2_e are genetic and residual variance components estimated for each metapopulation in each common garden. Standard errors associated with values of H^2_{ind} were calculated as described by Singh et al. (1993). The coefficient of genetic variation (CV_G) was calculated as the ratio of genetic standard deviation to the mean and was expressed as a percentage. Levels of population differentiation for quantitative traits are classically estimated through the coefficient of genetic differentiation (Q_{ST}), which is defined as the proportion of additive genetic variance attributable to differences between populations (Spitze 1993). Given that the present study was conducted with unrelated cloned individuals, we did not have access to additive genetic variation but to total genetic variation. Thus, the coefficient of metapopulation differentiation was estimated for each trait in each common garden as: $Q_{ST} = \sigma^2_M / (\sigma^2_M + 2 \times \sigma^2_G)$ with σ^2_G and σ^2_M representing the within- and among-metapopulations genetic variance components. The patterns of metapopulation differentiation were investigated by computing pairwise Q_{ST} across metapopulations.

When $G \times E$ interaction variance was significantly different from zero, it was further partitioned into two types of interaction according to the method 1 developed by Muir et al. (1992): i) interaction due to heterogeneous variances between common gardens and ii) interaction due to changes in genotype ranking between common gardens. The stability of genotype and metapopulation ranking between the two common gardens was assessed by

computing Spearman's rank coefficients (r_s) on a genotypic and metapopulation mean basis respectively. Phenotypic relationships between leaf traits were analysed on a genotypic mean basis for each metapopulation in each common garden and described using linear regression analysis [Pearson's correlation coefficients (r_p)].

RESULTS

Phenotypic variation in the two common gardens

All traits related to leaf dimensions (i.e. lamina length, lamina width, lamina perimeter, lamina area and petiole length) were highly correlated (data not shown). Data obtained for lamina length, lamina width, lamina perimeter and petiole length are not presented because they yielded comparable results to those obtained for lamina area (LA). Most leaf traits differed between ORL and SAV (**Fig. 2.2.1**). In SAV, leaves displayed a larger area (LA) than in ORL (102 ± 2 vs. 34 ± 1 cm², respectively; Figure 1a). The amplitude of variation between extreme genotypic means for LA was greater in SAV than in ORL (228 vs. 87 cm², respectively; **Fig. 2.2.1a**). Lamina shape also differed between the two common gardens: leaves collected in SAV exhibited lower values of $P : LA$ than in ORL (0.42 ± 0.01 vs. 0.72 ± 0.01 cm⁻¹, respectively), indicating that leaves tended to have a more circular shape in SAV than in ORL (**Fig. 2.2.1b**). Contrary to what was observed for LA, the range of variation between extreme genotypic means for lamina shape was lower in SAV than in ORL (0.41 vs. 0.80 cm⁻¹, respectively; **Fig. 2.2.1b**). Leaf structural and functional traits also differed between ORL and SAV: in the latter, leaves displayed higher SLA (126.6 ± 0.5 vs. 90.4 ± 0.5 cm².g⁻¹, respectively), higher nitrogen (32.7 ± 0.2 vs. 14.6 ± 0.1 mg.g⁻¹, respectively) and carbon content per mass unit (456.7 ± 0.4 vs. 426.8 ± 0.6 mg.g⁻¹) and lower $\Delta^{13}C$ values (19.09 ± 0.04 vs. 21.55 ± 0.05 ‰) than in ORL (**Fig. 2.2.1c,d,e,f**). The amplitude of variation between extreme genotypic means was similar between sites for $\Delta^{13}C$ (4.50 ‰; **Fig. 2.2.1f**) while it was greater in SAV for SLA (56.1 vs. 43.6 cm². g⁻¹), N_{Mass} (20.4 vs. 12.6 mg.g⁻¹) and lower for C_{Mass} (43.1 vs. 69.2 mg.g⁻¹) (**Fig. 2.2.1c,d,e**).

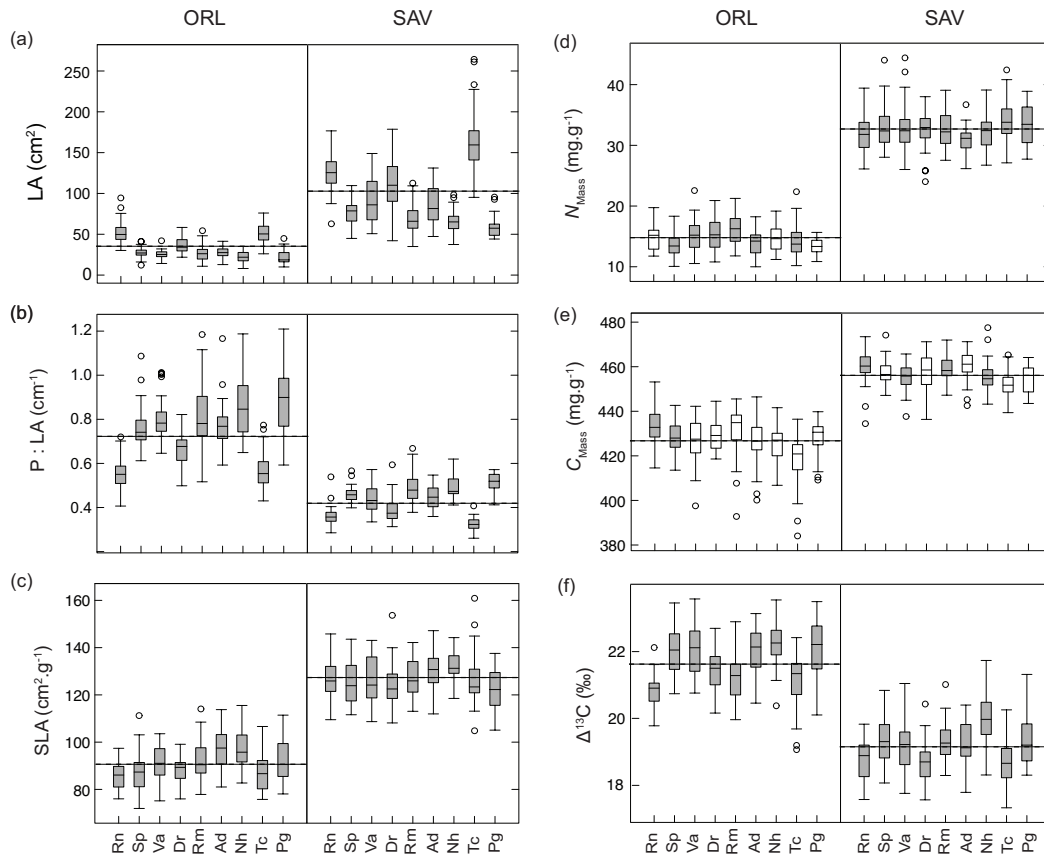


Figure 2.2.1. Phenotypic variation of leaf traits in the two common gardens: Orléans (ORL) and Savigliano (SAV). Box plots are shown for (a) lamina area (LA), (b) the ratio between lamina perimeter and lamina area ($P : LA$), (c) specific leaf area (SLA), (d) leaf nitrogen content on leaf dry mass basis (N_{Mass}), (e) leaf carbon content on leaf dry mass basis (C_{Mass}) and (f) bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$). Each box is based on block adjusted genotypic means and represents the quartile below (Q_1) and above (Q_3) the median value. Vertical bars represent minimum and maximum values. Genotypes with values away from 1.5 times from the top of the interquartile range ($Q_3 - Q_1$) are represented by open circles. Boxes filled in grey indicate that the genetic variance within a metapopulation was different from zero. For all traits, the number of genotypes used to construct box plots for the two common gardens (ORL/SAV) is: Rn, $n = 31/32$; Sp, $n = 27/28$; Va, $n = 30/31$; Dr, $n = 30/32$; Rm, $n = 44/45$; Ad, $n = 30/31$; Nh, $n = 28/29$; Tc, $n = 62/63$; Pg, $n = 26/26$. The horizontal dashed lines represent the general mean for each trait in each common garden. Abbreviations: Rn, Rhin; Sp, Saint-Pryvé; Va, ValAllier; Dr, Dranse; Rm, Ramières; Ad, Adour; Nh, Nohèdes; Tc, Ticino; Pg, Paglia.

Genetic variation within metapopulations, $G \times E$ interactions and relationships between traits

In each common garden and for each metapopulation, significant differences between genotypes were detected for all traits, except for N_{Mass} and C_{Mass} (**Fig. 2.2.1**). When estimated on an individual basis, H^2_{ind} varied among traits but in a site-dependent manner (**Fig. 2.2.2a**). At ORL, the highest H^2_{ind} values were recorded for $\Delta^{13}\text{C}$, while at SAV they were recorded for leaf size (LA) and leaf shape (P : LA) (**Fig. 2.2.2a**). Irrespective of the common garden, N_{Mass} and C_{Mass} always displayed low values of H^2_{ind} (**Fig. 2.2.2a**), explained by a low level of genetic variation and a higher influence of environmental variations. Standard errors associated with values of H^2_{ind} [$\text{SE}(H^2_{\text{ind}})$] never exceeded 0.13 ($0.05 \leq \text{SE}(H^2_{\text{ind}}) \leq 0.13$) regardless of the trait, the metapopulation and the common garden considered. On average, over all metapopulations and in comparison with ORL, heritability increased in SAV for the traits related to leaf size (LA) and leaf shape (P : LA), while it decreased for other structural and functional leaf traits (SLA and $\Delta^{13}\text{C}$) (**Fig. 2.2.2a**). The CV_G was constant between ORL and SAV for most of the traits, showing that the amplitude of genetic variation was similar between the two common gardens (**Fig. 2.2.2b**).

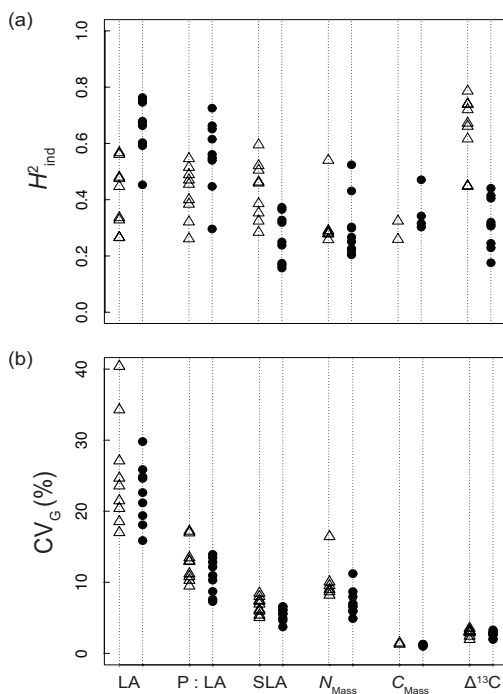


Figure 2.2.2. Broad-sense heritability estimated on an individual basis (H^2_{ind}) (a) and coefficient of genetic variation (CV_G) (b) calculated for each trait for each metapopulation in each common garden, Orléans (triangles) and Savigliano (circles). For both common gardens, values of H^2_{ind} and CV_G were calculated when genetic variance within a metapopulation was different from zero. Standard errors associated with values of H^2_{ind} were not plotted for the clarity of the figure. See Table 2.2.2 for trait abbreviations.

The relative contribution of $G \times E$ interactions to the total phenotypic variation was weak ($\sigma^2_{G \times E} / \sigma^2_P < 15\%$) for all metapopulations and traits (**Table 2.2.3**). For all the studied traits, the relative contribution of $G \times E$ effects to the total phenotypic variation reached the same level or was even greater than genetic effects for most of the metapopulations (**Table 2.2.3**). However, it is worth noting that the ratio between $G \times E$ and genetic variances ($\sigma^2_{G \times E} / \sigma^2_G$) varied across metapopulations, but in a trait-dependant manner (**Table 2.2.3**). For LA and SLA and for some metapopulations, this ratio reached up to 7.1 and 11.5 respectively, while it averaged about 1 and did not exceed 1.5 for $\Delta^{13}C$ (**Table 2.2.3, Fig. 2.2.3**). For LA, $G \times E$ interactions were explained by both changes in genotype ranking and increased variation in SAV (**Fig. 2.2.3a**). For SLA and $\Delta^{13}C$, $G \times E$ interactions were mainly attributed to changes in genotype ranking between the two common gardens, which was further confirmed by the low to moderate values of Spearman's rank coefficient generally observed for these traits (**Table 2.2.3, Fig. 2.2.3b,c**). For most of the metapopulations in the two common gardens, relationships between traits were weak and mostly non-significant such that no clear relationship could be evidenced (**Fig. S2.2.2**).

Table 2.2.3. Phenotypic variance components and stability of genotype ranking between the two experimental sites for leaf traits.

Trait	σ^2_E/σ^2_P (%)			σ^2_G/σ^2_P (%)			$\sigma^2_{G \times E}/\sigma^2_P$ (%)			$\sigma^2_{G \times E}/\sigma^2_G$			r_s		
	$N_{\text{Metapop.}}$	median	min. - max.	$N_{\text{Metapop.}}$	median	min. - max.	$N_{\text{Metapop.}}$	median	min. - max.	$N_{\text{Metapop.}}$	median	min. - max.	$N_{\text{Metapop.}}$	median	min. - max.
LA	9	81.4	75.5 - 87.5	8	4.2	1.2 - 10.6	9	6.4	2.9 - 13.4	8	1.4	0.3 - 11.5	6	0.54	0.46 - 0.79
P: LA	9	66.8	37.3 - 78.3	8	6.0	0.9 - 10.2	6	7.2	5.6 - 9.2	6	1.8	0.7 - 6.0	6	0.50	0.41 - 0.74
SLA	9	82.4	74.6 - 86.7	9	2.7	0.2 - 3.2	5	3.5	1.9 - 5.1	5	1.5	0.6 - 7.1	3	0.36	0.30 - 0.60
$\Delta^{13}\text{C}$	9	80.1	74.8 - 85.1	9	5.1	2.8 - 9.2	6	4.2	3.9 - 6.0	6	1.1	0.5 - 1.5	7	0.44	0.28 - 0.61

σ^2_P , σ^2_E , σ^2_G , $\sigma^2_{G \times E}$, phenotypic, environmental, genetic and genotype by environment interaction variance components; $N_{\text{Metapop.}}$, number of metapopulations for which variance components or Spearman's rank coefficients (r_s) were significantly different from zero; median, minimum and maximum calculated on the $N_{\text{Metapop.}}$ estimates; See Table 2.2.2 for trait abbreviations.

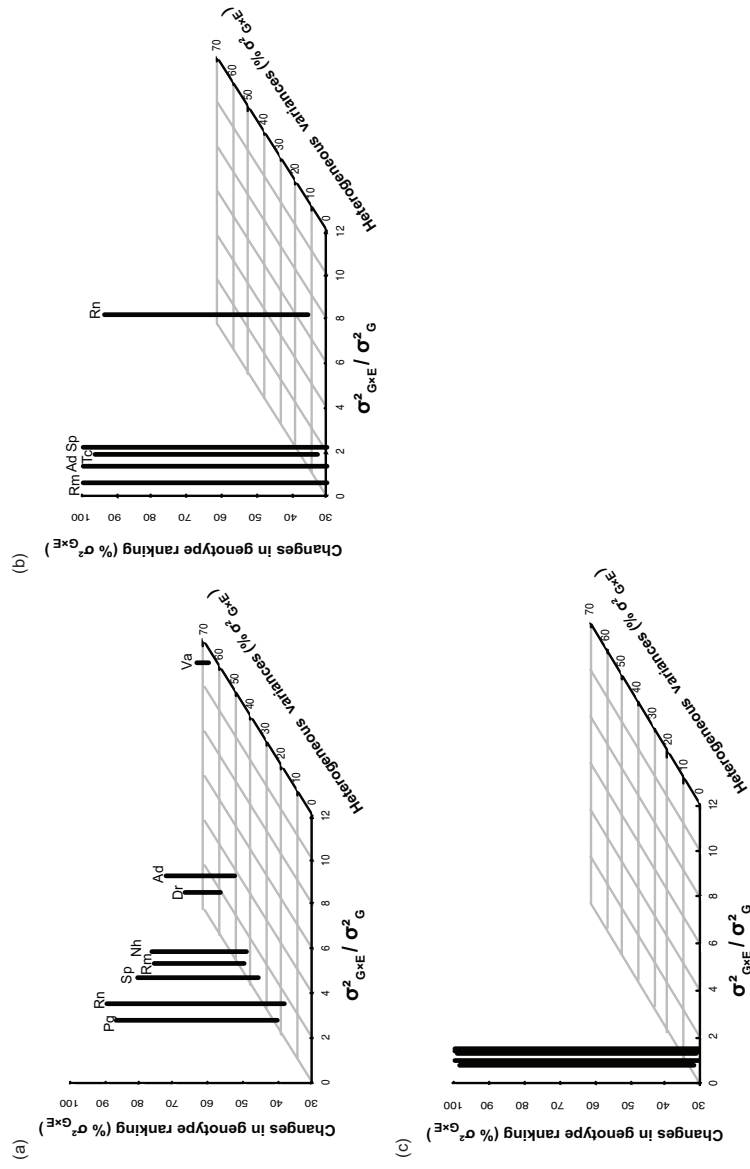


Figure 2.2.3. Importance of genotype by environment ($G \times E$) interactions relative to genetic effects ($\sigma^2_{G \times E} / \sigma^2_G$) and partitioning of $G \times E$ interactions into the part due to heterogeneous variances and the part due to changes in genotype ranking between the two common gardens, Orléans and Savigliano. Results are shown for (a) lamina area, (b) specific leaf area and (c) bulk leaf carbon isotope discrimination. Results are illustrated for the metapopulations for which $G \times E$ interaction and genetic variance components were significantly different from zero. For bulk leaf carbon isotope discrimination, metapopulations are not labeled because all metapopulations are confounded. Metapopulation abbreviations are as in Figure 2.2.1.

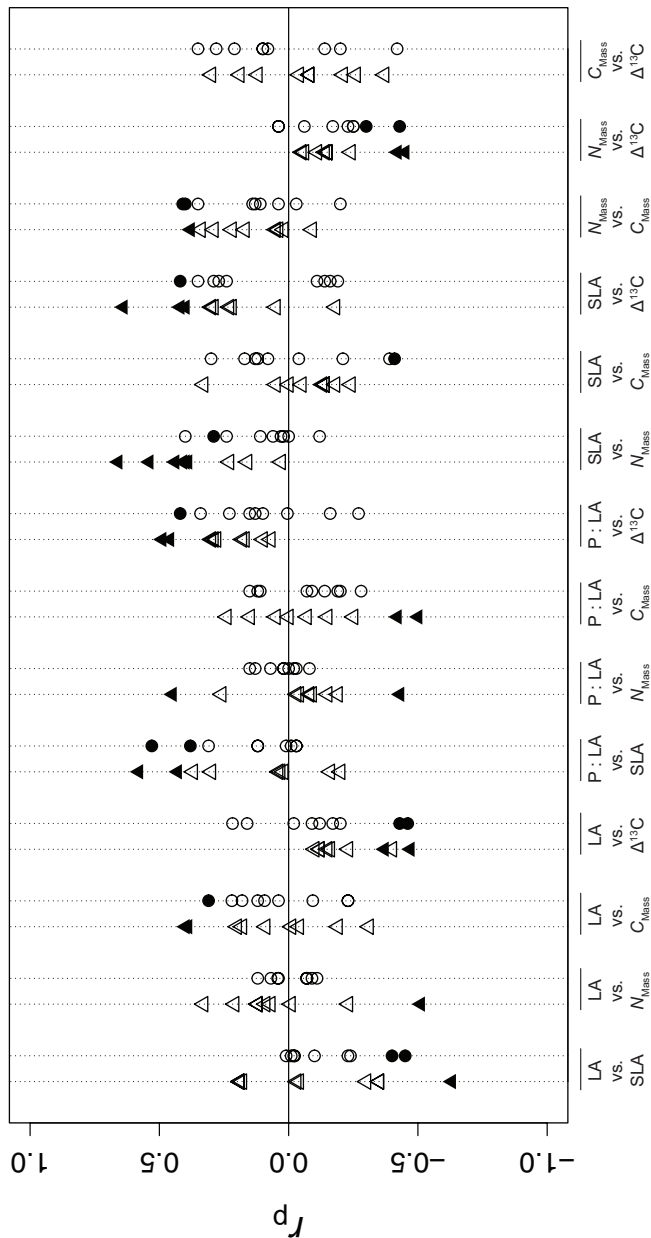


Figure S.2.2.2. Pearson's correlation coefficient (r_p) for the relationships between leaf traits in each common garden, Orléans (triangles) and Savigliano (circles). Each point represents the Pearson's correlation coefficients estimated on genotypic means within one metapopulation. Significant relationships at the risk of 5% are indicated by closed symbols. See Table 2.2.2 for trait abbreviations.

Genetic differentiation among metapopulations

Regardless of the common garden, metapopulations differed significantly for all leaf traits (**Fig. 2.2.1**). The percentage of phenotypic variation explained by differences among metapopulations varied largely among traits: it accounted for 40% to 60% of the phenotypic variation for LA and P : LA while it was less than 30% for SLA and $\Delta^{13}\text{C}$ (**Fig. 2.2.4**).

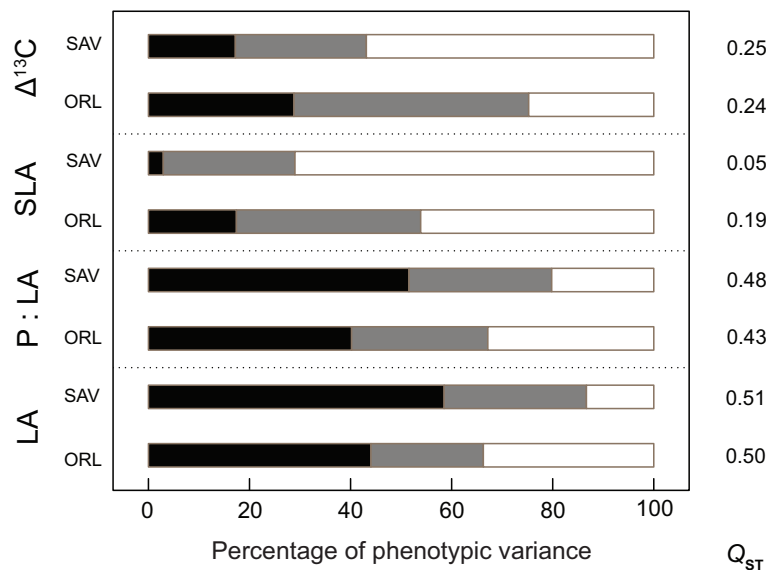


Figure 2.2.4. Partitioning of phenotypic variance for leaf traits in the two common gardens, Orléans (ORL) and Savigliano (SAV). The bars represent phenotypic variance components expressed as percentage: genetic variance (tinted bars) and residual variance (open bars). The genetic variance component was further partitioned into metapopulation (black bars) and genotype within metapopulation (grey bars) components. The coefficients of metapopulation differentiation (Q_{ST}) are given. See Table 2.2.2 for trait abbreviations.

The percentage of phenotypic variance explained by differences among metapopulations appeared to be modulated by the environment in a trait-dependent manner: it was greater in SAV for LA (59 vs. 44%) and P : LA (52 vs. 40%) while the opposite trend was observed for SLA (3 vs. 17%) and $\Delta^{13}\text{C}$ (17 vs. 29%) (**Fig. 2.2.4**). Graphical inspection, combined with the estimation of Spearman's rank coefficients among metapopulation means, indicated that the metapopulation ranking was highly conserved between the two common gardens for the traits related to leaf size (LA) and leaf shape (P : LA), while it was modified between ORL and SAV for structural and functional leaf traits (SLA and $\Delta^{13}\text{C}$) (**Fig. S2.2.3**).

For $\Delta^{13}\text{C}$, it is worth noting that the relationship among metapopulation means observed in ORL and SAV tended to be triangular: metapopulations with low values of $\Delta^{13}\text{C}$ in ORL also showed low values for this trait in SAV whereas metapopulations with high values of $\Delta^{13}\text{C}$ in ORL exhibited a great range of variation for this trait in SAV (**Fig. S2.2.3**).

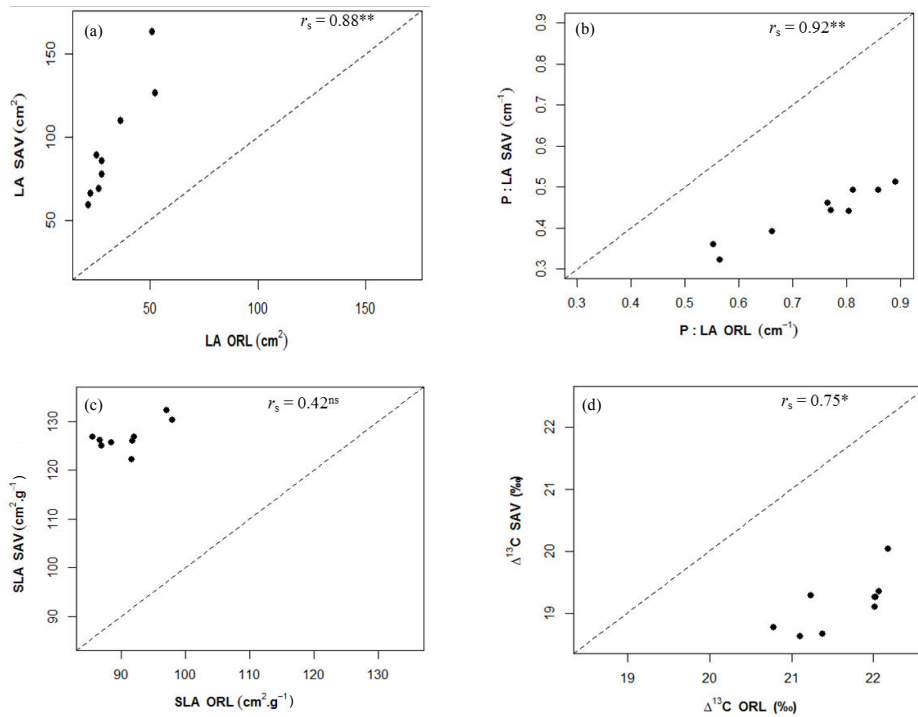


Fig. S2.2.3. Stability of the metapopulation ranking between the two common gardens (Orléans, ORL and Savigliano, SAV) for (a) lamina area (LA), (b) the ratio between lamina perimeter and lamina area (P : LA), (c) specific leaf area (SLA) and (d) bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$). Each point represents metapopulation means. The dashed lines indicate the 1:1 relationship. For all the studied traits, Spearman's rank coefficients (r_s) were computed on a metapopulation mean basis. Levels of significance are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, non-significant.

The level of metapopulation differentiation (Q_{ST}) for a given trait was comparable between ORL and SAV, but it largely varied among traits (**Fig. 2.2.4**). The highest Q_{ST} values were detected for LA ($Q_{ST} = 0.50$ at ORL and 0.51 at SAV) and P : LA ($Q_{ST} = 0.43$ at ORL and 0.48 at SAV) and the lowest one for SLA ($Q_{ST} = 0.19$ at ORL and 0.05 at SAV) (**Fig. 2.2.4**). For two of the most differentiated traits, LA and $\Delta^{13}C$, the differences between metapopulations could not be described according to a latitudinal cline irrespective of the common garden (**Fig. 2.2.1a,f**). Therefore, the patterns of pairwise metapopulation differentiation were investigated to evaluate how metapopulations clustered for these traits (**Fig. 2.2.5**). The geographical pattern of metapopulation differentiation was highly conserved between the two common gardens for LA (**Fig. 2.2.5a**). The metapopulations clustered into three major groups: the Eastern metapopulations, Rhin, Dranse and Ticino exhibited the highest values for LA, while the lowest ones were obtained for the metapopulations Nohèdes, Ramières and Paglia; intermediate values of LA were observed for the metapopulations Adour, StPryvé and ValAllier (**Fig. 2.2.1a, Fig. 2.2.5a**). Although the pattern of metapopulation differentiation for $\Delta^{13}C$ differed between the two common gardens, the metapopulations Rhin, Dranse and Ticino always displayed the lowest values for $\Delta^{13}C$, while the opposite trend was observed for the metapopulations Adour, Paglia, StPryvé and ValAllier (**Fig. 2.2.1f, Fig. 2.2.5b**).

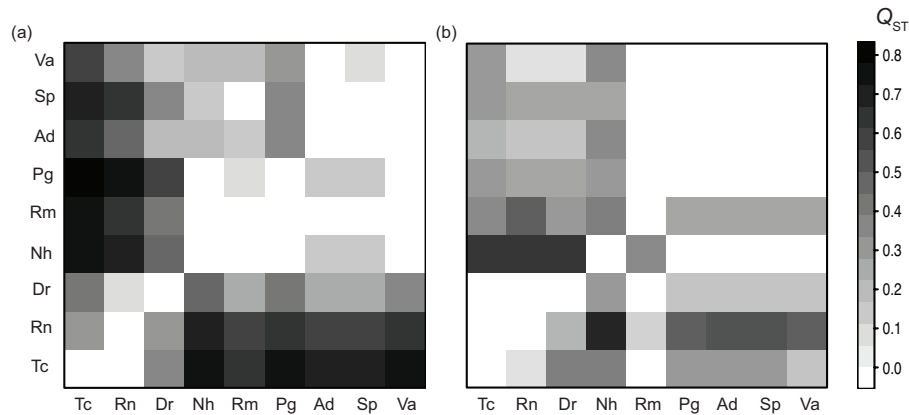


Figure 2.2.5. Patterns of pairwise genetic differentiation of metapopulations estimated with phenotypic data of two quantitative traits: (a) lamina area and (b) bulk leaf carbon isotope discrimination. Metapopulations were plotted on both X-axis and Y-axis and were ordered from the left to the right (X-axis) and from the bottom to the top (Y-axis) according to their level of differentiation with all the other metapopulations. Pairwise genetic differentiation of metapopulations was estimated for the two common gardens, Orléans (below the diagonal) and Savigliano (above the diagonal). Coloration is indicative of the coefficients of genetic differentiation according to the bar on the right. Metapopulation abbreviations are as in Figure 2.2.1.

DISCUSSION

In this paper, we evaluated the relative contribution of genetic and environmental effects to the phenotypic variation expressed for leaf morphology, leaf structure and $\Delta^{13}\text{C}$ in European *P. nigra* metapopulations. The study was conducted in two common gardens, one located in Central France (Orléans, ORL) and the other one in Northern Italy (Savigliano, SAV), such that robustness of metapopulation differentiation over environments could be tested. In SAV, the leaves exhibited, on average, a higher individual area, a more circular shape, a higher SLA and a lower value of $\Delta^{13}\text{C}$. These variations were attributed to the confounded effect of a higher soil fertility (Liu and Dickmann 1992, Ibrahim 1997) and an invigorating effect of shoot pruning in SAV (Tschaplinski and Blake 1989, 1995, Dickmann et al. 1996).

Partitioning of phenotypic variation within metapopulations

Our sampling strategy enabled to estimate genetic parameters for each metapopulation in each common garden, which is consistent with the fact that genetic variance components and heritability of traits are defined relative to one given population in a given environment (Visscher et al. 2008). The moderate to high values of H^2_{ind} reported for most leaf traits ($0.18 \leq H^2_{\text{ind}} \leq 0.79$) attested that the micro-environmental influences on phenotypic expression have been well-controlled in the two common gardens to allow the detection of significant genetic variation within the nine *P. nigra* metapopulations.

For most of the studied metapopulations, the phenotypic variance for leaf traits was significantly modulated by environmental conditions, as attested not only by environmental effects but also by a $G \times E$ interaction variance comparable or even greater than total genetic variance. However, the partitioning of the $G \times E$ interaction variance revealed contrasted interaction patterns depending on leaf traits. For LA, these interactions were explained by both changes in genotype ranking between the two common gardens and increased variation in SAV, while they were essentially explained by changes in genotype ranking between common gardens for SLA and $\Delta^{13}\text{C}$. These results indicate that the nine *P. nigra* metapopulations presented a substantial individual variation in the pattern of plastic responses for leaf traits to environmental variations.

As a pioneer tree species, the successful establishment of black poplar in the riparian habitat partly depends on its ability to rapidly colonize its environment which may notably depends on the variation expressed for phenotypic traits involved in resource acquisition and plant functioning, such as LA. Thus, the maintenance in *P. nigra* metapopulations of a high level of phenotypic plasticity for LA may contribute to high whole-plant plasticity and thus optimal population response to varying environmental conditions. The huge increase of variation observed for LA in SAV indicates that the contrast between *P. nigra* genotypes for this trait was exacerbated and may reflect different strategies in crown and leaf area development. Crown architecture determines leaf display, leaf distribution and canopy density and is therefore a critical determinant of whole-plant light interception (Hallé et al. 1978). A major part of the canopy architecture is influenced by the branching pattern. Poplars produce both proleptic and sylleptic branches. Proleptic branches are produced from buds that experienced a period of winter dormancy, while sylleptics develop from meristems during the same growing season in which they were formed (Remphrey and Powell 1985).

Sylleptic branches are characterized by a larger and faster development of leaf area when compared to the main stem axis (Scarascia-Mugnozza et al. 1989, Ceulemans et al. 1990, Zeleznik 2007). In addition, the large leaf area carried by sylleptic branches exports more carbon to the main stem and roots than main stem leaves that essentially contribute to height growth (Scarascia-Mugnozza et al. 1999). Leaf area distribution by main stem axis vs. sylleptic branches varies substantially among poplar genotypes (Ceulemans et al. 1990, Dunlap et al. 1995, Gielen et al. 2002, Zeleznik 2007, Broeckx et al. 2012) as well as in response to environmental conditions (Wu and Stettler 1998, Marron et al. 2006). These variations are known to play a key role in determining growth performances, a large number of sylleptics being generally associated with high growth performances (Ceulemans et al. 1990, Rae et al. 2004, Marron et al. 2006). Future research in black poplar should therefore adopt a better integrated approach by combining measurements at the leaf level but also at the whole-plant level to gain insights into the phenotypic plasticity of leaf size as well as of plant branchiness and crown architecture in response to environmental variations.

$\Delta^{13}\text{C}$ is a complex and composite trait reflecting primarily the balance between photosynthetic capacities and stomatal conductance to water vapour (in poplars for example, Monclus et al. 2006, Fichot et al. 2011, Rasheed et al. 2013). Plastic responses for $\Delta^{13}\text{C}$ are therefore potentially governed by the underlying responses of other morphological, structural and physiological components, including leaf nitrogen content and allocation to the photosynthetic apparatus, leaf density and/or leaf thickness, mesophyll conductance, stomatal density and stomatal morphology. The contribution of these components to the plastic responses for $\Delta^{13}\text{C}$ is likely to vary depending on environments and genetic background which may favour the detection of significant $G \times E$ interactions. The examination of $G \times E$ interactions for $\Delta^{13}\text{C}$ in forest tree species, including poplars, brought contrasted results, some studies reporting significant $G \times E$ interactions (Cregg et al. 2000, Ponton et al. 2002 in response to varying irradiance levels, Corcuera et al. 2010, Chamaillard et al. 2011 in response to site effect, Dillen et al. 2011, Toillon et al. 2013) while other failed to evidence such interactions (Johnsen et al. 1999, Ponton et al. 2002, Chamaillard et al. 2011 in response to varying water availability). As suggested by Dillen et al. (2011), the contrasted results for $G \times E$ interactions for $\Delta^{13}\text{C}$ could be partly explained by differences in i) plant material, genetic background and relatedness between studied genotypes, ii) the number of genotypes studied and iii) the nature of environmental variables driving plastic responses for $\Delta^{13}\text{C}$.

Genetic differentiation among metapopulations

Genetic differentiation among the nine *P. nigra* metapopulations was evidenced in the two common gardens for most of the studied leaf traits despite the substantial level of genetic variation expressed within metapopulations. In forest tree species, many studies examining jointly the levels and the patterns of population differentiation for quantitative traits have been conducted under single environments. Our two-site common garden experiment therefore enabled us to assess whether the patterns of metapopulation differentiation were conserved in different environments.

The nine *P. nigra* metapopulations were highly differentiated for LA in the two common gardens ($Q_{ST} = 0.50$ at ORL and 0.51 at SAV). This level of genetic differentiation was of the same order of magnitude as the one reported in a set of 14 *P. nigra* metapopulations, covering a comparable geographic range, for growth cessation ($Q_{ST} = 0.59$) and bud set ($Q_{ST} = 0.60$) (Rohde et al. 2011), two traits known to play a key role for local adaptation of natural populations of forest tree species (Howe et al. 2003, Alberto et al. 2013) including poplars (Hall et al. 2007, Keller et al. 2011, Evans et al. 2014). Interestingly, the pattern of metapopulation differentiation for LA was highly conserved between the two common gardens, suggesting that the evolutionary forces that have shaped this pattern have left a strong imprint, such that the differences between metapopulations were robust to environmental variations. $Q_{ST} - F_{ST}$ comparisons, i.e. comparative studies of the divergence of populations for quantitative traits and the corresponding differentiation based on neutral molecular markers, provide a means for researchers to infer the action of natural selection on phenotypic traits (Merilä and Crnokrak 2001). Microsatellites genotyping of a set of European *P. nigra* populations partially overlapping with the set studied here has revealed that European populations of black poplar are weakly differentiated, pairwise F_{ST} values ranging from 0.002 to 0.158 among populations (Smulders et al. 2008). This range of pairwise F_{ST} values was much lower than the range of pairwise Q_{ST} observed for LA in the two common gardens (58% of pairwise Q_{ST} values ranging from 0.20 to 0.76 at ORL and 54% of pairwise Q_{ST} values ranging from 0.21 to 0.78 at SAV), which led us to hypothesize that the pattern of metapopulation differentiation for this trait could have been partly shaped by directional selection. In *Quercus suber*, Ramírez-Valiente et al. (2009) showed that leaf size was highly differentiated among 13 natural populations ($Q_{ST} = 0.46$) and the Q_{ST} value for this trait was much higher than the F_{ST} estimate (0.032), providing evidence of adaptive

differentiation. Comparable results were obtained for petiole length in natural populations of *P. balsamifera* ($Q_{ST} = 0.70$; Keller et al. 2011). On the basis of chloroplast DNA structuration patterns, Cottrell et al. (2005) have suggested that black poplar had several glacial refugia in Spain, in Italy and/or in Balkans from which Southern France and the Eastern part of Europe were respectively colonised after the ice age. The fact that the three Eastern *P. nigra* metapopulations (i.e. Rhin, Dranse and Ticino) clustered together for LA suggests that post-glacial events and subsequent routes of recolonisation may have also played a role in shaping the geographical pattern of genetic variation for LA in black poplar.

Natural populations of different forest tree species, including poplar species, have been found to exhibit low to moderate levels of genetic differentiation for $\Delta^{13}C$ ($0.06 \leq Q_{ST} \leq 0.21$) (Ramírez-Valiente et al. 2009, Keller et al. 2011, Lamy et al. 2011). Our results further confirmed this trend since the nine *P. nigra* metapopulations were moderately differentiated for $\Delta^{13}C$ in the two common gardens ($Q_{ST} = 0.24$ at ORL and 0.25 at SAV). We also evidenced that the pattern of metapopulation differentiation for $\Delta^{13}C$ was not robust to environmental variations between the two common gardens. Given that $\Delta^{13}C$ is a composite trait, the physiological components driving the variations observed for $\Delta^{13}C$ may vary depending on environmental conditions which may be responsible for significant changes of population clustering across environments. In forest tree species, the variations observed for $\Delta^{13}C$ have been found to be under the control of several QTLs (four to ten QTLs) with small to moderate effects (2% to 30% of the total phenotypic variation) and not always stable over time and environmental conditions (Brendel et al. 2002, Casasoli et al. 2004, Rönnberg-Wästljung et al. 2005, Rae et al. 2009, Monclus et al. 2012). The complex genetic architecture underlying the variations of $\Delta^{13}C$ may also explain the difficulty to observe stable pattern of population differentiation for this trait across environments. As suggested by Muir et al. (2014), phenotypic traits that are highly polygenic, such as $\Delta^{13}C$, may respond to selection less readily than traits governed by few loci with large effects because of the potential existence of significant pleiotropy and correlations with other traits and because large genetic changes induced by directional selection are necessary to achieve phenotypic changes.

CONCLUSIONS

Our two-site common garden experiment revealed that the nine *P. nigra* metapopulations present substantial genetic variation and phenotypic plasticity for leaf morphology, leaf structure and $\Delta^{13}\text{C}$, which both represent potentially significant determinants of the capacities of populations to respond, on a short-term basis and over generations, to environmental variations. The patterns of metapopulation differentiation observed for leaf area and $\Delta^{13}\text{C}$ differed from the latitudinal cline previously reported for bud set in a set of comparable natural populations of black poplar, suggesting that the patterns of genetic variation for these traits are shaped by different evolutionary and/or environmental drivers. Finally, our findings also evidenced that the three Eastern metapopulations, Rhin, Dranse and Ticino, were highly differentiated from all the other metapopulations for both individual leaf area and $\Delta^{13}\text{C}$, exhibiting on average the largest individual leaf area and the lowest $\Delta^{13}\text{C}$. This specific multivariate behaviour could be the product of co-selection on a set of traits that maximize plant fitness under specific environmental conditions. These results also suggest that glacial refugia and subsequent routes of recolonisation also played a role in shaping the patterns of genetic variation for leaf traits in *P. nigra* metapopulations. Recent advances in next-generation DNA sequencing technologies have made possible the development of high-throughput Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping platforms that allow for simultaneous interrogation of thousands of SNPs in poplar (Geraldès et al. 2013). Such resources will provide a valuable tool to develop association genetics studies and to identify potential signatures of selection in candidate genomic regions for leaf area and $\Delta^{13}\text{C}$ in black poplar.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Marc Villar and the different owners of the EVOLTREE *P. nigra* collection for the access to the referenced genetic resources of black poplar; Olivier Forestier for the technical assistance of Guéméné-Penfao Forest State Nursery in preparation of the cuttings; Patrick Poursat and the staff of the experimental unit of INRA-GBFOR for the establishment, management and participation to measures in the experimental plantation in Orléans; Alasia Franco Vivai staff for the management of the experimental plantation in

Savigliano; Isabelle Le Jan, Francesco Palmieri and Antonio Santilli for their helpful assistance in data collection. The authors also thank Claude Bréchet and Christian Hossann of the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at INRA Nancy for isotopic and elemental analyses; Richard Antoine and the staff of the service unit 10 Soil Analysis Laboratory of Arras (US10, LAS Arras, INRA Lille, France) for soil analysis. The authors thank three anonymous reviewers and the Associate Editor for their helpful comments on previous versions of the manuscript.

FUNDING

This study was carried out with financial support from the NOVELTREE project (FP7 – 211868). J.G. was supported by a PhD grant from the ‘Conseil Régional, Région Centre, France’.

REFERENCES

- Abràmoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11:36-42.
- Al Afas N, Pellis A, Niinemets Ü, Ceulemans R (2005) Growth and production of a short rotation coppice culture of poplar. II. Clonal and year-to-year differences in leaf and petiole characteristics and stand leaf area index. *Biomass Bioenerg*. 28:536-547.
- Alberto FJ, Aitken SN, Alia R, Gonzalez-Martinez SC, Hanninen H, Kremer A, Lefevre F, Lenormand T, Yeaman S, Whetten R, Savolainen O (2013) Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Glob. Change Biol*. 19:1645-1661.
- 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*. 66:413-424.
- Aranda I, Pardos M, Puértolas J, Jiménez MD, Pardos JA (2007) Water-use efficiency in cork oak (*Quercus suber*) is modified by the interaction of water and light availabilities. *Tree Physiol*. 27:671-677.

- Aranda I, Alía R, Ortega U, Dantas Â, 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.
- Benomar L, DesRochers A, Larocque GR (2011) Changes in specific leaf area and photosynthetic nitrogen-use efficiency associated with physiological acclimation of two hybrid poplar clones to intracolonial competition. *Can. J. For. Res.* 41:1465-1476.
- 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.* 65:503-512.
- 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.
- Broeckx LS, Verlinden MS, Vangronsveld J, Ceulemans R (2012) Importance of crown architecture for leaf area index of different *Populus* genotypes in a high-density plantation. *Tree Physiol.* 32:1214-1226.
- Bylesjö M, Segura V, Soolanayakanahally R, Rae A, Trygg J, Gustafsson P, Jansson S, Street N (2008) LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. *BMC Plant Biol.* 8:82-91.
- Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi MC, Barreneche T, Lauteri M, Villani F (2004) Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant Cell Environ.* 27:1088-1101.
- Casella E, Ceulemans R (2002) Spatial distribution of leaf morphological and physiological characteristics in relation to local radiation regime within the canopies of 3-year-old *Populus* clones in coppice culture. *Tree Physiol.* 22:1277-1288.
- Ceulemans R, Stettler RF, Hinckley TM, Isebrands JG, Heilman PE (1990) Crown architecture of *Populus* clones as determined by branch orientation and branch characteristics. *Tree Physiol.* 7:157-167.
- Chamaillard S, Fichot R, Vincent-Barbaroux C, Bastien C, Depierreux C, Dreyer E, Villar M, Brignolas F (2011) Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three *Populus nigra* L. populations. *Tree Physiol.* 31:1076-1087.

- Cooke JEK, Martin TA, Davis JM (2005) Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytol.* 167:41-52.
- Corcuera L, Gil-Pelegrin E, Notivol E (2010) Phenotypic plasticity in *Pinus pinaster* $\delta^{13}\text{C}$: environment modulates genetic variation. *Ann. For. Sci.* 67:812-812.
- Cottrell JE, Krystufek V, Tabbener HE, Milner AD, Connolly T, Sing L, Fluch S, Burg K, Lefèvre F, Achard P, Bordács S, Gebhardt K, Vornam B, Smulders MJM, Broeck AHV, Slycken JV, Storme V, Boerjan W, Castiglione S, Fossati T, Alba N, Agúndez D, Maestro C, Notivol E, Bovenschen J, van Dam BC (2005) Postglacial migration of *Populus nigra* L.: lessons learnt from chloroplast DNA. *For. Ecol. Manag.* 206:71-90.
- Craig H (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 12:133-149.
- Cregg BM, Olivas-García JM, Hennessey TC (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.
- Curtis PS, Vogel CS, Pregitzer KS, Zak DR, Teeri JA (1995) Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO_2 on leaf area growth and carbon gain physiology in *Populus \times euramericana* (Dode) Guinier. *New Phytol.* 129:253-263.
- de Miguel M, Sanchez-Gomez D, Cervera MT, Aranda I (2011) Functional and genetic characterization of gas exchange and intrinsic water use efficiency in a full-sib family of *Pinus pinaster* Ait. in response to drought. *Tree Physiol.* 32:94-103.
- 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.
- DesRochers A, van den Driessche R, Thomas BR (2007) The interaction between nitrogen source, soil pH, and drought in the growth and physiology of three poplar clones. *Can. J. Bot.* 85:1046-1057.
- Dickmann DI, Nguyen PV, Pregitzer KS (1996) Effects of irrigation and coppicing on above-ground growth, physiology, and fine-root dynamics of two field-grown hybrid poplar clones. *For. Ecol. Manag.* 80:163-174.
- Dickmann DI, Kuzovkina J (2008) Poplars and Willows in the world - Chapter 2 : Poplars and Willows of the world, with emphasis on silviculturally important species, FAO/IPC (Food and Agricultural Organization of the United States/International Poplar Commission). Eds. J.G. Isebrands and J. Richardson, Rome, Italy.

- Dillen SY, Monclus R, Barbaroux C, Bastien C, Ceulemans R, Dreyer E, Villar M, Brignolas F, Marron N (2011) Is the ranking of poplar genotypes for leaf carbon isotope discrimination stable across sites and years in two different full-sib families? *Ann. For. Sci.* 68:1265-1275.
- 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.
- Dunlap JM, Stettler RF, Heilman PE (1995) Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. VIII. Leaf and crown morphology of native *P. trichocarpa* clones from four river valleys in Washington. *Can. J. For. Res.* 25:1710-1724.
- Evans LM, Slavov GT, Rodgers-Melnick E, Martin J, Ranjan P, Muchero W, Brunner AM, Schackwitz W, Gunter L, Chen J-G, Tuskan GA, DiFazio SP (2014) Population genomics of *Populus trichocarpa* identifies signatures of selection and adaptive trait associations. *Nat. Genet.* 46:1089-1096.
- 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.
- 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.
- Forsman A (2014) Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity. In press.*
- Geraldes A, DiFazio SP, Slavov GT, Ranjan P, Muchero W, Hannemann J, Gunter LE, Wymore AM, Grassa CJ, Farzaneh N, Porth I, McKown AD, Skyba O, Li E, Fujita M, Klápště J, Martin J, Schackwitz W, Pennacchio C, Rokhsar D, Friedmann MC, Wasteneys GO, Guy RD, El-Kassaby YA, Mansfield SD, Cronk QCB, Ehltng J, Douglas CJ, Tuskan GA (2013) A 34K SNP genotyping array for *Populus trichocarpa*: Design, application to the study of natural populations and transferability to other *Populus* species. *Mol. Ecol. Resour.* 13:306-323.
- Gielen B, Calfapietra C, Claus A, Sabatti M, Ceulemans R (2002) Crown architecture of *Populus* spp. is differentially modified by free-air CO₂ enrichment (POPFACE). *New Phytol.* 153:91-99.

- Gornall JL, Guy RD (2007) Geographic variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Can. J. Bot.* 85:1202-1213.
- Grossnickle SC, Fan S, Russell JH (2005) Variation in gas exchange and water use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees.* 19:32-42.
- Hall D, Luquez V, Garcia VM, St Onge KR, Jansson S, Ingvarsson PK (2007) Adaptive population differentiation in phenology across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula* L.): a comparison of neutral markers, candidate genes and phenotypic traits. *Evolution.* 61:2849-2860.
- Hallé F, Oldeman RAA, Tomlinson PB (1978) Tropical trees and forests: an architectural analysis. Springer-Verlag, Berlin, 441 p.
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC, Chen THH (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Can. J. Bot.* 81:1247-1266.
- Ibrahim L (1997) Main effects of nitrogen supply and drought stress upon whole-plant carbon allocation in poplar. *Can. J. For. Res.* 27:1413-1419.
- Johnsen KH, Flanagan LB, Huber DA, Major JE (1999) Genetic variation in growth, carbon isotope discrimination, and foliar N concentration in *Picea mariana*: analyses from a half-diallel mating design using field-grown trees. *Can. J. For. Res.* 29:1727-1735.
- Jump AS, Marchant R, Peñuelas J (2009) Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends Plant Sci.* 14:51-58.
- 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, Edwards PJ, Kollmann J (2002) The life history of *Salicaceae* living in the active zone of floodplains. *Freshwater Biol.* 47:733-748.
- Keller SR, Soolanayakanahally RY, Guy RD, Silim SN, Olson MS, Tiffin P (2011) Climate-driven local adaptation of ecophysiology and phenology in balsam poplar, *Populus balsamifera* L. (*Salicaceae*). *Am. J. Bot.* 98:99-108.
- Lamy J-B, Bouffier L, Burlett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S (2011) Uniform selection as a primary force reducing population genetic differentiation of cavitation resistance across a species range. *PLoS ONE.* 6:e23476.

- Larocque GR (1999) Performance and morphological response of the hybrid poplar DN-74 (*Populus deltoides* × *nigra*) under different spacings on a 4-year rotation. *Ann. For. Sci.* 56:275-287.
- 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. Evolution. 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*, International Plant Genetic Resources Institute edn., Rome, Italy.
- Liu Z, Dickmann DI (1992) Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. I. Morphology and growth. *Can. J. Bot.* 70:2265-2270.
- 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 J-M, Brignolas F (2005) Diversity of leaf traits related to productivity in 31 *Populus deltoides* × *Populus nigra* clones. *Tree Physiol.* 25:425-435.
- Marron N, Bastien C, Sabatti M, Taylor G, Ceulemans R (2006) Plasticity of growth and sylleptic branchiness in two poplar families grown at three sites across Europe. *Tree Physiol.* 26:935-946.
- Marron N, Ceulemans R (2006) Genetic variation of leaf traits related to productivity in a *Populus deltoides* × *Populus nigra* family. *Can. J. For. Res.* 36:390-400.
- Merilä J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *J. Evolution. Biol.* 14:892-903.
- 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, Villar M, Delmotte FM, 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 of *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.
- Monclus R, Leplé J-C, Bastien C, Bert P-F, Villar M, Marron N, Brignolas F, Jorge V (2012) Integrating genome annotation and QTL position to identify candidate genes for productivity, architecture and water-use efficiency in *Populus* spp. *BMC Plant Biol.* 12:173-188.
- Muir CD, Pease JB, Moyle LC (2014) Quantitative genetic analysis indicates natural selection on leaf phenotypes across wild tomato species (*Solanum* sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Genetics*. *In press*.
- Muir W, Nyquist WE, Xu S (1992) Alternative partitioning of the genotype-by-environment interaction. *Theor. Appl. Genet.* 84:193-200.
- Nicotra AB, Leigh A, Boyce CK, Jones CS, Niklas KJ, Royer DL, Tsukaya H (2011) The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Funct. Plant Biol.* 38:535-552.
- Niinemets Ü, Sack L (2006) Structural determinants of leaf light harvesting capacity and photosynthetic potentials. *Prog. Bot.* 67:385-418.
- Niinemets Ü (2014) Is there a species spectrum within the world-wide leaf economics spectrum? Major variations in leaf functional traits in the Mediterranean sclerophyll *Quercus ilex*. *New Phytol.* 205:973-993.
- Petit RJ, Hampe A (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:187-214.
- Ponton S, Dupouey J-L, Bréda 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 Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria.
- 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.

- Rae AM, Street NR, Robinson KM, Harris N, Taylor G (2009) Five QTL hotspots for yield in short rotation coppice bioenergy poplar: the poplar biomass loci. *BMC Plant Biol.* 9:23-36.
- Ramírez-Valiente JA, Lorenzo Z, Soto A, Valladares F, Gil L, Aranda I (2009) Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance. *Mol. Ecol.* 18:3803-3815.
- Ramírez-Valiente JA, Sánchez-Gómez D, Aranda I, Valladares F (2010) Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiol.* 30:618-627.
- Rasheed F, Dreyer E, Richard B, Brignolas F, Montpied P, Le Thiec D (2013) Genotype differences in ^{13}C discrimination between atmosphere and leaf matter match differences in transpiration efficiency at leaf and whole-plant levels in hybrid *Populus deltoides* \times *nigra*. *Plant Cell Environ.* 36:87-102.
- Reich PB, Wright IJ, Lusk CH (2007) Predicting leaf physiology from simple plant and climate attributes: a global GLOPNET analysis. *Ecol. Appl.* 17:1982-1988.
- Remphrey WR, Powell GR (1985) Crown architecture of *Larix laricina* saplings: sylleptic branching on the main stem. *Can. J. Bot.* 63:1296-1302.
- 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, Fabbrini 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.
- Rönnberg-Wästljung AC, Glynn C, Weih M (2005) QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* \times *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes. *Theor. Appl. Genet.* 110:537-549.
- Sack L, Cowan PD, Jaikumar N, Holbrook NM (2003) The ‘hydrology’ of leaves: coordination of structure and function in temperate woody species. *Plant Cell Environ.* 26:1343-1356.

- Scarascia-Mugnozza GE, Isebrands JG, Hinckley TM, Stettler RF (1989) Dynamics of light interception, leaf area and biomass production in *Populus* clones in the establishment year. *Ann. For. Sci.* 46:515s-518s.
- Scarascia-Mugnozza GE, Hinckley TM, Stettler RF, Heilman PE, Isebrands JG (1999) Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. III. Seasonal carbon allocation patterns from branches. *Can. J. For. Res.* 29:1419-1432.
- Siegwolf RTW, Matussek R, Saurer M, Maurer S, Günthardt-Goerg MS, Schmutz P, Bucher JB (2001) Stable isotope analysis reveals differential effects of soil nitrogen and nitrogen dioxide on the water use efficiency in hybrid poplar leaves. *New Phytol.* 149:233-246.
- Singh M, Ceccarelli S, Hamblin J (1993) Estimation of heritability from varietal trials data. *Theor. Appl. Genet.* 86:437-441.
- Smulders MJM, Cottrell JE, Lefèvre F, van der Schoot J, Arens P, Vosman B, Tabbener HE, Grassi F, Fossati T, Castiglione S, Krystufek V, Fluch S, Burg K, Vornam B, Pohl A, Gebhardt K, Alba N, Agúndez D, Maestro C, Notivol E, Volosyanchuk R, Pospísková M, Bordács S, Bovenschen J, van Dam BC, Koelewijn HP, Halfmaerten D, Ivens B, van Slycken J, Vanden Broeck A, Storme V, Boerjan W (2008) Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: consequences for conservation and restoration. *For. Ecol. Manag.* 255:1388-1399.
- 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.
- Spitze K (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics.* 135:367-374.
- Toillon J, Fichot R, Dallé E, Berthelot A, Brignolas F, Marron N (2013) Planting density affects growth and water-use efficiency depending on site in *Populus deltoides* × *P. nigra*. *For. Ecol. Manag.* 304:345-354.
- Tschaplinski TJ, Blake TJ (1989) Photosynthetic reinvigoration of leaves following shoot decapitation and accelerated growth of coppice shoots. *Physiol. Plant.* 75:157-165.

- Tschaplinski TJ, Blake TJ (1995) Growth and carbohydrate status of coppice shoots of hybrid poplar following shoot pruning. *Tree Physiol.* 15:333-338.
- Valladares F, Martinez-Ferri E, Balaguer L, Perez-Corona E, Manrique E (2000) Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytol.* 148:79-91.
- Visscher PM, Hill WG, Wray NR (2008) Heritability in the genomics era — concepts and misconceptions. *Nat. Rev. Genet.* 9:255-266.
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas M-L, 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.
- Wright IJ, Reich PB, Cornelissen JHC, Falster DS, Groom PK, Hikosaka K, Lee W, Lusk CH, Niinemets Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Warton DI, Westoby M (2005) Modulation of leaf economic traits and trait relationships by climate. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 14:411-421.
- Wu R, Stettler RF (1998) Quantitative genetics of growth and development in *Populus*. III. Phenotypic plasticity of crown structure and function. *Heredity.* 81:299-310.
- 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.
- Zeleznik JD (2007) Effects of apical meristem loss on sylleptic branching and growth of hybrid poplar. *Biomass Bioenerg.* 31:453-459.
- Zhang J, Marshall JD, Jaquish BC (1993) Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. *Oecologia.* 93:80-87.
- 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.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES : relations entre la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et les performances de croissance

Les résultats présentés dans les **Chapitres 2.1** et **2.2** nous ont permis de juger du niveau de structuration génétique pour la phénologie de croissance et WUE et de sa concordance avec la structuration géographique de la collection européenne étudiée. L'objectif de cette dernière partie du **Chapitre 2** est de juger des relations entre ces caractères fonctionnels. Par ailleurs, le peuplier noir étant l'une des espèces parentes des hybrides de peuplier euraméricain commercialisés et cultivés en Europe pour la production de bois, nous avons également évalué les relations entre les performances de croissance et la phénologie de croissance ainsi que WUE. Afin de s'affranchir des effets de structuration de la variabilité génétique, ces relations phénotypiques ont été évaluées au niveau intra-métapopulation à partir des moyennes génotypiques. Les relations entre la phénologie de croissance et WUE ont été évaluées sur les neuf métapopulations naturelles de peuplier noir pour lesquelles nous disposons de l'ensemble de ces données. Les performances de croissance ont été appréciées *via* la circonférence à 1 m du sol (CIR, en mm). Les mesures de circonférence ont été réalisées sur l'ensemble des individus à ORL et SAV. Ces mesures ont été respectivement effectuées au cours de la deuxième (2009) et de la troisième saison de végétation (2010) après plantation à ORL et SAV. Quel que soit le site expérimental, la circonférence à 1 m du sol a été mesurée sur des tiges de deux ans. Avant de procéder à l'analyse des relations entre caractères, nous présentons, succinctement, la variabilité phénotypique et ses composantes pour la circonférence à 1 m du sol au sein des 13 métapopulations naturelles de peuplier noir dans les deux sites expérimentaux, ORL et SAV.

1. Composantes de la variabilité phénotypique pour les performances de croissance

Les performances de croissance, évaluées *via* la circonférence à 1 m du sol (CIR), variaient significativement entre sites expérimentaux (**Fig. RC1**). En moyenne, la circonférence à 1 m du sol atteinte à SAV était près de quatre fois supérieure à la circonférence atteinte à ORL (173 mm *vs.* 45 mm ; **Fig. RC1**). L'amplitude de variation entre moyennes de géotypes extrêmes était également supérieure à SAV (235 mm *vs.* 58 mm ; **Fig. RC1**). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le site à SAV était caractérisé par un niveau de fertilité plus élevé ce qui a favorisé l'expression de la variabilité pour les performances de croissance.

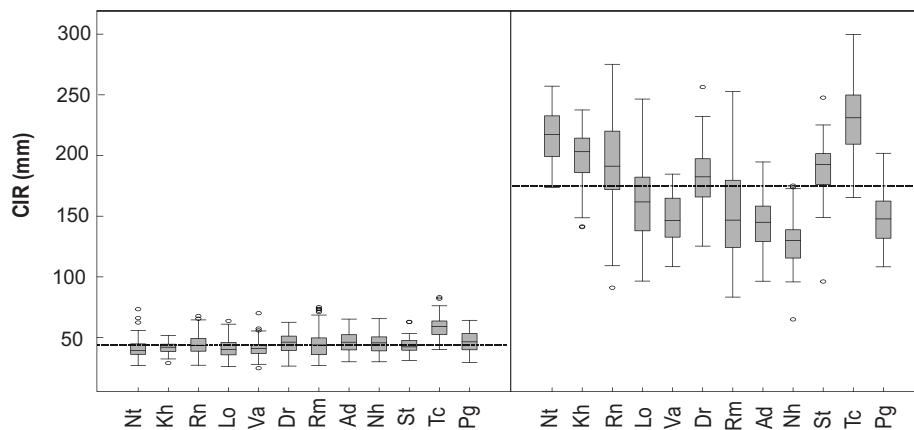


Figure RC1. Variabilité phénotypique exprimée pour la circonférence à 1 m du sol (CIR) au sein des 13 métapopulations naturelles de peuplier noir installées en test clonal à Orléans (ORL) et Savigliano (SAV). Chaque boîte à pattes est construite à partir des moyennes géotypiques et est constituée du quartile en dessous (Q1) et au-dessus (Q3) de la médiane. Les barres verticales représentent les valeurs minimales et maximales. Les valeurs extrêmes supérieures à 1,5 fois l'espace interquartiles ($Q_3 - Q_1$) sont représentées par des cercles. Les boîtes à pattes ont été colorées en gris lorsque la variabilité génétique exprimée dans la métapopulation est significative. Les métapopulations ont été ordonnées de la gauche vers la droite par pays selon un gradient latitudinal décroissant. *Abréviations* : Nt, Netherlands ; Kh, Kuhkopf ; Rn, Rhin ; Lo, Loire ; Va, ValAllier ; Dr, Dranse ; Rm, Ramières ; Ad, Adour ; Nh, Nohèdes ; St, Stura ; Tc, Ticino ; Pg, Paglia.

Des différences significatives entre géotypes ($P < 0,05$) ont été détectées pour CIR au sein de chaque métapopulation dans les deux sites expérimentaux (**Fig. RC1**). Les valeurs d'héritabilité individuelle au sens large (H^2_{ind}) étaient faibles (0,10) à fortes (0,62) selon les métapopulations et le site expérimental étudiés. En moyenne, H^2_{ind} était supérieure à SAV (0,40 vs. 0,31). En moyenne, le coefficient de variation génétique (CV_G) était comparable entre ORL et SAV et variait de 7 % à 21 % entre métapopulations. Des interactions Génotype \times Site ($G \times S$) significatives ont été détectées pour l'ensemble des métapopulations étudiées. Elles expliquaient entre 1 % et 5 % de la variabilité phénotypique exprimée pour CIR, en fonction des métapopulations. De manière générale, l'importance relative des interactions $G \times S$ dans la variabilité phénotypique était comparable voir même supérieure aux effets génétiques ($1,0 \leq \sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_G \leq 9,0$). Pour cinq des 13 métapopulations étudiées, les coefficients de corrélation de Spearman (r_s), calculés à partir des moyennes génotypiques pour CIR, étaient non-significatifs ($P > 0,05$). Lorsqu'ils étaient significatifs, les valeurs prises par ce coefficient étaient faibles à modérées ($0,32 \leq r_s \leq 0,60$), indiquant que les interactions $G \times S$ étaient en partie expliquées par des changements de rangs génotypiques entre sites expérimentaux.

Des différences significatives entre métapopulations ($P < 0,05$) ont été détectées pour CIR dans les deux sites expérimentaux (**Fig. RC1**). Les différences entre métapopulations étaient exacerbées à SAV : elles expliquaient 44 % de la variabilité phénotypique à SAV alors qu'elles n'expliquaient que 11 % de la variabilité phénotypique à ORL. Le coefficient de différenciation génétique des métapopulations pour CIR (Q_{ST}) était fort à SAV ($Q_{ST} = 0,46$) alors qu'il était faible à ORL ($Q_{ST} = 0,11$). De façon intéressante, les différences entre métapopulations pour CIR à SAV semblaient en partie se structurer selon un gradient latitudinal mais inverse à celui observé pour la date de formation du bourgeon terminal (**Fig. RC1**). En effet, les métapopulations septentrionales, telles que 'Netherlands', 'Kuhkopf' et 'Rhin', présentaient de fortes valeurs de CIR ; au contraire, certaines métapopulations méridionales, telles que 'Ramières' ou 'Paglia', présentaient de faibles valeurs de CIR (**Fig. RC1**). Dans une étude réalisée au sein de dix populations naturelles de *P. balsamifera*, Keller et al. (2011) ont mis en évidence que les populations se différenciaient pour leur performance de croissance selon un gradient latitudinal comparable : les populations issues de hautes latitudes présentaient une croissance supérieure aux autres populations. Ce résultat était alors expliqué par le fait que les populations de hautes latitudes compensaient une saison de

végétation courte en ayant de fortes valeurs de surface foliaire, et de fortes capacités photosynthétiques qui leur permettaient de maximiser leur potentiel de croissance.

2. Relations phénotypiques entre la phénologie de croissance, WUE et les performances de croissance

Les relations phénotypiques entre la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$) et les descripteurs de phénologie végétative, la date du stade 3 de débourrement (date_3), la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal ($\text{date}_{1,5}$) et la longueur de la saison de végétation (LSV), étaient non-significatives ($P > 0,05$) pour la plupart des métapopulations étudiées dans les deux sites expérimentaux (**Fig. RC2**). Ces résultats indiquent que la phénologie de croissance et WUE sont, *a priori*, découplés chez *P. nigra*. Les métapopulations de peuplier noir maintenaient donc une importante variabilité génétique pour des caractères fonctionnels, *a priori*, indépendants, ce qui permet de maintenir à l'échelle de la métapopulation une diversité de combinaisons phénotypiques pouvant permettre d'augmenter leur capacité de réponse face à des variations environnementales. Les relations entre la phénologie de croissance et WUE, évaluée via $\Delta^{13}\text{C}$, ont été très peu étudiées chez les espèces forestières de régions tempérées. Or, elles fournissent des informations quant aux stratégies en termes d'efficacité d'utilisation des ressources au sein des populations naturelles. Aletà et al. (2009) ont mis en évidence une relation génétique positive entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la date de débourrement ainsi que la date de sénescence foliaire. Les individus qui débourraient ou perdaient leurs feuilles précocement étaient alors les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau. Cependant, l'intensité de la relation entre ces caractères était variable en fonction de l'année d'étude. Chez des hybrides interspécifiques de peuplier, Verlinden et al. (2015) ont mis en évidence une relation négative entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la longueur de la saison de végétation suggérant que les génotypes qui présentaient une saison de végétation longue étaient les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau. Toillon et al. (2013) n'ont détecté aucune relation significative entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la date de débourrement, la date de formation du bourgeon et la longueur de la saison de végétation chez des hybrides de peuplier euraméricain. Chez *P. nigra*, l'absence de corrélation entre WUE et la longueur de la saison de végétation suggère l'existence d'une diversité de stratégie en termes d'efficacité d'utilisation de la ressource en eau.

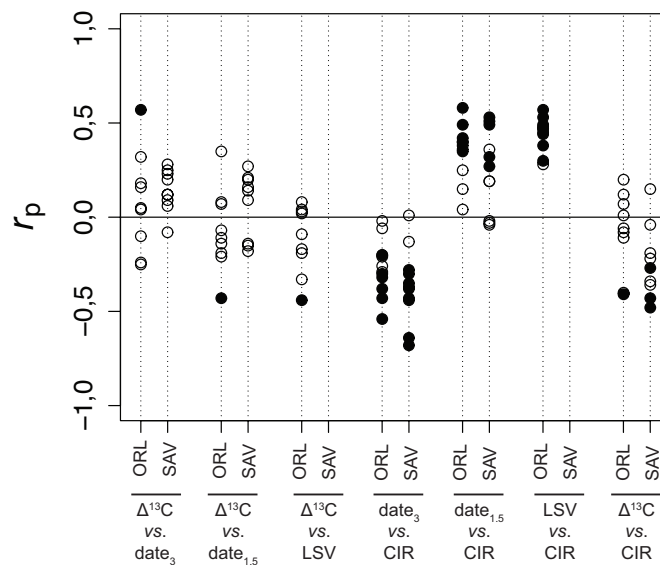


Figure RC2. Coefficient de corrélation linéaire de Pearson (r_p) calculés pour les relations phénotypiques entre la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$), la date du stade 3 de débourrement exprimée en jour calendaire (date_3), la date du stade 1,5 de formation du bourgeon terminal exprimée en jour calendaire ($\text{date}_{1,5}$), la longueur de la saison de végétation (LSV) et la circonférence à 1 m du sol (CIR). Le coefficient de corrélation linéaire de Pearson a été calculé à partir des moyennes génotypiques pour chaque métapopulation dans les deux sites expérimentaux, Orléans (ORL) et Savigliano (SAV), excepté pour la longueur de la saison de végétation qui n'a été mesurée qu'à Orléans. Les relations significatives au risque d'erreur de 5 % sont représentées par des cercles pleins noirs.

Pour six et neuf des métapopulations étudiées à ORL et à SAV, une relation phénotypique significative et négative ($-0,20 \leq r_p \leq -0,68$, $P < 0,05$) a été détectée entre la date de débourrement (date_3) et CIR (**Fig. RC2**). De façon comparable, pour sept et cinq des métapopulations étudiées à ORL et à SAV, une relation significative et positive ($0,27 \leq r_p \leq 0,58$, $P < 0,05$) a été détectée entre la date de formation du bourgeon terminal ($\text{date}_{1,5}$) et CIR (**Fig. RC2**). Cependant, ces relations étaient principalement expliquées par le fait que les génotypes qui débourraient tardivement ou qui formaient leurs bourgeons précocement présentaient de faibles valeurs de circonférence. La croissance est un caractère intégrateur complexe qui est au centre des programmes d'amélioration menés chez différentes espèces forestières et qui visent à augmenter de façon durable la production de bois tout en tenant compte des modifications de l'environnement. Ainsi, de nombreux travaux ont évalué les relations entre les performances de croissance et les caractères phénologiques qui jouent un

rôle central dans l'adaptation des populations aux contraintes thermiques. De manière générale, l'intensité de la relation entre les performances de croissance et la phénologie printanière ou automnale au niveau intra-population est très variable en fonction des espèces étudiées et de l'âge des arbres (voir revue dans Howe et al., 2003). Fondamentalement, l'intensité de la relation entre les caractères phénologiques et les performances de croissance dépend de : *i*) l'intensité de la relation entre ces caractères et la longueur de la saison de végétation et *ii*) de l'intensité de la relation entre la longueur de la saison de végétation et les performances de croissance. Le sens de la relation entre les performances de croissance et la date de débourrement est par ailleurs variable entre espèces, certaines études rapportant une relation négative (voire revue dans Howe et al., 2003; Aletà et al., 2009) entre ces caractères alors que d'autres études rapportent une relation positive (voir revue dans Howe et al., 2003; Notivol et al., 2007). Au contraire, le sens de la relation entre la croissance et la date d'arrêt de croissance ou de formation du bourgeon semble être conservé entre espèces : les individus qui ont un arrêt de croissance primaire et/ou une formation du bourgeon précoces ont une faible croissance (voir revue dans Howe et al., 2003).

Pour la plupart des métapopulations étudiées, une relation positive et modérée ($0,28 \leq r_p \leq 0,57$, $P < 0,05$) a été détectée à ORL entre la longueur de la saison de végétation et la circonférence à 1 m du sol (**Fig. RC2**). Cependant, cette relation était principalement expliquée par le fait que les génotypes qui présentaient une saison de végétation courte présentaient de faibles valeurs de circonférence. Ces résultats suggèrent donc qu'une saison de végétation courte est un facteur limitant pour la croissance mais qu'en revanche, une saison de végétation longue ne se traduit pas nécessairement par une augmentation des performances de croissance. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus chez des hybrides interspécifiques de peuplier (Toillon et al., 2013; Verlinden et al., 2015).

La relation entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la circonférence à 1 m du sol (CIR) était non-significative ($P > 0,05$) pour la plupart des métapopulations étudiées (**Fig. RC2**). Une relation modérée et négative entre $\Delta^{13}\text{C}$ et CIR ($-0,27 \leq r_p \leq -0,48$, $P < 0,05$) a été détectée pour seulement trois métapopulations, ce qui indique qu'au sein de ces métapopulations, les génotypes les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau présentaient les plus fortes valeurs de circonférence. L'ensemble de ces résultats semble donc suggérer une absence de compromis entre WUE et les performances de croissance au sein des populations naturelles de peuplier noir, ce qui confirme les résultats précédemment obtenus chez *P. nigra* (Chamaillard et al., 2011) et chez différents hybrides interspécifiques de peuplier (Rae et al., 2004; Monclus et al., 2005, 2006,

2009; Voltas et al., 2006; Bonhomme et al., 2008; Fichot et al., 2010; Toillon et al., 2013; Verlinden et al., 2015). Chez les autres espèces forestières de régions tempérées, les relations entre les performances de croissance et WUE, évaluée *via* $\Delta^{13}\text{C}$, ont été peu étudiées au niveau intra-population (Lauteri et al., 2004; Aletà et al., 2009; Lamy et al., 2011). Le sens de la relation était variable selon l'espèce, certaines études rapportant alors une relation négative (Lauteri et al., 2004; Aletà et al., 2009) alors que d'autres ont mis en évidence une relation positive (Lamy et al., 2011) entre $\Delta^{13}\text{C}$ et les performances de croissance. Le sens et l'intensité de la relation entre $\Delta^{13}\text{C}$ et les performances de croissance dépend de : **i**) quelle composante, l'assimilation nette de CO_2 ou la conductance stomatique à la vapeur d'eau, est à l'origine de la variabilité observée pour WUE_i et donc pour $\Delta^{13}\text{C}$ et **ii**) de l'intensité de la relation entre l'assimilation nette de CO_2 et les performances de croissance.

CONCLUSIONS & TRANSITION

Ce deuxième chapitre visait à évaluer la structuration géographique de la variabilité génétique pour la phénologie de croissance et WUE chez le peuplier noir afin de mettre en évidence de possibles phénomènes d'adaptation locale des populations. À cette fin, la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE a été évaluée au sein d'une collection européenne de peuplier noir installée dans deux tests clonaux en pépinière, en France et en Italie.

Nos résultats ont mis en évidence l'expression d'une importante variabilité génétique pour la date de débourrement, la date de formation du bourgeon terminal et $\Delta^{13}\text{C}$ au niveau intra-métapopulation et ce quels que soient le fond génétique et les conditions de croissance. Malgré cette importante variabilité intra-métapopulation, nous avons mis en évidence une différenciation génétique modérée à forte des métapopulations de peuplier noir pour les caractères phénologiques ($0,26 \leq Q_{ST} \leq 0,47$) et $\Delta^{13}\text{C}$ ($Q_{ST} \approx 0,25$). Les différences entre métapopulations pour la date de formation du bourgeon terminal se structuraient systématiquement selon un gradient latitudinal simple, suggérant une adaptation locale des populations aux conditions de photopériode. La variabilité génétique exprimée pour le débourrement semblait se structurer selon le degré de continentalité des sites d'origine des métapopulations, suggérant également une adaptation aux conditions de température. En revanche, pour $\Delta^{13}\text{C}$, les patrons de structuration étaient variables selon les conditions de croissance ; pour ce caractère, nos résultats ne semblaient donc pas vérifier l'hypothèse d'une différenciation adaptative des populations. Pour pouvoir conclure quant aux forces évolutives à l'origine de la différenciation observée pour les différents caractères fonctionnels, il aurait été nécessaire de comparer les valeurs de Q_{ST} aux valeurs de F_{ST} estimées à l'aide de marqueurs moléculaires supposés neutres pour cette même collection de métapopulations. Or, les travaux réalisés dans le cadre de la thèse n'ont pas permis de disposer de données moléculaires sur cette même collection de métapopulations de peuplier noir. Néanmoins, le niveau de différenciation génétique des populations de peuplier noir distribuée dans la partie occidentale de l'aire de répartition naturelle de l'espèce a déjà été évalué à l'aide de marqueurs moléculaires de type AFLP et microsatellites (Storme et al., 2004; Smulders et al., 2008). Ces études ont mis en évidence que le niveau de différenciation génétique des populations est variable selon le marqueur utilisé : les valeurs de F_{ST} estimées à l'aide des marqueurs AFLP étaient modérées ($F_{ST} \approx 0,27$) alors qu'elles étaient faibles pour les

microsatellites ($F_{ST} \approx 0,11$) (Storme et al., 2004; Smulders et al., 2008). La seule comparaison des valeurs de Q_{ST} et de F_{ST} ne permet donc pas de conclure quant aux forces évolutives qui ont façonné les patrons de différenciation génétique pour les caractères fonctionnels. Bien que les valeurs de F_{ST} soient variables entre marqueurs, les patrons de différenciation génétique étaient comparables quel que soit le marqueur utilisé. En effet, Storme et al. (2004) et Smulders et al. (2008) ont mis en évidence que les populations naturelles de peuplier noir, distribuées dans la partie occidentale de l'aire de répartition naturelle de l'espèce, se structuraient selon la géographie : les populations appartenant à un même bassin hydrographique et les populations de bassins hydrographiques proches géographiquement étaient faiblement différenciées entre elles alors qu'elles étaient plus fortement différenciées des autres populations. Cette structuration de la diversité génétique diffère de celle observée pour la date de débourrement et la date de formation du bourgeon terminal. Pour ces deux caractères phénologiques, l'hypothèse d'une adaptation locale des populations semble donc être vérifiée. En revanche, pour $\Delta^{13}C$, le regroupement des métapopulations semblait en partie refléter la position géographique des populations : les populations proches géographiquement, telles que 'Loire' et 'ValAllier' et 'Ramières' ou 'Adour', présentaient des valeurs comparables de $\Delta^{13}C$. Pour ce caractère, on ne peut donc pas exclure que la différenciation génétique observée reflète en partie l'histoire démographique des populations. Seulement trois métapopulations distribuées sur un gradient Nord-Sud dans la partie Est de l'aire échantillonnée (*i.e.*, 'Rhin', 'Dranse' et 'Ticino') étaient fortement différenciées des autres métapopulations alors qu'elles étaient faiblement différenciées entre elles et présentaient systématiquement de faibles valeurs de $\Delta^{13}C$. Ces résultats peuvent refléter un phénomène d'adaptation locale plus marqué sur certaines métapopulations de peuplier noir.

Les capacités de phénotypage pour la phénologie de croissance et WUE, évaluée *via* $\Delta^{13}C$, nous ont permis d'évaluer le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour ces caractères au sein d'une collection européenne de peuplier noir installée en test clonal dans deux sites expérimentaux. En revanche, les capacités de phénotypage pour la résistance à la cavitation constituent un véritable verrou méthodologique qui restreint la lecture de la variabilité génétique exprimée pour ce caractère à des effectifs de populations et d'individus limités. Tenant compte de ces limites méthodologiques, nous avons choisi d'évaluer la variabilité génétique exprimée pour la résistance à la cavitation au sein d'une population naturelle de peuplier noir. Cette stratégie de recherche nous a permis de

nous affranchir des effets de structuration de la variabilité génétique afin d'approfondir l'étude des relations fonctionnelles entre caractères. Deux types de relation ont été évalués : **i)** les relations entre la résistance à la cavitation et les propriétés structurales du xylème et **ii)** les relations entre la résistance à la cavitation, la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la production de biomasse aérienne. La population sélectionnée pour cette étude a été choisie parmi les 30 populations naturelles de peuplier noir qui constituaient la collection européenne établie dans le cadre du projet NovelTree. Il s'agit de la population Saint-Pryvé qui est naturellement présente en bord de Loire dans la Réserve Naturelle Nationale de Saint-Pryvé Saint-Mesmin (Loiret, France). Cette population a été choisie pour être représentative de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance, WUE et la production de biomasse aérienne en conditions hydriques non-limitantes chez le peuplier noir (Chamaillard et al., 2011 ; **Chapitre 2.1** et **Chapitre 2.2**). Cette population est représentée par 33 génotypes qui ont été installés, au printemps 2012, en test clonal en pépinière à l'INRA d'Orléans.

CHAPITRE 3

'RÉSISTANCE À LA CAVITATION chez P. nigra : variabilité génétique et relations avec la structure du xylème, la croissance, la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau au niveau intra-population'

Variabilité génétique pour la résistance à la cavitation et relations avec la structure du xylème, la croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau au sein d'une population naturelle de peuplier noir (*Populus nigra* L.)

JUSTINE GUET, RÉGIS FICHOT, CAMILLE LÉDÉE, FRANÇOISE LAURANS, HERVÉ COCHARD, SYLVAIN DELZON, CATHERINE BASTIEN & FRANCK BRIGNOLAS

Journal of Experimental Botany (2015) – doi : 10.1093/jxb/erv23

PRÉSENTATION SYNTHÉTIQUE DE L'ARTICLE

•**Contexte** L'essentiel du transfert de la sève brute vers les feuilles est assuré par le xylème. Au sein du xylème, la sève brute circule sous tension ce qui expose les vaisseaux conducteurs à des risques de cavitation et donc à une perte de fonctionnalité. Le phénomène de cavitation se produit lorsque les tensions xylémiennes dépassent une valeur seuil déterminée par les propriétés structurales des ponctuations entre vaisseaux. De nombreuses études réalisées au cours des 25 dernières années ont mis en évidence que la résistance à la cavitation est un caractère clé du fonctionnement hydrique des plantes en situation de sécheresse et pourrait donc jouer un rôle central dans l'adaptation des populations aux futurs événements de sécheresse extrême. Les études réalisées à l'échelle interspécifique suggèrent que la mise en place d'un xylème plus résistant à la cavitation aurait un coût en terme de fonctionnement hydrique et carboné de l'arbre. À l'échelle intraspécifique et au niveau inter-populations, les études n'ont généralement pas réussi à mettre en évidence de tels compromis. À ce jour, nous ignorons donc si les compromis détectés à l'échelle interspécifique reflètent de véritables relations fonctionnelles ou bien une évolution indépendante des caractères en réponse à des pressions de sélection naturelle.

•**Objectifs** L'objectif général de cette étude était d'évaluer la variabilité génétique pour la résistance à la cavitation et ses relations avec les caractères physiologiques en lien avec le fonctionnement hydrique et carboné au sein d'une population naturelle de peuplier noir (*Populus nigra* L.). Les objectifs spécifiques visaient à : *i*) évaluer la variabilité génétique exprimée pour la résistance à la cavitation au niveau intra-population chez *P. nigra*, *ii*) juger

des liens entre la résistance à la cavitation et les propriétés structurales du xylème en lien avec l'efficacité hydraulique et le renforcement mécanique et *iii*) évaluer les relations entre la résistance à la cavitation, les performances de croissance, la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau.

•**Stratégie expérimentale** L'étude a été réalisée à partir de 33 génotypes échantillonnés dans une population naturelle de peuplier noir située en bord de Loire dans la Réserve Naturelle Nationale de Saint-Pryvé Saint-Mesmin. Ces génotypes ont été installés en test clonal en pépinière à l'INRA d'Orléans et bénéficiaient d'un apport en eau non-limitant durant la saison de végétation. Les travaux ont été réalisés à partir de plançons démariés et enracinés depuis un an. Les mesures ont été réalisées sur la pousse de l'année. Les courbes de vulnérabilité à la cavitation ont été établies pour les 33 génotypes à partir de la technique Cavitrone. Les tensions xylémiennes induisant 12, 50 et 88 % de perte de conductivité hydraulique (Ψ_{12} , Ψ_{50} et Ψ_{88} , respectivement) ainsi que la pente de la courbe au point d'inflexion ont été estimées. Une analyse préliminaire des valeurs de Ψ_{50} a permis de sélectionner deux groupes de cinq génotypes présentant, respectivement, une résistance à la cavitation relativement faible (Ψ_{50} moyen = $-1,77 \pm 0,02$ MPa) et relativement forte (Ψ_{50} moyen = $-2,20 \pm 0,01$ MPa). Les propriétés structurales du xylème en lien avec l'efficacité de conduction (diamètre moyen des vaisseaux, pourcentage de surface allouée à la conduction et conductivité théorique spécifique), ou le renforcement mécanique au niveau cellulaire (épaisseur de la double paroi entre vaisseaux appariés et résistance au collapsus pariétal) ont été mesurées sur ces deux groupes de génotype. La densité du xylème et les caractères fonctionnels en lien avec l'efficacité d'utilisation de l'eau (la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C , $\Delta^{13}\text{C}$) et le potentiel de croissance (dates de débourrement et de formation du bourgeon, accroissement annuel en hauteur, biomasse aérienne sèche) ont été mesurés sur les 33 génotypes.

•**Résultats** Nos résultats ont permis de confirmer la grande vulnérabilité des peupliers à la cavitation. En moyenne, la tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique était de $-2,02$ MPa au sein de la population étudiée. Cependant, une variabilité génétique significative était exprimée pour la résistance à la cavitation, les valeurs de Ψ_{50} variant de $-1,72$ à $-2,31$ MPa. Une forte valeur d'héritabilité individuelle au sens-large (H^2_{ind}) a été estimée pour Ψ_{50} ($H^2_{\text{ind}} = 0,72$) et était associée à un faible coefficient de variation génétique ($\text{CV}_G = 7,3$ %). Une relation significative et négative a été détectée entre Ψ_{50} et la densité du xylème : les génotypes les plus résistants présentaient les valeurs de densité les

plus élevées. Des différences significatives ont été détectées entre les deux groupes de génotypes contrastés pour leur niveau de résistance à la cavitation pour l'ensemble des caractères associés à l'efficacité de conduction et au renforcement mécanique des vaisseaux. Les génotypes les plus résistants présentaient en moyenne une efficacité de conduction plus faible et un renforcement mécanique des vaisseaux plus important. Aucune relation significative n'a pu être détectée entre le niveau de résistance à la cavitation et les caractères en lien avec les performances de croissance et WUE.

• **Conclusions** Cette étude est la première à évaluer la variabilité génétique exprimée pour la résistance à la cavitation et ses relations avec la structure du xylème, les performances de croissance et l'efficacité d'utilisation au niveau intra-population chez une espèce riparienne. Nous avons mis en évidence que la population de peuplier noir étudiée exprimait une variabilité génétique significative pour la résistance à la cavitation en condition hydrique non-limitante. Les résultats obtenus suggèrent l'existence de compromis entre la résistance à la cavitation, l'efficacité de conduction et le renforcement mécanique du xylème au sein de la population étudiée. Étant donné que les génotypes appartiennent à une seule et même population et sont donc exposés, *in situ*, aux mêmes conditions environnementales et forces évolutives, les compromis mis en évidence dans cette étude confortent l'existence de relations fonctionnelles entre ces caractères. Enfin, nous n'avons détecté aucune relation significative entre la résistance à la cavitation, la production de biomasse aérienne et l'efficacité d'utilisation de l'eau ce qui suggère l'existence d'une diversité de combinaisons fonctionnelles au niveau intra-population.

Journal of Experimental Botany Advance Access published May 15, 2015

Journal of Experimental Botany
doi:10.1093/jxb/erv232



RESEARCH PAPER

Stem xylem resistance to cavitation is related to xylem structure but not to growth and water-use efficiency at the within-population level in *Populus nigra* L.

Justine Guet^{1,2}, Régis Fichot¹, Camille Lédée^{1,2}, Françoise Laurans², Hervé Cochard³, Sylvain Delzon⁴, Catherine Bastien² and Franck Brignolas^{1,*}

¹ Université d'Orléans, INRA, EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, F-45067 Orléans France

² INRA, UR 0588 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF), Centre de Recherche Val de Loire, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans Cedex 2, France

³ INRA, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

⁴ INRA, Université de Bordeaux, UMR 1202 BIOGECO, F-33405 Talence, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: franck.brignolas@univ-orleans.fr

Received 14 November 2014; Revised 7 April 2015; Accepted 20 April 2015

Editor: Howard Griffiths

Abstract

Xylem resistance to drought-induced cavitation is a key trait of plant water relations. This study assesses the genetic variation expressed for stem cavitation resistance within a population of a riparian species, the European black poplar (*Populus nigra* L.), and explores its relationships with xylem anatomy, water-use efficiency (WUE), and growth. Sixteen structural and physiological traits related to cavitation resistance, xylem anatomy, growth, bud phenology, and WUE were measured on 33 *P. nigra* genotypes grown under optimal irrigation in a 2-year-old clonal experiment in a nursery. Significant genetic variation was expressed for the xylem tension inducing 50% loss of hydraulic conductivity (Ψ_{50}) within the studied population, as attested by the high value of broad-sense heritability estimated for this trait ($H^2_{ind} = 0.72$). Stem cavitation resistance was associated with xylem structure: the more cavitation-resistant genotypes exhibited lower hydraulic efficiency and higher mechanical reinforcement as assessed from stem xylem cross sections. By contrast, Ψ_{50} was not significantly related to shoot height increment, total above-ground dry mass, or bulk leaf carbon isotope discrimination, a proxy for intrinsic WUE. These findings indicate that the trade-offs between xylem resistance to cavitation, hydraulic efficiency, and mechanical reinforcement can occur at the within-population level. Given that the studied genotypes were exposed to the same environmental conditions and evolutionary drivers *in situ*, the trade-offs detected at this scale are expected to reflect true functional relationships.

Key words: Bud phenology, bulk leaf carbon isotope discrimination, drought-induced cavitation, functional trade-offs, growth, *Populus nigra*, riparian species, water-use efficiency, within-population genetic variation, xylem structure.

Introduction

Long-distance water transport in plants occurs in the xylem, as a consequence of leaf transpiration. Because water is transported under tension in a metastable state, xylem conduits

can be subjected to cavitation events leading to hydraulic dysfunctions. According to the air-seeding hypothesis, drought-induced cavitation results from an air-bubble sucked from an

air-filled conduit into a water-filled conduit through the inter-conduit pit membrane (Sperry and Tyree, 1988). Air-filled (embolized) conduits then lose their functionality in water conduction, thereby decreasing xylem hydraulic conductivity and water transport efficiency (Tyree and Sperry, 1989). Xylem resistance to drought-induced cavitation is classically assessed by constructing vulnerability curves, which represent the per cent loss of hydraulic conductivity in relation to xylem tension. Several parameters are estimated from these curves, the most used being the xylem tension inducing 50% loss of hydraulic conductivity (Ψ_{50}) (Tyree and Ewers, 1991).

Xylem resistance to drought-induced cavitation is a key trait of plant water relations and may be important for plant responses to drought constraints, particularly for perennial species such as trees. This is supported by several lines of evidence. At the individual level, xylem resistance to cavitation has been shown to correlate strongly with the degree of resilience under severe drought both in conifers (Brodrribb and Cochard, 2009; Brodrribb *et al.*, 2010) and angiosperms (Barigah *et al.*, 2013; Urli *et al.*, 2013). At the species level, Ψ_{50} varies considerably and tends to be related to the minimum seasonal xylem water potential experienced *in situ* ($\Psi_{x_{min}}$); species experiencing low $\Psi_{x_{min}}$ are generally more resistant to cavitation (Hacke *et al.*, 2000; Pockman and Sperry, 2000; Choat *et al.*, 2012). However, most woody species seem to operate close to their cavitation threshold, indicating a global convergence in the optimization of hydraulic functioning (Choat *et al.*, 2012).

Increased xylem resistance to cavitation is supposed to be costly otherwise all species would exhibit a high degree of resistance. Two main functional trade-offs have been proposed to explain the possible cost of increased cavitation resistance. On the one hand, more resistant species have long been thought to be less efficient in water transport (Zimmermann, 1983; Tyree *et al.*, 1994). The 'rare pit' hypothesis (also called the 'pit area' hypothesis) has been proposed as a functional explanation for this relationship in angiosperms (Wheeler *et al.*, 2005; Christman *et al.*, 2009): species with a more efficient xylem are considered more vulnerable to drought-induced cavitation because larger and longer vessels tend to have a greater pitted wall area, which in turn may increase the probability of having a large pore in the pit membrane more prone to air-seeding. On the other hand, increased xylem resistance to cavitation is also thought to come at the expense of a higher mechanical reinforcement of the xylem (Hacke *et al.*, 2001). This relationship lies in the necessity for cavitation-resistant xylem to withstand higher negative pressures to avoid cell wall collapse. The trade-offs between cavitation resistance, hydraulic efficiency, and mechanical reinforcement have, however, not been consistently detected depending on the species sampled, the correction applied for phylogenetic dependencies, and the scales considered (e.g. Maherali *et al.*, 2004; Jacobsen *et al.*, 2007, 2009; Pratt *et al.*, 2007; Fichot *et al.*, 2010, 2011; Lens *et al.*, 2011). Most of our knowledge of the trade-offs linking xylem resistance to cavitation to other physiological traits has come from interspecific comparisons, although the links evidenced may not directly reflect functional relationships. Studies at the intraspecific level may

partly solve this issue because the phylogenetic noise confounding trade-offs at the interspecific level is likely to be minimized. Such studies are rather recent and have mostly focused on population comparison (Kavanagh *et al.*, 1999; Maherali and DeLucia, 2000; Martínez-Vilalta *et al.*, 2009; Corcuera *et al.*, 2011; Lamy *et al.*, 2012; Sterck *et al.*, 2012). However, the comparison of mean population performances may also be questionable if these populations have been subjected to different evolutionary drivers that have shaped the genetic variation at a geographic scale. The comparison of individual performances at the within-population level may therefore provide an alternative way to identify functional relationships.

Long-term responses of natural populations to environmental changes will partly depend on the level of standing genetic variation for key functional traits (Alberto *et al.*, 2013), such as xylem resistance to cavitation (Lamy *et al.*, 2014). Estimates of the genetic variation expressed for xylem resistance to cavitation in natural populations of forest tree species remain, however, scarce. Two recent studies conducted in provenance-open-pollinated progenies of *Pinus pinaster* Ait. (maritime pine) evidenced a low level of population differentiation, as estimated by the coefficient of genetic differentiation (Q_{ST}), for xylem resistance to cavitation ($Q_{ST} = 0.027$) (Lamy *et al.*, 2011, 2014). This, combined with a low coefficient of additive genetic variation ($CV_A \approx 5\%$), was interpreted to mean the trait has limited evolvability. Otherwise, substantial variation has been reported for xylem resistance to cavitation both within and among natural populations of *Fagus sylvatica* L. (Wortemann *et al.*, 2011) and *Pinus canariensis* L. (López *et al.*, 2013). However, only one replicate of each genotype was included in these studies, precluding estimates of the genetic variation expressed for xylem resistance to cavitation.

The aim of this study was to assess the extent of genetic variation for xylem resistance to cavitation within one natural population of a riparian species, the European black poplar, *Populus nigra* L., and determine whether the common trade-offs between cavitation resistance and other xylem traits can be revealed at the within-population level. Poplars are among the most vulnerable tree species to drought-induced cavitation in the Northern Hemisphere, although variation has been reported across species (Hukin, 2005) and interspecific hybrids (Harvey and van den Driessche, 1997, 1999; Cochard *et al.*, 2007; Fichot *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2011). The genetic variation expressed for xylem resistance to cavitation within natural populations of poplars remains, however, poorly documented with studies conducted on a limited number of genotypes per population ($n \leq 5$; Sparks and Black, 1999; Schreiber *et al.*, 2011). The European black poplar is a major pioneer tree species of riparian ecosystems in Europe, Northern Africa, and Western Asia (Dickmann, 2006). This species covers a wide range of pedoclimatic conditions and expresses a large amount of genetic variation for growth, bud phenology, and water-use efficiency (WUE) (Chamaillard *et al.*, 2011; Rohde *et al.*, 2011). It is, however, intriguing to determine whether natural populations of riparian tree species, such as black poplar, maintain genetic variation for

cavitation resistance and how this relates to the variation observed for other functional traits. The specific objectives of the present study were therefore to evaluate: (i) the amplitude of genetic variation expressed for xylem resistance to cavitation within one natural population of black poplar comprising 33 genotypes; (ii) the relationships between cavitation resistance and xylem structural properties related to hydraulic efficiency and mechanical reinforcement; and (iii) the relationships between xylem resistance to cavitation and growth, bud phenology, and WUE.

Materials and methods

Plant material and experimental design

This study makes use of a natural population of black poplar originating from a Natural National Reserve located along the Loire river (Saint-Pryvé Saint-Mesmin, Loiret, 47°51'N 1°48'E, 90 m above sea level). This population was chosen to be representative of the genetic variation expressed for growth and WUE under non-limiting conditions in black poplar (Chamaillard *et al.*, 2011; Guet *et al.*, unpublished results). In 2000, branch cuttings were sampled on 33 adult trees distributed along a linear distance of 1.8 km in the population. The cuttings were propagated and kept in a clonal archive as a source of material. The experimental plantation was established in May 2012 at Orléans within the National Institute of Agronomic Research (INRA) research station of Forest Genetics (France, Loiret, 47°49'N 01°54'E, 110 m above sea level); all measurements were carried out in 2013, i.e. during the second growing season. The clonal test was set up in a nursery on a loamy-sand soil (8.6% clay, 18.6% silt, and 72.8% sand, pH 6.5) from 25 cm hardwood cuttings and consisted of five randomized complete blocks with three adjacent copies of each genotype per block. The initial spacing within and between rows was 1 × 2 m. A double border row comprising a mix of the 33 genotypes was set up around the experimental plot to reduce border effect. During the growing season, the experimental plantation was weed- and pest-controlled and regularly irrigated with overhead sprinklers to meet evaporative demand (i.e. 4.5 mm of water was sprinkled every time cumulative evapotranspiration reached 4 mm).

Meteorological data of the experimental site were obtained from a meteorological station located close to the field site. In 2013, the year of experiments, the monthly mean temperature ranged from 2.4°C (February) to 21.7°C (July) and the mean annual temperature was 10.7°C. The cumulative annual precipitation was 801 mm with 52% occurring during the growing season (from April to September).

Spring and autumn phenology

Bud flush and bud set were scored on all trees approximately twice a week in 2013 from 27 April to 09 May and from 09 August to 10 September, respectively. At each date of measurement, bud flush and bud set were assessed by visual inspection of the main terminal bud and applying a score describing six [from bud dormancy (stage 0) to active growth (stage 5)] and seven [from active growth (stage 3) to bud dormancy (stage 0)] discrete stages, respectively (Castellani *et al.*, 1967; Rohde *et al.*, 2011). Observed scores of bud set were fitted to local polynomial regressions of degree 2, and the date of stage 1.5 of bud set (in day of the year, DOY) was retrieved as described by Fabbrini *et al.* (2012). The same procedure was applied for bud flush and used to estimate the date of stage 3 of bud flush (DOY).

Whole-plant growth

Whole-plant growth was described for each genotype in 2013 by estimating the annual shoot height increment and the total

above-ground dry mass produced over the two growing seasons, 2012 and 2013. Total stem height was measured to the nearest centimetre on all available trees in January and December 2013 and was then used to calculate the shoot height increment in 2013. Biomass measurements were performed on all available trees in December 2013; the fresh mass of each collected tree was measured to the nearest 0.5 g before branches were removed to measure stem fresh mass. Samples of stem and branches were then collected from each tree and weighed before and after being oven-dried at 103°C for 3 days to compute stem and branches dry/fresh mass ratio, which were then used to estimate the total above-ground dry mass.

Bulk leaf carbon isotope discrimination and leaf gas exchange

Bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) (see Table 1 for the definition of trait abbreviations used in this article) was measured on the 33 genotypes and used as a time-integrated value of intrinsic water-use efficiency (WUE_i). For these measurements, one mature and fully illuminated leaf was collected in early July on the 2013 terminal shoot of each tree ($n = 15$ per genotype). Leaves were oven-dried at 60°C for 72 h before being ground to a fine powder. Carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) was measured from 1 mg homogeneous leaf dry powder using a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Germany) coupled with an elemental analyser (Carlo Erba, Milan, Italy) and was expressed according to the Vienna Pee Dee Belemnite standard as described by Craig (1957). Bulk leaf carbon isotope discrimination was then determined according to Farquhar and Richards (1984).

In order to validate the functional relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and WUE_i, leaf gas exchange measurements were performed on a subset of ten genotypes. The ten genotypes were chosen to cover the range of genetic variation expressed for $\Delta^{13}\text{C}$ within the studied population, under irrigated conditions at Orléans, based on previously collected data from a distinct experimental design (Chamaillard *et al.*, 2011). Measurements were performed in mid-August on a cloudless day, between 11:00 and 15:00 local time, using a LI-6400 portable gas exchange system (Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, NE, USA). Net CO₂ assimilation rate (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and stomatal conductance to water vapour (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were recorded from one mature and fully illuminated leaf of one tree per genotype and block ($n = 5$ per genotype). The temperature of the chamber block was maintained at 25°C and the photosynthetic photon flux density was set to 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ using the 6400-02 LED light source; preliminary measurements indicated that this irradiance was sufficient to reach saturation for all genotypes. Average CO₂ concentration inside the chamber was set to 400 ppm and water vapour pressure deficit matched ambient conditions (1.4 ± 0.1 kPa). Measurements were taken once A and g_s had stabilized (typically 1 min after the leaf was enclosed in the chamber); the whole leaf was then sampled for $\Delta^{13}\text{C}$ determination as described above. WUE_i was calculated as the ratio between A and g_s .

Stem xylem resistance to drought-induced cavitation

Stem xylem resistance to cavitation was evaluated from one tree per block and genotype (5 blocks × 33 genotypes) using the 2013 terminal shoot. Measurements were performed in early October 2013, once primary growth had stopped but before the first autumn frosts occurred. Remaining leaves were first removed to limit transpiration and avoid embolism induction; the shoot was then severed, immediately wrapped in a moist towel and enclosed in black plastic bags to minimize dehydration. Stem xylem resistance to cavitation was measured using the Cavitron technique (Cochard *et al.*, 2005). This technique uses centrifugal force to generate negative pressures in a calibrated stem sample while measuring its hydraulic conductance. Calibrated samples of 0.4–0.8 cm in diameter and 28 cm in length were re-cut under water from each shoot and processed as described by Fichot *et al.* (2010). Stem vulnerability curves were established

Table 1. List of trait abbreviations used in the text

Symbol	Definition	Units
Functional traits		
A	Net CO ₂ assimilation rate	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
g_s	Stomatal conductance to water vapour	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
WUE_i	Intrinsic water-use efficiency	mmol mol^{-1}
$\Delta^{13}\text{C}$	Bulk leaf carbon isotope discrimination	‰
Ψ_{12}	Stem xylem tension causing 12% loss of hydraulic conductivity	MPa
Ψ_{50}	Stem xylem tension causing 50% loss of hydraulic conductivity	MPa
Ψ_{88}	Stem xylem tension causing 88% loss of hydraulic conductivity	MPa
Structural traits		
A_v	Percentage of vessel lumen area	%
d_h	Hydraulic vessel diameter	μm
d_{mean}	Mean vessel diameter	μm
$K_{s(t)}$	Theoretical xylem specific hydraulic conductivity	$\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}$
t_h	Double vessel wall thickness	μm
$(t/b)_h^2$	Thickness-to-span ratio	
V_G	Vessel grouping index	
ρ_x	Xylem density	g cm^{-3}

from the percent loss of hydraulic conductivity (PLC) measured for 7–11 steps of xylem tension depending on sample's cavitation resistance. The following sigmoid function was fitted to each curve (Pammenter and Willigen, 1998):

$$\text{PLC} = 100 / \left[1 + \exp \left(s / 25 \times (\Psi - \Psi_{50}) \right) \right] \quad (1)$$

where Ψ_{50} is the stem xylem tension causing 50% loss of hydraulic conductivity (MPa) and s is the slope of the curve at Ψ_{50} (% MPa⁻¹). A high quality of fit was overall observed with R^2 values ranging from 0.955 to 0.999. Values of Ψ_{50} were used to compare the resistance to cavitation of the different genotypes. Stem xylem tensions inducing 12% and 88% loss of hydraulic conductivity (Ψ_{12} and Ψ_{88} respectively) were calculated for each sample according to Domec and Gartner (2001) as: $\Psi_{12} = \Psi_{50} - 50/s$ and $\Psi_{88} = \Psi_{50} + 50/s$. Values of Ψ_{12} and Ψ_{88} represent thresholds of xylem tension at the onset and offset of cavitation, respectively (Sparks and Black, 1999; Domec and Gartner, 2001).

Xylem density and anatomy

Xylem density (ρ_x , g cm^{-3}) was evaluated from the same stem segments used for cavitation measurements ($n = 5$ per genotype; 33 genotypes). Stem samples 4 cm long were placed in a vial of deionized water and allowed to equilibrate under vacuum at room temperature for five days. Xylem density was then determined following the protocol developed by Hacke *et al.* (2000) using the Archimedes' principle to measure fresh volume of the stem samples.

Xylem anatomical properties were evaluated on a subset of two groups of five genotypes contrasted for their mean value of Ψ_{50} : five genotypes were selected for their relatively low resistance to cavitation (mean $\Psi_{50} = -1.77 \pm 0.02$ MPa, hereafter referred to as 'less resistant' group), while five other genotypes were selected for their relatively high resistance to cavitation (mean $\Psi_{50} = -2.20 \pm 0.01$ MPa, hereafter referred to as 'more resistant' group). All anatomical measurements were made on 30 μm -thick stem cross sections obtained from a rotary microtome (RM 1225, Leica Microsystems, Vienne, Austria) from each stem sample used for cavitation measurements ($n = 5$ per genotype). Cross sections were stained for 45 s in a Safranin O solution (1

% (w: v) in ethanol 50%) before being flushed with absolute ethanol and permanently mounted on slides using Canada Balsam. Stained cross sections were observed under a light microscope (Leica DMR) coupled with a Leica DFC 320 digital camera, and image analysis was performed using the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov>).

Anatomical traits related to hydraulic efficiency were measured from observations made on three radial sectors per stem section. Images of radial sectors were taken with an objective $\times 10$. All of the vessels in the sectors were counted from pith to cambium, such that at least 465 vessels were counted per stem section. Vessel diameter (d , μm), mean vessel diameter (d_{mean} , μm), the percentage of vessel lumen area (A_v , %), the hydraulically weighted vessel diameter (d_h , μm), and the theoretical xylem specific hydraulic conductivity ($K_{s(t)}$, $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) were determined following the same protocol developed by Fichot *et al.* (2010). The total number of vessel groupings was calculated from the same images as the sum of solitary vessels and vessel clusters and was then used to estimate a vessel grouping index (V_G), defined as the ratio between the total number of vessels and the total number of vessel groupings (Carlquist, 1984; Scholz *et al.*, 2013a). Values of the three radial sectors were averaged to give a single value per stem cross section.

The 'thickness to wall span ratio' $[(t/b)_h^2]$ was evaluated from images taken with an objective $\times 20$. The $(t/b)_h^2$ was used as an anatomical surrogate of vessel wall reinforcement against implosion (Hacke *et al.*, 2001) and was determined for vessel clusters in which at least the diameter of one vessel fell within $\pm 8 \mu\text{m}$ of d_h (Fichot *et al.*, 2010). The double-wall thickness between two clustered vessels (t_h , μm) was measured directly on images, while the width of the conduit (b , μm) was calculated as the diameter of the vessel obtained from the equivalent area.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the R software (R Development Core Team). All tests were considered significant at $P < 0.05$. Means are expressed with their standard errors.

All the variables measured on the 33 genotypes were analysed using the following mixed linear model: $Y_{ij} = \mu + B_i + G_j + e_{ij}$, where Y_{ij} refers to tree individual performance, μ is the general mean, B_i is the effect of block i considered as fixed, G_j is the effect of the genotype j considered as random and e_{ij} is the residual error. Data required no transformation to meet the assumption of homoscedasticity and normal distribution of residuals. Variance components were estimated using the restricted maximum likelihood method. Broad-sense heritability was then calculated on an individual basis (H^2_{ind}) according to the following equation: $H^2_{\text{ind}} = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_e)$, where σ^2_G and σ^2_e are genetic and residual variance components. The coefficient of genetic variation (CV_G) was calculated as the ratio of genetic standard deviation to the mean and was expressed as a percentage. Given that phenological traits and $\Delta^{13}\text{C}$ were respectively expressed according to an arbitrary scale (i.e. in DOY) and a standard (i.e. the Vienna Pee Belemnite standard), CV_G values were not estimated for these traits because they would be meaningless (Brendel, 2014).

Prior to exploring the differences between the two groups of five genotypes for traits related to xylem anatomy, a Levene's test was performed and indicated that variances were not homoscedastic between the two groups. In addition, the distribution of individual data did not follow a normal distribution within each group. The differences between the two groups of genotypes were therefore tested using the non-parametric Mann–Whitney–Wilcoxon test (W). Phenotypic relationships between traits were analysed on a genotypic mean basis and described using linear regressions and Pearson's correlation coefficients (r_p).

Results

Stem xylem resistance to drought-induced cavitation, xylem density and xylem anatomy

Significant differences ($P < 0.001$) were detected between the 33 genotypes for Ψ_{12} , Ψ_{50} , and Ψ_{88} . The xylem tension

inducing 50% loss of hydraulic conductivity (Ψ_{50}) ranged from -1.72 to -2.31 MPa between extreme genotypic means; the same amplitude of variation was observed for Ψ_{12} and Ψ_{88} (Supplementary Fig. S1). Significant differences ($P < 0.001$) were also detected between genotypes for the slope parameter, which ranged from 141 to 270% MPa⁻¹. However, strong and positive relationships were detected between Ψ_{12} , Ψ_{50} , and Ψ_{88} ($0.86 \leq r_p \leq 0.98$, $P < 0.001$), indicating that the shape of the curves slightly varied between genotypes. High values of broad-sense heritability on an individual basis were recorded for Ψ_{12} ($H^2_{\text{ind}} = 0.57$), Ψ_{50} ($H^2_{\text{ind}} = 0.72$), and Ψ_{88} ($H^2_{\text{ind}} = 0.70$) and were associated with low coefficients of genetic variation ($CV_G = 7.0$, 7.3, and 7.6% for Ψ_{12} , Ψ_{50} , and Ψ_{88} respectively).

Xylem density (ρ_x) varied significantly ($P < 0.001$) among the 33 genotypes from 0.353 to 0.468 g cm⁻³ (Fig. 1A). The value of H^2_{ind} and CV_G estimated for ρ_x ($H^2_{\text{ind}} = 0.73$ and $CV_G = 7.1\%$) were comparable to those obtained for Ψ_{50} . A significant and negative relationship was detected between ρ_x and Ψ_{50} ($r_p = -0.44$, $P = 0.010$; Fig. 1A).

Significant differences ($P < 0.001$) were detected between the two groups of five genotypes for all anatomical traits related to mechanical reinforcement at the vessel level (Fig. 2A,B): on average, the 'more resistant' group exhibited higher $(t/b)_h^2$ (0.023 ± 0.001 vs. 0.013 ± 0.001) and t_h (6.60 ± 0.04 μm vs. 5.3 ± 0.2 μm) than the 'less resistant' group (Fig. 2A,B). Traits related to hydraulic efficiency also differed significantly ($P < 0.01$) between the two groups of genotypes: on average, the 'more resistant' group exhibited lower d_{mean} (35.0 ± 0.9 μm vs. 36.9 ± 0.3 μm), A_v ($18.1 \pm 0.4\%$ vs. $19.7 \pm 0.5\%$) and $K_{s-(t)}$ (9.5 ± 0.3 kg s⁻¹ m⁻¹ MPa⁻¹ vs. 11.7 ± 0.5 kg s⁻¹ m⁻¹ MPa⁻¹) than the 'less resistant' group (Fig. 2C,D,E). A significant difference was also detected between the two groups of genotypes for vessel grouping (V_G): the 'more resistant' group exhibited a lower value of V_G than the 'less resistant' group (1.65 ± 0.04 vs. 1.76 ± 0.05 ; Fig. 2F).

Carbon isotope discrimination and leaf gas exchange

Significant differences ($P < 0.001$) were detected between the 33 genotypes for $\Delta^{13}\text{C}$, which ranged from 20.6 to 23.0‰ between extreme genotypic means (Fig. 1B). This range of variation was comparable to those previously reported for $\Delta^{13}\text{C}$ in the same population under non-limiting water conditions (Chamaillard *et al.*, 2011; Guet *et al.* unpublished results). A linear and negative relationship was detected between $\Delta^{13}\text{C}$ and WUE_i as expected from theory ($r_p = -0.75$, $P = 0.012$; Supplementary Fig. S2). The variations observed for WUE_i were mainly driven by variations in g_s ($r_p = -0.77$, $P = 0.008$) rather than in A ($r_p = -0.14$, $P = 0.685$). A high H^2_{ind} (0.70) was recorded for $\Delta^{13}\text{C}$. There was no significant relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and ρ_x ($r_p = 0.13$, $P = 0.456$) or Ψ_{50} ($r_p < 0.01$, $P = 0.991$; Fig. 1B).

Bud phenology and growth

Significant differences ($P < 0.001$) were detected between the 33 genotypes for the timing of phenological events. Bud

flush and bud set respectively occurred in a range of 24 days between 14 April (DOY 104) and 08 May (DOY 128) and between 17 August (DOY 229) and 10 September (DOY 253) for all genotypes. The 33 genotypes also differed for growth. The shoot height increment in 2013 varied from 54 to 145 cm and total above-ground dry mass spanned from 78 to 352 g between extreme genotypic means. Bud flush exhibited the highest value of broad-sense heritability ($H^2_{\text{ind}} = 0.94$) among the different studied traits, while bud set and growth variables exhibited low to moderate H^2_{ind} values ($0.20 \leq H^2_{\text{ind}} \leq 0.58$). Shoot height increment and total above-ground dry mass exhibited comparable CV_G values ($CV_G = 23.3\%$ and 25.7%, respectively).

Significant relationships were detected between shoot height increment and the date of bud flush ($r_p = -0.50$, $P = 0.003$) and bud set ($r_p = 0.38$, $P = 0.030$). However, these relationships were mainly explained by the fact that the genotypes that flushed late or set bud early achieved a low shoot height increment. Total above-ground dry mass did not correlate with the date of bud flush ($r_p = -0.03$, $P = 0.856$) or bud set ($r_p = 0.07$, $P = 0.682$). No significant relationship could be detected between $\Delta^{13}\text{C}$ and growth performances, as inferred from shoot height increment ($r_p = -0.17$, $P = 0.333$) or total above-ground dry mass ($r_p = -0.14$, $P = 0.451$). A positive relationship was detected between xylem density and the date of bud flush ($r_p = 0.40$, $P = 0.020$), but was principally explained by the fact that the genotypes that flushed bud later exhibited the highest wood density. No significant relationship was detected between xylem density and the date of bud set ($r_p = -0.29$, $P = 0.097$). Xylem density (ρ_x) was negatively correlated with shoot height increment ($r_p = -0.46$, $P = 0.008$) and tended to scale negatively with total above-ground dry mass ($r_p = -0.30$, $P = 0.086$). A significant and positive relationship was evidenced between Ψ_{50} and the date of bud set ($r_p = 0.46$, $P = 0.008$; Fig. 1C), while no correlation could be observed with bud flush ($r_p = -0.26$, $P = 0.144$). There was no relationship between Ψ_{50} and shoot height increment ($r_p = 0.20$, $P = 0.249$) or total above-ground dry mass ($r_p < -0.01$, $P = 0.995$; Fig. 1D).

Discussion

Genetic variation for stem xylem resistance to cavitation

Compared with other forest tree species of the Northern Hemisphere, poplars are particularly vulnerable to drought-induced cavitation (Maherali *et al.*, 2004). The results obtained on the *P. nigra* population studied here (mean Ψ_{50} across the 33 genotypes = -2.01 MPa) confirm this trend and are consistent with data already reported for other poplar species ($-0.70 \leq \Psi_{50} \leq -2.13$ MPa) and hybrids ($-1.07 \leq \Psi_{50} \leq -2.19$ MPa) (Fichot *et al.*, 2015).

Broad-sense heritability recorded for Ψ_{50} in the present study was high ($H^2_{\text{ind}} = 0.72$), indicating that micro-environmental variations were well controlled. This enabled the detection of significant genetic variation for xylem resistance to cavitation within the population. Large-scale phenotyping

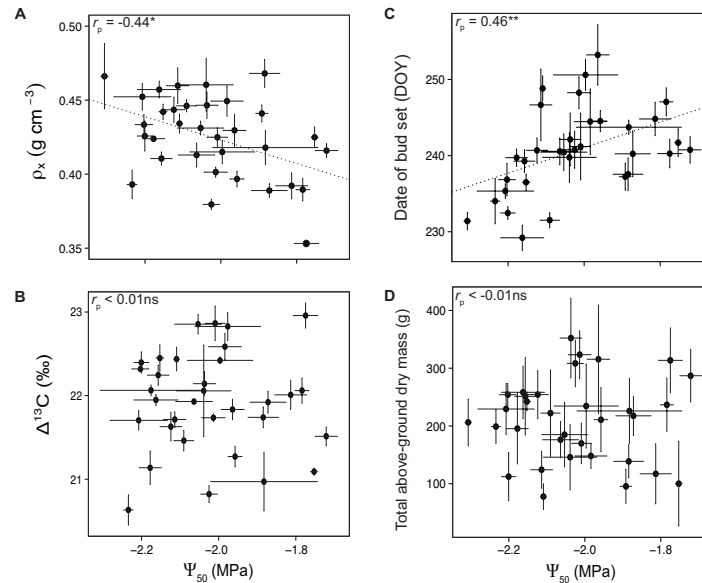


Fig. 1. Relationships between xylem resistance to drought-induced cavitation estimated as the stem xylem tension inducing 50% loss of hydraulic conductivity (Ψ_{50}) and (A) xylem density (ρ_x), (B) bulk leaf carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$), (C) date of bud set and (D) total above-ground dry mass. Each point represents genotypic means \pm standard error. Dashed lines represent linear regressions fitted to the data. Pearson's correlation coefficients (r_p) were calculated on a genotypic mean basis ($n = 33$). ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, non-significant at a 5% risk level. DOY, day of the year.

of cavitation resistance has already been conducted on natural populations of *Pinus* species (Corcuera *et al.*, 2011; Lamy *et al.*, 2011, 2014; Sterck *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013) and *F. sylvatica* (Wortemann *et al.*, 2011), but such studies are lacking for riparian tree species. This study is believed to be the first reporting estimates of the genetic variation expressed for this trait within a natural population of a riparian tree species. A low CV_G value was found for Ψ_{50} (7.3%), which is consistent with results previously reported in natural populations of maritime pine ($\text{CV}_A \approx 5\%$; Lamy *et al.*, 2011, 2014).

Although black poplar and maritime pine widely differ in their ecological preferences, these species seem to maintain a low level of genetic variation for cavitation resistance. In maritime pine, the low level of genetic variation for cavitation resistance was associated with a low level of phenotypic plasticity, which led Lamy *et al.* (2014) to suggest that facing drought through cavitation resistance-related traits may have limited adaptive potential in maritime pine as compared to other morphological and growth-related traits. Black poplar is, however, much more vulnerable to drought-induced cavitation than maritime pine [mean Ψ_{50} over six populations = -3.93 MPa (Lamy *et al.*, 2011)]. Therefore, the level of genetic variation expressed for stem cavitation resistance in the *P. nigra* population may not have the same physiological significance as in maritime pine because CV_G do not refer to the same means. The 0.59 MPa difference observed between extreme genotypic means could actually be physiologically relevant for enabling evolutionary responses in such vulnerable species, for which cavitation events begin as soon as xylem tension reaches -1.5 to -2.0 MPa. In addition, stem xylem resistance to cavitation was only evaluated under non-limiting

water conditions in the present study. The capacity for a plastic response of cavitation resistance in the *P. nigra* population studied has been ignored; however, previous results obtained on different hybrid poplars have indicated that xylem resistance to cavitation is responsive to moderate water deficit and in a genotype-dependent manner, with decreases in Ψ_{50} down to 0.60 MPa (Fichot *et al.*, 2010).

Stem cavitation resistance and xylem structure

Trade-offs between xylem resistance to cavitation, hydraulic efficiency, and mechanical reinforcement have long been hypothesized from interspecific comparisons, but have not been systematically detected depending on the species sampled and the correction applied for phylogenetic dependencies (e.g. Pockman and Sperry, 2000; Maherali *et al.*, 2004; Pratt *et al.*, 2007; Jacobsen *et al.*, 2009; Markesteijn *et al.*, 2011). At the intraspecific level, comparisons of population performances have generally failed to evidence relationships between xylem structure and function (Kavanagh *et al.*, 1999; Choat *et al.*, 2007; Martínez-Vilalta *et al.*, 2009; Schreiber *et al.*, 2011; Lamy *et al.*, 2012; Sterck *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013). The present study is the first one addressing the question within a single population, and the results obtained here on *P. nigra* support the idea that trade-offs between xylem structure and function can actually occur at such scale. Given that the *P. nigra* genotypes originated from the same population, and were exposed to the same environmental conditions and evolutionary drivers *in situ*, it can be concluded that the trade-offs evidenced in this study reflect true functional relationships between traits. The apparent trade-off between

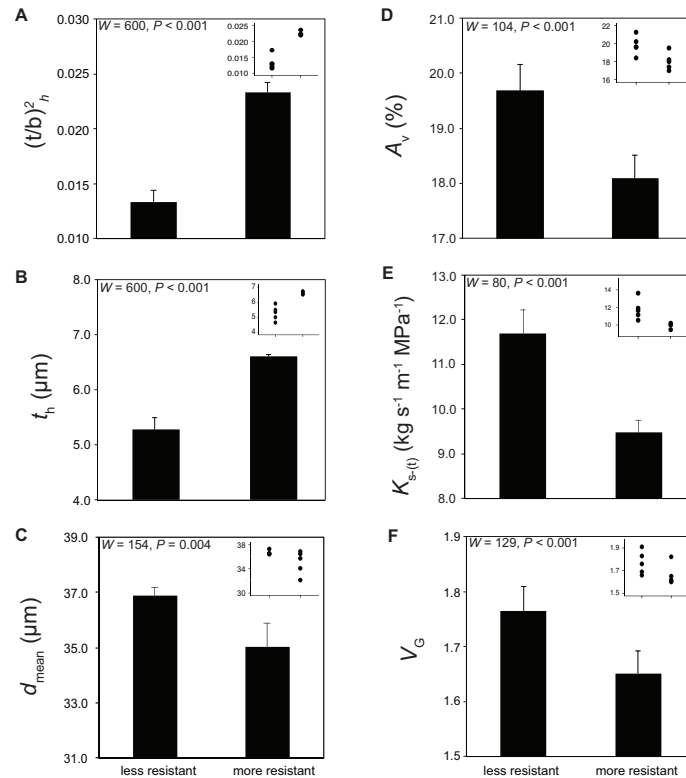


Fig. 2. Differences in xylem anatomical traits between the group of five genotypes with a relatively low and a relatively high resistance to drought-induced cavitation ('less resistant' and 'more resistant', respectively). Data are shown for: (A) thickness to wall span ratio $[(t/b)_h^2]$, (B) double vessel wall thickness (t_h), (C) mean vessel diameter (d_{mean}), (D) percentage of vessel lumen area (A_v), (E) theoretical xylem specific hydraulic conductivity ($K_{s(t)}$), and (F) vessel grouping index (V_G). Each bar represents means of each group \pm standard error. The differences between means of the two groups were tested according to a Mann-Whitney-Wilcoxon test (W). Each inset shows the distribution of genotypic means within each group.

hydraulic efficiency and safety could be explained by the 'rare pit' hypothesis (also called the 'pit area' hypothesis) (Wheeler *et al.*, 2005; Christman *et al.*, 2009). Genotypes with smaller vessels tend to be less efficient in water transport, but may also have a lower pitted wall area, which in turn decreases the probability of having a large pore in the pit membrane more prone to air-seeding. The relationship between cavitation resistance and mechanical reinforcement has been generally interpreted as a result of the need for cavitation-resistant genotypes to withstand the strong mechanical load induced by high negative pressures on vessel wall to avoid vessel wall collapse (Hacke *et al.*, 2001). An alternative hypothesis has been proposed to explain the relationship between cavitation resistance and mechanical reinforcement at the vessel level and relates to the co-variation between vessel wall thickness and pit membrane properties. Anatomical observations of pit membrane properties using electron microscopy evidenced that the porosity and the degree to which pit membranes are damaged by mechanical deformation decrease with an increase of pit membrane thickness, which is positively related to vessel wall thickness (Jansen *et al.*, 2009; Tixier *et al.*, 2014).

Besides xylem traits directly related to water transport efficiency and mechanical reinforcement, the more cavitation-resistant genotypes exhibited a lower degree of vessel grouping. These results are consistent with those previously reported by Scholz *et al.* (2013b) across *Prunus* species. They support the hydraulic model of Loepe *et al.* (2007), which suggests that a high degree of vessel connectivity decreases xylem resistance to cavitation by increasing the risk of embolism spreading between adjacent vessels via air-seeding. However, this is in contradiction with the vessel grouping hypothesis postulated by Carlquist (1984), stating that xeric-adapted species have a higher degree of vessel grouping than those growing in mesic conditions to bypass the more frequent embolism. This hypothesis has since been supported by Lens *et al.* (2011) who found a positive relationship between cavitation resistance and the degree of vessel grouping across *Acer* species.

Stem xylem resistance to cavitation, growth, and WUE

Increased xylem resistance to drought-induced cavitation has long been thought to come at the expense of reduced plant

growth. Such a trade-off could be detected if cavitation resistance comes at the cost of greater mechanical reinforcement of the xylem, a feature associated with greater construction costs in terms of carbon allocation (Enquist *et al.*, 1999). However, the relationship between cavitation resistance and growth remains equivocal. These two traits were found to be unrelated in natural populations of different forest tree species (Martínez-Vilalta *et al.*, 2009; Lamy *et al.*, 2011; Schreiber *et al.*, 2011; Sterck *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013). Actually, only few studies evidenced a significant relationship between these traits, but with opposite direction. A negative relationship was detected between xylem resistance to cavitation and biomass production across willow genotypes (Wikberg and Ögren, 2004; Cochard *et al.*, 2007) and provenances of cedar (Ducey *et al.*, 2008). By contrast, a positive relationship was detected between these traits across poplar hybrids (Fichot *et al.*, 2010). In this study, there was no evidence for a trade-off between xylem resistance to cavitation and growth, despite cavitation resistance being positively related to xylem density, which in turn was negatively correlated with shoot height increment. In fact, although the relationships between xylem density and cavitation resistance or shoot height increment were significant, they remained weak ($r_p < 0.50$), indicating that the variation in xylem density only explains a small part of the variation in cavitation resistance and growth. This may partly explain why cavitation resistance and growth were uncoupled in the *P. nigra* population studied.

Growth performances of the *P. nigra* genotypes studied here were significantly influenced by the dates of bud flush and bud set. However, these relationships were mainly explained by the fact that the genotypes that flushed late or set bud early achieved the lowest shoot height increment. Only a weak negative relationship was detected between xylem resistance to cavitation and the date of bud set and was mainly explained by the fact that the genotypes that set bud earlier exhibited the highest degree of resistance to cavitation. The complex relationships linking bud phenology to cavitation resistance and growth indicate that the *P. nigra* population studied maintains a wide diversity of phenotypic combinations for these traits. This may further explain why growth was uncoupled from cavitation resistance in the studied *P. nigra* population.

$\Delta^{13}\text{C}$ is a complex and composite trait generally used as a proxy of WUE_i but also, more generally, as a set point for leaf physiology (Ehleringer *et al.*, 1992). As expected from theory, $\Delta^{13}\text{C}$ was negatively related to WUE_i in the studied *P. nigra* population, but no significant relationship was detected with leaf nitrogen content (data not shown) or growth variables. These results indicate that the variations in $\Delta^{13}\text{C}$ mainly reflected variations in plant water-use as already reported in hybrid poplars (Monclus *et al.*, 2006). Results previously obtained in natural populations of different forest tree species indicate that the relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{50} is species-specific. Martínez-Vilalta *et al.* (2009) found a positive relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{50} across populations of *Pinus sylvestris* L.. By contrast, Lamy *et al.* (2011) evidenced a negative relationship between these traits in natural populations of maritime pine, but the relationship broke down at the

genetic level. $\Delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{50} were found to be unrelated across genotypes of *Populus tremuloides* (Schreiber *et al.*, 2011). In the present study, no significant relationship could be detected between $\Delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{50} . The lack of relationship between these two traits has a major functional significance because it indicates that stem cavitation resistance and WUE could evolve independently in response to environmental changes.

Conclusions

This study is, as far as can be determined, the first one reporting estimates of genetic variation expressed for stem xylem resistance to cavitation and its relationships with xylem structure, growth, and WUE at the within-population level and in a riparian tree species. Significant genetic variation was recorded for stem xylem resistance to cavitation in the studied *P. nigra* population under non-limiting water conditions. The findings also demonstrate that the trade-offs between xylem resistance to cavitation, hydraulic efficiency, and mechanical reinforcement of the xylem can be evidenced at the within-population level. However, how the expression and the amplitude of genetic variation would be modulated under drier conditions has not been explored. Such information would be valuable to gain insight into the phenotypic plasticity and adaptive potential of natural populations of black poplar.

Supplementary material

Supplementary data can be found at *JXB* online.

[Supplementary Fig. S1](#). Stem xylem vulnerability curves of the 33 *P. nigra* genotypes.

[Supplementary Fig. S2](#). Relationship between intrinsic WUE and bulk leaf carbon isotope discrimination.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Marc Villar for the access to the referenced genetic resources of black poplar; Olivier Forestier for the technical assistance of Guéméné-Penfao Forest State Nursery in the preparation of the cuttings; Patrick Poursat and the staff of the experimental unit of INRA-GBFOR for the establishment, management, and participation to measures. We also thank Claude Bréchet and Christian Hossann of the Technical Platform of Functional Analysis (OC 081) at INRA Nancy for isotopic and elemental analysis; and Richard Antoine and the staff of the service unit 10 Soil Analysis Laboratory of Arras (US10, LAS Arras, INRA Lille, France) for soil analysis. JG was supported by a PhD grant from the 'Conseil Régional, Région Centre, France'. The authors thank H. Griffiths and two anonymous reviewers for helpful comments on an earlier version of the manuscript.

References

- Alberto FJ, Aitken SN, Alia R, Gonzalez-Martinez SC, Hanninen H, Kremer A, Lefevre F, Lenormand T, Yeaman S, Whetten R, Savolainen O. 2013. Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology* **19**, 1645–1661.
- Barigah TS, Charrier O, Douris M, Bonhomme M, Herbet S, Ameglio T, Fichot R, Brignolas F, Cochard H. 2013. Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of Botany* **112**, 1431–1437.

- Brendel O.** 2014. Is the coefficient of variation a valid measure for variability of stable isotope abundances in biological materials? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **28**, 370–376.
- Brodribb TJ, Bowman DJMS, Nichols S, Delzon S, Burrett R.** 2010. Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytologist* **188**, 533–542.
- Brodribb TJ, Cochard H.** 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology* **149**, 575–584.
- Carlquist S.** 1984. Vessel grouping in Dicotyledon wood: significance and relationship to imperforate tracheary elements. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* **104**, 505–525.
- Castellani E, Freccero V, Lapietra G.** 1967. Proposta di una scala di differenziazione delle gemme fogliari del pioppo utile per gli interventi antiparasitari. *Giornale Botanico Italiano* **101**, 355–360.
- Chamaillard S, Fichot R, Vincent-Barbaroux C, Bastien C, Depierreux C, Dreyer E, Villar M, Brignolas F.** 2011. Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three *Populus nigra* L. populations. *Tree Physiology* **31**, 1076–1087.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, Jacobsen AL, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J, Mayr S, Mencuccini M, Mitchell PJ, Nardini A, Pittermann J, Pratt RB, Sperry JS, Westoby M, Wright IJ, Zanne AE.** 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**, 752–755.
- Choat B, Sack L, Holbrook NM.** 2007. Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytologist* **175**, 686–698.
- Christman MA, Sperry JS, Adler FR.** 2009. Testing the 'rare pit' hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist* **182**, 664–674.
- Cochard H, Casella E, Mencuccini M.** 2007. Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiology* **27**, 1761–1767.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T.** 2005. Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**, 410–418.
- Corcuera L, Cochard H, Gil-Pelegrin E, Notivol E.** 2011. Phenotypic plasticity in mesic populations of *Pinus pinaster* improves resistance to xylem embolism (P_{50}) under severe drought. *Trees* **25**, 1033–1042.
- Craig H.** 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **12**, 133–149.
- Dickmann DI.** 2006. Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: then and now. *Biomass and Bioenergy* **30**, 696–705.
- Domec J-C, Gartner BL.** 2001. Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees* **15**, 204–214.
- 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 Physiology* **28**, 689–701.
- Ehleringer JR, Phillips SL, Comstock JP.** 1992. Seasonal variation in production and life-history variation in vascular plants. *Functional Ecology* **6**, 396–404.
- Enquist BJ, West GB, Charnov EL, Brown JH.** 1999. Allometric scaling of production and life-history variation in vascular plants. *Nature* **401**, 907–911.
- Fabbrini F, Gaudet M, Bastien C, Zaina G, Harfouche A, Beritognolo I, Marron N, Morgante M, Scarascia-Mugnozza G, Sabatti M.** 2012. Phenotypic plasticity, QTL mapping and genomic characterization of bud set in black poplar. *BMC Plant Biology* **12**, 47–63.
- Farquhar GD, Richards RA.** 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**, 539–552.
- Fichot R, Barigah TS, Chamaillard S, Le Thiec D, 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 & Environment* **33**, 1553–1568.
- Fichot R, Brignolas F, Cochard H, Ceulemans R.** 2015. Vulnerability to drought-induced cavitation in poplars: synthesis and future opportunities. *Plant, Cell & Environment*, in Press.
- 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. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2093–2106.
- Hacke UG, Sperry JS, Pittermann J.** 2000. Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah. *Basic and Applied Ecology* **1**, 31–41.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA.** 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* **126**, 457–461.
- Harvey HP, van den Driessche R.** 1997. Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiology* **17**, 647–654.
- Harvey HP, van den Driessche R.** 1999. Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiology* **19**, 943–950.
- Hukin D.** 2005. Cavitation vulnerability in roots and shoots: does *Populus euphratica* Oliv., a poplar from arid areas of Central Asia, differ from other poplar species? *Journal of Experimental Botany* **56**, 2003–2010.
- Jacobsen AL, Esler KJ, Pratt RB, Ewers FW.** 2009. Water stress tolerance of shrubs in Mediterranean-type climate regions: convergence of fynbos and succulent karoo communities with California shrub communities. *American Journal of Botany* **96**, 1445–1453.
- Jacobsen AL, Pratt RB, Ewers FW, Davis SD.** 2007. Cavitation resistance among 26 chaparral species of Southern California. *Ecological Monographs* **77**, 99–115.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A.** 2009. Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**, 409–419.
- Kavanagh KL, Bond BJ, Aitken SN, Gartner BL, Knowe S.** 1999. Shoot and root vulnerability to xylem cavitation in four populations of Douglas-fir seedlings. *Tree Physiology* **19**, 31–37.
- Lamy J-B, Bouffier L, Burrett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S.** 2011. Uniform selection as a primary force reducing population genetic differentiation of cavitation resistance across a species range. *PLoS ONE* **6**, e23476.
- Lamy J-B, Delzon S, Bouche PS, Alia R, Vendramin GG, Cochard H, Plomion C.** 2014. Limited genetic variability and phenotypic plasticity detected for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytologist* **201**, 874–886.
- Lamy J-B, Lagane F, Plomion C, Cochard H, Delzon S.** 2012. Micro-evolutionary patterns of juvenile wood density in a pine species. *Plant Ecology* **213**, 1781–1792.
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S.** 2011. Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist* **190**, 709–723.
- Loepfe L, Martínez-Vilalta J, Piñol J, Mencuccini M.** 2007. The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology* **247**, 788–803.
- López R, Heredia ULd, Collada C, Cano FJ, Emerson BC, Cochard H, Gil L.** 2013. Vulnerability to cavitation, hydraulic efficiency, growth and survival in an insular pine (*Pinus canariensis*). *Annals of Botany* **111**, 1167–1179.
- Maherali H, DeLucia EH.** 2000. Xylem conductivity and vulnerability to cavitation of ponderosa pine growing in contrasting climates. *Tree Physiology* **20**, 859–867.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB.** 2004. Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**, 2184–2199.
- Markesteijn L, Poorter L, Paz H, Sack L, Bongers F.** 2011. Ecological differentiation in xylem cavitation resistance is associated with stem and leaf structural traits. *Plant, Cell & Environment* **34**, 137–148.
- Martínez-Vilalta J, Cochard H, Mencuccini M, Sterck F, Herrero A, Korhonen JFJ, Llorens P, Nikinmaa E, Nolé A, Poyatos R, Ripullone F, Sass-Klaassen U, Zweifel R.** 2009. Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytologist* **184**, 353–364.

- Monclus R, Dreyer E, Villar M, Delmotte FM, Delay D, Petit JM, Barbaroux C, Le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F.** 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist* **169**, 765–777.
- Pammenter NW, Willigen CVd.** 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* **18**, 589–593.
- Pockman WT, Sperry JS.** 2000. Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran Desert vegetation. *American Journal of Botany* **87**, 1287–1299.
- Pratt RB, Jacobsen AL, Ewers FW, Davis SD.** 2007. Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytologist* **174**, 787–798.
- R Development Core Team.** 2011. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria. 3–900051–07–0. <http://www.R-project.org/>.
- Rohde A, Storme V, Jorge V, Gaudet M, Vitacolonna N, Fabbrini 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 Phytologist* **189**, 106–121.
- Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S.** 2013a. How to quantify conduits in wood? *Frontiers in Plant Science* **4**, 56–67.
- Scholz A, Rabaey D, Stein A, Cochard H, Smets E, Jansen S.** 2013b. The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree Physiology* **33**, 684–694.
- Schreiber SG, Hacke UG, Hamann A, Thomas BR.** 2011. Genetic variation of hydraulic and wood anatomical traits in hybrid poplar and trembling aspen. *New Phytologist* **190**, 150–160.
- Sparks JP, Black RA.** 1999. Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiology* **19**, 453–459.
- Sperry JS, Tyree MT.** 1988. Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology* **88**, 581–587.
- Sterck FJ, Martínez-Vilalta J, Mencuccini M, Cochard H, Gerrits P, Zweifel R, Herrero A, Korhonen JFJ, Llorens P, Nikinmaa E, Noïè A, Poyatos R, Ripullone F, Sass-Klaassen U.** 2012. Understanding trait interactions and their impacts on growth in Scots pine branches across Europe: functional branch trait coordination. *Functional Ecology* **26**, 541–549.
- Tixier A, Herbette S, Jansen S, Capron M, Tordjeman P, Cochard H, Badel E.** 2014. Modelling the mechanical behaviour of pit membranes in bordered pits with respect to cavitation resistance in angiosperms. *Annals of Botany* **114**, 325–334.
- Tyree MT, Davis SD, Cochard H.** 1994. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal* **15**, 335–360.
- Tyree MT, Ewers FW.** 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* **119**, 345–360.
- Tyree MT, Sperry JS.** 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 19–36.
- Urii M, Porte AJ, Cochard H, Guengant Y, Burlett R, Delzon S.** 2013. Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree Physiology* **33**, 672–683.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N.** 2005. Inter-vessel pitting and cavitation in woody *Rosaceae* and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell & Environment* **28**, 800–812.
- Wikberg J, Ögren E.** 2004. Interrelationships between water use and growth traits in biomass-producing willows. *Trees* **18**, 70–76.
- Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, Fumanal B, Alia R, Ducousso A, Gomory D, Roedel-Drevet P, Cochard H.** 2011. Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree Physiology* **31**, 1175–1182.
- Zimmermann MH.** 1983. *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer Verlag, Berlin, Germany.

TRANSITION

La résistance à la cavitation et l'efficacité d'utilisation de l'eau sont des caractères complexes, dont les capacités de phénotypage, offertes par les méthodes de mesure actuelles, restent limitées par rapport à des caractères directement observables ou mesurables, tels que la phénologie de croissance. Afin d'étendre l'étude de la variabilité génétique exprimée pour ces caractères fonctionnels et leurs relations à différents fonds génétiques dans différentes conditions environnementales, il convient d'identifier des méthodes de phénotypage haut-débit. Dans le cadre de la thèse, nous avons jugé de la pertinence de la spectroscopie proche et moyen infra-rouge comme méthode de phénotypage indirecte et haut-débit de caractères fonctionnels complexes, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation, chez le peuplier noir. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 4

***Pertinence de la spectroscopie infrarouge comme méthode
de phénotypage indirecte de caractères fonctionnels
complexes chez P. nigra***

1. Introduction

La Spectroscopie dans le Proche ou Moyen InfraRouge (SPIR ou SMIR) est une technique analytique basée sur le principe d'absorption du rayonnement infrarouge par les liaisons chimiques de la matière organique. Cette absorption est intimement liée à la composition chimique de l'échantillon qui peut alors être déterminée par l'acquisition des spectres d'absorption. Dans le domaine du moyen infrarouge (MIR, 2500 à 25 000 nm), la signature spectrale d'un échantillon est déterminée par les vibrations fondamentales des liaisons chimiques au sein des molécules. Dans le domaine du proche infrarouge (PIR, 1000 à 2500 nm), la signature spectrale résulte d'une combinaison de vibrations fondamentales et de vibrations harmoniques. Quel que soit le domaine infrarouge exploré, la spectroscopie infrarouge nécessite une phase de calibration basée sur des mesures de référence et l'établissement de modèles statistiques permettant de relier l'information spectrale aux résultats des mesures effectuées.

Au cours des deux dernières décennies, la SPIR a trouvé de nombreuses applications en écologie, notamment pour prédire la composition chimique des sols, des tissus animaux et végétaux (voir Foley et al., 1998 pour une revue). Chez les arbres forestiers, la SPIR a été utilisée pour estimer de façon indirecte les propriétés chimiques et structurales des feuilles, telles que la teneur massique en azote et carbone (*e.g.*, Gillon et al., 1999; Petisco et al., 2005; 2006; Richardson and Reeves III, 2005; Rubert-Nason et al., 2013), et du bois, telles que les teneurs en extractibles, en lignine et en cellulose, ou encore sa densité (*e.g.*, Hoffmeyer and Pedersen, 1995; Gierlinger et al., 2002; Schimleck et al., 2003; Kelley et al., 2004; Yeh et al., 2004; Poke and Raymond, 2006). De manière générale, les modèles de calibration établis pour ces caractères étaient de bonne qualité avec des coefficients de détermination de validation croisée (R^2_{CV})⁷ supérieurs à 0,80, indiquant que la SPIR pouvait être une alternative précise et rapide aux méthodes de mesures traditionnelles. La SPIR a également été utilisée pour prédire la composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) des aiguilles chez deux espèces de conifères, *Picea rubens* Sarg. et *Abies balsamea* (L.) Mill. (Richardson and Reeves III, 2005). Le modèle de calibration construit au niveau interspécifique pour $\delta^{13}\text{C}$ était de bonne qualité avec un R^2_{CV} de 0,76. Contrairement à la SPIR, la SMIR a été peu utilisée pour estimer de façon indirecte les propriétés chimiques, structurales et fonctionnelles chez les arbres

⁷Le coefficient de détermination de validation croisée (R^2_{CV}) permet d'apprécier la qualité de prédiction d'un modèle de calibration. Il correspond à la variance d'un caractère phénotypique dans un échantillon qui peut être expliquée par le modèle de calibration.

forestiers. À ce jour, seule une étude réalisée chez deux espèces de conifères a mis en évidence que les modèles de calibration établis à partir de spectres MIR présentaient une qualité de prédiction comparable, voire supérieure ($0,92 \leq R^2_{CV} \leq 0,96$), aux modèles établis à partir des spectres PIR ($0,26 \leq R^2_{CV} \leq 0,95$) pour estimer la teneur en azote, en carbone et le $\delta^{13}\text{C}$ des aiguilles (Richardson and Reeves III, 2005). Enfin, à ce jour, aucune étude publiée n'a déterminé si le niveau de résistance à la cavitation pouvait être estimé de façon indirecte par SPIR ou SMIR.

Le haut-débit de la spectroscopie infrarouge se caractérise par environ 12 échantillons par heure dans le domaine PIR et MIR (K. Ader, comm. pers.). Ce débit est à comparer au débit de phénotypage des méthodes de mesures actuelles de $\Delta^{13}\text{C}$ et de construction des courbes de vulnérabilité à la cavitation. L'analyseur élémentaire couplé au spectromètre de masse à flux continu permet de phénotyper environ quatre échantillons par heure (C. Hossann, comm. Pers.). La spectroscopie infrarouge pourrait donc permettre d'augmenter considérablement le débit de phénotypage pour $\Delta^{13}\text{C}$. De son côté, le Cavitron permet la construction d'environ deux courbes de vulnérabilité à la cavitation par heure pour une espèce aussi vulnérable que le peuplier noir. L'analyse de la résistance à la cavitation par la technique Cavitron ne nécessite aucune réelle préparation des échantillons de tiges alors qu'au contraire l'analyse par spectroscopie infrarouge nécessite une phase de séchage, de broyage et de tamisage. Malgré ce temps de préparation supplémentaire, le haut-débit de la spectroscopie infrarouge permettrait d'accroître les possibilités de phénotypage pour la résistance à la cavitation.

L'objectif général de cette étude visait à juger de la pertinence de la spectroscopie infrarouge comme méthode de phénotypage indirecte et haut-débit de caractères fonctionnels complexes, WUE et la résistance à la cavitation, chez le peuplier noir. Les travaux réalisés chez *P. nigra* ont permis de révéler l'expression d'une variabilité génétique significative pour WUE, évaluée *via* $\Delta^{13}\text{C}$ (Chamaillard et al., 2011; **Chapitre 2.2**), et pour la résistance à la cavitation, évaluée *via* Ψ_{50} (**Chapitre 3**). Par ailleurs, des différences significatives ont également été observées entre génotypes pour les caractères en lien avec la structure des feuilles (*i.e.*, la surface massique foliaire et les teneurs massiques en azote et carbone) et du xylème (*i.e.*, densité du xylème) au sein de populations naturelles de peuplier noir (Chamaillard et al., 2011; **Chapitre 2.2**; **Chapitre 3**). Les objectifs spécifiques de cette étude visaient à établir et à évaluer la qualité prédictive de modèles de calibration établis au niveau phénotypique et reliant les spectres infrarouges *i*) aux caractères en lien avec la structure des feuilles (*i.e.*, la surface massique foliaire et les teneurs massiques en azote et carbone) et du

xylème (*i.e.*, la densité du xylème) et **ii**) aux caractères en lien avec le fonctionnement hydrique de la plante, WUE et la résistance à la cavitation. L'acquisition des spectres infrarouge a été réalisée à partir d'échantillons de feuille et de tige qui avaient été précédemment utilisés, dans le cadre de la thèse, pour évaluer la variabilité génétique exprimée pour les caractères en lien avec la structure des feuilles et du xylème ainsi que pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} . Les broyats obtenus à partir des échantillons de feuille étaient en quantité insuffisante pour permettre une analyse dans le domaine PIR ; les spectres ont donc été acquis dans le MIR. En revanche, les broyats de tige étaient en quantité suffisante pour permettre une analyse dans le domaine PIR. Les spectres MIR ont été acquis sur un ensemble de 360 individus, correspondant à 120 génotypes échantillonnés dans neuf métapopulations naturelles de peuplier noir et représentés par trois ramets. Les spectres PIR ont été acquis sur un ensemble de 139 individus, correspondant à 33 génotypes d'une population naturelle de peuplier noir représentés par trois à cinq ramets.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal, sites expérimentaux et acquisition des données phénotypiques

Une description complète du matériel végétal, des sites expérimentaux, du prélèvement des échantillons ainsi que de l'acquisition des données phénotypiques utilisées dans cette étude peut être trouvée dans le **Chapitre 2.2** et le **Chapitre 3**.

2.1.1. Discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C et caractères structuraux foliaires

Dans le cadre de la thèse, la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C et les caractères structuraux foliaires (surface massique foliaire, teneurs massiques en azote et carbone) ont été mesurés sur un ensemble de 296 génotypes échantillonnés dans neuf métapopulations naturelles de peuplier noir installées en test clonal à Orléans et à Savigliano (**Chapitre 2.2**). Ces deux tests clonaux étaient organisés en six blocs complets randomisés à parcelle unitaire mono-arbre. Une à six feuilles matures et pleinement illuminées avaient été prélevées sur l'ensemble des génotypes étudiés dans cinq blocs des deux tests clonaux. Des disques foliaires calibrés ($0,80\text{ cm}^2$ à Savigliano et 2 cm^2 à Orléans) avaient été prélevés sur les feuilles échantillonnées puis mis à sécher à l'étuve à $60\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 72 h. Les disques foliaires de trois des cinq blocs échantillonnés avaient alors été pesés afin de déterminer la surface massique foliaire (SLA, $\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Ces disques foliaires avaient ensuite été broyés en une fine poudre de granulométrie inférieure à $50\text{ }\mu\text{m}$. Les teneurs massiques en azote et carbone (N_{Mass} et C_{Mass} , mg g^{-1}) ainsi que la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}\text{C}$) avaient été déterminées à partir d'un milligramme de poudre analysé à l'aide d'un analyseur élémentaire (Carlo Erba, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse à flux continu (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Allemagne). Les échantillons de poudre restants ont été utilisés pour l'acquisition des spectres infrarouge. Pour cette étude, seules les poudres de feuilles prélevées à Orléans ont été utilisées. Un sous-échantillon de 120 génotypes représentatifs de la gamme de variabilité exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ à Orléans a été choisi à l'aide de l'algorithme de Kennard et Stone (Kennard and Stone, 1969) sur la base des moyennes génotypiques (**Fig. 4.1a**). Afin de prendre en compte les effets de structuration génétique, les génotypes ont été échantillonnés dans les neuf métapopulations. Les 120 génotypes sélectionnés étaient également représentatifs de la gamme de variabilité génétique exprimée pour les caractères structuraux foliaires, SLA, N_{Mass} et C_{Mass} (**Fig. 4.1b,c,d**). Au

total, les spectres infrarouges ont été acquis sur un ensemble de 360 individus, correspondant à trois ramets des 120 génotypes choisis pour constituer l'échantillon.

2.1.2. Résistance à la cavitation et densité du xylème

Dans le cadre de la thèse, la résistance à la cavitation et la densité du xylème avaient été évaluées au sein d'une population naturelle de peuplier noir représentée par 33 génotypes et installée en test clonal en pépinière à l'INRA d'Orléans (**Chapitre 3**). Des segments de tige calibrés (28 cm en longueur et 0,4-0,8 cm en diamètre) avaient été prélevés sur l'ensemble des génotypes dans les cinq blocs constituant le dispositif expérimental. Des courbes de vulnérabilité à la cavitation avaient été construites à partir de ces échantillons en utilisant la technique Cavitron (Cochard et al., 2005). La tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique (Ψ_{50} , MPa) avait alors été estimée à partir des courbes et utilisée pour comparer le niveau de résistance à la cavitation des génotypes. La densité du xylème (ρ_x , g cm⁻³) avait été déterminée à partir de sous-échantillons d'une longueur de 4 cm prélevés sur ces mêmes tiges. Ces sous-échantillons avaient été écorcés et la moelle retirée avant de procéder aux mesures de densité du xylème selon le protocole développé par Hacke et al. (2000). Pour l'acquisition des spectres infrarouge, les portions de tige restantes ont été écorcées, séchées à l'étuve et intégralement broyées au moyen d'un broyeur à billes. Au total, les spectres infrarouge ont été acquis sur un ensemble de 139 individus, correspondant aux 33 génotypes représentés par trois à cinq ramets en fonction du niveau de mortalité pour chaque génotype.

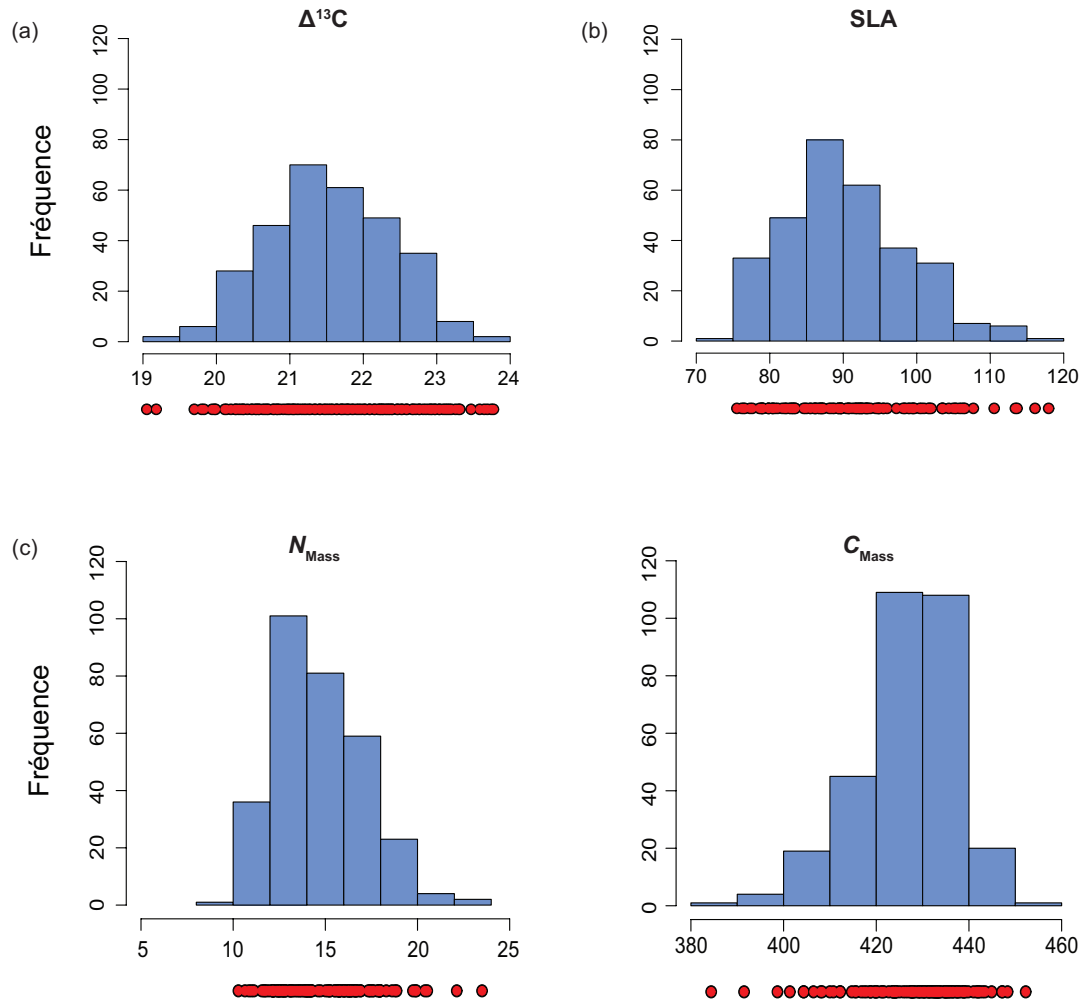


Figure 4.1. Distribution des moyennes génotypiques au sein des neuf métapopulations de peuplier noir pour (a) la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰), (b) la surface massique foliaire (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) et (c) et (d) les teneurs massiques en azote et carbone foliaires (N_{Mass} et C_{Mass} respectivement, mg g^{-1}). Les histogrammes et les points représentent respectivement la distribution des moyennes génotypiques pour les caractères mesurés sur les 296 génotypes et sur le sous-échantillon de 120 génotypes. Ces données sont issues du test clonal NovelTree précédemment utilisé dans le cadre de la thèse pour évaluer la variabilité génétique exprimée pour l'efficacité d'utilisation et d'autres caractères morphologiques et structuraux foliaires.

2.2. Acquisition des spectres et prétraitements statistiques

Les échantillons broyés et tamisés (fraction 50 – 1000 μm) ont été maintenus en chambre de dessiccation en attendant de procéder à l'acquisition des spectres infrarouge. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un spectromètre proche et moyen infrarouge (Spectrum 400, Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Après analyse isotopique, la quantité de poudre de feuille restante (≈ 4 g) était insuffisante pour permettre une analyse en SPIR. Ces échantillons ont donc été analysés dans le domaine du MIR. Pour chaque échantillon, un à deux milligrammes de poudre de feuille ont été disposés sur le module ATR diamant du spectromètre infrarouge. Cette opération a été répétée trois fois afin de disposer, pour chaque échantillon, de trois spectres qui ont ensuite été moyennés afin de ne disposer que d'un spectre unique par échantillon. L'acquisition des spectres MIR a été réalisée dans un intervalle de longueurs d'onde allant de 600 à 4000 cm^{-1} avec un pas de 1 cm^{-1} . Les spectres ont ensuite été découpés pour ne conserver que les valeurs d'absorbance pour les longueurs d'onde comprises entre 700 et 1800 cm^{-1} (**Fig. 4.2**). Cette gamme spectrale contient les principales bandes d'absorption caractéristiques de la composition de la matière organique. Les broyats des échantillons de tige ont été analysés par SPIR. Pour chaque échantillon, dix à 15 grammes de poudre ont été disposés dans des flacons Vial en verre. Soixante-quatre spectres PIR ont été acquis en différents points de l'échantillon et ont ensuite été moyennés afin d'obtenir un spectre unique pour chaque échantillon. L'acquisition des spectres PIR a été réalisée sur un intervalle de longueurs d'onde allant de 4000 à 10000 cm^{-1} avec un pas de 2 cm^{-1} . Ces spectres ont ensuite été découpés afin de ne retenir que les valeurs d'absorbance pour les longueurs d'onde comprises entre 4000 et 8000 cm^{-1} . Différents prétraitements statistiques ont été appliqués aux spectres MIR et PIR afin d'améliorer la qualité du signal enregistré. Les spectres ont été normalisés et dérivés, selon une dérivation première (fenêtre de 74 cm^{-1}) et seconde (fenêtre de 122 cm^{-1}), au moyen du filtre de Savitzky et Golay (Savitzky and Golay, 1964). Une combinaison de ces prétraitements statistiques a permis d'obtenir huit modalités spectrales : spectres bruts, spectres normalisés, spectres dérivés selon une dérivation première ou seconde, spectres normalisés puis dérivés selon une dérivation première ou seconde et spectres dérivés selon une dérivation première ou seconde puis normalisés (**Fig. 4.2**). Les prétraitements statistiques des spectres MIR et PIR ont été réalisés sous le logiciel R (R Development Core Team, 2012), notamment au moyen de la fonction '*sgolayfilt*' de la library '*signal*' pour les dérivations de spectres.

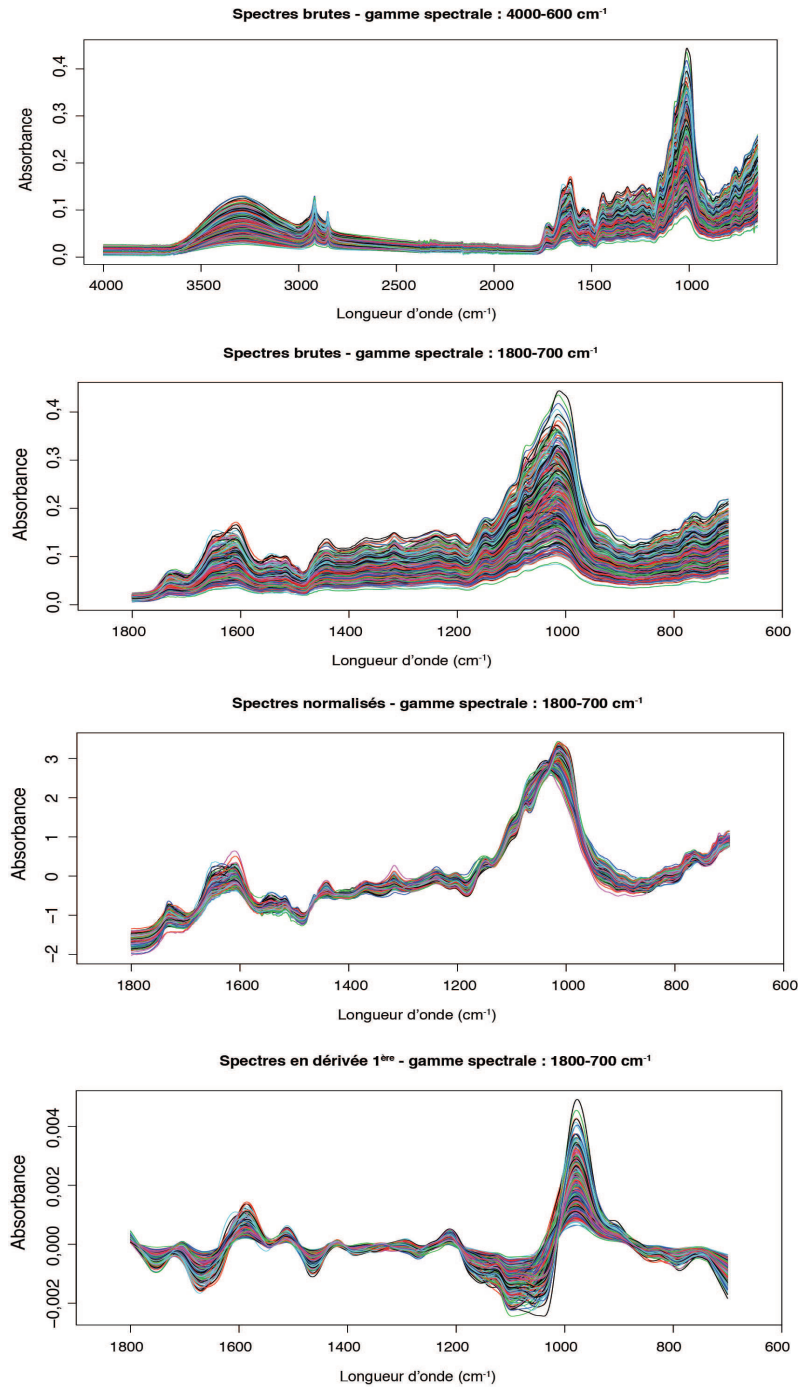


Figure 4.2. Exemples de spectres foliaires acquis dans le domaine du moyen infrarouge. Les deux premières figures en partant du haut représentent des spectres foliaires bruts dans la gamme spectrale 4000-600 cm⁻¹ puis découpés pour ne conserver que la gamme spectrale 1800-600 cm⁻¹. Les deux dernières figures illustrent l'effet de la normalisation et de la dérivation sur les spectres MIR. Les spectres sont ici représentés pour les 360 individus de peuplier noir sélectionnés pour établir les modèles de calibration reliant les spectres MIR à la variabilité phénotypique observée pour les caractères structuraux et fonctionnels foliaires.

2.3. Établissement des modèles de calibration

Les modèles de calibration ont été construits sous le logiciel R à partir du package ‘*pls*’ en utilisant la régression des moindres carrés partiels (PLS, ‘*Partial Least Squares*’) appliquée aux données spectrales prétraitées. La construction des modèles de calibration a été réalisée en trois étapes. La première étape consistait à établir les modèles de calibration en tenant compte de l’ensemble des échantillons mais également de l’ensemble des informations apportées par les différentes longueurs d’onde de la gamme spectrale explorée. Les composantes des modèles de calibration ont été déterminées par validations croisées et répétées de Monte-Carlo. Dans cette étude, les validations croisées et répétées ont été réalisées en utilisant 75 % des observations pour la construction du modèle de calibration ; les 25 % restants ont été utilisés pour la validation du modèle établi. Cette étape de validation croisée a été réitérée 100 fois. Afin de juger de la qualité de prédiction des modèles établis, différents paramètres statistiques ont été estimés au cours de la validation croisée : le coefficient de détermination de validation croisée (R^2_{CV}), l’erreur moyenne de prédiction en validation croisée ($RMSE_{CV}$) et le critère RPD_{CV} , qui correspond au ratio entre l’écart-type pour la variable à calibrer et l’erreur moyenne de prédiction en validation croisée. La deuxième étape consistait à identifier des observations aberrantes (également appelées ‘*outliers*’) qui s’écartent de la gamme de calibration. Ces observations correspondent aux observations pour lesquelles les résidus de validation croisée s’écartent d’une distribution normale. De nouveaux modèles de calibration ont alors été construits à partir des données filtrées de ces observations aberrantes. Enfin, la troisième étape consistait à sélectionner un sous-échantillon de longueurs d’onde les plus pertinentes pour établir les modèles de calibrations pour les différentes variables étudiées. Le sous-échantillonnage des longueurs d’onde a été réalisé avec l’algorithme ‘*CARS*’ qui permet de sélectionner les longueurs d’onde qui minimisent l’erreur moyenne de validation croisée (Li et al., 2009). De nouveaux modèles de calibrations ont alors été construits à partir des données filtrées des observations aberrantes et des valeurs d’absorbance pour les longueurs d’onde précédemment sélectionnées. Parmi l’ensemble des modèles construits, le ‘meilleur’ modèle a été identifié comme étant celui qui permet de maximiser le coefficient de détermination de validation croisée et de minimiser l’erreur moyenne de prédiction en validation croisée.

3. Résultats

3.1. Variabilité phénotypique et relations entre caractères dans l'échantillon d'étude

Une importante variabilité phénotypique était exprimée pour les caractères structuraux foliaires (SLA, N_{Mass} et C_{Mass}) et $\Delta^{13}\text{C}$ dans le sous-échantillon de 360 individus (**Fig. 4.3**). L'amplitude de variation entre individus extrêmes était de $56,0 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ pour SLA, $20,9 \text{ mg g}^{-1}$ pour N_{Mass} , $115,8 \text{ mg g}^{-1}$ pour C_{Mass} et $6,0\text{‰}$ pour $\Delta^{13}\text{C}$ (**Fig. 4.3**). Une relation significative et positive a été détectée entre $\Delta^{13}\text{C}$ et SLA (coefficient de corrélation de Pearson, $r_p = 0,42$, $P < 0,001$; **Fig. 4.3a**). Par ailleurs, $\Delta^{13}\text{C}$ était négativement corrélé à N_{Mass} ($r_p = -0,20$, $P < 0,001$; **Fig. 4.3b**). Enfin, aucune relation phénotypique significative n'a été détectée entre $\Delta^{13}\text{C}$ et C_{Mass} ($r_p = -0,05$, $P = 0,295$; **Fig. 4.3c**). Une corrélation positive a été détectée entre SLA et N_{Mass} ($r_p = 0,44$, $P < 0,001$).

Une importante variabilité phénotypique a été observée pour ρ_x et Ψ_{50} au sein de la population naturelle de peuplier noir étudiée (**Fig. 4.4**). L'amplitude de variation entre individus extrêmes était de $0,19 \text{ g cm}^{-3}$ pour ρ_x et de $0,84 \text{ MPa}$ pour Ψ_{50} (**Fig. 4.4**). Une relation phénotypique négative a été détectée entre Ψ_{50} et ρ_x ($r_p = -0,43$, $P < 0,001$; **Fig. 4.4**).

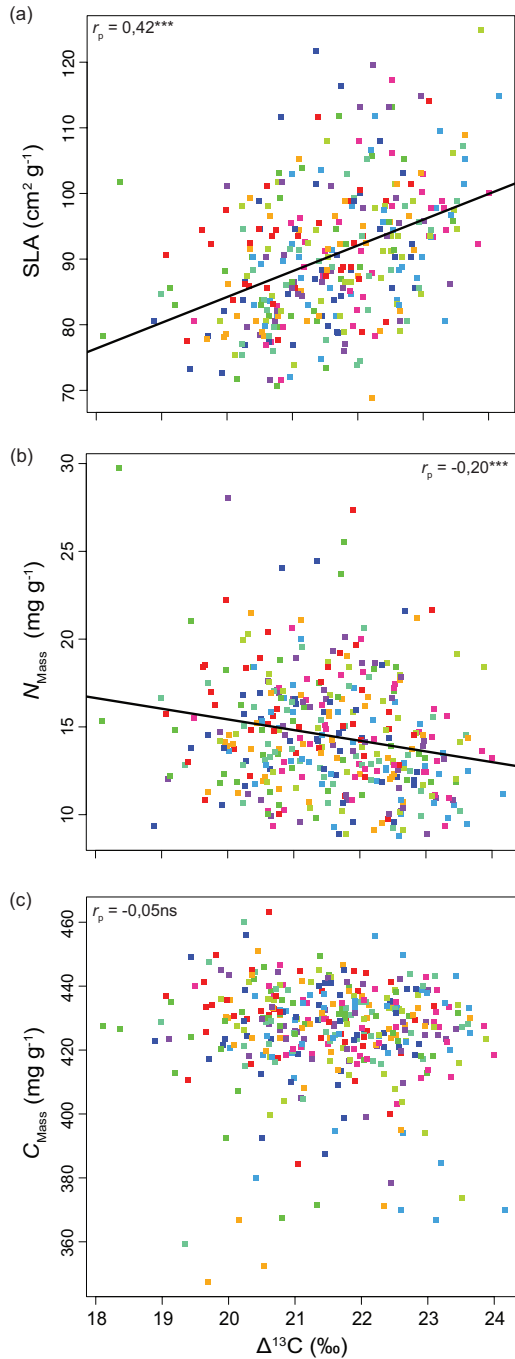


Figure 4.3. Relations phénotypiques entre la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}\text{C}$) et (a) la surface massique foliaire (SLA), et (b) et (c) les teneurs massiques en azote et carbone foliaires (N_{Mass} et C_{Mass}). Chaque point représente les valeurs observées pour un individu. Chaque individu présente une couleur caractéristique de la métapopulation à laquelle il appartient. Lorsque les relations étaient significatives, une droite de régression a été tracée. Le coefficient de corrélation de Pearson (r_p) a été calculé sur les valeurs individuelles. Les niveaux de significativité sont : *** $P < 0,001$; ns, non-significatif.

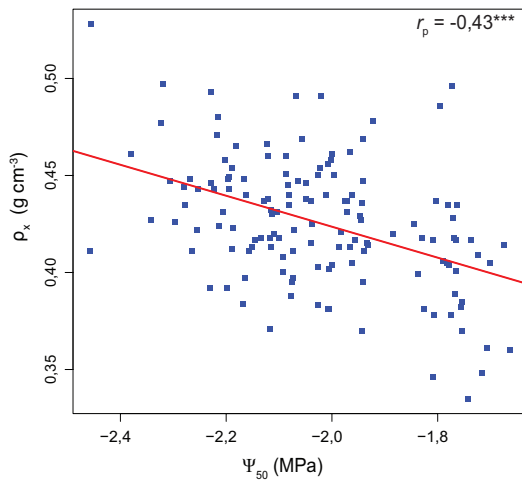


Figure 4.4. Relation phénotypique entre la tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique (Ψ_{50}) et la densité du xylème (ρ_x). Chaque point représente les valeurs observées pour un individu. La droite rouge représente la droite de régression ajustée aux données. Le coefficient de corrélation de Pearson (r_p) a été calculé sur les valeurs individuelles. Le niveau de significativité est : *** $P < 0,001$.

3.2. Modèles de calibration pour les caractères structuraux et fonctionnels foliaires

Les ‘meilleurs’ modèles de calibration pour les caractères structuraux (*i.e.*, SLA , N_{Mass} et C_{Mass}) et fonctionnels ($\Delta^{13}C$) foliaires sont présentés dans le **Tableau 4.1** et la **Figure 4.5**. Ces modèles ont été construits à partir des données spectrales normalisées. Les valeurs de R^2_{CV} étaient modérées à fortes et variaient de 0,50 pour $\Delta^{13}C$ à 0,88 pour N_{Mass} . Le critère RPD_{CV} , qui permet également d’évaluer la qualité de prédiction des modèles, variait de 1,42 pour $\Delta^{13}C$ à 2,94 pour N_{Mass} . De manière générale, les valeurs de R^2_{CV} et RPD_{CV} pour les caractères structuraux foliaires (*i.e.*, SLA , N_{Mass} et C_{Mass}) étaient supérieures ($0,62 \leq R^2_{CV} \leq 0,88$ et $1,62 \leq RPD_{CV} \leq 2,94$) à celles observées pour $\Delta^{13}C$, suggérant une meilleure capacité de prédiction de la variabilité structurale que de la variabilité fonctionnelle. Parmi l’ensemble des caractères étudiés, N_{Mass} présentait le ‘meilleur’ modèle de calibration avec un fort pouvoir de prédiction alors que $\Delta^{13}C$ présentait le moins bon modèle avec un pouvoir de prédiction modéré. Pour les caractères structuraux foliaires, 3,9 % à 12,5 % des observations initiales ont été filtrées pour construire les modèles. Pour $\Delta^{13}C$, seulement 0,5 % des observations initiales ont été filtrées. Enfin, 103 (C_{Mass}) à 157 (SLA) longueurs d’onde ont été retenues pour la construction des modèles de calibration.

Tableau 4.1. Modèles de calibration sélectionnés pour les caractères structuraux et fonctionnels mesurés chez le peuplier noir.

Domaine IR	Caractère	Prétraitement	Nb. variables latentes	R^2_{train}	R^2_{cv}	RMSE _{cv}	RPD _{cv}	Nb. obs.	Nb. outliers	% outliers	Nb. lambda
Moyen IR	SLA	Norm.	11	0,78	0,732 (0,008)	5,20 (0,08)	1,94 (0,03)	300	12	3,9	157
	N_{Mass}	Norm.	10	0,90	0,883 (0,003)	1,11 (0,02)	2,94 (0,04)	336	24	6,7	120
	C_{Mass}	Norm.	6	0,65	0,619 (0,007)	5,80 (0,06)	1,62 (0,02)	315	45	12,5	103
	$\Delta^{13}\text{C}$	Norm.	11	0,57	0,50 (0,01)	0,78 (0,01)	1,42 (0,02)	358	2	0,5	125
Proche IR	ρ_x	Der. 1 ^{ère}	8	0,77	0,62 (0,02)	0,015 (0,001)	1,64 (0,05)	117	21	15,2	244
	Ψ_{50}	Der. 1 ^{ère}	5	0,58	0,45 (0,03)	0,113 (0,003)	1,36 (0,04)	121	18	13,0	173

L'écart-type des valeurs moyennes de R^2_{train} , R^2_{cv} , RMSE_{cv} et RPD_{cv} est indiquée entre parenthèses. *Abréviations* : *Domaine IR*, domaine infrarouge ; R^2_{train} , coefficient de détermination d'apprentissage ; R^2_{cv} , coefficient de détermination de validation croisée ; $RMSE_{\text{cv}}$, erreur moyenne de validation croisée ; RPD_{cv} , ratio entre l'écart-type de la variable à calibrer et l'erreur moyenne de validation croisée ; *Nb. obs.*, nombre d'observations sur lesquelles ont été construits les modèles de calibration ; *Nb. outliers*, nombre d'observations aberrantes ; *% outliers*, pourcentage d'observations aberrantes par rapport au nombre d'observations totales ; *Nb. lambda*, nombre de longueurs d'onde sélectionnées pour la construction des modèles de calibration ; *SLA*, surface massique foliaire ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) ; N_{Mass} et C_{Mass} , teneurs massiques en azote et carbone foliaire (mg g^{-1}) ; $\Delta^{13}\text{C}$, discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C de la matière organique foliaire (%₀₀) ; ρ_x , densité du xylème (g cm^{-3}) ; Ψ_{50} , tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique (MPa) ; *Norm.*, normalisation ; *Der. 1^{ère}*, dérivation première.

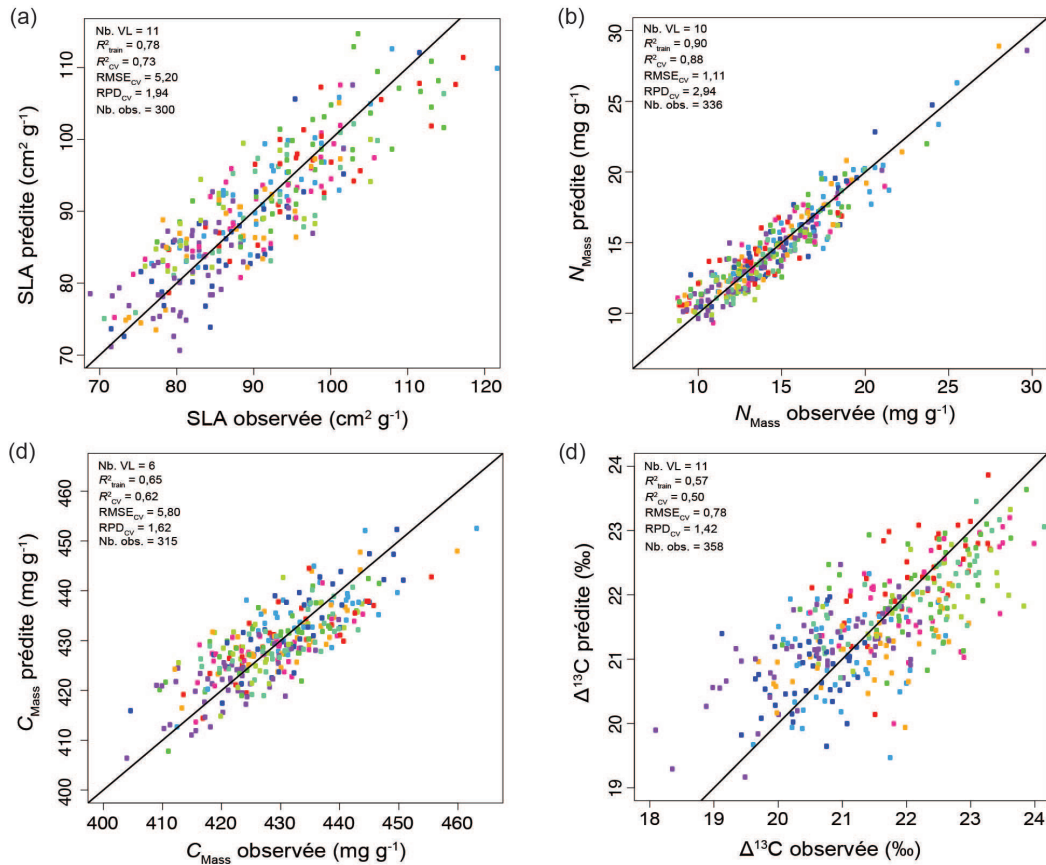


Figure 4.5. Représentation graphique des validations croisées de Monte-Carlo pour les modèles de calibration sélectionnés pour les caractères structuraux et fonctionnels foliaires mesurés au sein de neuf métapopulations naturelles de peuplier noir. Les résultats des validations croisées sont illustrées pour (a) la surface massique foliaire (SLA), (b) et (c) les teneurs massiques en azote et carbone foliaires (N_{Mass} et C_{Mass} , respectivement) et (d) la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C de la matière organique foliaire ($\Delta^{13}\text{C}$). Chaque point représente les valeurs observées et prédites pour un individu. Chaque individu présente une couleur caractéristique de la métapopulation à laquelle il appartient. Les lignes noires représentent la relation 1 : 1. Les abréviations sont identiques à celles utilisées dans le Tableau 4.1.

3.3. Modèles de calibration pour la densité du xylème et la résistance à la cavitation

Les ‘meilleurs’ modèles de calibration pour la densité du xylème (ρ_x) et la tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique (Ψ_{50}) sont présentés dans le **Tableau 4.1** et la **Figure 4.6**. Ces modèles ont été construits à partir des données spectrales en dérivée première. Pour ces deux caractères, les valeurs de R^2_{CV} étaient modérées ; cependant, ρ_x présentait une valeur de R^2_{CV} (0,62) supérieure à celle observée pour Ψ_{50} (0,45). La plus faible valeur de RPD_{CV} a été observée pour Ψ_{50} et était proche de 1, ce qui indique que l’erreur moyenne de prédiction en validation croisée était d’autant plus importante par rapport à l’écart-type de ce caractère au sein de l’échantillon étudié. Les modèles de calibration pour ρ_x et Ψ_{50} ont été respectivement construits en filtrant 15,2 % et 13,0 % des observations initiales et en utilisant les valeurs d’absorbance pour 244 et 173 longueurs d’onde.

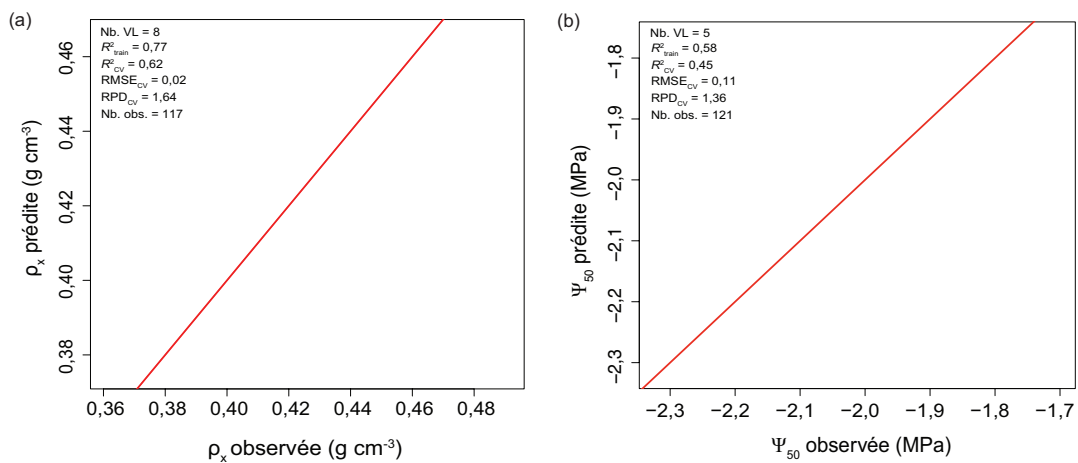


Figure 4.6. Représentation graphique des validations croisées de Monte-Carlo pour les modèles de calibration sélectionnés pour les caractères en lien avec la structure et la fonction du xylème mesurés au sein d’une population naturelle de peuplier noir. Les résultats des validations croisées sont illustrés pour (a) la densité du xylème (ρ_x) et (b) la tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique (Ψ_{50}). Chaque point représente les valeurs observées et prédites pour un individu. La ligne rouge représente la relation 1 : 1. Les abréviations sont identiques à celles utilisées dans le Tableau 4.1.

4. Discussion

4.1. Calibration par spectroscopie infrarouge de caractères en lien avec la structure des feuilles et du xylème

La capacité de la SPIR à évaluer de manière indirecte la teneur en azote foliaire a été mise en évidence chez de nombreuses espèces forestières (*e.g.*, Card et al., 1988; Bolster et al., 1996; Gillon et al., 1999; McIlwee et al., 2001; Petisco et al., 2005; Richardson and Reeves III, 2005). De manière générale, les modèles de calibration établis pour ce caractère étaient de bonne qualité avec des R^2_{CV} compris entre 0,81 et 0,98 en fonction des espèces étudiées. Le fort pouvoir de prédiction de ces modèles était, par ailleurs, confirmé par les valeurs de RPD_{CV} supérieures à trois, indiquant que l'erreur moyenne de validation croisée était amplement inférieure à l'écart-type observé pour la teneur en azote foliaire au sein des échantillons (Gillon et al., 1999; Petisco et al., 2005, 2006; Rubert-Nason et al., 2013). Contrairement à la SPIR, peu d'études ont évalué le pouvoir de prédiction de la teneur en azote foliaire de modèles de calibration établis à partir de spectres MIR chez les espèces forestières. À notre connaissance, seule une étude réalisée chez *Picea rubens* et *Abies balsamea*, a mis en évidence que la SMIR pouvait estimer avec précision la teneur en azote des aiguilles ($R^2_{CV} = 0,94$). Avec un R^2_{CV} de 0,88 et un RPD_{CV} de 2,94, le modèle de calibration sélectionné pour N_{Mass} dans notre étude présentait également un fort pouvoir de prédiction. Ces résultats semblent donc indiquer que même au niveau intraspécifique, où la gamme de variabilité est généralement plus restreinte qu'au niveau interspécifique, la SMIR peut être utilisée comme une méthode de phénotypage indirecte et précise de la teneur en azote foliaire.

Dans notre étude, le modèle de calibration par SMIR sélectionné pour C_{Mass} présentait un pouvoir de prédiction modéré, comme indiqué par le R^2_{CV} de 0,62 et le RPD_{CV} de 1,62. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par Richardson and Reeves III (2005) qui ont mis en évidence que les modèles de calibration établis à partir de spectres MIR permettaient d'estimer avec précision la teneur en carbone des aiguilles ($R^2_{CV} = 0,92$) chez deux espèces de conifères. Les résultats obtenus par SPIR pour ce même caractère sont également controversés. En effet, le modèle de calibration sélectionné pour estimer la teneur en carbone d'aiguilles présentait un fort pouvoir de prédiction pour le pin d'Alep (Gillon et al., 1999) alors qu'il était faible pour l'épinette rouge et le sapin baumier (Richardson and Reeves III, 2005). Deux hypothèses peuvent alors être envisagées pour expliquer ces résultats contrastés.

La première hypothèse s'appuie sur la comparaison des gammes de variabilité explorées pour établir les modèles de calibration. La capacité à construire des modèles de calibration pour un caractère est en effet déterminée par la variabilité observée pour ce caractère au sein d'un échantillon ; la capacité à construire un modèle de calibration est attendue comme meilleure lorsqu'il existe une forte variabilité pour ce caractère au sein d'un échantillon. Cette hypothèse semble toutefois être invalidée par nos résultats. Dans notre étude, C_{Mass} variait dans une gamme de 115,8 mg g⁻¹ entre individus extrêmes. Bien que cette amplitude de variation phénotypique soit supérieure à celle observée pour C_{Mass} dans l'étude de Richardson and Reeves III (2005) (115,8 vs. 45,5 mg g⁻¹), le pouvoir de prédiction de notre modèle de calibration était inférieur à celui du modèle établi par Richardson and Reeves III (2005). La deuxième hypothèse met en cause la nature des composés carbonés présents au sein des tissus foliaires. En fonction de la nature de ces composés, le domaine infrarouge le plus approprié pour calibrer et prédire la teneur en carbone foliaire peut alors être différent. Cette hypothèse semble être supportée par l'étude réalisée par Richardson and Reeves III (2005) qui a mis en évidence que les modèles de calibration établis à partir de spectres MIR pour la teneur en carbone foliaire présentaient un pouvoir de prédiction supérieur à celui des modèles établis à partir de spectres PIR (R^2_{CV} : 0,92 vs. 0,26).

Les variations de surface massique foliaire (SLA) reflètent des variations de l'épaisseur et/ou de la densité des feuilles : plus la valeur de SLA est faible, plus une feuille est épaisse et/ou dense. Ces variations de l'épaisseur et/ou de la densité s'accompagnent, elles-mêmes, de variations de la teneur en composés carbonés et azotés. À titre d'exemple, nous avons pu mettre en évidence une relation phénotypique positive entre SLA et N_{Mass} , indiquant que les feuilles les plus épaisses et/ou denses présentaient les plus faibles teneurs en azote par unité de masse. De façon similaire, la densité du xylème est un caractère intégrateur de la structure du xylème dont les variations reflètent des différences d'investissement carboné. Tenant compte des covariations entre la composition chimique et la structure des feuilles ou du xylème, il est légitime de supposer que la spectroscopie infrarouge puisse évaluer de manière indirecte la variabilité exprimée pour SLA et pour la densité du xylème. Les résultats obtenus dans cette étude ne confirment que partiellement cette hypothèse. Avec un R^2_{CV} de 0,73 et un RPD_{CV} de 1,94, le modèle de calibration par SMIR sélectionné pour SLA présentait un bon pouvoir de prédiction de la variabilité phénotypique exprimée pour ce caractère au sein des neuf métapopulations naturelles de peuplier noir. En revanche, le modèle de calibration par SPIR sélectionné pour ρ_x présentait un pouvoir de prédiction

modéré, comme indiqué par le R^2_{CV} de 0,62 et le RPD_{CV} de 1,64. Ce modèle de calibration a été établi à partir de la variabilité phénotypique observée dans une seule population naturelle de peuplier noir. Si ce caractère varie entre populations naturelles, alors la gamme de variabilité phénotypique sur laquelle seraient construits les modèles de calibration serait plus importante et pourrait permettre d'augmenter la qualité prédictive des modèles. La SPIR a été utilisée chez différentes espèces forestières pour estimer de façon indirecte la densité du bois (Hoffmeyer and Pedersen, 1995; Schimleck et al., 2003; Jones et al., 2005; Hein et al., 2009). Les modèles de calibration établis pour ce caractère étaient de bonne qualité avec des valeurs de R^2_{CV} comprises entre 0,76 et 0,90 selon les espèces étudiées. Les différences de qualité de prédiction entre notre modèle et ceux précédemment établis chez d'autres espèces forestières peuvent être en partie expliquées par la plus faible gamme de variabilité phénotypique observée pour ρ_x au sein de la population de peuplier noir étudiée (amplitude de variation : $0,19 \text{ g cm}^{-3}$) par rapport aux autres espèces forestières ($0,27 \text{ g cm}^{-3} \leq \text{amplitude de variation} \leq 0,50 \text{ g cm}^{-3}$) (Hoffmeyer and Pedersen, 1995; Schimleck et al., 2003; Jones et al., 2005; Hein et al., 2009).

4.2. Calibration par spectroscopie infrarouge de l'efficacité d'utilisation de l'eau et de la résistance à la cavitation

Chez les espèces forestières, seule une étude réalisée chez *Picea rubens* et *Abies balsamea* a jugé de la capacité de la SPIR et de la SMIR à estimer de façon indirecte $\Delta^{13}\text{C}$ (Richardson and Reeves III, 2005). Les modèles de calibration étaient de bonne qualité avec des R^2_{CV} supérieurs à 0,76, indiquant que la spectroscopie infrarouge pouvait prédire de façon indirecte et précise les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$. Cependant, ces modèles de calibration avaient été établis au niveau interspécifique et ne permettent pas de juger de la capacité de la SPIR et de la SMIR à évaluer indirectement $\Delta^{13}\text{C}$ au niveau intraspécifique. Nos résultats démontrent que la SMIR et la SPIR ne peuvent être respectivement utilisées comme méthodes de phénotypage indirectes de la variabilité exprimée pour WUE et la résistance à la cavitation chez le peuplier noir. Leur utilisation ne peut être envisagée que pour l'identification de génotypes extrêmes. En effet, les modèles de calibration sélectionnés pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} présentaient des valeurs de R^2_{CV} égales ou inférieures à 0,50, ce qui indique une faible précision des modèles de prédiction établis pour ces caractères. Ce résultat était, par ailleurs, confirmé par les valeurs

d'erreur moyenne de validation croisée (RMSE_{CV}) qui atteignaient 0,78 % pour $\Delta^{13}\text{C}$ et 0,11 MPa pour Ψ_{50} .

Dans une étude réalisée chez deux espèces de conifères, Richardson and Reeves III (2005) avaient suggéré que la capacité de la spectroscopie infrarouge à évaluer la variabilité exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ était déterminée par les effets de covariation entre ce caractère fonctionnel et les caractères en lien avec la composition chimique ou la structure des feuilles. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence des relations phénotypiques significatives entre $\Delta^{13}\text{C}$, SLA et N_{Mass} . La tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité (Ψ_{50}) hydraulique était corrélée avec ρ_x . Par ailleurs, les modèles de calibration sélectionnés pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} présentaient un pouvoir de prédiction inférieur à celui des modèles sélectionnés pour les caractères structuraux associés. L'ensemble de ces résultats semble donc confirmer l'hypothèse formulée par Richardson and Reeves III (2005) et suggère que la capacité de la SMIR et de la SPIR à évaluer respectivement une part de la variabilité phénotypique exprimée pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} chez le peuplier noir résulterait des effets de corrélation entre ces caractères fonctionnels et les caractères structuraux associés. La capacité de la spectroscopie infrarouge à évaluer de façon indirecte $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} chez *P. nigra* pourrait alors être limitée quel que soit le domaine infrarouge exploré.

5. Conclusions

Les résultats obtenus chez le peuplier noir indiquent que la pertinence de la spectroscopie infrarouge comme méthode de phénotypage indirecte varie en fonction des caractères à calibrer. Dans notre étude, les modèles de calibration sélectionnés pour les caractères en lien avec la structure des feuilles et du xylème présentaient un meilleur pouvoir de prédiction que celui des modèles établis pour les caractères fonctionnels. Parmi les caractères structuraux étudiés, N_{Mass} et SLA présentaient des modèles de calibration à fort pouvoir de prédiction. Pour ces caractères, la spectroscopie infrarouge pourrait être utilisée comme méthode de phénotypage indirecte haut-débit. Au contraire, les modèles de calibration sélectionnés pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} présentaient un faible pouvoir de prédiction. À notre connaissance, cette étude est la première à juger de la pertinence de la spectroscopie infrarouge comme méthode de prédiction indirecte de WUE et de la résistance à la cavitation au niveau intraspécifique chez une espèce forestière. Nos résultats suggèrent que la capacité de la spectroscopie infrarouge à prédire une part de la variabilité phénotypique observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} résultait

simplement des effets de covariation entre caractères structuraux et fonctionnels. Tenant compte des corrélations modérées entre ces caractères, la capacité de la spectroscopie infrarouge à prédire la variabilité pour $\Delta^{13}\text{C}$ et Ψ_{50} chez le peuplier noir pourrait alors être limitée quel que soit le domaine infrarouge exploré.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse présentaient une double finalité. Sur le plan cognitif, ils visaient à caractériser le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique pour des caractères phénotypiques au sein d'une collection européenne de peuplier noir afin de permettre, à brèves échéances, d'identifier les bases génétiques de l'adaptation locale chez *P. nigra*. Sur le plan appliqué, les travaux réalisés s'inscrivent dans la continuité de ceux entrepris dans le cadre des programmes de conservation des ressources génétiques du peuplier noir et qui visent à développer nos connaissances quant à la structuration de la variabilité génétique. La mise en place des stratégies de conservation des ressources génétiques du peuplier noir nécessite de prendre en compte la trajectoire évolutive des populations, incluant à la fois leur histoire passée mais également leur évolution possible face aux modifications de l'environnement, afin de sélectionner des unités de conservation ou de constituer une collection de populations qui soient représentatives de la diversité de trajectoires évolutives au sein de l'espèce. Quelle que soit l'espèce forestière concernée, la conservation et la gestion des ressources génétiques nécessitent une description aussi exhaustive que possible de la variabilité génétique présente dans les populations naturelles. Depuis plusieurs décennies, la variabilité génétique exprimée au sein des populations forestières a été principalement évaluée pour des caractères phénotypiques facilement observables ou mesurables, tels que la phénologie végétative ou la croissance (Langlet, 1971; Morgenstern, 1996; Alberto et al., 2013a). L'identification de descripteurs indirects de caractères fonctionnels complexes, tels que $\Delta^{13}\text{C}$ pour WUE, et le développement des techniques de phénotypage pour ces descripteurs, ont permis d'étendre la lecture de la variabilité génétique à des caractères fonctionnels complexes.

Dans le cadre de la thèse, nos travaux ont porté sur l'étude de trois caractères fonctionnels connus pour être sensibles à des variations de la température de l'air et de la disponibilité en eau du sol : **1-** la phénologie de croissance, **2-** l'efficacité d'utilisation de l'eau et **3-** la résistance à la cavitation. Les objectifs spécifiques de la thèse visaient à : **i)** évaluer le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique pour les caractères fonctionnels d'intérêt, **ii)** de juger des relations entre la phénologie de croissance, WUE, la résistance à la cavitation et les performances de croissance et **iii)** d'identifier des prédictors indirects de la variabilité observée pour les caractères fonctionnels. Ce dernier objectif s'inscrit dans une volonté de continuer à faire progresser les performances de

phénotypage pour les caractères fonctionnels complexes afin d'étendre la lecture de la variabilité exprimée pour ces caractères à différents fonds génétiques dans différentes conditions environnementales. Ces objectifs ont été traités dans trois chapitres et ont reposé sur la mise en place et/ou le suivi de deux plans d'expérience. Dans cette section finale, les principaux résultats sont restitués et discutés au regard des objectifs initiaux et les perspectives ouvertes par ce travail de thèse sont également présentées.

1. Phénologie de croissance et efficacité d'utilisation de l'eau : variabilité génétique et plasticité phénotypique

Nos travaux ont permis de caractériser le niveau et la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE au sein d'une même collection européenne de ressources naturelles de peuplier noir (**Chapitre 2**). À la différence des études précédemment réalisées au sein du genre *Populus*, l'expression de la variabilité génétique a été évaluée dans des conditions de croissance contrastées en utilisant un niveau d'échantillonnage intra-population important. Cette stratégie expérimentale nous a permis d'évaluer la plasticité phénotypique des génotypes et de juger de la stabilité de l'expression de la variabilité génétique dans des conditions expérimentales contrastées. Les résultats obtenus soulignent la complexité de la variabilité phénotypique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE qui résultait à la fois d'une variabilité génétique intra- et inter-métapopulations ainsi que d'une plasticité phénotypique et d'une variabilité génétique de la plasticité. L'importance relative de ces différentes composantes de la variabilité phénotypique distingue clairement les caractères phénologiques de WUE.

1.1. Maintien d'une variabilité génétique intra-métapopulation pour la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau

Quels que soient le fond génétique et les conditions de croissance, nous avons pu mettre en évidence que les métapopulations de peuplier noir maintenaient une importante variabilité génétique pour les caractères phénologiques et WUE (**Chapitre 2**). Pour ces deux caractères fonctionnels, la variabilité génétique exprimée au niveau intra-métapopulation était supérieure à celle exprimée au niveau inter-métapopulations. Le maintien d'une importante variabilité génétique au niveau intra-population semble être une caractéristique générale des espèces forestières. En effet, les espèces forestières sont caractérisées par des tailles de populations et

des flux de gènes importants et présentent généralement un système de reproduction allogame favorisant les événements de recombinaison et permettant le maintien d'un fort niveau de variabilité génétique (Hamrick et al., 1992; Kremer, 1994; Savolainen et al., 2007). Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence que la variabilité génétique exprimée pour des caractères phénotypiques, tels que la phénologie de croissance, était majoritairement distribuée au niveau intra-population chez les espèces forestières (Alberto et al., 2013a). Chez le peuplier noir, le niveau de diversité et de variabilité génétique présent au sein des populations naturelles est fortement influencé par la dynamique hydromorphologique des bassins hydrographiques de laquelle dépend la régénération de l'espèce. L'estimation du niveau de diversité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires neutres, qui permettent notamment d'apprécier le niveau de clonalité au sein des populations, a mis en évidence que les populations de peuplier noir qui n'expriment plus de dynamique démographique, en raison d'une forte régulation de la dynamique fluviale, présentent un faible niveau de diversité (Storme et al., 2004; Smulders et al., 2008b). Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence que les populations qui maintenaient de forts niveaux de variabilité génétique pour la phénologie de croissance et WUE présentaient *in situ* une dynamique démographique. À titre d'exemple, la population 'Saint-Pryvé Saint-Mesmin', qui est représentée par des cohortes d'âges différents, était représentative de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE chez le peuplier noir (**Chapitre 2**; Chamaillard et al., 2011). Ces résultats témoignent de la nécessité de préserver la dynamique démographique des populations, et donc la dynamique des bassins hydrographiques, pour maintenir un réservoir de variabilité génétique et le potentiel adaptatif des populations face à des variations environnementales.

1.2. Plasticité phénotypique et stabilité de l'expression de la variabilité génétique intra-métapopulation entre conditions expérimentales contrastées

Nos résultats ont mis en évidence une forte plasticité des caractères phénologiques et de WUE en réponse à des variations de conditions de croissance entre sites expérimentaux (**Chapitre 2**). Cette réponse plastique expliquait une part prépondérante de la variabilité phénotypique exprimée pour les caractères phénologiques et WUE au sein des métapopulations de peuplier noir. Fondamentalement, WUE est un caractère dynamique qui reflète une balance entre des composantes fonctionnelles qui varient constamment en fonction

des conditions environnementales pour permettre l'ajustement du fonctionnement hydrique et carboné de la plante. Ainsi, à l'échelle foliaire, de nombreux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer l'assimilation nette de CO₂ (A) et/ou la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) sont susceptibles d'influencer WUE_i et $\Delta^{13}C$, tels que la température de l'air (Lauteri et al., 2004; Xu et al., 2008), la disponibilité en eau du sol (*e.g.*, Lauteri et al., 2004; Zhang et al., 2004; Xu et al., 2008; Aranda et al., 2010; Chamaillard et al., 2011; de Miguel et al., 2011), et en nutriments (*e.g.*, Guehl et al., 1995; Harvey and van den Driessche, 1999; Ripullone et al., 2004; Cooke et al., 2005; DesRochers et al., 2006), l'irradiance (Aranda et al., 2007; Toillon et al., 2013) ou encore la concentration en CO₂ de l'air (Guehl et al., 1994).

Le décalage du débourrement observé entre sites expérimentaux pouvait être expliqué par une variation du degré de continentalité et donc par une variation des régimes de températures entre sites (**Chapitre 2.1**). Le site le plus continental (*i.e.*, SAV) était caractérisé par une accumulation rapide de températures chaudes au printemps favorisant le débourrement. En tant que tels, ces résultats ne font que confirmer ceux précédemment obtenus chez différentes espèces forestières qui ont mis en évidence une forte plasticité du débourrement en réponse à une augmentation de température, avec une avancée de la date de débourrement variant entre 1,5 et 6,0 jours par degré, selon les espèces et les populations étudiées (Worrall, 1983; Kramer, 1995; Vitasse et al., 2009b; Vitasse et al., 2010). Par ailleurs, l'avancée de la date de débourrement des arbres forestiers, accompagnant les modifications climatiques, constitue vraisemblablement l'illustration la plus flagrante de la plasticité de ce caractère en réponse à une augmentation moyenne de la température annuelle (Menzel and Fabian, 1999; Menzel et al., 2006; Parmesan, 2006; Cleland et al., 2007).

La précocité de la formation du bourgeon terminal observée dans le site expérimental à Orléans pouvait être à la fois expliquée par un effet des températures froides en fin de saison de végétation mais également par un effet de la défeuillaison précoce induite par l'attaque par la rouille foliaire à *Melampsora larici-populina* (**Chapitre 2.1**). Les résultats obtenus dans le cadre de la thèse ne permettent donc pas de conclure quant à l'effet propre de la température sur l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal. Rohde et al. (2011a) ont mis en évidence chez des hybrides de peuplier euraméricain que les températures chaudes en fin de saison de végétation diminuaient la sensibilité du bourgeon au signal photopériodique, retardant ainsi l'arrêt de croissance, mais qu'une fois l'arrêt de croissance induit, elles accélèrent la formation du bourgeon terminal. Ces résultats ont été confirmés par les travaux réalisés par Fabbrini et al. (2012) au sein d'une famille de plein-frères *P. nigra* qui ont mis en

évidence une avancée de la date d'arrêt de croissance en réponse à des températures nocturnes froides. Afin de tester la robustesse de ces résultats au sein de populations naturelles de peuplier noir, il pourrait être intéressant d'évaluer l'influence de variations de température en fin de saison de végétation, à régime photopériodique constant, sur l'arrêt de croissance et la formation du bourgeon terminal.

Nos résultats ont également permis de révéler l'existence d'une variabilité génétique de la plasticité phénotypique (*i.e.*, interactions $G \times S$) au sein des métapopulations de peuplier noir pour la phénologie de croissance et WUE (**Chapitre 2**). L'étude des interactions $G \times S$ au niveau intra-population permet de juger de la stabilité de l'expression de la variabilité génétique dans des conditions environnementales contrastées. Pour les caractères phénologiques, la variabilité de la plasticité était essentiellement expliquée par des différences entre génotypes dans l'amplitude de leur réponse sans que cela n'aboutisse systématiquement à de profondes modifications du classement génotypique entre sites (**Chapitre 2.1**). Au contraire, pour WUE, l'amplitude de réponse plastique variait considérablement entre génotypes, de telle manière que le classement des génotypes était fortement modifié entre sites expérimentaux (**Chapitre 2.2**). Les populations naturelles de peuplier noir sont exposées *in situ* à des variations temporelles de la disponibilité en eau qui varie généralement avec le niveau des fleuves ou des rivières adjacentes (Karrenberg et al., 2002). De façon comparable, la disponibilité en nutriments varie considérablement dans le temps en fonction de la granulométrie des sédiments, de l'installation progressive de la végétation mais également en fonction des activités agricoles développées par l'Homme à proximité des zones alluviales (Karrenberg et al., 2002). L'hétérogénéité temporelle de la disponibilité en eau et en nutriments à l'échelle de l'habitat riparien peut ainsi favoriser le maintien d'une forte plasticité phénotypique et d'une importante variabilité des patrons de plasticité pour WUE au sein des populations de peuplier noir.

La faible diversité des patrons de plasticité phénotypique observée pour les caractères phénologiques confirment les résultats précédemment obtenus au sein d'une famille de plein-frères chez *P. nigra* (Fabbrini et al., 2012) et au sein de populations naturelles de *P. tremula* (Luquez et al., 2008). L'hypothèse qui peut être avancée pour expliquer cette faible diversité de patrons de plasticité repose sur le fait que la lecture de la plasticité pour ces caractères a été effectuée dans des conditions de croissance qui restent dans la gamme de conditions environnementales auxquelles sont exposées les populations dans leur milieu naturel. Il serait donc intéressant de tester si l'exposition des populations à des conditions environnementales

extrêmes, notamment à de fortes températures printanières et automnales, permettrait de révéler l'expression d'une importante variabilité pour les patrons de plasticité au sein des populations. Par ailleurs, cela permettrait de déterminer s'il existe des valeurs seuils de températures au-delà desquelles on observe une rupture de la réponse plastique des génotypes de peuplier noir pour les caractères phénologiques.

1.3. Différenciation génétique entre métapopulations et phénomènes d'adaptation locale

Bien qu'une importante variabilité génétique était exprimée au niveau intra-métapopulation, nous avons systématiquement détecté une différenciation génétique modérée à forte des métapopulations de peuplier noir pour les caractères phénologiques ($0,26 \leq Q_{ST} \leq 0,47$) et WUE ($Q_{ST} \approx 0,25$) (**Chapitre 2**). La caractérisation du niveau de diversité génétique au sein de populations européennes de peuplier noir à l'aide de marqueurs AFLP et microsatellites a mis en évidence une forte variabilité du niveau de différenciation génétique (F_{ST}) en fonction des marqueurs utilisés ($F_{ST} \approx 0,28$ pour les marqueurs AFLP vs. 0,11 pour les microsatellites; Storme et al., 2004; Smulders et al., 2008). La seule comparaison des valeurs de Q_{ST} et de F_{ST} ne permet pas de conclure quant aux forces évolutives qui ont façonné les patrons de différenciation génétique des métapopulations pour la phénologie de croissance et WUE. Néanmoins, quels que soient les marqueurs utilisés, la diversité génétique au sein des populations se structurait selon la géographie : les populations distribuées dans un même bassin hydrographique et proches géographiquement étaient faiblement différenciées entre elles et plus fortement différenciées des autres populations (Storme et al., 2004; Smulders et al., 2008). La comparaison de ce patron avec ceux observés pour les caractères phénotypiques étudiés dans le cadre de la thèse semble donc suggérer l'existence de phénomènes d'adaptation locale qui semblent toutefois plus ou moins marqués selon le caractère et les métapopulations étudiés.

Les patrons de différenciation génétique des métapopulations pour les caractères phénologiques étaient fortement conservés entre sites expérimentaux (**Chapitre 2.1**). Pour la date de formation du bourgeon terminal, les différences entre métapopulations se structuraient selon un gradient latitudinal photopériodique. Les métapopulations septentrionales formaient alors leurs bourgeons plus précocement que les métapopulations méridionales. Pour le débourrement, les patrons de différenciation étaient plus complexes, dans le sens où ils ne

pouvaient être résumés à l'expression d'un gradient géographique simple de type latitude, longitude ou altitude. Cependant, les métapopulations semblaient se différencier selon les paramètres thermiques de leur site d'origine. Le débourrement le plus précoce était alors observé pour les métapopulations issues de sites continentaux caractérisés par une accumulation rapide de températures chaudes au printemps. L'ensemble de ces résultats suggère une adaptation locale des métapopulations aux conditions photopériodiques et thermiques. En tant que tels, ces résultats ne font que s'ajouter à ceux précédemment obtenus chez de nombreuses espèces forestières qui soulignent le rôle majeur des caractères phénologiques dans l'adaptation des populations au froid (voir Howe et al., 2003 et Alberto et al., 2013a pour une revue).

Avec le développement des techniques de génotypage, les études visant à évaluer les bases génétiques de l'adaptation locale pour les caractères phénologiques se sont développées chez les espèces forestières. Chez *P. trichocarpa*, le génotypage par reséquençage du génome à moyenne profondeur de 544 génotypes non-apparentés issus de 16 populations naturelles a permis l'identification de plus de 17 millions de marqueurs SNPs polymorphes dans cette collection (Evans et al., 2014). L'analyse de ce polymorphisme, à l'aide de cinq métriques différentes, dont la mesure de différenciation (F_{ST}) et la pente de la relation entre les fréquences alléliques et les covariables environnementales des sites d'origine des populations, a permis d'identifier 397 régions génomiques, d'une largeur de 1 kb, considérées comme des régions candidates pour des traces de sélection récente. Ces régions génomiques étaient impliquées dans le contrôle de la variabilité phénotypique exprimée pour les caractères phénologiques. À titre d'exemple, la variabilité génétique observée pour le débourrement était en partie associée au niveau de polymorphisme du gène *Flowering Locus T1 (FT1)* (Evans et al., 2014). L'expression de ce gène est induite durant l'hiver par les températures froides et est à l'origine de la transition florale. La variabilité observée pour la formation du bourgeon terminal était, quant à elle, en partie associée au niveau de polymorphisme du gène *FT2* (Evans et al., 2014). Ce gène est exprimé durant toute la saison de végétation et permet le maintien de la croissance végétative de la plante. Son expression est réprimée en fin de saison de végétation par une diminution de la longueur du jour. Dans le cadre du projet européen FP7-NovelTree (2008 – 2012), une puce Illumina regroupant 10 331 marqueurs SNPs a été développée à la fin de l'année 2011 par l'INRA et deux partenaires européens (*i.e.*, l'Université de Southampton et l'Institut de Génomique Appliquée d'Udine). Cette puce a été développée avec pour principal objectif de mettre en relation la variabilité génétique observée

pour des caractères d'intérêt, tels que la phénologie de croissance, la tolérance à la rouille foliaire à *Mlp* ou encore les propriétés chimiques du bois, avec le niveau de polymorphisme moléculaire à l'échelle du génome du peuplier noir. Les 10 331 marqueurs SNP_s que comporte la puce sont distribués sur les 19 groupes de liaison dans des régions candidates pour les caractères d'intérêt et des régions non candidates (**Fig. P1**). Parmi ces marqueurs, 9127 SNP_s ont fourni des données de génotypage valides sur le plan technique et 8259 ont été utilisés pour faire une première analyse de la structure génétique d'une collection de 706 génotypes de peuplier noir appartenant à 12 métapopulations, pour lesquels nous disposons des données de phénologie de croissance. L'identification de signatures sélectives à l'échelle du génome du peuplier noir pourrait nous permettre de confirmer l'adaptation locale des métapopulations et d'explorer ses bases génétiques. Pour ce faire, la stratégie expérimentale pourrait reposer sur l'identification de l'ensemble des loci qui présentent un niveau de différenciation génétique supérieur à celui qui serait attendu dans le cas d'une différenciation induite par les forces évolutives neutres (également appelés 'loci *outliers*') et la mise en relation du niveau de polymorphisme observé pour ces loci avec la variabilité génétique observée pour les caractères phénologiques.

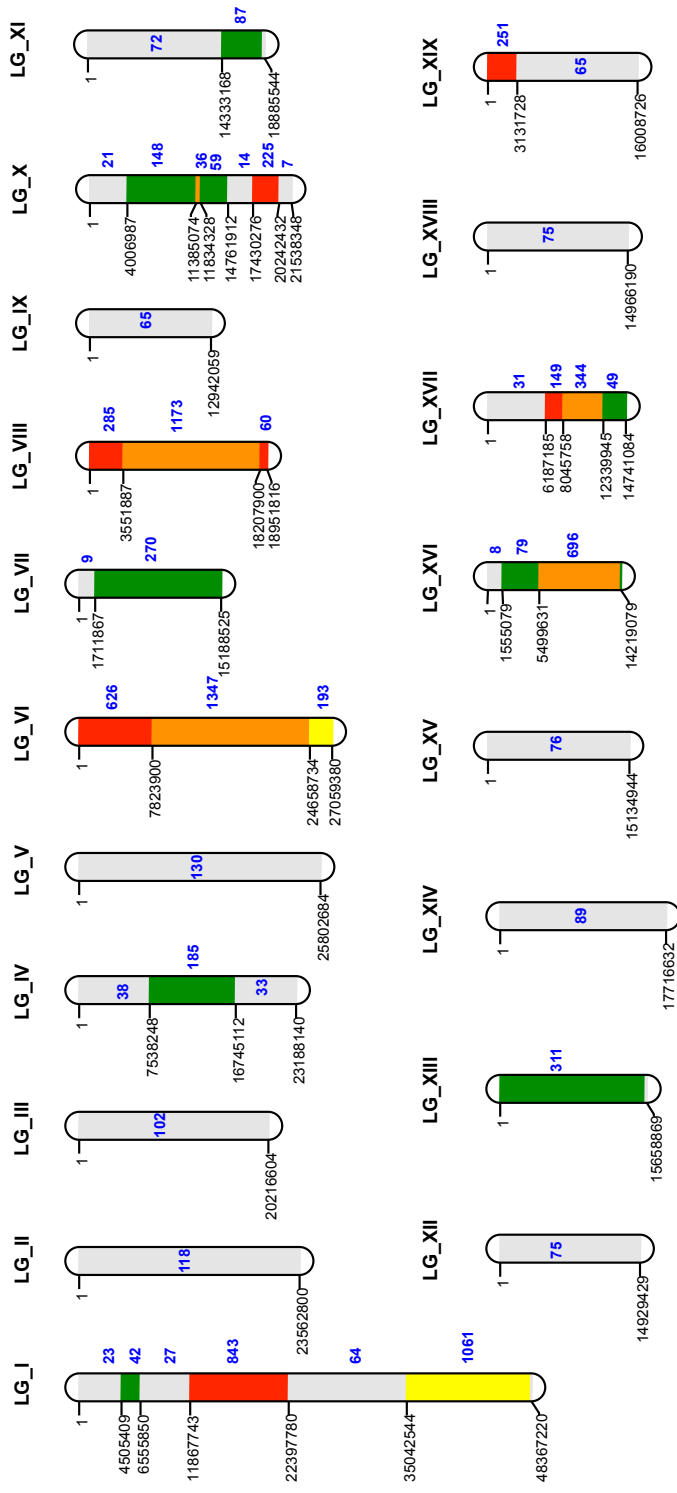


Figure P1. Distribution des 10 331 marqueurs SNP_s sur les 19 groupes de liaison du peuplier noir. Les marqueurs SNP_s sont distribués dans des régions non-candidates (1 SNP / 200 kb, en gris) ainsi que dans des régions candidates à faible (1 SNP / 50 kb, en vert) et forte (1 SNP / 12,5 kb, en jaune, rouge et orange) priorité. Les régions à forte priorité correspondent aux régions dans lesquelles des gènes candidats ont été identifiés pour les caractères d'intérêts. Les régions génomiques colorées en jaune correspondent aux régions à forte priorité définies dans le cadre du projet NovelTree ; les régions génomiques colorées en rouge correspondent aux régions à forte priorité définies dans le cadre du projet EnergyPoplar ; les régions colorées en orange correspondent aux régions à forte priorité communes aux deux projets. Le nombre de SNP_s sélectionnés dans chaque région pour chaque groupe de liaison est indiqué en bleu.

Chez différentes espèces forestières, le niveau de différenciation génétique des populations naturelles pour WUE, évaluée *via* $\Delta^{13}\text{C}$, a été montré comme étant modéré voire faible ($Q_{\text{ST}} < 0,30$) (Ramírez-Valiente et al., 2009; Keller et al., 2011; Lamy et al., 2011). Par ailleurs, ces études ont mis en évidence que les valeurs de Q_{ST} pour ce caractère fonctionnel étaient comparables à celles observées pour le F_{ST} , suggérant que la différenciation des populations pour WUE résulte essentiellement de l'action de la dérive génétique (Ramírez-Valiente et al., 2009; Keller et al., 2011; Lamy et al., 2011). Dans notre étude, les valeurs de Q_{ST} modérées pour $\Delta^{13}\text{C}$ étaient associées à des patrons de différenciation génétique variables en fonction des conditions de croissance (**Chapitre 2.2**). Nos résultats ne semblent donc pas vérifier l'hypothèse d'une différenciation génétique adaptative des métapopulations naturelles de peuplier noir pour WUE. La différenciation observée résulterait alors essentiellement de l'action de forces évolutives neutres, telles que la dérive génétique. Cette hypothèse peut être en partie corroborée par les regroupements particuliers de métapopulations pour $\Delta^{13}\text{C}$. En effet, les métapopulations proches géographiquement, telles que 'Nohèdes' et 'Adour' ou encore 'Loire' et 'ValAllier', présentaient des valeurs moyennes de $\Delta^{13}\text{C}$ comparables (**Chapitre 2.2**). Cependant, de façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence que trois métapopulations distribuées sur un gradient Nord-Sud dans la partie Est de l'aire échantillonnée (*i.e.*, 'Rhin', 'Dranse' et 'Ticino') étaient fortement différenciées des autres métapopulations étudiées alors qu'elles étaient faiblement différenciées entre elles et présentaient une forte efficacité d'utilisation de l'eau, quelles que soient les conditions de croissance (**Chapitre 2.2**). L'ensemble de ces résultats semble suggérer un phénomène d'adaptation locale plus marqué sur certaines métapopulations naturelles de peuplier noir.

Les différences observées entre caractères phénologiques et WUE, en termes de différenciation génétique des populations et de diversité des patrons de plasticité phénotypique, sont susceptibles de refléter des caractéristiques propres à chaque caractère mais peuvent également résulter de différences d'échelle de mesure et donc d'intégration entre ces caractères fonctionnels. En effet, la phénologie de croissance est mesurée à l'échelle de l'arbre alors que WUE a été appréciée à l'échelle foliaire, *via* $\Delta^{13}\text{C}$. Or, la réponse physiologique des individus face à des variations environnementales et la valeur sélective d'un individu se lisent à l'échelle de la plante entière et non pas à l'échelle de l'organe. L'interprétation des différences observées entre les caractères phénologiques et WUE est donc limitée par notre incapacité à déterminer dans quelle mesure la variabilité génétique et

la plasticité phénotypique observée pour $\Delta^{13}\text{C}$ reflètent les variations de WUE à l'échelle de la plante entière (également appelée efficacité de transpiration à l'échelle de la plante entière). Une étude réalisée chez des hybrides interspécifiques de peuplier a mis en évidence une relation linéaire et négative entre $\Delta^{13}\text{C}$ et l'efficacité de transpiration à l'échelle de la plante entière, indiquant que $\Delta^{13}\text{C}$ est un bon indicateur de l'efficacité de transpiration à l'échelle de la plante entière (Rasheed et al., 2013). Afin d'asseoir le choix de $\Delta^{13}\text{C}$ comme prédicteur indirect de l'efficacité d'utilisation de l'eau à l'échelle de la plante entière chez *P. nigra*, il serait donc nécessaire de mettre en évidence l'existence d'une relation entre ces deux caractères fonctionnels.

2. Maintien d'une diversité de combinaisons fonctionnelles au sein des métapopulations de peuplier noir

Outre la caractérisation de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique, nos travaux ont également permis de préciser les relations entre la phénologie de croissance et WUE au sein des métapopulations naturelles de peuplier noir (**Chapitre 2**). Quels que soient le fond génétique et les conditions de croissance, aucune relation n'a été détectée entre la date de débourrement et la date de formation du bourgeon terminal, indiquant l'existence d'une importante variabilité pour la longueur de la saison de végétation au sein des métapopulations de peuplier noir (**Chapitre 2.1**). De façon comparable, nous n'avons détecté aucune relation significative entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la date de débourrement, la date de formation du bourgeon terminal et la longueur de la saison de végétation (**Chapitre 2.2**). Les métapopulations de peuplier noir maintenaient donc une importante variabilité génétique mais également un certain niveau de variabilité de la plasticité phénotypique pour des caractères fonctionnels qui sont *a priori* indépendants, ce qui permet aux métapopulations de disposer de différents niveaux de réponse (plastique ou génétique) et de différentes formes de réponse (*i.e.*, phénologique ou en termes de gestion des flux d'eau et de carbone) pour faire face à des modifications des conditions environnementales.

Les relations entre la phénologie de croissance et WUE ont été peu étudiées au sein des populations naturelles forestières. Or, elles fournissent des informations quant aux stratégies en termes d'efficacité d'utilisation de la ressource en eau. L'étude réalisée par Aletà et al. (2009) au sein de provenances de noyer a mis en évidence une relation positive entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la date de débourrement ainsi que la date de sénescence foliaire. Ainsi, les

individus qui présentaient un débourrement ou une senescence foliaire précoce étaient les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau. Cependant, l'intensité de la relation entre ces caractères variait en fonction de l'année d'étude. Chez des hybrides interspécifiques de peuplier, Verlinden et al. (2015) ont mis en évidence une relation négative entre la longueur de la saison de végétation et $\Delta^{13}\text{C}$: les géotypes caractérisés par une saison de végétation longue étaient les plus efficaces pour l'utilisation de l'eau. L'absence de relation entre $\Delta^{13}\text{C}$ et les caractères phénologiques étudiés dans le cadre de la thèse suggère qu'une diversité de stratégie en termes d'efficacité d'utilisation de la ressource en eau existe au sein des populations naturelles de peuplier noir.

L'un des objectifs de la thèse visait également à évaluer les relations entre les caractères fonctionnels et les performances de croissance au sein des populations naturelles de peuplier noir. Cet objectif s'inscrit dans une problématique agronomique de valorisation des ressources génétiques du peuplier noir pour l'amélioration des hybrides de peuplier euraméricain. Pour la plupart des populations étudiées, nous avons détecté une relation positive modérée entre la longueur de la saison de végétation et les performances de croissance. De manière générale, cette relation était principalement expliquée par le fait que les géotypes qui étaient caractérisés par une saison de végétation courte présentaient les plus faibles performances de croissance. Ces résultats indiquent donc qu'une saison de végétation courte est un facteur limitant de la croissance mais qu'une longue saison de végétation ne se traduit pas nécessairement par de fortes performances de croissance ; dans ce cas, d'autres caractéristiques morphologiques, telles que la surface foliaire totale, ou fonctionnelles, telles que l'assimilation nette de CO_2 , déterminent probablement les performances de croissance. Deux études précédemment réalisées chez des hybrides interspécifiques de peuplier ont également mis en évidence que la longueur de la saison de végétation et les performances de croissance pouvaient être en partie découplées (Toillon et al., 2013; Verlinden et al., 2015).

Quels que soient le fond génétique et les conditions de croissance, les relations entre les descripteurs de croissance et $\Delta^{13}\text{C}$ étaient non-significatives ou modérées et négatives (**Chapitres 2.2 et 3**). Ces résultats semblent donc suggérer une absence de compromis entre les performances de croissance et WUE au sein des métapopulations de peuplier noir ce qui confirme les résultats précédemment obtenus chez *P. nigra* (Chamaillard et al., 2011) et chez de nombreux hybrides interspécifiques de peuplier (Rae et al., 2004; Monclus et al., 2005, 2006; Voltas et al., 2006; Bonhomme et al., 2008; Monclus et al., 2009; Fichot et al., 2010; Toillon et al., 2013; Verlinden et al., 2015).

3. Identification de prédicteurs indirects de caractères fonctionnels complexes chez *P. nigra*

Le dernier objectif de ce travail de thèse était d'évaluer dans quelle mesure la variabilité exprimée pour des caractères fonctionnels complexes, WUE et la résistance à la cavitation, pouvait être évaluée par des prédicteurs indirects. Cet objectif s'inscrit dans une logique d'amélioration des performances de phénotypage pour ces caractères afin d'étendre la lecture de la variabilité à différents fonds génétiques dans différentes conditions environnementales. Dans le cadre de la thèse, nous avons jugé de la pertinence de caractères en lien avec la structure des feuilles ou du xylème ainsi que de la spectroscopie infrarouge comme prédicteurs indirects de WUE et de la résistance à la cavitation chez *P. nigra*.

Les résultats obtenus dans le cadre de la thèse suggèrent l'existence, au niveau intra-population, d'une relation entre la résistance à la cavitation et les propriétés structurales du xylème en lien avec l'efficacité de conduction et le renforcement mécanique (**Chapitre 3**). Les géotypes les plus résistants présentaient alors une faible efficacité de conduction (estimée *via* le diamètre moyen des vaisseaux, la surface de xylème allouée à la conduction et la conductivité hydraulique spécifique théorique du xylème) et un fort degré de renforcement mécanique du xylème (estimé *via* l'épaisseur de la double paroi entre vaisseaux appariés, la résistance au collapsus pariétal et la densité du xylème). L'existence de relations structure-fonction pourrait permettre d'évaluer la variabilité exprimée pour la résistance à la cavitation chez *P. nigra* à partir de celle exprimée pour les propriétés structurales du xylème. Néanmoins, même si nos résultats suggèrent l'existence d'une relation, la stratégie expérimentale adoptée dans le cadre de la thèse n'a pas permis de juger de la force ni de la robustesse de cette relation dans différents fonds génétiques et conditions de croissance. Au sein du genre *Populus*, les résultats obtenus pour des espèces pures ou des hybrides interspécifiques ont mis en évidence que les relations entre la résistance à la cavitation et les propriétés structurales du xylème en lien avec l'efficacité de conduction et le renforcement mécanique variaient considérablement en fonction de l'échelle d'étude, des espèces considérées, des conditions de croissance et de l'échelle de mesure (voir Fichot et al., 2014 pour une revue). Seule l'épaisseur de la double paroi entre vaisseaux appariés (t_h) s'est avérée être fortement et positivement corrélée au niveau de résistance à la cavitation chez différents hybrides interspécifiques, les géotypes les plus résistants présentaient alors les plus fortes

valeurs de t_h (Awad et al., 2010; Fichot et al., 2010). Cette relation résulte vraisemblablement de la covariation entre l'épaisseur de la paroi et l'épaisseur de la membrane des ponctuations ; l'augmentation de l'épaisseur de la membrane avec l'épaisseur de la paroi des vaisseaux permet de diminuer le degré de porosité de la membrane et d'augmenter le niveau de résistance à la cavitation (Jansen et al., 2009). L'étude de cette relation nécessite d'être étendue à d'autres espèces du genre *Populus*, dans différents fonds génétiques et conditions de croissance, afin de juger de sa généralité et de sa robustesse au sein du genre *Populus* et de déterminer si la variable t_h peut être utilisée comme un prédicteur indirect du niveau de résistance à la cavitation chez le peuplier et notamment chez le peuplier noir. Toutefois, il convient de noter que l'utilisation de t_h en tant que prédicteur indirect de la résistance à la cavitation ne peut être envisagée, en l'état actuel, comme outil de phénotypage haut-débit. En effet, les valeurs de t_h ne sont obtenues qu'après avoir dénombré et déterminé le diamètre de l'ensemble des vaisseaux puisque les valeurs de t_h sont, par définition, calculées pour une population de vaisseaux dont le diamètre est proche du diamètre hydraulique.

La spectroscopie infrarouge est une technique de phénotypage haut-débit prometteuse qui a été utilisée chez de nombreuses espèces forestières pour prédire de façon indirecte et précise les propriétés chimiques et structurales des feuilles (*e.g.*, Gillon et al., 1999; Petisco et al., 2006; Rubert-Nason et al., 2013) et du bois (*e.g.*, Schimleck et al., 2003; Yeh et al., 2004; Poke and Raymond, 2006). Les travaux réalisés dans le cadre de la thèse ont permis de juger, pour la première fois au niveau intraspécifique, de la capacité de la spectroscopie infrarouge à évaluer de manière indirecte la variabilité phénotypique exprimée pour des caractères complexes, WUE et la résistance à la cavitation (**Chapitre 4**). Les modèles de calibration établis pour ces caractères fonctionnels présentaient une faible qualité de prédiction, suggérant que la spectroscopie infrarouge ne peut être utilisée que pour l'identification de génotypes extrêmes chez *P. nigra*. À ce jour, les travaux réalisés dans le cadre de la thèse n'ont donc pas permis d'identifier d'outils de prédiction indirecte et haut-débit de WUE et de la résistance à la cavitation chez *P. nigra*.

4. La résistance à la cavitation chez *P. nigra* : connaissances actuelles et perspectives d'étude

De manière générale, les espèces du genre *Populus* sont caractérisées par une grande sensibilité à la sécheresse qui se traduit notamment par une forte vulnérabilité à la cavitation

(Maherali et al., 2004; Fichot et al., 2014). Le peuplier noir ne déroge pas à la règle. En effet, nos résultats ont mis en évidence que la rupture hydraulique se produisait pour des valeurs de tension xylémienne inférieures à -3,0 MPa (**Chapitre 3**). Le peuplier noir, et de manière générale les espèces du genre *Populus*, pourraient donc s'avérer particulièrement vulnérables face à l'augmentation en fréquence et en intensité des événements climatiques extrêmes, de type canicule et sécheresse. Dans ce contexte de modifications climatiques, il paraît donc nécessaire de développer nos connaissances quant à la variabilité génétique exprimée pour la résistance à la cavitation au sein des populations naturelles de peuplier. À ce jour, ces études ont été restreintes à un faible nombre d'espèces ($n = 2$), à un faible nombre de populations pour chaque espèce ($n \leq 3$) et à un faible nombre de génotypes au sein des populations ($n \leq 5$) (Sparks and Black, 1999; Schreiber et al., 2011).

Nos résultats ont mis en évidence qu'une variabilité génétique significative était exprimée pour la résistance à la cavitation au niveau intra-population chez le peuplier noir (**Chapitre 3**). Par ailleurs, la variabilité génétique exprimée pour ce caractère était en partie découplée de celle observée pour la phénologie de croissance et WUE, suggérant qu'une diversité de combinaisons fonctionnelles était maintenue au niveau intra-population. Cependant, notre lecture de la variabilité génétique exprimée pour la résistance à la cavitation et l'étude de ses relations avec la phénologie de croissance et WUE ne restent que très partielles dans le sens où elles ont été limitées à l'étude d'une seule population de peuplier noir (*i.e.*, population de Loire 'Saint-Pryvé Saint-Mesmin') dans un seul site expérimental. Tenant compte des évolutions attendues du climat à l'échelle de l'aire de répartition naturelle du peuplier noir, les populations distribuées dans la zone méditerranéenne (*e.g.*, 'Basento', 'Paglia', Ramières') pourraient être particulièrement exposées à des contraintes thermiques et hydriques estivales. Dans ce contexte, il paraît nécessaire de développer nos connaissances quant au niveau de variabilité génétique et de plasticité phénotypique de la résistance à la cavitation en réponse à des contraintes thermiques et hydriques au sein de ces populations. Cependant, n'ayant pas identifié de méthode de phénotypage haut-débit de la résistance à la cavitation chez *P. nigra*, les capacités de phénotypage par la technique Cavitron restent limitées à un débit de 12-13 échantillons par jour par opérateur. En conséquence, cette perspective d'étendre la lecture de la variabilité génétique à de nouveaux fonds génétiques dans différentes conditions environnementales nécessiterait un temps d'analyse des échantillons et/ou des moyens humains importants et ne peut donc être envisagée qu'à long terme.

Avant d'explorer la variabilité génétique pour la résistance à la cavitation dans différents fonds génétiques chez *P. nigra*, il pourrait être intéressant d'évaluer comment la résistance à la cavitation varie au sein d'un même individu en fonction des organes considérés : pétiole, tige ou racine. L'hypothèse de segmentation de vulnérabilité a été énoncée pour la première fois par Zimmermann (1983) et suggérait que les pétioles seraient plus vulnérables à la cavitation que les tiges. Les feuilles correspondent aux zones de la plante où les tensions sont les plus fortes et ce sont elles qui seront exposées aux premiers événements de cavitation en situation de contrainte hydrique lorsque la tension seuil sera dépassée. À terme, ces événements de cavitation induisent la chute des feuilles et permettent une diminution des pertes en eau et donc une réduction des tensions s'exerçant sur les colonnes d'eau au sein de la plante. Sous cette hypothèse, les organes non-pérennes, en l'occurrence les feuilles, seraient donc sacrifiés au profit d'organes pérennes, la tige, qui représentent un investissement carboné important. Au sein du genre *Populus*, l'hypothèse de segmentation de la vulnérabilité n'a pas toujours été vérifiée. En effet, selon les espèces étudiées, certaines études ont mis en évidence que les pétioles présentaient un niveau de résistance à la cavitation supérieur à celui de la tige alors que d'autres ont obtenues des résultats inverses ; enfin, certaines études n'ont détecté aucune différence de résistance à la cavitation entre la tige et les pétioles (voir Fichot et al., 2014 pour une revue au sein du genre *Populus*). Des résultats variables ont également été observés entre espèces quant au niveau de résistance à la cavitation des racines par rapport aux autres organes (Fichot et al., 2014). À titre d'exemple, chez *P. balsamifera*, les racines étaient moins résistantes à la cavitation que la tige et les pétioles (Hacke and Sauter, 1996) alors que chez *P. euphratica*, les racines étaient plus résistantes que la tige et les feuilles (Hukin, 2005). À ce jour, aucune étude n'a évalué la variabilité de la résistance à la cavitation entre organes chez le peuplier noir.

Depuis quelques années, un nombre croissant d'études met en évidence que la rupture hydraulique induite par des sécheresses extrêmes est un facteur de dépérissement chez les arbres forestiers (Brodribb and Cochard, 2009; Brodribb et al., 2010; Choat et al., 2012; Urli et al., 2013) et notamment chez le peuplier (Anderegg et al., 2012; Barigah et al., 2013). Les expériences de sécheresse extrêmes mises en place par Barigah et al. (2013) à partir d'hybrides de peuplier euraméricain ont mis en évidence que le seuil létal de perte de conductivité hydraulique de la tige était proche de 90 %. Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence, qu'en conditions hydriques non-limitantes, un certain niveau de

variabilité génétique était exprimé pour la résistance à la cavitation au niveau intra-population chez *P. nigra*. La tension xylémienne induisant 50 % de perte de conductivité hydraulique variait dans une gamme de 0,50 MPa entre géotypes extrêmes au sein de la population étudiée. Cependant, il reste difficile d'interpréter cette amplitude de variation au niveau physiologique et de déterminer si elle a un sens en terme de survie à une contrainte hydrique. Ainsi, afin de déterminer si le niveau de résistance à la cavitation est un déterminant majeur de la survie chez le peuplier noir, il serait intéressant de déterminer si des géotypes qui présentent des niveaux contrastés de résistance intrinsèque en condition hydrique non-limitante présentent également un différentiel de survie en réponse à une sécheresse extrême.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~ A ~

- Abràmoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004.** Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**: 36-42.
- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S. 2008.** Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, **1**: 95-111.
- Al Afas N, Pellis A, Niinemets Ü, Ceulemans R. 2005.** Growth and production of a short rotation coppice culture of poplar. II. Clonal and year-to-year differences in leaf and petiole characteristics and stand leaf area index. *Biomass & Bioenergy*, **28**: 536-547.
- Alberto F, Bouffier L, Louvet JM, Lamy JB, Delzon S, Kremer A. 2011.** Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**: 1442-1454.
- Alberto FJ, Aitken SN, Alia R, et al. 2013a.** Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology*, **19**: 1645-1661.
- Alberto FJ, Derory J, Boury C, Frigerio J-M, Zimmermann NE, Kremer A. 2013b.** Imprints of natural selection along environmental gradients in phenology-related genes of *Quercus petraea*. *Genetics*, **195**: 495-512.
- 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. *Annals of Forest Science*, **66**: 413-424.
- Alleaume-Benharira M, Pen IR, Ronce O. 2006.** Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**: 203-215.
- Anderegg WRL, Berry JA, Smith DD, Sperry JS, Anderegg LDL, Field CB. 2012.** The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**: 233-237.
- Aranda I, Pardos M, Puértolas J, Jiménez MD, Pardos JA. 2007.** Water-use efficiency in cork oak (*Quercus suber*) is modified by the interaction of water and light availabilities. *Tree Physiology*, **27**: 671-677.
- Aranda I, Alía R, Ortega U, Dantas Â, 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 Genetics & Genomes*, **6**: 169-178.
- Arango-Velez A, Zwiazek JJ, Thomas BR, Tyree MT. 2011.** Stomatal factors and vulnerability of stem xylem to cavitation in poplars. *Physiologia Plantarum*, **143**: 154-165.
- Awad H, Barigah T, Badel E, Cochard H, Herbette S. 2010.** Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*, **139**:280-288.

~ B ~

- Balaguer L, Martínez-Ferri E, Valladares F, et al. 2001.** Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology*, **15**: 124-135.
- Barigah TS, Saugier B, Mousseau M, Guittet J, Ceulemans R. 1994.** Photosynthesis, leaf area and productivity of 5 poplar clones during their establishment year. *Annals of Forest Science*, **51**: 613-625.
- Barigah TS, Charrier O, Douris M, et al. 2013.** Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of Botany*, **112**: 1431-1437.
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willis KJ. 1991.** Quaternary refugia of North European trees. *Journal of Biogeography*, **18**: 103-115.
- Benomar L, DesRochers A, Larocque GR. 2011.** Changes in specific leaf area and photosynthetic nitrogen-use efficiency associated with physiological acclimation of two hybrid poplar clones to intraclonal competition. *Canadian Journal of Forest Research*, **41**: 1465-1476.
- Billington HL, Pelham J. 1991.** Genetic variation in the date of budburst in Scottish Birch populations: implications for climate change. *Functional Ecology*, **5**.
- Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, et al. 2006.** CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, **312**: 1040-1043.
- Bolster KL, Martin ME, Aber JD. 1996.** Determination of carbon fraction and nitrogen concentration in tree foliage by near infrared reflectances: a comparison of statistical methods. *Canadian Journal of Forest Research*, **26**: 590-600.
- Bongarten BC, Hanover JW. 1986.** Genetic parameters of blue spruce (*Picea pungens*) at two locations in Michigan. *Silvae Genetica*, **35**: 106-112.
- Bonhomme L, Barbaroux C, Monclus R, et al. 2008.** Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. *Annals of Forest Science*, **65**: 503-512.
- Bradshaw AD. 1965.** Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, **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 & Environment*, **25**: 945-953.
- Brendel O, Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Kremer A, Guehl J-M. 2007.** Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes*, **4**: 263-278.
- Bresson CC, Vitasse Y, Kremer A, Delzon S. 2011.** To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology*, **31**: 1164-1174.
- Bridle JR, Polechová J, Kawata M, Butlin RK. 2010.** Why is adaptation prevented at ecological margins? New insights from individual-based simulations. *Ecology Letters*, **13**: 485-494.
- Brodribb TJ, Cochard H. 2009.** Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology*, **149**: 575-584.
- Brodribb TJ, Bowman DJMS, Nichols S, Delzon S, Burlett R. 2010.** Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytologist*, **188**: 533-542.

- Brown JH. 1984.** On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist*, **124**: 255-279.
- Burns DA, Ciurczak EW. 2007.** *Handbook of near-infrared analysis, Third edition*: CRC Press.
- Bylesjö M, Segura V, Soolanayakanahally R, et al. 2008.** LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. *BMC Plant Biology*, **8**: 82-91.

~ C ~

- Cagelli L, Lefèvre F. 1995.** The conservation of *Populus nigra* L. and gene flow within cultivated poplars in Europe. *Forest Genetics*, **2**: 135-144.
- Callahan HS, Pigliucci M, Schlichting CD. 1997.** Developmental phenotypic plasticity: where ecology and evolution meet molecular biology. *BioEssays*, **19**: 519-525.
- Cao X, Jia JB, Li H, et al. 2012.** Photosynthesis, water use efficiency and stable carbon isotope composition are associated with anatomical properties of leaf and xylem in six poplar species. *Plant Biology*, **14**: 612-620.
- Card DH, Peterson DL, Matson PA, Aber JD. 1988.** Prediction of leaf chemistry by the use of visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Remote Sensing of Environment*, **26**: 123-147.
- Carlquist S. 1984.** Vessel grouping in Dicotyledon wood: significance and relationship to imperforate tracheary elements. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, **104**: 505-525.
- Carrion JS, Yll EI, Walker MJ, Legaz AJ, Cháin C, López A. 2003.** Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Global Ecology and Biogeography*, **12**: 119-129.
- Casoli M, Pot D, Plomion C, et al. 2004.** Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant, Cell & Environment*, **27**: 1088-1101.
- Casella E, Ceulemans R. 2002.** Spatial distribution of leaf morphological and physiological characteristics in relation to local radiation regime within the canopies of 3-year-old *Populus* clones in coppice culture. *Tree Physiology*, **22**: 1277-1288.
- Castellani E, Freccero V, Lapietra G. 1967.** Proposta di una scala di differenziazione delle gemme fogliari del pioppo utile per gli interventi antiparasitari. *Giornale botanico italiano*, **101**: 355-360.
- Chamaillard S, Fichot R, Vincent-Barbaroux C, et al. 2011.** Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three *Populus nigra* L. populations. *Tree Physiology*, **31**: 1076-1087.
- Cheddadi R, Vendramin GG, Litt T, et al. 2006.** Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. *Global Ecology and Biogeography*, **15**: 271-282.
- Chen J, Källman T, Ma X, et al. 2012.** Disentangling the roles of history and local selection in shaping clinal variation of allele frequencies and gene expression in Norway spruce (*Picea abies*). *Genetics*, **191**: 865-881.
- Chevin L-M, Lande R. 2010.** When do adaptive plasticity and genetic evolution prevent extinction of a density-regulated population? *Evolution*, **64**: 1143-1150.
- Choat B, Sack L, Holbrook NM. 2007.** Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytologist*, **175**: 686-698.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, et al. 2012.** Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature*, **491**: 752-755.

- Christman MA, Sperry JS, Adler FR. 2009.** Testing the ‘rare pit’ hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist*, **182**: 664-674.
- Chuine I, Cour P. 1999.** Climatic determinants of budburst seasonality in four temperate-zone tree species. *New Phytologist*, **143**: 339-349.
- Cleland EE, Chuine I, Menzel A, Mooney HA, Schwartz MD. 2007.** Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**: 357-365.
- Cochard H. 2002.** A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell & Environment*, **25**: 815-819.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T. 2005.** Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum*, **124**: 410-418.
- Cochard H, Casella E, Mencuccini M. 2007.** Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiology*, **27**: 1761-1767.
- Collingham YC, Huntley B. 2000.** Impacts of habitat fragmentation and patch size upon migration rates. *Ecological Applications*, **10**: 131-144.
- Cooke JEK, Martin TA, Davis JM. 2005.** Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist*, **167**: 41-52.
- Cooke JEK, Eriksson ME, Junttila O. 2012.** The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant, Cell & Environment*: 1707-1728.
- Corcuera L, Gil-Pelegrin E, Notivol E. 2010.** Phenotypic plasticity in *Pinus pinaster* $\delta^{13}\text{C}$: environment modulates genetic variation. *Annals of Forest Science*, **67**:812-823.
- Corcuera L, Cochard H, Gil-Pelegrin E, Notivol E. 2011.** Phenotypic plasticity in mesic populations of *Pinus pinaster* improves resistance to xylem embolism (P_{50}) under severe drought. *Trees*, **25**: 1033-1042.
- Cottrell JE, Krystufek V, Tabbener HE, et al. 2005.** Postglacial migration of *Populus nigra* L.: lessons learnt from chloroplast DNA. *Forest Ecology and Management*, **206**: 71-90.
- Craig H. 1957.** Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **12**: 133-149.
- Cregg BM, Olivas-García JM, Hennessey TC. 2000.** Provenance variation in carbon isotope discrimination of mature ponderosa pine trees at two locations in the Great Plains. *Canadian Journal of Forest Research*, **30**: 428-439.
- Curtis PS, Vogel CS, Pregitzer KS, Zak DR, Teeri JA. 1995.** Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO_2 on leaf area growth and carbon gain physiology in *Populus \times euramericana* (Dode) Guinier. *New Phytologist*, **129**: 253-263.

~ D ~

- Davis MB, Shaw RG. 2001.** Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. *Science*, **292**: 673-679.
- De Kroon H, Huber H, Stuefer JF, Van Groenendael JM. 2005.** A modular concept of phenotypic plasticity in plants: research review. *New Phytologist*, **166**: 73-82.
- de Miguel M, Sanchez-Gomez D, Cervera MT, Aranda I. 2011.** Functional and genetic characterization of gas exchange and intrinsic water use efficiency in a full-sib family of *Pinus pinaster* Ait. in response to drought. *Tree Physiology*, **32**: 94-103.

- DesRochers A, van den Driessche R, Thomas BR. 2006.** NPK fertilization at planting of three hybrid poplar clones in the boreal region of Alberta. *Forest Ecology and Management*, **232**: 216-225.
- Dickmann DI. 2006.** Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: then and now. *Biomass and Bioenergy*, **30**: 696-705.
- Dickmann DI, Kuzovkina J. 2008.** *Poplars and Willows in the world - Chapter 2 : Poplars and Willows of the world, with emphasis on silviculturally important species*. Rome, Italy: J.G. Isebrands and J. Richardson.
- Dickmann DI, Nguyen PV, Pregitzer KS. 1996.** Effects of irrigation and coppicing on above-ground growth, physiology, and fine-root dynamics of two field-grown hybrid poplar clones. *Forest Ecology and Management*, **80**: 163-174.
- Dillen SY, Marron N, Sabatti M, Ceulemans R, Bastien C. 2009.** Relationships among productivity determinants in two hybrid poplar families grown during three years at two contrasting sites. *Tree Physiology*, **29**: 975-987.
- Domec J-C, Gartner BL. 2001.** Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir. *Trees*, **15**: 204-214.
- 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 Physiology*, **28**: 689-701.
- Dunlap JM, Stettler RF, Heilman PE. 1995.** Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. VIII. Leaf and crown morphology of native *P. trichocarpa* clones from four river valleys in Washington. *Canadian Journal of Forest Research*, **25**: 1710-1724.
- Dunlap JM, Stettler RF. 1996.** Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. IX. Phenology and Melampsora rust incidence of native black cottonwood clones from four river valleys in Washington. *Forest Ecology and Management*, **87**: 233-256.
- Dynesius M, Nilsson C. 1994.** Fragmentation and flow regulation of river systems in the Northern third of the world. *Science*, **266**: 753-762.

~ E ~

- Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, Changnon SA, Karl TR, Mearns LO. 2000.** Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science*, **289**: 2068-2074.
- Edelaar P, Björklund M. 2011.** If F_{ST} does not measure neutral genetic differentiation, then comparing it with Q_{ST} is misleading. Or is it? *Molecular Ecology*, **20**: 1805-1812.
- Edelaar P, Burraco P, Gomez-Mestre I. 2011.** Comparisons between Q_{ST} and F_{ST} —how wrong have we been? *Molecular Ecology*, **20**: 4830-4839.
- Enquist BJ, West GB, Charnov EL, Brown JH. 1999.** Allometric scaling of production and life-history variation in vascular plants. *Nature*, **401**: 907-911.
- Etterson JR, Shaw RG. 2001.** Constraint to adaptive evolution in response to global warming. *Science*, **294**: 151-154.
- Evans LM, Slavov GT, Rodgers-Melnick E, et al. 2014.** Population genomics of *Populus trichocarpa* identifies signatures of selection and adaptive trait associations. *Nature Genetics*, **46**: 1089-1096.

~ F ~

- Fabbrini F, Gaudet M, Bastien C, et al. 2012.** Phenotypic plasticity, QTL mapping and genomic characterization of bud set in black poplar. *BMC Plant Biology*, **12**: 47-63.
- Farmer RE. 1993.** Latitudinal variation in height and phenology of balsam poplar. *Silvae Genetica*, **42**: 148-153.
- Farquhar GD, Richards RA. 1984.** Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, **11**: 539-552.
- Fichot R, Barigah TS, Chamaillard S, Le Thiec D, 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 & Environment*, **33**: 1553-1568.
- Fichot R, Chamaillard S, Depardieu C, et al. 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.
- Fichot R, Brignolas F, Cochard H, Ceulemans R. 2015.** Vulnerability to drought-induced cavitation in poplars: synthesis and future opportunities. *Plant, Cell & Environment*: In Press.
- Foley WJ, McIlwee A, Lawler I, Aragonés L, Woolnough AP, Berding N. 1998.** Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy – a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia*, **116**: 293-305.
- Foussadier R. 2003.** Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. In: Piégay H, Pautou G, Ruffinoni C, eds.: eds, Paris: Institut pour le Développement Forestier.
- Frewen BE, Chen THH, Howe GT, et al. 2000.** Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics*, **154**: 837-845.

~ G ~

- García-Ramos G, Kirkpatrick M. 1997.** Genetic models of adaptation and gene flow in peripheral populations. *Evolution*, **51**: 21-28.
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN. 2007.** Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, **21**: 394-407.
- GIEC. 2013.** Résumé à l'intention des décideurs. *Changements climatiques 2013 : Les éléments scientifiques. Contribution du Groupe de travail I au cinquième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat* Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni et New York (État de New York), États-Unis d'Amérique ed.
- Gierlinger N, Schwanninger M, Hinterstoisser B, Wimmer R. 2002.** Rapid determination of heartwood extractives in *Larix* sp. by means of Fourier transform near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **10**: 203-214.
- Gillon D, Houssard C, Joffre R. 1999.** Using near-infrared reflectance spectroscopy to predict carbon, nitrogen and phosphorus content in heterogeneous plant material. *Oecologia*, **118**: 173-182.

- Gorczyński W. 1920.** Sur le calcul du degré de continentalisme et son application dans la climatologie. *Geografiska Annaler*, **2**: 324-331.
- Gornall JL, Guy RD. 2007.** Geographic variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Canadian Journal of Botany*, **85**: 1202-1213.
- Grossnickle SC, Fan S, Russell JH. 2005.** Variation in gas exchange and water use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees*, **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 Physiology*, **14**: 707-724.
- Guehl J-M, 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 plants. *New Phytologist*, **131**: 149-157.
- Guy RD. 2014.** The early bud gets to warm. *New Phytologist*, **202**: 7-9.

~ H ~

- Hacke U, Sauter JJ. 1996.** Drought-induced xylem dysfunction in petioles, branches, and roots of *Populus balsamifera* L. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Physiology*, **111**: 413-417.
- Hacke UG, Sperry JS, Pittermann J. 2000.** Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah. *Basic and Applied Ecology*, **1**: 31-41.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA. 2001.** Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia*, **126**: 457-461.
- Hall D, Luquez V, Garcia VM, St Onge KR, Jansson S, Ingvarsson PK. 2007.** Adaptive population differentiation in phenology across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula* L.): A comparison of neutral markers, candidate genes and phenotypic traits. *Evolution*, **61**: 2849-2860.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. 1992.** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In: Adams WT, Strauss SH, Copes DL, Griffin AR, eds. *Population Genetics of Forest Trees*: Springer Netherlands.
- Harvey HP, van den Driessche R. 1997.** Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiology*, **17**: 647-654.
- Harvey HP, van den Driessche R. 1999.** Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiology*, **19**: 943-950.
- Hein PRG, Campos ACM, Trugilho PF, Lima JT, Chaix G. 2009.** Near-infrared spectroscopy for estimating wood basic density in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis*. *Revista cerne*, **15**: 133-141.
- Hoffmeyer P, Pedersen JG. 1995.** Evaluation of density and strength of Norway spruce wood by near infrared reflectance spectroscopy. *Holz als Roh- und Werkstoff*, **53**: 165-170.
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC, Chen THH. 2003.** From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Canadian Journal of Botany*, **81**: 1247-1266.
- Hukin D. 2005.** Cavitation vulnerability in roots and shoots: does *Populus euphratica* Oliv., a poplar from arid areas of Central Asia, differ from other poplar species? *Journal of Experimental Botany*, **56**: 2003-2010.

~ I ~

- Ibrahim L. 1997.** Main effects of nitrogen supply and drought stress upon whole-plant carbon allocation in poplar. *Canadian Journal of Forest Research*, **27**: 1413-1419.
- Imbert E, Lefèvre F. 2003.** Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal of Ecology*, **91**: 447-456.
- Ingvarsson PK, García MV, Hall D, Luquez V, Jansson S. 2006.** Clinal variation in phyB2, a candidate gene for day-length-induced growth cessation and bud set, across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula*). *Genetics*, **172**: 1845-1853.
- Isebrands JG, Nelson ND. 1982.** Crown architecture of short-rotation, intensively cultured *Populus* II. Branch morphology and distribution of leaves within the crown of *Populus* 'Tristis' as related to biomass production. *Canadian Journal of Forest Research*, **12**: 853-864.

~ J ~

- Jacob D, Petersen J, Eggert B, et al. 2014.** EURO-CORDEX: new high-resolution climate change projections for European impact research. *Regional Environmental Change*, **14**: 563-578.
- Jacobsen AL, Pratt RB, Ewers FW, Davis SD. 2007.** Cavitation resistance among 26 chaparral species of Southern California. *Ecological Monographs*, **77**: 99-115.
- Jacobsen AL, Esler KJ, Pratt RB, Ewers FW. 2009.** Water stress tolerance of shrubs in Mediterranean-type climate regions: Convergence of fynbos and succulent karoo communities with California shrub communities. *American Journal of Botany*, **96**: 1445-1453.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A. 2009.** Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany*, **96**: 409-419.
- Jaramillo-Correa JP, Beaulieu J, Bousquet J. 2001.** Contrasting evolutionary forces driving population structure at expressed sequence tag polymorphisms, allozymes and quantitative traits in white spruce. *Molecular Ecology*, **10**: 2729-2740.
- Johnsen KH, Flanagan LB, Huber DA, Major JE. 1999.** Genetic variation in growth, carbon isotope discrimination, and foliar N concentration in *Picea mariana*: analyses from a half-diallel mating design using field-grown trees. *Canadian Journal of Forest Research*, **29**: 1727-1735.
- Jones PD, Schimleck LR, Peter GF, Daniels RF, Clark Iii A. 2005.** Nondestructive estimation of *Pinus taeda* L. wood properties for samples from a wide range of sites in Georgia. *Canadian Journal of Forest Research*, **35**: 85-92.
- Jump AS, Marchant R, Peñuelas J. 2009.** Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends in Plant Science*, **14**: 51-58.

~ K ~

- Kanaga MK, Ryel RJ, Mock KE, Pfrender ME. 2008.** Quantitative-genetic variation in morphological and physiological traits within a quaking aspen (*Populus tremuloides*) population. *Canadian Journal of Forest Research*, **38**: 1690-1694.

- Karrenberg S, Edwards PJ, Kollmann J. 2002.** The life history of *Salicaceae* living in the active zone of floodplains. *Freshwater Biology*, **47**: 733-748.
- Kavanagh KL, Bond BJ, Aitken SN, Gartner BL, Knowe S. 1999.** Shoot and root vulnerability to xylem cavitation in four populations of Douglas-fir seedlings. *Tree Physiology*, **19**: 31-37.
- Kawecki TJ, Ebert D. 2004.** Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, **7**: 1225-1241.
- Keller SR, Soolanayakanahally RY, Guy RD, Silim SN, Olson MS, Tiffin P. 2011.** Climate-driven local adaptation of ecophysiology and phenology in balsam poplar, *Populus balsamifera* L. (*Salicaceae*). *American Journal of Botany*, **98**: 99-108.
- Kelley SS, Rials TG, Snell R, Groom LH, Sluiter A. 2004.** Use of near infrared spectroscopy to measure the chemical and mechanical properties of solid wood. *Wood Science and Technology*, **38**: 257-276.
- Kennard RW, Stone LA. 1969.** Computer aided design of experiments. *Technometrics*, **11**: 137-148.
- Kramer K. 1995.** Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant, Cell & Environment*, **18**: 93-104.
- Kremer A. 1994.** Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genetics Selection Evolution*, **26**: S105-S123.
- Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, et al. 2012.** Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology Letters*, **15**: 378-392.

~ L ~

- Lamy J-B, Bouffier L, Burlett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S. 2011.** Uniform selection as a primary force reducing population genetic differentiation of cavitation resistance across a species range. *PLoS ONE*, **6**: e23476.
- Lamy J-B, Lagane F, Plomion C, Cochard H, Delzon S. 2012.** Micro-evolutionary patterns of juvenile wood density in a pine species. *Plant Ecology*, **213**: 1781-1792.
- Lamy J-B, Delzon S, Bouche PS, et al. 2014.** Limited genetic variability and phenotypic plasticity detected for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytologist*, **201**: 874-886.
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL. 1987.** Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, **22**: 371-377.
- Langlet O. 1971.** Two hundred years of genecology. *Taxon*, **20**: 653-721.
- Larocque GR. 1999.** Performance and morphological response of the hybrid poplar DN-74 (*Populus deltoides* × *nigra*) under different spacings on a 4-year rotation. *Annals of Forest Science*, **56**: 275-287.
- 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. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**: 1286-1296.
- Lauteri M, Scartazza A, Guido MC, Brugnoli E. 1997.** Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology*, **11**: 675-683.
- Lefèvre F, Barsoum N, Heinze B, et al. 2001.** *EUFORGEN Technical Bulletin: In Situ Conservation of Populus nigra*. Rome, Italy.

- Leinonen T, McCairns RJS, O'Hara RB, Merilä J. 2013.** Q_{ST} - F_{ST} comparisons: evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, **14**: 179-190.
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S. 2011.** Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist*, **190**: 709-723.
- Li H, Liang Y, Xu Q, Cao D. 2009.** Key wavelengths screening using competitive adaptive reweighted sampling method for multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, **648**: 77-84.
- Li P, Beaulieu J, Corriveau A, Boursquet J. 1993.** Genetic variation in juvenile growth and phenology in a white spruce provenance-progeny test. *Silvae Genetica*, **42**: 52-60.
- Li P, Beaulieu J, Boursquet J. 1997a.** Genetic structure and patterns of genetic variation among populations in eastern white spruce (*Picea glauca*). *Canadian Journal of Forest Research*, **27**: 189-198.
- Li P, Beaulieu J, Daoust G, Plourde A. 1997b.** Patterns of adaptive genetic variation in eastern white pine (*Pinus strobus*) from Quebec. *Canadian Journal of Forest Research*, **29**: 199-206.
- Liu Z, Dickmann DI. 1992.** Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. I. Morphology and growth. *Canadian Journal of Botany*, **70**: 2265-2270.
- Loepfe L, Martinez-Vilalta J, Piñol J, Mencuccini M. 2007.** The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology*, **247**: 788-803.
- Lönn M, Prentice HC. 2002.** Gene diversity and demographic turnover in central and peripheral populations of the perennial herb *Gypsophila fastigiata*. *Oikos*, **99**: 489-498.
- López R, Heredia ULd, Collada C, et al. 2013.** Vulnerability to cavitation, hydraulic efficiency, growth and survival in an insular pine (*Pinus canariensis*). *Annals of Botany*, **111**: 1167-1179.
- Luquez V, Hall D, Albrechtsen B, Karlsson J, Ingvarsson P, Jansson S. 2008.** Natural phenological variation in aspen (*Populus tremula*): the SwAsp collection. *Tree Genetics and Genomes*, **4**: 279-292.
- Luterbacher J, Dietrich D, Xoplaki E, Grosjean M, Wanner H. 2004.** European seasonal and annual temperature variability, trends, and extremes since 1500. *Science*, **303**: 1499-1503.

~ M ~

- Macaya-Sanz D, Heuertz M, López-de-Heredia U, et al. 2012.** The Atlantic-Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars: genetic structure in Iberian poplars. *Molecular Ecology*, **21**: 3593-3609.
- Magri D. 2008.** Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *Journal of Biogeography*, **35**: 450-463.
- Maherali H, DeLucia EH. 2000.** Xylem conductivity and vulnerability to cavitation of ponderosa pine growing in contrasting climates. *Tree Physiology*, **20**: 859-867.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB. 2004.** Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology*, **85**: 2184-2199.

- Marguerit E, Bouffier L, Chancerel E, et al. 2014.** The genetics of water-use efficiency and its relation to growth in maritime pine. *Journal of Experimental Botany*, **65**: 4757-4768.
- Markesteijn L, Poorter L, Paz H, Sack L, Bongers F. 2011.** Ecological differentiation in xylem cavitation resistance is associated with stem and leaf structural traits. *Plant, Cell & Environment*, **34**: 137-148.
- Marron N, Dreyer E, Boudouresque E, et al. 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 Physiology*, **23**: 1225-1235.
- Marron N, Villar M, Dreyer E, et al. 2005.** Diversity of leaf traits related to productivity in 31 *Populus deltoides* × *Populus nigra* clones. *Tree Physiology*, **25**: 425-435.
- Marron N, Ceulemans R. 2006.** Genetic variation of leaf traits related to productivity in a *Populus deltoides* × *Populus nigra* family. *Canadian Journal of Forest Research*, **36**: 390-400.
- Marron N, Dillen SY, Ceulemans R. 2007.** Evaluation of leaf traits for indirect selection of high yielding poplar hybrids. *Environmental and Experimental Botany*, **61**: 103-116.
- Marron N, Brignolas F, Delmotte F, Dreyer E. 2008.** Modulation of leaf physiology by age and response to abiotic constraints in young cuttings of two *Populus deltoides* × *P. nigra* genotypes. *Annals of Forest Science*. 65 : 404-412.
- Marron N, Storme V, Dillen SY, et al. 2010.** Genomic regions involved in productivity of two interspecific poplar families in Europe. 2. Biomass production and its relationships with tree architecture and phenology. *Tree Genetics and Genomes*, **6**: 533-554.
- Martínez-Vilalta J, Cochard H, Mencuccini M, et al. 2009.** Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytologist*, **184**: 353-364.
- McIlwee AM, Lawler IR, Cork SJ, Foley WJ. 2001.** Coping with chemical complexity in mammal-plant interactions: near-infrared spectroscopy as a predictor of *Eucalyptus* foliar nutrients and of the feeding rates of folivorous marsupials. *Oecologia*, **128**: 539-548.
- McKown AD, Guy RD, Klápště J, et al. 2014a.** Geographical and environmental gradients shape phenotypic trait variation and genetic structure in *Populus trichocarpa*. *New Phytologist*, **201**: 1263-1276.
- McKown AD, Klápště J, Guy RD, et al. 2014b.** Genome-wide association implicates numerous genes underlying ecological trait variation in natural populations of *Populus trichocarpa*. *New Phytologist*, **203**: 535-553.
- Menzel A, Fabian P. 1999.** Growing season extended in Europe. *Nature*, **397**: 659-659.
- Menzel A, Sparks TH, Estrella N, et al. 2006.** European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology*, **12**: 1969-1976.
- Merilä J, Crnokrak P. 2001.** Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**: 892-903.
- Mimura M, Aitken SN. 2007.** Adaptive gradients and isolation-by-distance with postglacial migration in *Picea sitchensis*. *Heredity*, **99**: 224-232.
- Monclus R, Dreyer E, Delmotte FM, et al. 2005.** Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytologist*, **167**: 53-62.
- Monclus R, Dreyer E, Villar M, et al. 2006.** Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytologist*, **169**: 765-777.

- Monclus R, Villar M, Barbaroux C, et al. 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 Physiology*, **29**: 1329-1339.
- Monclus R, Leplé J-C, Bastien C, et al. 2012.** Integrating genome annotation and QTL position to identify candidate genes for productivity, architecture and water-use efficiency in *Populus* spp. *BMC Plant Biology*, **12**: 173-188.
- Morgenstern EK. 1969.** Genetic variation in seedlings of *Picea mariana* (Mill.) BSP. II. Variation patterns. *Silvae Genetica*, **18**: 161-167.
- Morgenstern M. 1996.** *Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture*: UBC Press.
- Muir W, Nyquist WE, Xu S. 1992.** Alternative partitioning of the genotype-by-environment interaction. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**: 193-200.

~ N ~

- Naiman RJ, Décamps H, McClain ME. 2005.** *Riparia: ecology, conservation, and management of streamside communities*: Academic Press.
- Nei M. 1987.** *Molecular evolutionary genetics*: Columbia University Press.
- Niinemets Ü, Sack L. 2006.** Structural determinants of leaf light harvesting capacity and photosynthetic potentials. *Progress in Botany*, **67**: 385-418.
- Nilsson C, Reidy CA, Dynesius M, Revenga C. 2005.** Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems. *Science*, **308**: 405-408.
- Notivol E, García-Gil MR, Alía R, Savolainen O. 2007.** Genetic variation of growth rhythm traits in the limits of a latitudinal cline in Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research*, **37**: 540-551.

~ O ~

- Ozaki Y, McClure WF, Christy AA. 2006.** *Near-infrared spectroscopy in food science and technology*: John Wiley & Sons.

~ P ~

- Pammenter NW, Willigen CVD. 1998.** A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology*, **18**: 589-593.
- Parmesan C. 2006.** Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**: 637-669.
- Pellis A, Laureysens I, Ceulemans R. 2004.** Genetic variation of the bud and leaf phenology of seventeen poplar clones in a short rotation coppice culture. *Plant Biology*, **6**: 38-46.
- Petisco C, García-Criado B, Aldana BRVd, Zabalgoceazcoa I, Mediavilla S, García-Ciudad A. 2005.** Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**: 458-465.
- Petisco C, García-Criado B, Mediavilla S, Aldana BRVD, Zabalgoceazcoa I, García-Ciudad A. 2006.** Near-infrared reflectance spectroscopy as a fast and non-destructive

- tool to predict foliar organic constituents of several woody species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**: 1823-1833.
- Petit RJ, Aguinalde I, Beaulieu J-Ld, et al. 2003.** Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**: 1563-1565.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, et al. 2002.** Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, **156**: 49-74.
- Petit RJ, Hampe A. 2006.** Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **37**: 187-214.
- Petit RJ, Hu FS, Dick CW. 2008.** Forests of the past: a window to future changes. *Science*, **320**: 1450-1452.
- Pockman WT, Sperry JS. 2000.** Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran Desert vegetation. *American Journal of Botany*, **87**: 1287-1299.
- Poke FS, Raymond CA. 2006.** Predicting extractives, lignin, and cellulose contents using near infrared spectroscopy on solid wood in *Eucalyptus globulus*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **26**: 187-199.
- Pratt RB, Jacobsen AL, Ewers FW, Davis SD. 2007.** Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine *Rhamnaceae* species of the California chaparral. *New Phytologist*, **174**: 787-798.

~ R ~

- R Development Core Team. 2011.** R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- R Development Core Team. 2012.** R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Rae AM, Robinson KM, Street NR, Taylor G. 2004.** Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. *Canadian Journal of Forest Research*, **34**: 1488-1498.
- Rae AM, Street NR, Robinson KM, Harris N, Taylor G. 2009.** Five QTL hotspots for yield in short rotation coppice bioenergy poplar: the poplar biomass loci. *BMC Plant Biology*, **9**: 23.
- Ramírez-Valiente JA, Lorenzo Z, Soto A, Valladares F, Gil L, Aranda I. 2009.** Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance. *Molecular Ecology*, **18**: 3803-3815.
- Ramírez-Valiente JA, Sánchez-Gómez D, Aranda I, Valladares F. 2010.** Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiology*, **30**: 618-627.
- Rasheed F, Dreyer E, Richard B, Brignolas F, Montpied P, Le Thiec D. 2013.** Genotype differences in ¹³C discrimination between atmosphere and leaf matter match differences in transpiration efficiency at leaf and whole-plant levels in hybrid *Populus deltoides* × *nigra*. *Plant, Cell & Environment*, **36**: 87-102.
- Rathmacher G, Niggemann M, Köhnen 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. *Conservation Genetics*, **11**: 1327-1338.
- Rehfeldt GE. 1983.** Genetic variability within Douglas-fir populations: implications for tree improvement. *Silvae Genetica*, **32**: 9-14.

- Rehfeldt GE, Ying CC, Spittlehouse DL, Hamilton DA. 1999.** Genetic responses to climate in *Pinus contorta*: niche breadth, climate change, and reforestation. *Ecological Monographs*, **69**: 375-407.
- Rehfeldt GE, Tchebakova NM, Parfenova YI, Wykoff WR, Kuzmina NA, Milyutin LI. 2002.** Intraspecific responses to climate in *Pinus sylvestris*. *Global Change Biology*, **8**: 912-929.
- Reich G. 2005.** Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 1109-1143.
- Richardson AD, Reeves III JB. 2005.** Quantitative reflectance spectroscopy as an alternative to traditional wet lab analysis of foliar chemistry: near-infrared and mid-infrared calibrations compared. *Canadian Journal of Forest Research*, **35**: 1122-1130.
- Ridge CR, Hinckley TM, Stettler RF, Volkenburgh EV. 1986.** Leaf growth characteristics of fast-growing poplar hybrids *Populus trichocarpa* × *P. deltoides*. *Tree Physiology*, **1**: 209-216.
- Ripullone F, Lauteri M, Grassi G, Amato M, Borghetti M. 2004.** Variation in nitrogen supply changes water-use efficiency of *Pseudotsuga menziesii* and *Populus* × *euroamericana*; a comparison of three approaches to determine water-use efficiency. *Tree Physiology*, **24**: 671-679.
- Ritland K. 2000.** Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, **9**: 1195-1204.
- Rodrigues S, Bréhéret JG, Macaire JJ, 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, Bastien C, Boerjan W. 2011a.** Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiology*, **31**: 472-482.
- Rohde A, Storme V, Jorge V, et al. 2011b.** Bud set in poplar – genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytologist*, **189**: 106-121.
- Rönnerberg-Wästljung AC, Glynn C, Weih M. 2005.** QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* × *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**: 537-549.
- Rotach P. 2004.** Poplars and biodiversity. In: J. Koskela SMGdV, D. Kajba and G. von Wühlisch, ed. *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 ed. Rome, Italy.
- Roussel M, Thiec D, Montpied P, Ningre N, Guehl J-M, Brendel O. 2009.** Diversity of water use efficiency among *Quercus robur* genotypes: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest Science*, **66**: 408-408.
- Rubert-Nason KF, Holeski LM, Couture JJ, Gusse A, Undersander DJ, Lindroth RL. 2013.** Rapid phytochemical analysis of birch (*Betula*) and poplar (*Populus*) foliage by near-infrared reflectance spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**: 1333-1344.
- Ruffinoni C, Tremolières M, Zanchez-Perez JM. 2003.** Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. In: Piégay H, Pautou G, Ruffinoni C, eds.: Eds, Paris: Institut pour le Développement Forestier.

- Sack L, Cowan PD, Jaikumar N, Holbrook NM. 2003.** The ‘hydrology’ of leaves: coordination of structure and function in temperate woody species. *Plant, Cell & Environment*, **26**: 1343-1356.
- Santiago LS, Goldstein G, Meinzer FC, et al. 2004.** Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia*, **140**: 543-550.
- Savitzky A, Golay MJE. 1964.** Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, **36**: 1627-1639.
- Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knürr T. 2007.** Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **38**: 595-619.
- Schär C, Vidale PL, Lüthi D, et al. 2004.** The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature*, **427**: 332-336.
- Schimleck LR, Mora C, Daniels RF. 2003.** Estimation of the physical wood properties of green *Pinus taeda* radial samples by near infrared spectroscopy. *Canadian Journal of Forest Research*, **33**: 2297-2305.
- Schlichting CD, Pigliucci M. 1998.** Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. 387 pp.
- Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S. 2013a.** How to quantify conduits in wood? *Frontiers in Plant Science*, **4**:1-11.
- Scholz A, Rabaey D, Stein A, Cochard H, Smets E, Jansen S. 2013b.** The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree Physiology*, **33**: 684-694.
- Schreiber SG, Hacke UG, Hamann A, Thomas BR. 2011.** Genetic variation of hydraulic and wood anatomical traits in hybrid poplar and trembling aspen. *New Phytologist*, **190**: 150-160.
- Schwartz MW. 1993.** Modelling effects of habitat fragmentation on the ability of trees to respond to climatic warming. *Biodiversity & Conservation*, **2**: 51-61.
- Smulders MJM, Beringen R, Volosyanchuk R, et al. 2008a.** Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. x canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine river in the Netherlands. *Tree Genetics & Genomes*, **4**: 663-675.
- Smulders MJM, Cottrell JE, Lefèvre F, et al. 2008b.** Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: consequences for conservation and restoration. *Forest Ecology and Management*, **255**: 1388-1399.
- 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 & Environment*, **32**: 1821-1832.
- Soolanayakanahally RY, Guy RD, Silim SN, Song M. 2012.** Timing of photoperiodic competency causes phenological mismatch in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Plant, Cell & Environment*, **36**:116-127.
- Sparks JP, Black RA. 1999.** Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiology*, **19**: 453-459.
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT. 1988.** A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell & Environment*, **11**: 35-40.
- Sperry JS, Nichols KL, Sullivan JEM, Eastlack SE. 1994.** Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of Northern Utah and Interior Alaska. *Ecology*, **75**:1736-1752.

- Sperry JS, Tyree MT. 1988.** Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology*, **88**: 581-587.
- Spitze K. 1993.** Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, **135**: 367-374.
- St Clair JB, Mandel NL, Vance-Borland KW. 2005.** Genecology of Douglas Fir in Western Oregon and Washington. *Annals of Botany*, **96**: 1199-1214.
- Sterck FJ, Martínez-Vilalta J, Mencuccini M, et al. 2012.** Understanding trait interactions and their impacts on growth in Scots pine branches across Europe: functional branch trait coordination. *Functional Ecology*, **26**: 541-549.
- Storme V, Broeck A, Ivens B, et al. 2004.** *Ex-situ* conservation of black poplar in Europe: genetic diversity in nine gene bank collections and their value for nature development. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**: 969-981.

~ T ~

- Tanino K, Kalsits L, Silim S, Kendall E, Gray G. 2010.** Temperature-driven plasticity in growth cessation and dormancy development in deciduous woody plants: a working hypothesis suggesting how molecular and cellular function is affected by temperature during dormancy induction. *Plant Molecular Biology*, **73**: 49-65.
- Thomas BR, Macdonald SE, Dancik BP. 1997.** Variance components, heritabilities and gain estimates for growth chamber and field performance of *Populus tremuloides*: growth parameters. *Silvae Genetica*, **46**: 317-326.
- Toillon J, Fichot R, Dallé E, Berthelot A, Brignolas F, Marron N. 2013.** Planting density affects growth and water-use efficiency depending on site in *Populus deltoides* × *P. nigra*. *Forest Ecology and Management*, **304**: 345-354.
- Tschaplinski TJ, Blake TJ. 1989.** Photosynthetic reinvigoration of leaves following shoot decapitation and accelerated growth of coppice shoots. *Physiologia Plantarum*, **75**: 157-165.
- Tschaplinski TJ, Blake TJ. 1995.** Growth and carbohydrate status of coppice shoots of hybrid poplar following shoot pruning. *Tree Physiology*, **15**: 333-338.
- Turok J, Lefèvre F, Cagelli L, de Vries S. 1996.** *Populus nigra* network: Report of the 2nd meeting, 10-12 September 1995, Casale Monferrato, Italy.
- Tyree MT, Sperry JS. 1989.** Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**: 19-36.
- Tyree MT, Ewers FW. 1991.** The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist*, **119**: 345-360.
- Tyree MT, Davis SD, Cochard H. 1994a.** Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal*, **15**: 335-360.
- Tyree MT, Kolb KJ, Rood SB, Patiño S. 1994b.** Vulnerability to drought-induced cavitation of riparian cottonwoods in Alberta: a possible factor in the decline of the ecosystem? *Tree Physiology*, **14**: 455-466.

~ U ~

- Urli M, Porte AJ, Cochard H, Guengant Y, Burlett R, Delzon S. 2013.** Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree Physiology*, **33**: 672-683.

~ V ~

- Valladares F, Sanchez-Gomez D, Zavala MA. 2006.** Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, **94**: 1103-1116.
- van Dam BC, Bordács S. 2002.** EUROPOP: "Genetic diversity in river populations of European black poplar for evaluation of biodiversity, conservation strategies, nature development and genetic improvement"; first synthesis of the project. B.C. van Dam & S. Bordács (eds.).
- Vanden Broeck A, Storme V, Cottrell JE, et al. 2004.** Gene flow between cultivated poplars and native black poplar (*Populus nigra* L.): a case study along the river Meuse on the Dutch–Belgian border. *Forest Ecology and Management*, **197**: 307-310.
- Verlinden MS, Fichot R, Broeckx LS, Vanholme B, Boerjan W, Ceulemans R. 2015.** Carbon isotope compositions ($\delta^{13}\text{C}$) of leaf, wood and holocellulose differ among genotypes of poplar and between previous land uses in a short-rotation biomass plantation: $\delta^{13}\text{C}$ of leaf, wood and holocellulose in poplar. *Plant, Cell & Environment*, **38**: 144-156.
- Villar M, Forestier O. 2009.** Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? *Revue Forestière Française*, **61**: 457-466.
- Violle C, Navas M-L, Vile D, et al. 2007.** Let the concept of trait be functional! *Oikos*, **116**: 882-892.
- Visscher PM, Hill WG, Wray NR. 2008.** Heritability in the genomics era — concepts and misconceptions. *Nature Reviews Genetics*, **9**: 255-266.
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A. 2009a.** Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, **39**: 1259-1269.
- Vitasse Y, Delzon S, Dufrêne E, et al. 2009b.** Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: do within-species populations exhibit similar responses? *Agricultural and Forest Meteorology*, **149**: 735-744.
- Vitasse Y, Bresson CC, Kremer A, Michalet R, Delzon S. 2010.** Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, **24**: 1211-1218.
- Vitasse Y, Lenz A, Kollas C, Randin CF, Hoch G, Körner C. 2014.** Genetic vs. non-genetic responses of leaf morphology and growth to elevation in temperate tree species. *Functional Ecology*, **28**: 243-252.
- Voltas J, Serrano L, Hernandez M, Peman Js. 2006.** Carbon isotope discrimination, gas exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering regimes. *New Forests*, **31**: 435-451.

~ W ~

- Weber JC, Stettler RF, Heilman PE. 1985.** Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. I. Morphology and phenology of 50 native clones. *Canadian Journal of Forest Research*, **15**: 376-383.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N. 2005.** Inter-vessel pitting and cavitation in woody *Rosaceae* and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell & Environment*, **28**: 800-812.

- Whiteley RE, Black-Samuelsson S, Jansson G. 2003.** Within and between population variation in adaptive traits in *Ulmus laevis*, the European white elm. *Forest Genetics*, **10**:309-319.
- Whitlock MC. 2011.** G'_{ST} and D do not replace F_{ST} . *Molecular Ecology*, **20**: 1083-1091.
- Wikberg J, Ögren E. 2004.** Interrelationships between water use and growth traits in biomass-producing willows. *Trees*, **18**: 70-76.
- Worrall J. 1983.** Temperature - bud-burst relationships in amabilis and subalpine fir provenance tests replicated at different elevations. *Silvae Genetica*, **32**: 203-209.
- Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, et al. 2011.** Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree Physiology*, **31**: 1175-1182.
- Wright S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**: 323-354.

~ 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 & Environment*, **31**: 850-860.

~ Y ~

- Yeh T-F, Chang H-m, Kadla JF. 2004.** Rapid prediction of solid wood lignin content using transmittance near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 1435-1439.

~ Z ~

- Zhang J, Marshall JD, Jaquish BC. 1993.** Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. *Oecologia*, **93**: 80-87.
- Zhang J, Fins L, Marshall JD. 1994.** Stable carbon isotope discrimination, photosynthetic gas exchange, and growth differences among western larch families. *Tree Physiology*, **14**: 531-539.
- 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 Sciences*, **166**: 791-797.
- Zimmermann MH. 1983.** *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer Verlag, Berlin, Germany.

***VALORISATION DES TRAVAUX
SCIENTIFIQUES***

VALORISATION DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS SOUMISES DANS DES REVUES INTERNATIONALES À COMITÉ DE LECTURE SCIENTIFIQUE

J. GUET, R. FICHOT, C. LÉDÉE, F. LAURANS, S. DELZON, H. COCHARD, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS (2015) Stem xylem resistance to cavitation is related to xylem structure but not to growth and water-use efficiency at the within-population level in *Populus nigra* L. *Journal of Experimental Botany*, *In Press*.

J. GUET, F. FABBRINI, R. FICHOT, M. SABATTI, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS. Genetic variation for leaf morphology, leaf structure and leaf carbon isotope discrimination in European populations of black poplar (*Populus nigra* L.). *Tree Physiology* (accepté).

ARTICLES EN PRÉPARATION

F. FABBRINI, **J. GUET**, M. SABATTI, A. ROHDE, G. SCARASCIA-MUGNOZZA, A. HARFOUCHE, F. BRIGNOLAS & C. BASTIEN. Genetic characterization of phenology and growth in a *Populus nigra* European association population grown in different environments.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES COLLOQUES INTERNATIONAUX

(le nom de l'auteur ayant présenté les travaux est souligné)

J. GUET, F. FABBRINI, M. SABATTI, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS (2014) Phenotypic plasticity and genetic differentiation for morphological and structural leaf traits in nine metapopulations of black poplar (*Populus nigra* L.). *Sixth International Poplar Symposium*, July 20th-23rd 2014, Vancouver, Canada.

V. SEGURA, JP. CHARPENTIER, K. ADER, R. ELMALKI, **J. GUET**, V. JORGE, P. POURSAT, JC. BASTIEN & C. BASTIEN (2014) The concept of phenomic selection: using Near InfraRed Spectroscopy (NIRS) to predict quantitative phenotypes. *Sixth International Poplar Symposium*, July 20th-23rd 2014, Vancouver, Canada.

V. SEGURA, JP. CHARPENTIER, K. ADER, R. ELMALKI, **J. GUET**, V. JORGE, P. POURSAT, JC. BASTIEN & C. BASTIEN (2013) Using Near Infrared Spectroscopy to explore geographical patterns of genetic diversity and predict quantitative phenotypes: application to natural populations of black poplar (*Populus nigra*). *IUFRO International Conference on Tree Biotechnologies*, May 26th to June 1st 2013, Ashville, USA.

M. SABATTI, F. FABBRINI, M. GAUDET, C. BASTIEN, **J. GUET**, G. ZAINA, A. HARFOUCHE, I. BERITOGNOLO, V. JORGE, N. MARRON, M. MORGANTE & G. SCARASCIA-MUGNOZZA (2012) QTL mapping and genomic characterization of phenology in black poplar. *Final Conference NovelTree Project*, October 16th-18th 2012, Helsinki, Finlande.

COMMUNICATIONS ORALES DANS DES COLLOQUES NATIONAUX

(le nom de l'auteur ayant présenté les travaux est souligné)

J. GUET, F. FABBRINI, M. SABATTI, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS (2013) Effet de la fertilité du sol sur l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.). 26^{ème} Colloque Biotechnocentre, 10 et 11 octobre 2013, Seillac, France.

J. GUET, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS (2013) Expression d'une variabilité génétique pour la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.). *Séminaire des doctorants du département INRA-EFPA*, 14 au 16 janvier 2013, Dourdan, France.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

F. FABBRINI, **J. GUET**, M. SABATTI, A. ROHDE, G. SCARASCIA-MUGNOZZA, A. HARFOUCHE, F. BRIGNOLAS, C. BASTIEN (2014) Genetic characterization of phenology and growth in a *Populus nigra* European association population grown in different environments. *Sixth International Poplar Symposium*, July 20th-23rd 2014, Vancouver, Canada.

J. GUET, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS (2012) Structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.). 25^{ème} Colloque Biotechnocentre, 11 et 12 octobre 2012, Seillac, France.

J. GUET, C. BASTIEN & F. BRIGNOLAS (2011) Structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.). 24^{ème} Colloque Biotechnocentre, 13 et 14 octobre 2011, Seillac, France.

Justine GUET

Expression d'une variabilité génétique pour la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation au sein de populations naturelles de peuplier noir (*Populus nigra* L.)

Cette thèse visait à développer nos connaissances quant au contrôle génétique et environnemental et la structuration géographique de la variabilité phénotypique pour des caractères fonctionnels chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.). Trois caractères fonctionnels ont été étudiés : la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation. La variabilité phénotypique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE a été évaluée au sein d'une collection européenne de peuplier noir regroupant 1085 génotypes échantillonnés dans 13 métapopulations et installés en test clonal en pépinière dans deux sites expérimentaux. Nos résultats ont révélé une importante variabilité génétique ainsi qu'une importante plasticité phénotypique des caractères phénologiques et de WUE au sein des métapopulations. Une différenciation génétique modérée à forte des métapopulations a été observée pour la phénologie de croissance et WUE. Les différences entre métapopulations se structuraient selon des patrons plus ou moins complexes, qui semblaient refléter, pour la phénologie de croissance, une adaptation locale des métapopulations aux conditions de photopériode et de température. Tenant compte des capacités de phénotypage limitées pour la résistance à la cavitation, la variabilité génétique exprimée pour ce caractère a été évaluée au sein d'une population naturelle de peuplier noir regroupant 33 génotypes et installée en test clonal en pépinière dans un site expérimental. Nous avons détecté une variation significative du niveau de résistance à la cavitation entre génotypes. De manière générale, aucune relation phénotypique significative n'a été détectée entre la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation au niveau intra-population, suggérant le maintien d'une diversité de combinaisons fonctionnelles. Le développement d'une puce à 10 331 marqueurs SNP_s distribués à l'échelle du génome de *P. nigra*, notamment dans des régions candidates pour la phénologie de croissance, devrait permettre, à court terme, de confirmer l'adaptation locale des populations de peuplier noir et d'explorer ses bases génétiques.

Mots clés : adaptation locale, discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, efficacité d'utilisation de l'eau, phénologie de croissance, plasticité phénotypique, populations naturelles, peuplier noir, résistance à la cavitation, structuration géographique, variabilité génétique.

Expression of genetic variation for bud phenology, water-use efficiency and xylem resistance to drought-induced cavitation in natural populations of black poplar (*Populus nigra* L.)

This work aimed at improving our understanding of the genetic and environmental control as well as the geographic structure of phenotypic variation for functional traits in black poplar (*Populus nigra* L.). Three functional traits were studied: bud phenology, water-use efficiency (WUE) and xylem resistance to drought-induced cavitation. The phenotypic variation expressed for bud phenology and WUE was evaluated in a European *P. nigra* collection composed of 1085 cloned individuals sampled in 13 natural metapopulations and established in clonal test in nursery at two experimental sites. Substantial genetic variation and substantial phenotypic plasticity for bud phenology and WUE were observed within all metapopulations. Moderate to strong genetic differentiation of metapopulations was evidenced for phenological traits and WUE. Patterns of genetic differentiation were more or less complex depending on traits and seemed to reflect, for phenological traits, local adaptation of metapopulations to photoperiod and temperature. Taking into account the limited phenotyping capacity for xylem resistance to cavitation, genetic variation expressed for this trait was evaluated within one single natural population of black poplar composed of 33 genotypes which were established in clonal test in nursery at one experimental site. Significant variations were observed between genotypes for the degree of cavitation resistance. Overall, no significant relationship was detected between bud phenology, WUE and cavitation resistance at the within-population level, indicating the maintenance of a diversity of functional combinations. The development of an array covering 10 331 SNP_s distributed across the *P. nigra* genome, notably in candidate regions for bud phenology, will enable in the short-term to confirm local adaptation of *P. nigra* populations and to identify its genetic basis.

Key words: black poplar, bud phenology, carbon isotope discrimination, genetic variation, geographical structure, local adaptation, natural populations, phenotypic plasticity, water-use efficiency, xylem resistance to drought-induced cavitation.



Université Orléans, INRA 1207, Laboratoire de Biologie des
Ligneux et des Grandes Cultures

INRA, UR 0588 'Amélioration, Génétique et Physiologie
Forestières', centre de recherche Val de Loire



Justine GUET

Expression d'une variabilité génétique pour la phénologie de croissance, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la résistance à la cavitation au sein de populations naturelles de peuplier noir (*Populus nigra* L.)

Cette thèse visait à développer nos connaissances quant au contrôle génétique et environnemental et la structuration géographique de la variabilité phénotypique pour des caractères fonctionnels chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.). Trois caractères fonctionnels ont été étudiés : la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation. La variabilité phénotypique exprimée pour la phénologie de croissance et WUE a été évaluée au sein d'une collection européenne de peuplier noir regroupant 1085 génotypes échantillonnés dans 13 métapopulations et installés en test clonal en pépinière dans deux sites expérimentaux. Nos résultats ont révélé une importante variabilité génétique ainsi qu'une importante plasticité phénotypique des caractères phénologiques et de WUE au sein des métapopulations. Une différenciation génétique modérée à forte des métapopulations a été observée pour la phénologie de croissance et WUE. Les différences entre métapopulations se structuraient selon des patrons plus ou moins complexes, qui semblaient refléter, pour la phénologie de croissance, une adaptation locale des métapopulations aux conditions de photopériode et de température. Tenant compte des capacités de phénotypage limitées pour la résistance à la cavitation, la variabilité génétique exprimée pour ce caractère a été évaluée au sein d'une population naturelle de peuplier noir regroupant 33 génotypes et installée en test clonal en pépinière dans un site expérimental. Nous avons détecté une variation significative du niveau de résistance à la cavitation entre génotypes. De manière générale, aucune relation phénotypique significative n'a été détectée entre la phénologie de croissance, WUE et la résistance à la cavitation au niveau intra-population, suggérant le maintien d'une diversité de combinaisons fonctionnelles. Le développement d'une puce à 10 331 marqueurs SNP_s distribués à l'échelle du génome de *P. nigra*, notamment dans des régions candidates pour la phénologie de croissance, devrait permettre, à court terme, de confirmer l'adaptation locale des populations de peuplier noir et d'explorer ses bases génétiques.

Mots clés : adaptation locale, discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, efficacité d'utilisation de l'eau, phénologie de croissance, plasticité phénotypique, populations naturelles, peuplier noir, résistance à la cavitation, structuration géographique, variabilité génétique.

Expression of genetic variation for bud phenology, water-use efficiency and xylem resistance to drought-induced cavitation in natural populations of black poplar (*Populus nigra* L.)

This work aimed at improving our understanding of the genetic and environmental control as well as the geographic structure of phenotypic variation for functional traits in black poplar (*Populus nigra* L.). Three functional traits were studied: bud phenology, water-use efficiency (WUE) and xylem resistance to drought-induced cavitation. The phenotypic variation expressed for bud phenology and WUE was evaluated in a European *P. nigra* collection composed of 1085 cloned individuals sampled in 13 natural metapopulations and established in clonal test in nursery at two experimental sites. Substantial genetic variation and substantial phenotypic plasticity for bud phenology and WUE were observed within all metapopulations. Moderate to strong genetic differentiation of metapopulations was evidenced for phenological traits and WUE. Patterns of genetic differentiation were more or less complex depending on traits and seemed to reflect, for phenological traits, local adaptation of metapopulations to photoperiod and temperature. Taking into account the limited phenotyping capacity for xylem resistance to cavitation, genetic variation expressed for this trait was evaluated within one single natural population of black poplar composed of 33 genotypes which were established in clonal test in nursery at one experimental site. Significant variations were observed between genotypes for the degree of cavitation resistance. Overall, no significant relationship was detected between bud phenology, WUE and cavitation resistance at the within-population level, indicating the maintenance of a diversity of functional combinations. The development of an array covering 10 331 SNP_s distributed across the *P. nigra* genome, notably in candidate regions for bud phenology, will enable in the short-term to confirm local adaptation of *P. nigra* populations and to identify its genetic basis.

Key words: black poplar, bud phenology, carbon isotope discrimination, genetic variation, geographical structure, local adaptation, natural populations, phenotypic plasticity, water-use efficiency, xylem resistance to drought-induced cavitation.



Université Orléans, INRA 1207, Laboratoire de Biologie des
Ligneux et des Grandes Cultures

INRA, UR 0588 'Amélioration, Génétique et Physiologie
Forestières', centre de recherche Val de Loire

