



Faculté des
Sciences
Université d'Orléans

LBLGC
Laboratoire de Biologie des Ligneux
et des Grandes Cultures
UPRES EA 1207

ARCHE
Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales

INRA

UAGPF
INRA Centre d'Orléans

Master 2 Ecosystèmes Terrestres (2010-2011)

Structuration géographique de la variabilité génétique de la phénologie de croissance et de l'efficience d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.)

JUSTINE GUET ^{1, 2, 3}, CATHERINE BASTIEN ³ et FRANCK BRIGNOLAS ^{1, 2}

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

² INRA, USC1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), F-45067 Orléans, France

³ INRA, UR 588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF), centre de recherche d'Orléans, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans Cedex 2, France

Résumé Dans un contexte de modifications climatiques, il convient d'intégrer, dans les programmes de conservation des ressources génétiques du peuplier noir, l'étude de caractères fonctionnels, tels que l'efficience d'utilisation de l'eau et la phénologie de croissance, afin d'évaluer les possibilités de réponse de l'espèce face aux modifications climatiques. Les objectifs de l'étude étaient d'évaluer la variabilité génétique, et sa structuration géographique, pour la phénologie de croissance, l'efficience d'utilisation de l'eau, et leurs relations, au sein d'une collection de 15 populations naturelles de peupliers noirs âgés de deux ans et installés en test clonal à Orléans. Nous avons donc étudié des descripteurs de phénologie végétative, débourrement et arrêt de croissance, et des variables écophysiologiques incluant la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 (Δ). Pour tous les traits, une variabilité génétique significative a été observée dans toutes les populations. Pour l'arrêt de croissance, les populations se différenciaient selon un gradient latitudinal suggérant des adaptations locales à la photopériode et la température. Pour le débourrement et Δ , le patron de différenciation génétique des populations est plus complexe. Aucune relation phénotypique significative n'a été observée entre phénologie de croissance et WUE. Ces résultats suggèrent l'existence d'une bonne capacité d'adaptation des populations de peuplier noir à long terme.

Mots-clés : *Populus nigra*, diversité génétique, discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, débourrement végétatif, arrêt de croissance



Faculté des
Sciences
Université d'Orléans

LBLGC
Laboratoire de Biologie des Ligneux
et des Grandes Cultures
UPRES EA 1207

ARCHE
Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales

INRA

UAGPF
INRA Centre d'Orléans

Master 2 Ecosystèmes Terrestres (2010-2011)

Structuration géographique de la variabilité génétique de la phénologie de croissance et de l'efficience d'utilisation de l'eau chez le peuplier noir (*Populus nigra* L.)

JUSTINE GUET ^{1, 2,3}, CATHERINE BASTIEN ³ et FRANCK BRIGNOLAS ^{1, 2}

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

² INRA, USC1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), F-45067 Orléans, France

³ INRA, UR 588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF), centre de recherche d'Orléans, CS 40001 Ardon, F-45075 Orléans Cedex 2, France

Résumé Dans un contexte de modifications climatiques, il convient d'intégrer, dans les programmes de conservation des ressources génétiques du peuplier noir, l'étude de caractères fonctionnels, tels que l'efficience d'utilisation de l'eau et la phénologie de croissance, afin d'évaluer les possibilités de réponse de l'espèce face aux modifications climatiques. Les objectifs de l'étude étaient d'évaluer la variabilité génétique, et sa structuration géographique, pour la phénologie de croissance, l'efficience d'utilisation de l'eau, et leurs relations, au sein d'une collection de 15 populations naturelles de peupliers noirs âgés de deux ans et installés en test clonal à Orléans. Nous avons donc étudié des descripteurs de phénologie végétative, débourrement et arrêt de croissance, et des variables écophysiologiques incluant la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 (Δ). Pour tous les traits, une variabilité génétique significative a été observée dans toutes les populations. Pour l'arrêt de croissance, les populations se différenciaient selon un gradient latitudinal suggérant des adaptations locales à la photopériode et la température. Pour le débourrement et Δ , le patron de différenciation génétique des populations est plus complexe. Aucune relation phénotypique significative n'a été observée entre phénologie de croissance et WUE. Ces résultats suggèrent l'existence d'une bonne capacité d'adaptation des populations de peuplier noir à long terme.

Mots-clés : *Populus nigra*, diversité génétique, discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13, débourrement végétatif, arrêt de croissance.

ABSTRACT

In the framework of climate modifications, more focus on functional traits such as water use efficiency (WUE) and growth phenology is needed in the conservation programs of *Populus nigra* genetic resources. The objectives of this study were to estimate amount and structuration of genetic variability for growth phenology, water use efficiency and their relations in a large European collection of natural populations of *P. nigra* established in a two years old field experiment at Orléans. Both phenology traits, bud burst and bud set, and leaf traits including carbon isotope discrimination (Δ) have been studied. Significant genetic variation was found for all traits and within all populations. Bud set showed strong clinal variation with latitude suggesting an adaptative response to local photoperiod and temperature. Geographical pattern of genetic variation expressed for bud burst and Δ seems complex. No relationship was found between growth phenology and water use efficiency. These results suggest a high adaptative potential for *P. nigra* populations.

Key words: *Populus nigra*, *genetic variation*, *carbon isotope discrimination*, *budflush*, *budset*.

1. INTRODUCTION

Membre de la famille des Salicacées et du genre *Populus*, le peuplier noir (*Populus nigra* L.) est l'essence dominante des ripisylves. Son aire de répartition est très vaste, elle s'étend de l'Europe de l'Ouest jusqu'à l'extrême Ouest de la Chine en passant par une étroite frange nord-africaine (EUFORGEN 2009). Il colonise les sédiments alluviaux et contribue à la formation des forêts alluviales où il sera représenté soit par des individus âgés, souvent isolés, soit par des cohortes d'âges différents. Au sein des forêts alluviales, le peuplier noir est le support d'une diversité faunistique remarquable (Rotach 2004) et assure, grâce à son système racinaire, la fixation des sédiments limitant ainsi l'érosion des berges (Ruffinoni et al. 2003).

Le peuplier noir est reconnu comme l'une des espèces forestières dont la diversité génétique est la plus menacée en Europe de par : (i) la réduction et l'altération de son habitat résultant de perturbations anthropiques, (ii) le risque de pollution génétique de ses peuplements naturels par la variété ornementale *P. nigra* 'italica' et par les hybrides interspécifiques cultivés (Vanden Broeck et al. 2005). 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 et européenne (Villar et Forestier 2009). Ces programmes reposent sur l'inventaire de la diversité génétique au sein des populations naturelles et sur la mise en évidence d'une structuration géographique et écologique de cette diversité. La diversité génétique de l'espèce est donc évaluée simultanément pour des marqueurs moléculaires neutres vis-à-vis de la sélection naturelle, pour retracer l'histoire évolutive des populations, et pour des caractères morphologiques et fonctionnels pour identifier de possibles adaptations locales des populations soumises à des pressions de sélection naturelle.

Les modifications climatiques enregistrées dans les régions tempérées peuvent représenter une menace supplémentaire quant à l'établissement et la survie des populations de peuplier noir. L'aptitude de l'espèce à répondre à des modifications de la durée de la saison de végétation et à une augmentation en fréquence des étés plus secs et plus chauds dépendra alors de la plasticité phénotypique des individus et de la capacité d'adaptation génétique des populations. Dans ce contexte, deux caractères fonctionnels peuvent nous permettre de prédire si l'espèce sera capable de faire face à de telles modifications : (i) l'efficience d'utilisation de l'eau (WUE), définie comme le rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau consommée dans le même laps de temps, (ii) la phénologie de croissance principalement définie par les dates de débourrement et d'arrêt de croissance et par la cinétique de croissance. Evaluer la variabilité génétique disponible pour ces deux caractères, et leur plasticité phénotypique, et mettre en évidence une structuration géographique de cette variabilité peut nous permettre d'évaluer le potentiel d'adaptation des populations de peuplier noir face aux modifications climatiques.

Fondamentalement, WUE peut être estimée au niveau foliaire soit directement par l'efficience intrinsèque (WUE_i), définie comme le rapport entre assimilation nette de CO_2 (A) et conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), soit indirectement *via* la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 de la matière organique foliaire (Δ) (Farquhar et al. 1982). Δ permet d'évaluer WUE sur le pas de temps de développement de la feuille avec une relation linéaire et négative entre Δ et WUE_i (Farquhar et Richards 1984). Récemment, une expression importante de la variabilité génétique de Δ a été mise en évidence au sein de trois populations françaises de peuplier noir ; cette étude a également révélé des différences significatives entre populations (Chamaillard et al. 2011, soumis). Une importante variabilité génétique pour Δ , accompagnée d'une différenciation des populations en fonction de gradients thermiques ou hydriques, ont également été mises en évidence chez d'autres espèces du genre *Populus*, telles

que *P. angustifolia* James (Sparks et Ehleringer 1997), *P. fremontii* S. Wats. (Sparks et Ehleringer 1997, Leffler et Evans 2001), *P. davidiana* Dode (Zhang et al. 2004) et *P. balsamifera* L. (Soolanayakanahally et al. 2009), suggérant l'existence, au sein de ce genre, d'une capacité d'adaptation des populations aux pressions environnementales locales.

Les dates de débourrement et d'arrêt de croissance, ainsi que la cinétique de croissance, sont des paramètres essentiels qui conditionnent la durée de la saison de végétation chez une plante ainsi que la production de biomasse aérienne, facteur essentiel de compétitivité en milieu naturel. Récemment, l'expression de la variabilité génétique de la date d'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal a été étudiée au sein d'une large collection européenne de populations naturelles de peuplier noir (Rohde et al. 2010). Cette étude a permis de révéler une différenciation latitudinale des populations : les populations les plus nordiques arrêtaient alors leur croissance plus tôt que les populations méridionales suggérant une adaptation aux conditions locales de photopériode et de température. Des gradients environnementaux comparables ont également été mis en évidence pour le débourrement et/ou l'arrêt de croissance chez *P. tremula* L. (Luquez et al. 2008), *P. trichocarpa* Torr. & Gray (Dunlap et Stettler 1996) et *P. tremuloides* Michx. (Li et al. 2010).

Ainsi, l'ensemble des données disponibles sur WUE, estimée *via* Δ , et sur la phénologie de croissance, estimée à l'aide des dates de débourrement et d'arrêt de croissance, semblent donc indiquer qu'une variabilité génétique, et une structuration géographique de cette variabilité, existent pour ces caractères au sein du genre *Populus*. Toutefois, les études visant à évaluer le niveau de variabilité génétique disponible au sein d'un grand nombre de populations naturelles, réparties sur des bassins hydrographiques différents, restent rares. Enfin, à ce jour, aucun des travaux réalisés sur le peuplier noir n'a cherché à étudier les relations entre phénologie de croissance et WUE. Dans un contexte de changements climatiques, mettre en évidence de telles relations au sein des populations de peuplier noir peut donc nous permettre d'apprécier les réponses simultanées possibles face aux contraintes environnementales.

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés et vise à approfondir les connaissances en terme de diversité génétique adaptative des populations de peuplier noir. Les objectifs spécifiques de cette étude étaient : (i) d'étudier, au sein de populations naturelles de peuplier noir, la variabilité génétique exprimée pour WUE, pour la phénologie de croissance et pour la production de biomasse aérienne, (ii) d'analyser la structuration géographique de cette variabilité afin de mettre en évidence de possibles adaptations locales des populations,

(iii) d'étudier la nature des relations entre WUE, phénologie de croissance et production de biomasse aérienne.

Les observations ont été réalisées, pour une année de croissance réalisée en conditions non limitantes en eau, sur des plants de peuplier noir âgés de deux ans et installés en dispositif expérimental à l'INRA d'Orléans. Les plants étudiés appartiennent à 32 populations naturelles européennes de peuplier noir représentatives de bassins hydrographiques différents. Cette collection a été constituée dans le cadre du projet européen NovelTree (2008-2012) avec pour objectifs contractuels d'évaluer la variabilité génétique naturelle pour la tolérance à la rouille foliaire et pour la phénologie de croissance et d'associer cette variabilité au niveau de polymorphisme moléculaire de plusieurs gènes candidats.

2. MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel végétal et dispositif expérimental

Trente deux populations naturelles ont été échantillonnées dans des forêts alluviales aux Pays-Bas, en Allemagne, en France et en Italie (Tableau I). Des boutures ont été collectées sur 1098 arbres échantillonnes dans les 32 populations. Les populations présentant des caractéristiques différentes, l'échantillonnage a été réalisé de manière à disposer, si possible, d'un effectif d'au moins 30 individus représentatifs de la variabilité phénotypique observée tous critères confondus. Les populations présentant un effectif inférieur à 30 individus, et étant suffisamment proches pour faire l'objet de flux de gènes, ont été regroupées en métapopulations. 15 métapopulations ont ainsi été constituées à partir des 32 populations initiales. Après collecte des boutures, un génotypage réalisé à l'aide de dix marqueurs microsatellites a permis de confirmer que l'ensemble des boutures collectées appartiennent à des individus génotypiquement différents. Un second génotypage réalisé à partir de 48 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism), spécifiques à *P.deltoïdes* et *P.nigra*, a permis de tester la présence d'éventuels hybrides interspécifiques au sein des populations naturelles de peuplier noir. Seulement deux hybrides interspécifiques ont été identifiés et retirés de la collection.

Tableau I. Localisation géographique des 32 populations naturelles de peuplier noir et nombre de génotypes étudiés par population.

Pays	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Population	Bassin hydrographique	Métapopulation	Nombre de génotypes étudiés pour la phénologie de croissance et la production de biomasse aérienne	Nombre de génotype étudiés pour l'efficience d'utilisation de l'eau et les autres traits foliaires
Italie	40°38' N	15°56' E	286	Basento	Basento	Basento	30	-
Italie	42°52' N	11°45' E	358	Paglia	Pô	Paglia	48	26
Italie	44°23' N	6°56' E	1699	Stura	Stura	Stura	25	-
Italie	45°12' N	9°04'E	65	Ticino-South (RN)	Ticino	Ticino-South	60	31
Italie	45°16' N	8°59' E	98	Ticino-North (RN)	Ticino	Ticino-North	43	32
France	42°37' N	2°17' E	820	Nohedes (RN)	Nohedes	Nohedes	43	29
France	43°13' N	0°04'E	310	Tarbes	Adour	Adour	5	-
France	42°53' N	0°06' W	902	Cauterets	Adour	Adour	10	5
France	43°05' N	0°02' W	375	Lourdes	Adour	Adour	4	4
France	43°12' N	0°15' W	238	Baudreix	Adour	Adour	7	6
France	43°13' N	0°18' W	216	Baliros	Adour	Adour	1	-
France	43°14' N	0°18' W	210	Assat	Adour	Adour	9	9
France	43°23' N	0°56' W	52	Sauveterre	Adour	Adour	15	7
France	43°09' N	0°54' W	135	Gave-Mauleon	Adour	Adour	12	-
France	43°51' N	4°59' E	60	Durance	Durance	Durance	15	-
France	44°41' N	5°24' E	470	Drome1 (RN)	Drôme	Ramieres	58	25
France	44°44' N	4°55' E	145	Ramieres (RN)	Drôme	Ramieres	67	-
France	44°45' N	4°55' E	145	Drome6 (RN)	Drôme	Ramieres	59	20
France	46°23'N	6°30' E	374	Dranse (RN)	Dranse	Dranse	40	32
France	46°24' N	3°19' E	220	ValAllier (RN)	Allier	ValAllier	150	31
France	47°13' N	2°59' E	154	ValdeLoire (RN)	Loire	Loire	52	-
France	47°34' N	00249E	135	Bonny	Loire	Loire	40	-
France	47°48' N	2°18' E	112	LoireEast	Loire	Loire	31	-
France	47°48' N	2°17' E	100	Guilly	Loire	Loire	38	-
France	47°51' N	1°48' E	90	StPryve (RN)	Loire	Loire	35	28
France	47°28' N	0°33' W	15	LoireWest	Loire	Loire	22	-
France	48°16' N	7°41' E	160	Rhinau (RN)	Rhin	Rhin	21	16
France	48°18' N	7°43' E	155	Taubergiessen	Rhin	Rhin	6	-
France	48°25' N	7°43' E	150	Erstein (RN)	Rhin	Rhin	16	8
France	48°37' N	7°49' E	135	Strasbourg (RN)	Rhin	Rhin	23	8
Allemagne	49°49' N	8°30' E	88	Kuhkopf	Rhin	Kuhkopf	54	-
Pays-Bas	52°05' N	5°13' E	-	Netherlands (individus isolés)	-	Netherlands	47	-

(RN) : réserve naturelle nationale

Les données météorologiques des sites où ont été collectées les populations, issues du modèle Aurelhy de Météo-France (Analyse Utilisant le Relief pour l'Hydrométéorologie), n'ont malheureusement pas pu être obtenues à temps pour cette étude.

Après homogénéisation en parc à pieds mères à la pépinière forestière de Guémené-Penfao, l'ensemble de la collection a été planté en mai 2008 à l'INRA d'Orléans (France, Loiret, 47°46'N, 1°52'E, 110 m d'altitude). Le dispositif expérimental est organisé en six blocs complets randomisés à parcelles unitaires mono-arbre (chaque génotype est représenté par une bouture dans chaque bloc). Au sein des blocs, les boutures ont été installées de manière aléatoire selon un espacement de 1 m sur la ligne et de 2 m entre deux lignes. Autour du dispositif, une double rangée du cultivar *P.nigra 'Jean Pourtet'* a été plantée afin de limiter les effets de bordure. Après installation, le dispositif n'a bénéficié d'aucune fertilisation. Durant la saison de végétation, la qualité phytosanitaire du dispositif a été assurée par des traitements insecticides apportés selon les besoins. En revanche, aucun traitement fongicide n'a été apporté, le dispositif étant également utilisé pour permettre l'étude de la sensibilité à la rouille foliaire. Pendant la saison de végétation, de mai à septembre, le dispositif a également bénéficié d'un apport journalier en eau assuré par un système d'arrosage au goutte à goutte. Ce système d'arrosage a été élaboré de manière à compenser les pertes d'eau liées à l'évapotranspiration. Afin d'étudier d'éventuelles interactions génotype × milieu pour des traits d'intérêt, le dispositif a été dupliqué, en 2008, à Savigliano (Italie, Piémont, 44°41' N, 7°38' E, 321 m d'altitude) où les 32 populations de peuplier noir représentées par 815 génotypes ont été installées. Dans le cadre de notre étude, seules les observations réalisées au sein du dispositif expérimental d'Orléans ont été utilisées. La variabilité génétique de la phénologie de croissance et de la production de biomasse aérienne a été étudiée pour l'ensemble des individus des 32 populations. L'étude de la variabilité génétique de l'efficience d'utilisation de l'eau a été limitée à 317 génotypes échantillonnés dans 17 populations naturelles (tableau I). La sélection des génotypes et des populations auxquelles ils appartiennent devait satisfaire à trois critères : (i) ont été jugées prioritaires, les populations françaises et italiennes, (ii) les populations sélectionnées devaient couvrir des bassins hydrographiques différents, (iii) les métapopulations devaient être représentées par au moins 30 génotypes sur les deux sites expérimentaux (France, Italie).

2.2. Collecte et traitement des données

2.2.1. Production de biomasse aérienne

La hauteur totale du brin principal (HT09, cm) et la circonférence à 1m du sol (CIR09, mm) ont été mesurées pour l'ensemble des individus du dispositif expérimental en février 2010.

2.2.2. Efficience d'utilisation de l'eau et autres traits foliaires

Du 21 au 25 juillet 2009, plusieurs feuilles matures et pleinement illuminées ont été prélevées sur 317 génotypes, échantillonnés dans cinq blocs du dispositif. Quatre disques foliaires de 2 cm² ont ensuite été prélevés à l'emporte-pièce de part et d'autre de la nervure centrale des feuilles collectées. Ces disques ont été mis à sécher à l'étuve pendant 72H à 60°C jusqu'à obtention d'une masse constante. Les disques de trois des cinq blocs échantillonnés ont été pesés afin de déterminer la surface massique foliaire (SLA, cm².g⁻¹ de matière sèche (MS)) définie comme le rapport moyen entre la surface et la masse sèche des quatre disques prélevés sur chaque individu. Pour permettre l'analyse de la composition isotopique relative en carbone 13 ($\delta^{13}\text{C}$) et de la teneur en azote et en carbone des feuilles, les quatre disques foliaires de chaque individu ont été broyés (broyeur à billes, Retsch MM 300, Haan, Germany). Un milligramme de poudre a alors été pesé (microbalance, Mettler Toledo MX5, Greifensee, Switzerland) et disposé dans des capsules en étain qui ont été brûlées. Le CO₂ produit par la combustion des capsules a été purifié et le ratio $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ a été déterminé grâce à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Germany). La composition isotopique relative en ^{13}C a alors été calculée par rapport au standard de la Pee Dee Belemnite selon l'expression suivante : $\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 (\text{\textperthousand})$ (Craig 1957) où $R_{\text{échantillon}}$ et R_{standard} sont les ratios $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ respectifs de l'échantillon et du standard. La discrimination isotopique entre le carbone atmosphérique (δ_{air} considéré comme égal à -8‰) et le carbone de la matière organique foliaire (δ_{plante}) a alors été calculée selon l'équation suivante : $\Delta^{13}\text{C} = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plante}}) / (1 + (\delta_{\text{plante}} / 1000)) (\text{\textperthousand})$ (Farquhar et Richards 1984). Les teneurs massiques en azote et en carbone (N_M et C_M, mg.g⁻¹ de matière sèche (MS)) ont été déterminées à partir de ces mêmes échantillons grâce à un analyseur élémentaire (Carlo Erba NA1500, Instruments, Milan, Italy), associé au

spectromètre de masse à ratio isotopique. L'ensemble de ces analyses a été réalisé par le plateau technique d'écologie fonctionnelle de l'INRA de Nancy.

2.2.3. Phénologie de croissance

Entre les 03 et 24 avril 2009, six observations de débourrement végétatif ont été réalisées sur l'ensemble des individus du dispositif expérimental. Le stade de débourrement du bourgeon terminal de la tige principale a été évalué en utilisant une échelle de notation à six classes notées de 0 à 5 et traduisant l'évolution du bourgeon du stade où il est dormant à celui de l'elongation des entrenœuds de la tige (Turok et al. 1996) (Annexe 1). Entre le 07 août et le 02 octobre 2009, huit observations de l'arrêt de croissance et de la formation du bourgeon terminal ont été réalisées sur l'ensemble des individus du dispositif. Le stade d'arrêt de croissance a été apprécié en observant la pousse terminale et en utilisant une échelle de notation à sept classes de 3 à 0 qui représentent, respectivement, un stade d'elongation des entrenœuds de la tige et un stade où le bourgeon est en dormance (Rohde et al. 2010) (Annexe 2). Une première analyse de la distribution des stades observés pour chaque date de mesure, exprimée en jour calendaire, a permis de mettre en évidence que c'est au 14 avril 2009 (jour 104), pour le débourrement végétatif, et au 11 septembre 2009 (jour 254), pour l'arrêt de croissance, que les dispersions suivent une distribution gaussienne de variance maximale. La comparaison des métapopulations pour leur débourrement et leur arrêt de croissance sera donc réalisée à ces dates (stade_{104} , stade_{254}). Par ailleurs, l'ajustement des deux séries d'observation à un modèle polynomiale de degré deux, dont le régresseur est la date de mesure exprimée en jour calendaire, a permis d'estimer les dates d'évènements phénologiques pouvant s'avérer particulièrement sensibles aux conditions environnementales. Pour le débourrement, nous nous sommes intéressés à la date à laquelle le stade 3 a été atteint (date_3 , jour calendaire). D'un point de vue adaptatif, cette date joue un rôle clé dans le sens où elle traduit une transition de l'état du bourgeon d'un stade légèrement ouvert à un stade totalement ouvert et donc sensible aux gelées printanières tardives. De même, la durée nécessaire à cette transition de l'état du bourgeon a été estimée par le calcul de la différence entre les dates estimées du stade 4 et du stade 2 ($\text{durée}_{2/4}$, nombre de jours). Pour l'arrêt de croissance, nous avons considéré comme variables les dates estimées des stades 2,5 ($\text{date}_{2,5}$, jour calendaire) et 1,5 ($\text{date}_{1,5}$, jour calendaire). En effet, ces dates sont essentielles d'un point de vue adaptatif puisqu'elles représentent respectivement l'arrêt de la croissance et la formation du bourgeon

terminal et traduisent donc un véritable compromis entre l'exploitation maximale de la saison de végétation et l'évitement des gelées automnales précoces. La durée nécessaire à la transition entre les stades 2,5 et 1,5 a également pu être calculée à partir des dates estimées pour ces deux stades (durée_{2,5/1,5}, nombre de jours).

2.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 2.13.0 (2011, A Language and Environment for Statistical Computing). Des calculs de statistiques élémentaires et un examen graphique préalable des données recueillies ont permis un premier contrôle de la qualité des informations disponibles ainsi que le choix des analyses statistiques ultérieures.

2.3.1. Ajustement des données aux effets micro-environnementaux

La structure du dispositif expérimental en blocs complets a permis un premier contrôle des effets micro-environnementaux grâce au modèle d'analyse de variance $Y'_{ijk} = \mu + B_i + G_j + \varepsilon_{ijk}$ où μ est la moyenne générale de la variable étudiée, B_i est l'effet du bloc i considéré comme fixe, G_j est l'effet du génotype j considéré comme aléatoire, ε_{ijk} est l'erreur résiduelle incluant les variations micro-environnementales, l'effet observateur et l'erreur de mesure. Une cartographie spatiale des résidus de ce modèle a permis de juger de la nécessité d'une correction complémentaire des effets micro-environnementaux par la méthode itérative de Papadakis. Cette méthode utilise comme prédicteur environnemental la moyenne constituée par une maille de 5 individus en abscisse et de 7 individus en ordonnée, voisins de chaque plant et nécessite donc de disposer à l'échelle du dispositif expérimental des valeurs prises par chaque individu. Ainsi, dans le cadre de l'étude, l'ensemble des variables de production de biomasse aérienne (HT09 et CIR09) et les variables d'arrêt de croissance (date_{2,5} et durée_{2,5}) ont été ajustées selon la méthode itérative de Papadakis. Pour les autres variables phénologiques et pour les variables liées à WUE et aux autres traits foliaires, un simple ajustement des données aux effets blocs a été effectué.

2.3.2. Héritabilité, variabilité génétique et différenciation des métapopulations

Les variations génétiques et le niveau de différenciation des métapopulations ont été appréciés par analyse de variance selon deux modèles :

- (i) pour l'analyse des effets génotypes propres à chaque métapopulation et à chaque variable, un modèle aléatoire d'ANOVA a été utilisé : $Y'_{jk} = \mu + G_j + \varepsilon_{jk}$ où Y'_{jk} est la variable étudiée ajustée aux effets micro-environnementaux, μ est la moyenne générale, G_j est l'effet du génotype j , d'une métapopulation i , considéré comme aléatoire de variance σ^2_{Gi} et ε_{jk} est l'erreur résiduelle de variance σ^2_{Ri} .
- (ii) pour l'analyse des effets métapopulations, lorsque ces dernières présentent des effets génotypes significatifs, un modèle hiérarchique d'ANOVA a été utilisé : $Y'_{ijk} = \mu + M_i + G_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$ où Y'_{ijk} est la variable étudiée ajustée aux effets micro-environnementaux, μ est la moyenne générale, M_i est l'effet de la métapopulation i considéré comme fixe, $G_{j(i)}$ est l'effet du génotype j dans la métapopulation i considéré comme aléatoire de variance σ^2_G et ε_{ijk} est l'erreur résiduelle de variance σ^2_R .

Pour chaque métapopulation, les variances génotypiques (σ^2_{Gi}) et les variances résiduelles (σ^2_{Ri}) ont été estimées selon la méthode d'Henderson III. Dans le cas du modèle hiérarchique, les variances σ^2_G et σ^2_R ont été estimées selon la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML) en supposant les variances σ^2_{Gi} et σ^2_{Ri} homogènes pour toutes les métapopulations. Les génotypes étant représentés par des clones, les variances génotypiques (σ^2_{Gi} , σ^2_G) fournissent des estimations de la variance génétique totale ($\sigma^2_{génétique}$) respectivement pour chaque métapopulation et pour l'ensemble des métapopulations. L'héritabilité au sens large pour chaque métapopulation (H^2_i) a alors été calculée comme étant le rapport entre la variance génétique ($\sigma^2_{génétique}$) et la variance phénotypique ($\sigma^2_{phénotype}$), avec $\sigma^2_{phénotype} = \sigma^2_{génétique} + \sigma^2_{résiduelle}$, estimées à partir du modèle aléatoire d'ANOVA. Afin d'évaluer le niveau de différenciation des métapopulations, le coefficient de différenciation génétique des métapopulations (Q_{st}) a été calculé selon l'expression suivante : $Q_{st} = \sigma^2_{métapopulation} / (\sigma^2_{métapopulation} + 2 \times \sigma^2_{génotype})$ avec $\sigma^2_{métapopulation}$, la variance des métapopulations, et $\sigma^2_{génotype}$ estimées à partir d'un dernier modèle d'ANOVA où les deux facteurs métapopulation et génotype ont été considérés comme aléatoires.

2.3.3. *Relations entre caractères*

Les relations entre caractères ont été évaluées à l'échelle individuelle par approche multivariée reposant sur l'analyse en composantes principales (ACP). Les ACP ont été réalisées pour chacune des dix métapopulations sur les seuls génotypes pour lesquels nous disposons à la fois des données relatives à l'efficience d'utilisation de l'eau, à la phénologie de croissance et à la production de biomasse aérienne. Les variables utilisées pour réaliser les ACP ont été choisies de manière à éviter les redondances en termes d'informations pour une même catégorie de caractère. Ayant des unités de mesures et des ordres de grandeur différents, les variables ont été standardisées afin d'apprécier les variations relatives des unes en fonction des autres. Des facteurs orthogonaux (F1 et F2) ont alors été successivement construits comme des combinaisons linéaires de ces variables pour maximiser le pourcentage de variance phénotypique expliqué. Les corrélations entre caractères ont alors été appréciées par projection des variables dans le premier plan factoriel et par estimation des coefficients de corrélations linéaires de Pearson.

3. RESULTATS

3.1. Composantes de la variabilité phénotypique

Les objectifs de cette partie sont de mettre en évidence l'expression d'une variabilité génétique pour les différents caractères d'intérêt et de déterminer les parts respectives des niveaux génotype et métapopulation dans l'expression de la variabilité phénotypique. Dans la suite de l'étude, seule la variable date_{2,5} n'a pas été considérée car à la première date de suivi de l'arrêt de croissance plus de 30% des individus avaient déjà initié un arrêt de croissance et avaient même dépassé le stade 2,5. Il paraissait donc impossible d'analyser de façon fiable la variabilité génétique pour cette initiation de l'arrêt de croissance. Par ailleurs, durée_{2/4} et durée_{2,5/1,5} n'ont été estimées avec précision que pour huit et sept métapopulations respectivement. Les autres métapopulations ayant plus de 20% d'individus qui avaient dépassé le stade 2 de débourrement au jour 93 et le stade 2,5 d'arrêt de croissance au jour 219.

3.1.1. Phénologie de croissance

Une variabilité génétique significative, au risque de 1%, a été détectée pour toutes les variables de phénologie au sein de chaque métapopulation étudiée à l'exception des variables durée_{2/4} et durée_{2,5/1,5} pour les métapopulations 'Basento' et 'Durance' (tableau II).

Tableau II. Moyenne générale, moyennes génotypiques minimum et maximum, probabilité associées aux tests des effets génotypes pour chaque métapopulation, héritabilité au sens large pour chaque métapopulation (H^2_i) pour les variables de débourrement et d'arrêt de croissance.

Variables	Moyenne générale et erreur standard	Moyennes génotypiques extrêmes		Probabilité des tests des effets génotypes	H^2_i	
		min	max		min	max
date ₃	103,82 ± 0,01	92,1	118,3	≤ 10 ⁻⁷	0,396	0,907
stade ₁₀₄	3 ± 0,01	3	5	≤ 10 ⁻⁴	0,249	0,849
durée _{2/4}	8,99 ± 0,01	6,3	17	≤ 10 ⁻⁵ sauf Basento	0,176	0,529
date _{1,5}	253,16 ± 0,01	219	273,8	≤ 10 ⁻⁴	0,176	0,494
stade ₂₅₄	1,47 ± 0,01	0	3	≤ 10 ⁻³	0,146	0,510
durée _{2,5/1,5}	20,61 ± 0,01	4,9	38,2	≤ 10 ⁻³ sauf Durance et Basento	0,104	0,277

En moyenne, les métapopulations ont atteint le stade 3 de débourrement au 104^{ème} jour, soit le 17 avril 2009, tandis que le stade 1,5 de formation du bourgeon terminal a été atteint en moyenne au 253^{ème} jour, soit le 10 septembre 2009. Pour le débourrement végétatif, l'étendue observée entre moyennes de génotypes extrêmes est de 26,2 jours pour date₃, de deux stades pour la variable stade₁₀₄ et de 10,7 jours pour durée_{2/4}. En fin de saison de végétation, cette étendue est de 54,8 jours pour date_{1,5}, de trois stades pour stade₂₅₄ et de 33,3 jours pour durée_{2,5/1,5}. Ainsi, pour la phénologie de croissance, la variabilité génétique exprimée est toujours plus importante en fin de saison de végétation qu'en début. L'héritabilité la plus élevée a été détectée pour la date du stade 3 de débourrement et pour la variable stade₁₀₄ ; des héritabilités plus faibles ont été observées pour les autres descripteurs.

Pour l'ensemble des variables de phénologie végétative étudiées, des effets métapopulations significatifs, au risque de 1%, ont été mis en évidence (figure 1). Ainsi, l'étendue observée entre moyennes de métapopulations extrêmes est de 11,8 jours pour date₃, de 2 stades pour la variable stade₁₀₄, de 2,4 jours pour durée_{2/4}, de 24,32 jours pour date_{1,5}, de 2,5 stades pour stade₂₅₄ et de 5,3 jours pour durée_{2,5/1,5}. La part de variabilité phénotypique expliquée par ces différences entre métapopulations est variable d'un caractère à l'autre. En

effet, elle est importante pour les variables calant temporellement le débourrement végétatif (date₃, 38,75% ; stade₁₀₄, 35,20%) et l'arrêt de croissance (date_{1.5}, 48,80% ; stade₂₅₄, 43,50%).

En revanche, elle est d'amplitude modérée pour les variables faisant référence à la durée de ces évènements (durée_{2/4}, 14,33% ; durée_{2.5/1.5}, 2,91%).

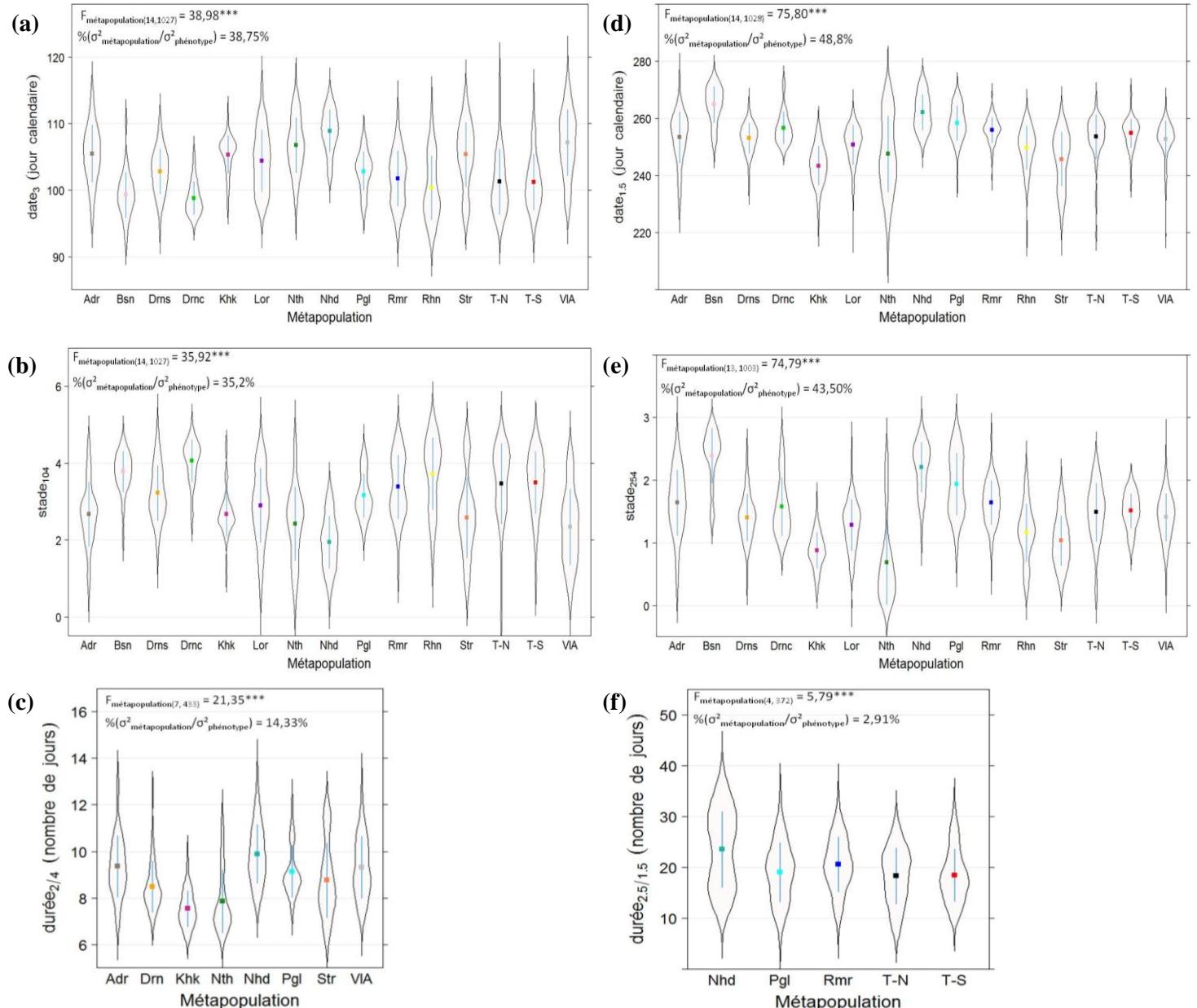


Figure 1. Distribution des moyennes génotypiques pour date₃ (a), stade₁₀₄ (b), durée_{2/4} (c), date_{1.5} (d), stade₂₅₄ (e), durée_{2.5/1.5} (f). Sur une boîte à violon sont représentés la moyenne (carré central) et l'écart-type (barres bleues). La forme de la boîte à violon est donnée par la courbe de densité. *Abréviations* : Adr, Adour ; Bsn, Basento ; Drns/Drn, Dranse ; Drnc, Durance ; Khk, Kuhkopf ; Lor, Loire ; Nth, Netherlands ; Nhd, Nohedes ; Pgl, Paglia ; Rmr, Ramieres ; Rhn, Rhin ; Str, Stura ; T-N, Ticino-North ; T-S, Ticino-South ; VIA, ValAllier ; $F_{\text{métapopulation}}(x,y)$, statistique de test de l'effet métapopulation pour x et y, nombre de degrés de liberté au niveau métapopulation et au niveau génotype ; ***, significatif à 10^{-3} ; $\%(\sigma^2_{\text{métapopulation}}/\sigma^2_{\text{phénotype}})$, pourcentage de $\sigma^2_{\text{phénotype}}$ expliquée par $\sigma^2_{\text{métapopulation}}$.

3.1.2. *Efficience d'utilisation de l'eau et autres traits foliaires*

Une variabilité génétique significative a été mise en évidence au sein de chacune des dix métapopulations étudiées pour les variables Δ et SLA. En revanche, pour les variables N_M et C_M , trois et cinq métapopulations, respectivement, ne présentent aucune variabilité génétique significative au risque de 1% (tableau III).

Tableau III. Moyenne générale, moyennes génotypiques minimum et maximum, probabilité associées aux tests des effets génotypes pour chaque métapopulation, hérabilité au sens large pour chaque métapopulation (H^2_i) pour les variables d'efficience d'utilisation de l'eau et des autres traits foliaires.

Variables	Moyenne générale et erreur standard	Moyennes génotypiques extrêmes		Probabilité des tests des effets génotypes	H^2_i	
		min	max		min	max
Δ	$21,56 \pm 0,01$	19,0	23,5	$\leq 10^{-5}$	0,444	0,777
SLA	$90,66 \pm 0,02$	71,9	115,5	$\leq 4 \times 10^{-3}$	0,285	0,601
N_M	$14,66 \pm 0,01$	9,7	22,9	$\leq 6 \times 10^{-3}$ sauf Paglia, Nohedes, Rhin $\leq 5 \times 10^{-2}$ sauf Paglia, Ticino-South, Nohedes, Ramieres, Dranse	0,178	0,551
C_M	$426,65 \pm 0,03$	382,4	451,9		0,178	0,358

Sur l'ensemble des métapopulations étudiées, une valeur de 21,56%, de 90,66 $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ MS, de 14,66 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS, et de 426,65 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS ont été respectivement obtenues pour les variables Δ , SLA, N_M et C_M au sein des métapopulations (tableau III). L'étendue entre moyennes génotypiques extrêmes est de 4,5% pour Δ , de 43,6 $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour SLA, de 13,2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS pour N_M , et de 69,5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS pour C_M . C'est pour Δ que sont observées les plus fortes valeurs d'hérabilité alors que les plus faibles valeurs ont été observées pour les variables N_M et C_M (tableau III).

Pour l'ensemble des variables, des différences significatives entre métapopulations au risque d'erreur de 1% ont été détectées (figure 2). Toutefois, la part de variance phénotypique expliquée par ces différences n'est supérieure à 15% que pour les seules variables Δ (28,70%) et SLA (16,20%) (figures 2a et 2b). Pour les variables C_M et N_M , la variabilité phénotypique observée est donc principalement expliquée par des effets non génétiques (figures 2c et 2d).

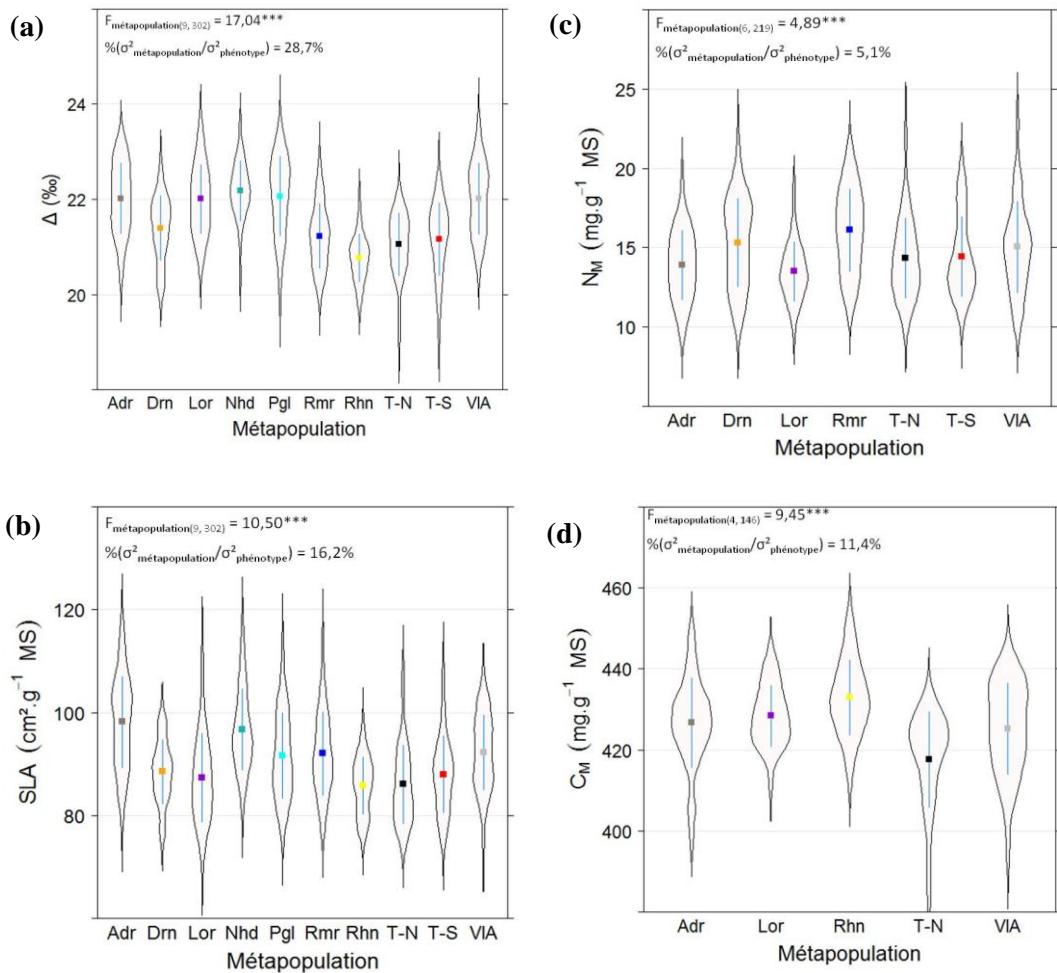


Figure 2. Distribution des moyennes génotypiques pour Δ (a), pour SLA (b), pour N_M (c) et pour C_M (d). Sur une boîte à violon sont représentés la moyenne (carré central) et l'écart-type (barres bleues). La forme de la boîte à violon est donnée par la courbe de densité. *Abréviations* : Adr, Adour ; Drn, Dranse ; Lor, Loire ; Nhd, Nohedes ; Pgl, Paglia ; Rmr, Ramieres ; Rhn, Rhin ; T-N, Ticino-North ; T-S, Ticino-South ; VIA, ValAllier ; $F_{\text{metapopulation}(x,y)}$, statistique de test de l'effet métapopulation pour x et y, nombre de degrés de liberté au niveau métapopulation et au niveau génotype ; ***, significatif à 10^{-3} ; $\%(\sigma^2_{\text{metapopulation}}/\sigma^2_{\text{phénotype}})$, pourcentage de $\sigma^2_{\text{phénotype}}$ expliquée par $\sigma^2_{\text{metapopulation}}$.

3.1.3. Production de biomasse aérienne

Pour les deux variables de production de biomasse, une variabilité génétique significative, au risque d'erreur de 1%, a été mise en évidence pour chaque métapopulation étudiée excepté ‘Durance’ qui ne présente pas de variabilité génétique significative pour CIR09 (tableau IV). En fin de saison de végétation 2009, les 15 métapopulations étudiées ont en moyenne atteint une hauteur totale de 227 cm et une circonférence à 1m du sol de 44 mm (tableau IV). L’étendue entre moyennes de génotypes extrêmes est de 305 cm pour HT09 et

de 57 mm pour CIR09. Les valeurs d'héritabilité calculées pour les variables de production de biomasse sont modérées et très peu différentes entre HT09 et CIR09 (tableau IV).

Tableau IV. Moyenne générale, moyennes génotypiques minimum et maximum, probabilité associées aux tests des effets génotypes pour chaque métapopulation, héritabilité au sens large pour chaque métapopulation (H^2_i) pour les variables de production de biomasse aérienne.

Variables	Moyenne générale et erreur standard	Moyennes génotypiques extrêmes		Test effet génotype	H^2_i	
		min	max		min	max
HT09	227 ± 1	63	368	$\leq 2 \times 10^{-3}$	0,102	0,599
CIR09	44 ± 1	26	83	$\leq 6 \times 10^{-3}$ sauf Durance	0,133	0,633

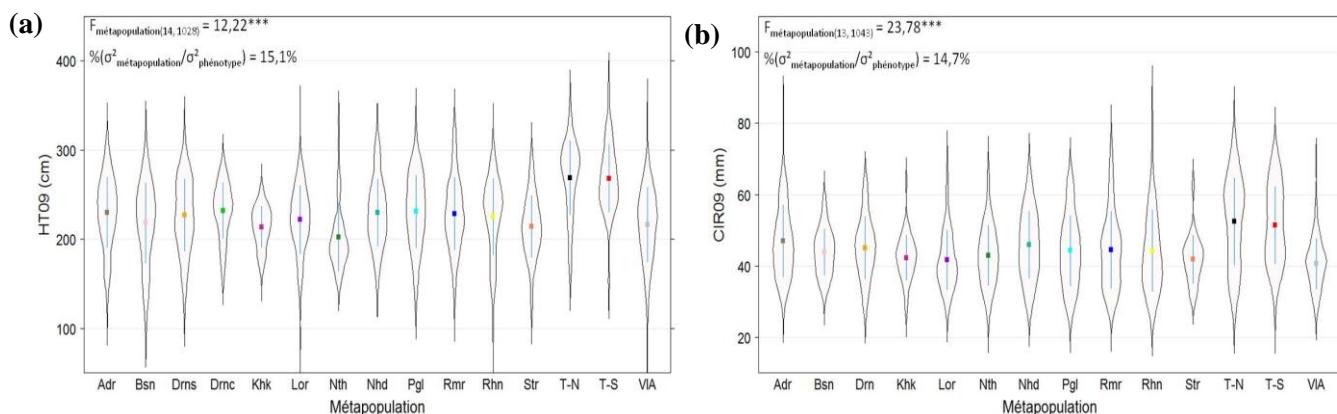


Figure 3. Distribution des moyennes génotypiques pour HT09 (a) et pour CIR09 (b). Sur une boîte à violon sont représentés la moyenne (carré central) et l'écart-type (barres bleues). Abréviations : Adr, Adour ; Bsn, Basento ; Drns/Drn, Dranse ; Drnc, Durance ; Khk, Kuhkopf ; Lor, Loire ; Nth, Netherlands ; Nhd, Nohedes ; Pgl, Paglia ; Rmr, Ramieres ; Rhn, Rhin ; Str, Stura ; T-N, Ticino-North ; T-S, Ticino-South ; VIA, ValAllier ; $F_{\text{métapopulation}(x,y)}$, statistique de test de l'effet métapopulation pour x et y, nombre de degrés de liberté au niveau métapopulation et au niveau génotype ; ***, significatif à 10^{-3} ; $\%(\sigma^2_{\text{métapopulation}}/\sigma^2_{\text{phénotype}})$, pourcentage de $\sigma^2_{\text{phénotype}}$ expliquée par $\sigma^2_{\text{métapopulation}}$.

Des différences significatives entre métapopulations ont été détectées pour les variables HT09 et CIR09 au risque d'erreur de 1% (figure 3). L'étendue entre métapopulations extrêmes est de 71 cm pour HT09 et de 18 mm pour CIR09. Graphiquement, il est possible de constater que la variabilité entre métapopulations, pour ces deux variables, est principalement liée à la position extrême occupée par les deux métapopulations italiennes 'Ticino-North' et 'Ticino-South'. La part de variabilité phénotypique expliquée par ces différences entre métapopulations est d'environ 15% pour les deux variables et met en

évidence que c'est au niveau génotype intramétapopulation que la variabilité génétique est maximale.

Une comparaison des différentes catégories de caractères nous amènent à souligner que le débourrement végétatif ($date_3$, $stade_{104}$) et l'efficience d'utilisation de l'eau (Δ) sont les deux caractères qui présentent une variabilité génétique significative dans toutes les métapopulations et des valeurs d'héritabilité élevées. En terme de différenciation entre métapopulations, c'est pour la phénologie de début et de fin de croissance ($date_3$, $stade_{104}$, $date_{1.5}$, $stade_{254}$) et pour l'efficience d'utilisation de l'eau (Δ) que la part de variabilité phénotypique expliquée par les différences entre métapopulations est la plus marquée ($\geq 20\%$). C'est donc sur ces caractères que nous nous attacherons maintenant à identifier une éventuelle structuration géographique de la variabilité génétique.

3.2. Structuration géographique de la variabilité génétique

L'analyse de la structuration géographique de la variabilité génétique a été conduite sur les variables dont les coefficients de différenciation génétique entre métapopulations (Q_{st}) étaient les plus importants. Sont ainsi concernés la phénologie de croissance, avec $date_{1.5}$ ($Q_{st} = 0,55$), $stade_{254}$ ($Q_{st} = 0,53$), $stade_{104}$ ($Q_{st} = 0,27$) et $date_3$ ($Q_{st} = 0,24$), ainsi que l'efficience d'utilisation de l'eau avec Δ ($Q_{st} = 0,24$). Pour la phénologie de croissance, seules les variables $date_3$ et $stade_{254}$ ont été considérées car elles résument une grande part de la variabilité génétique observée et permettent d'apprécier le calage temporel des métapopulations vis-à-vis des stades phénologiques les plus importants d'un point de vue adaptatif.

Pour la variable $stade_{254}$, les différences entre métapopulations semblent se structurer selon un gradient latitudinal et pour les deux pays (France, Italie) (figure 4). Ainsi, dans chaque pays, les métapopulations les plus méridionales ont, à Orléans, un arrêt de croissance significativement plus tardif que les métapopulations les plus nordiques. Un arrêt de croissance particulièrement précoce des métapopulations 'Kuhkopf' et 'Netherlands' a été observé à Orléans alors que les conditions de fin d'été sont encore favorables à la croissance des peupliers. A l'inverse, les métapopulations 'Basento' et 'Nohedes' présentent moins de 50% d'individus ayant formé leur bourgeon terminal lorsque les premiers risques de gelées automnales apparaissent à Orléans.

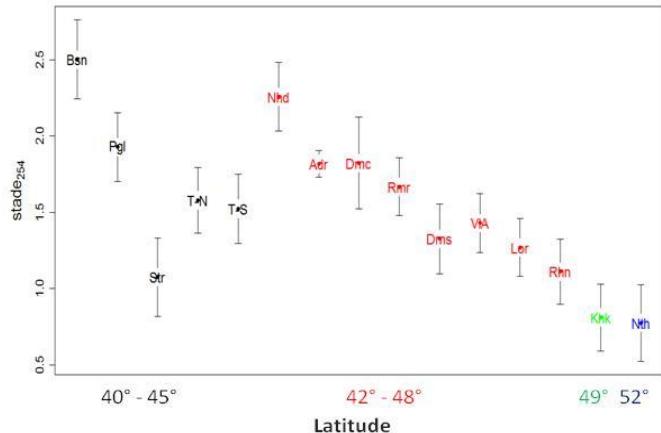


Figure 4. Structuration géographique latitudinale de la variabilité génétique exprimée pour la variable $stade_{254}$. Sont représentés la moyenne et son intervalle de confiance à 95% pour chaque métapopulation. En noir, les métapopulations italiennes ; en rouge, les métapopulations françaises ; en vert, la métapopulation allemande ; en bleu, la métapopulation néerlandaise. *Abréviations* : Adr, Adour ; Bsn, Basento ; Drns, Dranse ; Drnc, Durance ; Khk, Kuhkopf ; Lor, Loire ; Nth, Netherlands ; Nhd, Nohedes ; Pgl, Paglia ; Rmr, Ramieres ; Rhn, Rhin ; Str, Stura ; T-N, Ticino-North ; T-S, Ticino-South ; Vla, ValAllier.

Pour les deux autres variables, $date_3$ et Δ , la structuration géographique des différences entre métapopulations paraît plus complexe et difficilement résumable à l'expression de gradients environnementaux simples (figure 5).

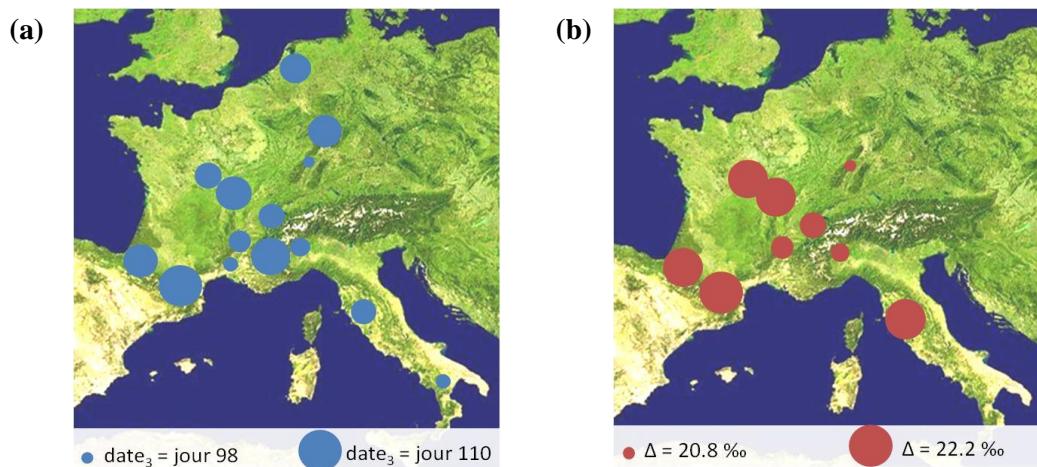


Figure 5. Structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour $date_3$ (a) et pour Δ (b). Les cercles représentent, de manière proportionnelle, la moyenne de chaque métapopulation pour la variable considérée.

Les métapopulations qui présentent le débourrement le plus précoce, à Orléans, sont issues de sites de basses altitudes et/ou d'origine méridionale (figure 5a). Au contraire, les métapopulations à débourrement tardif sont soit des métapopulations d'altitude soit des métapopulations septentrionales. Quant à Δ , les métapopulations les moins discriminantes en

juillet 2009, donc les plus efficientes, correspondent aux métapopulations issues des plaines du Rhin, ‘Rhin’, du Sud-Est de la France, ‘Ramieres’ et ‘Dranse’ et du Piémont italien, ‘Ticino-North’ et ‘Ticino-South’ (figure 5b). A noter que la métapopulation la plus méridionale, ‘Paglia’, présente des valeurs de discrimination comparable aux valeurs observées pour les métapopulations ‘Loire’ et ‘ValAllier’.

3.3. Relations entre caractères

Afin de caractériser les relations phénotypiques entre caractères, les ACP ont été réalisées à partir de l’ensemble des variables à l’exception de $\text{durée}_{2/4}$, $\text{durée}_{2.5/1.5}$ et C_M compte tenu de leur faible niveau de variabilité génétique exprimée au sein des métapopulations. De même, les variables stade_{104} et $\text{date}_{1.5}$ n’ont pas été considérées, d’une part, pour éviter les redondances en terme d’informations, et d’autre part, pour conserver les variables nous permettant d’apprécier le calage phénologique des métapopulations par rapport aux stades importants d’un point de vue adaptatif (date_3 , stade_{254}).

Pour l’ensemble des ACP réalisées, le premier plan factoriel ($F1 \times F2$) explique environ 60% de la variabilité phénotypique exprimée dont 30 à 40% sont expliqués par l’axe F1 et 20 à 30% sont expliqués par l’axe F2 (résultats non présentés). L’axe F1 est principalement défini par les variables de production de biomasse aérienne, HT09 et CIR09, et par les variables des traits foliaires, SLA et N_M . L’axe F2 est le plus souvent défini par les variables de phénologie de croissance, date_3 et stade_{254} , et Δ . Les relations observées sur les ACP ont été estimées pour chaque métapopulation par les coefficients de corrélations linéaires de Pearson (tableau V). Les relations observées entre caractères sont très variables d’une métapopulation à l’autre (tableau V). Il est ainsi impossible de les regrouper par classe de métapopulation présentant de mêmes catégories de relations.

Deux niveaux principaux de relations phénotypiques entre caractères ont été observés au sein des métapopulations : les relations intragroupes, reflétant les relations entre différents descripteurs d’une même catégorie de caractères, et les relations intergroupes, décrivant les relations entre descripteurs de catégories de caractères différentes.

Tableau V. Coefficients de corrélations linéaires de Pearson entre variables de phénologie de croissance, d'efficience d'utilisation de l'eau et des autres traits foliaires, et de production de biomasse aérienne pour dix métapopulations de peuplier noir. En gras, les corrélations significativement différentes de zéro au risque de 5%.

Corrélations	Adour	Dranse	Loire	Nohedes	Paglia	Ramieres	Rhin	Ticino-North	Ticino-South	ValAllier
HT09-date₃	-0,155	0,014	-0,207	-0,194	-0,253	-0,400	-0,279	-0,121	-0,186	-0,179
CIR09-date₃	-0,130	0,033	-0,144	-0,206	-0,207	-0,390	-0,142	-0,025	-0,168	-0,186
HT09-stade₂₅₄	0,304	0,369	0,410	0,252	0,475	0,345	0,504	0,167	0,308	0,398
CIR09-stade₂₅₄	0,251	0,355	0,260	0,200	0,353	0,299	0,380	0,225	0,247	0,294
HT09-Δ	0,133	-0,049	-0,016	-0,138	-0,326	-0,101	-0,129	-0,172	-0,055	-0,070
CIR09-Δ	0,125	-0,043	0,103	-0,171	-0,267	-0,037	-0,114	-0,013	-0,084	0,113
date₃-Δ	0,060	-0,219	0,450	0,273	0,345	0,023	0,056	-0,125	-0,171	0,163
stade₂₅₄-Δ	0,138	-0,071	0,293	-0,111	-0,297	0,000	0,147	0,016	-0,192	-0,138
Δ-SLA	0,003	0,002	0,209	0,279	0,362	0,261	0,100	0,129	0,157	0,330
Δ-N_M	-0,463	-0,312	-0,269	-0,215	-0,241	-0,121	-0,247	-0,157	-0,115	-0,261
SLA-N_M	0,358	0,539	0,284	0,461	0,335	0,510	0,506	0,643	0,697	0,308
HT09-CIR09	0,822	0,887	0,840	0,858	0,882	0,869	0,881	0,778	0,803	0,811
date₃-stade₂₅₄	0,248	-0,075	-0,103	-0,030	-0,143	-0,206	-0,087	0,051	-0,050	-0,086

Au niveau intragroupe, une forte corrélation positive a été mise en évidence entre les variables de production de biomasse aérienne, HT09 et CIR09, pour l'ensemble des métapopulations (tableau V). De même, SLA et N_M sont corrélés positivement pour l'ensemble des métapopulations. Une corrélation négative entre Δ et N_M a également été mise en évidence pour huit des dix métapopulations étudiées. En revanche, seulement quatre métapopulations présentent une corrélation significative et positive entre Δ et SLA.

Au niveau inter-groupe, de faibles corrélations négatives sont observées entre le débourrement et les variables de production de biomasse aérienne excepté pour la métapopulation 'Ramieres' pour laquelle elles atteignent une valeur proche de -0,4 (tableau V). Au contraire, les variables de production de biomasse aérienne sont corrélées positivement et significativement avec la variable d'arrêt de croissance stade₂₅₄. Aucune corrélation significative n'a été détectée entre les variables de production de biomasse aérienne (HT09, CIR09) et Δ sauf pour la métapopulation 'Paglia' pour laquelle on observe une corrélation négative entre ces variables. Des corrélations positives et significatives entre débourrement et Δ ont été mises en évidence pour trois métapopulations 'Loire', 'Nohedes' et 'Paglia'. A l'opposé, 'Dranse' présente une corrélation négative entre ces deux variables. Aucune relation marquée n'a été trouvée entre l'arrêt de croissance et Δ excepté pour 'Loire' et 'Paglia'.

4. DISCUSSION

Cette étude visait à juger de la variabilité génétique, et de sa structuration géographique, pour la phénologie de croissance, l'efficience d'utilisation de l'eau, la production de biomasse aérienne, et leurs relations, au sein d'une collection de 15 métapopulations naturelles de peuplier noir. Une variabilité génétique significative a été mise en évidence au niveau génotype et métapopulation et se structure selon des gradients environnementaux. Les relations phénotypiques observées varient entre métapopulations.

4.1. Variabilité génétique et structuration géographique

Pour l'ensemble des variables étudiées, une variabilité génétique significative a été mise en évidence au sein des métapopulations. Les plus fortes valeurs d'héritabilité ont été observées pour le débourrement, $date_3$ et $stade_{104}$, et pour l'efficience d'utilisation de l'eau, avec Δ , suggérant que l'expression phénotypique pour ces caractères était sous un fort contrôle génétique associé à une faible influence des facteurs environnementaux. L'expression de la variabilité génétique pour le débourrement est connue comme importante chez le peuplier (Frewen et al. 2000). Cette étude confirme également pour un plus grand nombre de populations naturelles européennes, l'existence d'une variabilité génétique significative pour WUE (Chamaillard et al. 2011, soumis). Les valeurs d'héritabilités plus modérées observées pour l'arrêt de croissance s'expliquent à la fois par une influence plus importante des effets micro-environnementaux et une plus faible précision des mesures. L'échelle de notation utilisée pour suivre l'arrêt de croissance chez le peuplier noir utilise des stades particuliers choisis au cours d'un processus continu. Ces stades se distinguent par des variations subtiles de la morphologie du bourgeon terminal sujettes à des erreurs de notations. Par ailleurs, la phénologie automnale est influencée par un grand nombre de facteurs biotiques, tels que la compétition entre individus voisins ou encore des infections par agents pathogènes, tels que la rouille foliaire *Melampsora larici-populina*, mais est également influencée par des facteurs abiotiques tels que les déficits hydriques pouvant survenir en fin de saison de végétation (Dunlap et Stettler 1996, Rohde et al. 2010). Pour l'ensemble des variables étudiées, des différences significatives entre métapopulations ont été mises en évidence. Estimées par les Q_{st} , les plus fortes différenciations entre métapopulations ont été observées pour le calage temporel du débourrement végétatif ($date_3$, $stade_{104}$) et de l'arrêt de

croissance (date_{1.5}, stade₂₅₄) ainsi que pour l'efficience d'utilisation de l'eau (Δ). Les différences observées entre métapopulations pour l'arrêt de croissance semblent se structurer selon un gradient latitudinal (figure 4). Les métapopulations ayant fait l'objet d'un transfert vers de plus basses latitudes ('Rhin', 'Kuhkopf', 'Netherlands') présentaient un arrêt de croissance plus précoce que les métapopulations locales. Inversement, les métapopulations ayant été transférées vers de plus hautes latitudes ('Paglia', 'Nohedes', 'Basento') présentaient une croissance prolongée par rapport aux métapopulations locales. Ces résultats confirment donc ce qui a été observé en Belgique pour une partie de cette même collection de peuplier noir (Rohde et al. 2010). Un gradient latitudinal comparable de la date d'arrêt de croissance a déjà été mis en évidence chez d'autres espèces du genre *Populus* (Farmer 1993, Luquez et al. 2008). Ce comportement lors de transferts latitudinaux s'explique par une adaptation des populations aux conditions photopériodiques locales (Rohde et al. 2010). Récemment, il a été montré que la température peut également moduler la sensibilité au signal photopériodique (Rohde et al. 2011).

La structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour le débourrement et l'efficience d'utilisation de l'eau apparaît plus complexe et non résumable à l'expression de gradients environnementaux simples (latitude, longitude, altitude). Au sein du genre *Populus*, le débourrement a été montré comme étant sensible aux températures printanières (Dunlap et Stettler 1996, Li et al. 2010, Keller et al. 2010). Le débourrement le plus précoce était alors observé pour des populations nécessitant une faible somme de degré jours et issues de sites peu exposés aux risques de gelées printanières tardives. Au sein du genre *Populus*, le niveau d'efficience d'utilisation de l'eau a été montré comme étant sensible à la température de l'air mais également à la disponibilité en eau du sol (Leffler et Evans 2001, Zhang et al. 2004, Keller et al. 2010). Chez *P. fremontii*, espèce de ripisylve, l'influence du régime hydrique des bassins versants sur WUE a été mise en évidence (Leffler et Evans 2001). Cette étude a permis de montrer que WUE augmentait en cas de diminution du régime hydrique.

Pour pouvoir véritablement conclure quant aux facteurs environnementaux à l'origine de la structuration observée de la variabilité génétique exprimée pour le débourrement et WUE, une meilleure caractérisation des sites d'origine des populations étudiées est nécessaire. L'acquisition prochaine des données climatiques couvrant la saison de végétation (précipitations annuelles moyennes, nombre de jours sans gel, nombre de mois où la température est supérieure à 30°C, températures minimales, températures maximales, somme de températures printanières) mais également des données hydrologiques des bassins versants

nous permettront de préciser le niveau actuel d'adaptation des populations de peuplier noir. Toutefois, le fort niveau de variabilité génétique observé au sein de chaque métapopulation pour les caractères d'intérêt semble déjà indiquer l'existence d'une capacité d'adaptation à long terme des populations de peuplier noir.

4.2. Relations entre caractères

Dans le cadre de l'étude, deux niveaux de corrélations phénotypiques ont été mis en évidence : des corrélations intragroupes et des corrélations intergroupes.

Au niveau intra-groupe, la plus forte corrélation phénotypique a été observée entre la hauteur et la circonférence atteinte en fin de saison de végétation. Les individus qui réalisent un accroissement en hauteur important sont susceptibles de développer une surface foliaire totale élevée permettant de réaliser une croissance radiale importante. Cette relation entre hauteur, surface foliaire totale et circonférence a déjà été mise en évidence chez des hybrides euraméricains de peuplier (Monclús et al. 2009). Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre le calage temporel du débourrement et de l'arrêt de croissance. Ces résultats soulignent l'expression d'une variabilité génétique importante pour la dynamique de croissance. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre Δ et la production de biomasse aérienne. La variabilité phénotypique de WUE est donc principalement contrôlée par la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) ce qui confirme ce qui avait déjà été observé au sein de trois populations naturelles de peuplier noir (Chamaillard et al. 2011, soumis) et chez des hybrides *P.deltoidea* \times *P.nigra* (Fichot et al. 2010). Toutefois, une relation négative entre Δ et N_M a été mise en évidence pour certaines métapopulations. N_M étant un indicateur des capacités photosynthétiques, on ne peut donc pas exclure qu'une part de la variabilité phénotypique exprimée pour WUE soit liée à l'assimilation nette de CO_2 (A). Par ailleurs, l'absence de corrélations entre biomasse et Δ ne signifie pas qu'elles n'existent pas. En effet, la croissance ne dépend pas que des capacités photosynthétiques des plants. D'autres paramètres tels que la surface foliaire ou encore l'allocation en carbone entre compartiments aériens et souterrains influencent la relation entre WUE et biomasse. L'intégration de ces paramètres en tant que co-variables ainsi que la mesure des échanges gazeux au niveau foliaire pourraient nous permettre d'élucider les relations entre biomasse et WUE.

Au niveau intergroupe, la plus forte corrélation phénotypique a été observée entre les variables de production de biomasse aérienne et la tardiveté de l'arrêt de croissance laissant

suggérer que l'allongement de la saison de végétation, induit par les modifications climatiques, pourrait permettre une augmentation de la productivité des peupleraies naturelles. Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre phénologie de croissance et Δ excepté pour quatre métapopulations. Excepté ces quatre métapopulations, les facteurs environnementaux agissent donc indépendamment sur la structuration géographique de la variabilité génétique exprimée pour WUE et pour la phénologie de croissance.

Les résultats de cette étude sont relatifs à l'expression de la variabilité génétique dans les conditions environnementales d'Orléans. Ces conditions peuvent ne pas être favorables quant à l'expression de la variabilité génétique de certaines métapopulations et notamment des métapopulations italiennes les plus distantes des conditions environnementales d'Orléans d'un point de vue géographique et écologique. L'analyse prochaine des observations réalisées au sein du dispositif expérimental italien permettra une comparaison croisée des métapopulations françaises et italiennes. De même, ce dispositif nous permettra d'évaluer les possibilités de réponses à court terme des populations de peuplier noir en étudiant la plasticité phénotypique des caractères d'intérêt et de leurs relations.

REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier Catherine BASTIEN et Franck BRIGNOLAS sans ce qui ce stage n'aurait pas eu la même valeur. Je vous remercie sincèrement pour l'aide que vous avez su m'apporter tout au long du stage, pour la richesse de vos enseignements et pour vos indéniables qualités humaines qui m'ont été d'un grand soutien dans les moments de doutes. Mes remerciements vont également à Sylvain CHAMAILLARD. Je te remercie pour tes conseils et pour ta gentillesse. Enfin, je souhaite remercier Isabelle LE JAN pour l'aide technique qu'elle m'a apportée lors de la préparation de mes échantillons.

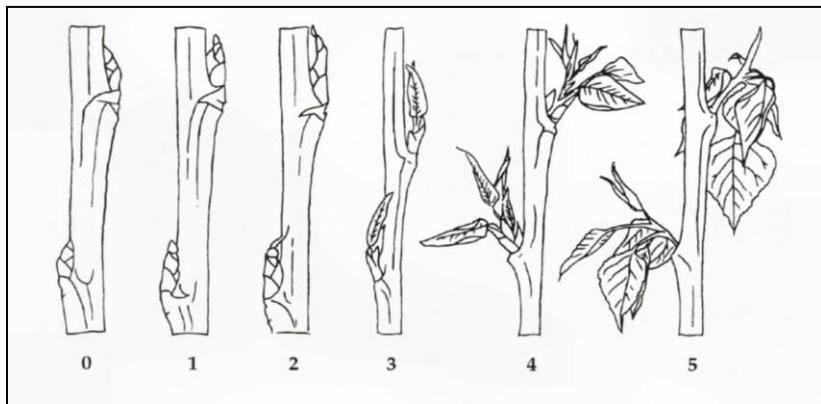
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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.
- Dunlap, J. M., et R. F. Stettler. 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.
- Farmer, R. E. 1993. Latitudinal Variation In Height and Phenology of Balsam Poplar. *Silvae Genetica* 42:148–

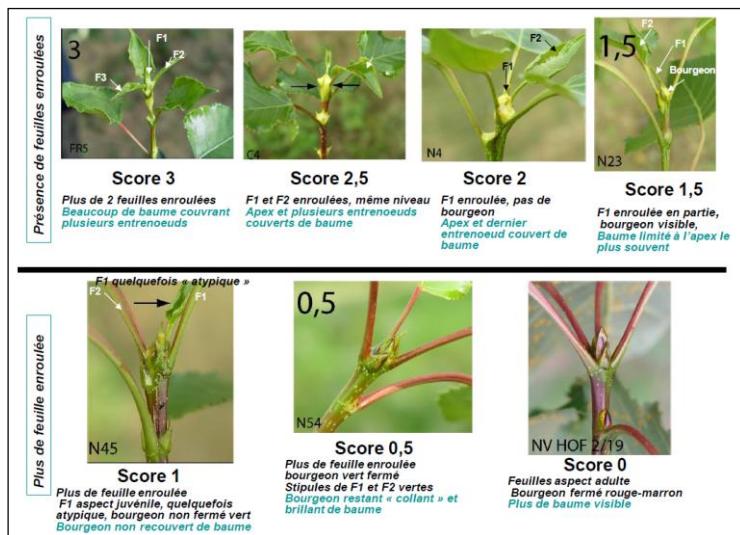
- Farquhar, G. D., et R. A. Richards. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11:539-552.
- Farquhar, G. D., M. H. O'Leary, et J. A. Berry. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9:121-137.
- Fichot, R., T. S. Barigah, S. Chamaillard, D. Le Thiec, F. Laurans, H. Cochard, et F. Brignolas. 2010. Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant, Cell & Environment* 33:1553-1568.
- Frewen, B. E., T. H. H. Chen, G. T. Howe, J. Davis, A. Rohde, W. Boerjan, et H. D. Bradshaw. 2000. Quantitative Trait Loci and Candidate Gene Mapping of Bud Set and Bud Flush in *Populus*. *Genetics* 154:837-845.
- Keller, S. R., R. Y. Soolanayakanahally, R. D. Guy, S. N. Silim, M. S. Olson, et P. Tiffin. 2010. Climate-driven local adaptation of ecophysiology and phenology in balsam poplar, *Populus balsamifera* L. (Salicaceae). *American Journal of Botany*:99-108.
- Leffler, A. J., et A. S. Evans. 2001. Physiological variation among *Populus fremontii* populations: short- and long-term relationships between $\delta^{13}\text{C}$ and water availability. *Tree Physiology* 21:1149-1155.
- Li, H. T., X. L. Wang, et A. Hamann. 2010. Genetic adaptation of aspen (*Populus tremuloides*) populations to spring risk environments: a novel remote sensing approach. *Canadian Journal of Forest Research-revue Canadienne De Recherche Forestiere* 40:2082-2090.
- Luquez, V., D. Hall, B. Albrechtsen, J. Karlsson, Pā. Ingvarsson, et S. Jansson. 2008. Natural phenological variation in aspen (*Populus tremula*): the SwAsp collection. *Tree Genetics & Genomes* 4:279-292.
- Monclus, R., M. Villar, C. Barbaroux, C. Bastien, R. Fichot, F. M. Delmotte, D. Delay, J.-M. Petit, C. Bréchet, E. Dreyer, et F. Brignolas. 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.
- Rohde, A., V. Storme, V. Jorge, M. Gaudet, N. Vitacolonna, F. Fabbrini, T. Ruttink, G. Zaina, N. Marron, S. Dillen, M. Steenackers, M. Sabatti, M. Morgante, W. Boerjan, et C. Bastien. 2010. Bud set in poplar - genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytologist*:1-16.
- Rohde, A., C. Bastien, et W. Boerjan. 2011. Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiology* 31:472 -482.
- Rotach, P. 2004. Poplars and Biodiversity. Pages 79-100 *Populus nigra* Network, Report of seventh (25-27 October 2001, Osijek, Croatia) and eighth meetings (22-24 May 2003, Treppeln, Germany). Rome, Italy.
- Ruffinoni, C., M. Tremolières, et J. M. Zanchez-Perez. 2003. Les forêts riveraines des cours d'eau, écologie, fonctions et gestion. Pages 134-154. Eds, Paris: Institut pour le Développement Forestier.
- Soolanayakanahally, R. Y., R. D. Guy, S. N. Silim, E. C. Drewes, et W. R. Schroeder. 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.
- Sparks, J. P., et J. R. Ehleringer. 1997. Leaf carbon isotope discrimination and nitrogen content for riparian trees along elevational transects. *Oecologia* 109:362-367.
- Turok, J., F. Lefèvre, L. Cagelli, et S. de Vries. 1996. *Populus nigra* network: Report of the 2nd meeting, 10-12 September 1995, Casale Monferrato, Italy.

- Vanden Broeck, A., M. Villar, E. Van Bockstaele, et J. Van Slycken. 2005. Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Annals of Forest Science* 62:601-613.
- Villar, M., et O. Forestier. 2009. Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? *Revue Forestière Française* 61:457-466.
- Zhang, X., R. Zang, et C. Li. 2004. Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Science* 166:791 - 797.

ANNEXES



Annexe 1. Echelle de notation du débourrement. 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 petite feuille entre les écailles ; stade 3 : bourgeon totalement ouvert, les écailles sont toujours présentes, les feuilles sont apparentes mais enroulées ; stade 4 : les feuilles divergent entre elles et commencent à se dérouler, les écailles peuvent être toujours présentes ou avoir disparues ; stade 5 : les feuilles sont totalement déroulées, les écailles ont disparu, les entrenœuds s'allongent (Turok et al. 1996).



Annexe 2. Echelle de notation de l'arrêt de croissance (Rohde et al. 2010).