



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Faculté des Sciences et Technologies : Université de Lorraine

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles (SiReNa)

## **Thèse**

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

En Sciences Agronomiques

par Théo GERARDIN

### **Plasticité et diversité de l'efficience d'utilisation de l'eau chez deux espèces de chêne blanc d'Europe : les chênes pédonculé (*Quercus robur* L.) et sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)**

Approche descriptive de la dynamique de réponse stomatique aux changements environnementaux

Soutenance publique le : 19/09/2019 Faculté des Sciences et Technologies de Nancy

#### **Membres du jury :**

##### **Rapporteurs :**

M. Thierry SIMONNEAU, Directeur de Recherche INRA Montpellier

Mme. Gaëlle DAMOUR, Chargée de Recherche CIRAD Montpellier

##### **Examineurs :**

Mme. Nathalie BREDA, Directrice de Recherche INRA Nancy

Mme. Annabel PORTE, Directrice de Recherche INRA Bordeaux

M. Oliver BRENDEL, Directeur de Recherche INRA Nancy (Directeur de thèse)

## Remerciements

Vous êtes nombreux, aussi j'espère que vous ne m'en voudrez pas de ne pas tous vous citer nommément. Ainsi, afin d'éviter tout oubli : merci à tous !

Je tenais tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers toutes celles et ceux qui de près ou de loin ont apporté leur concours à la réalisation de ces travaux de thèse (de la préparation des expérimentations, leur entretien, aux récoltes finales souvent fastidieuses mais aussi les mesures et analyses en tout genre). Merci à toutes les personnes de notre petite unité/équipe pour votre bonne humeur et votre gentillesse (même Irène). Je garderai grâce à vous un très beau souvenir de cette étape de ma vie. Mention spéciale à Cyril B. pour avoir pris tant soin de la serre et de nos chênes (avant que l'on ne les découpe...) et Médaille de la Patience pour les dames de l'administration ayant combattu ma phobie administrative.

Un grand merci aux « gens de la fac' » pour m'avoir aidé à trouver mes marques facilement (ou disons plutôt pas trop difficilement) lorsqu'il m'a fallu exercer la délicate tâche de l'Enseignement. Votre bienveillance m'a conforté dans ma vocation à enseigner un jour à mon tour. J'espère cependant ne pas avoir trop violenté d'étudiants avec les cycles de vie des fougères.

Je remercie tout particulièrement Didier et Oliver qui depuis mes premiers pas dans la Recherche lors de mon premier stage jusqu'à aujourd'hui m'ont accordé leur confiance et apporté de précieux conseils et enseignements. Nul doute que leur influence marquera mon parcours pendant de nombreuses années (pour le meilleur et/ou pour le pire).

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à ma famille ainsi qu'à mes amis (Hélène, Valentin, Thibault, Cyprien... tous les autres et même le chat) pour leur simple présence et leur soutien plus que salvateur durant ces années. Vous êtes bien trop nombreux pour qu'il me soit possible de tous vous citer mais je sais que vous vous reconnaitrez.

Mention honorable : Pour les braves petits chênes tombés au nom de la Science.

Enfin et encore une fois : merci à vous tous !

## Table des matières

Chapitre I : Introduction .....	5
Le Chêne : sessile ( <i>Q. petraea</i> ) et pédonculé ( <i>Q. robur</i> ).....	6
Notion de stress .....	9
L'efficience d'utilisation de l'eau (WUE) .....	16
Objectifs .....	25
Chapitre II méthodologique : Modélisation dynamique de la réponse stomatique .....	27
Introduction .....	27
Description de la dynamique de réponse stomatique ( $g_s$ ) .....	28
Impacts de la dynamique de réponse stomatique sur les échanges gazeux foliaires.....	29
Facteurs influençant la dynamique .....	31
Considérations biochimiques des mouvements stomatiques.....	33
Objectifs .....	34
Article 1: Introduction à la dynamique de réponse stomatique .....	35
Synthèse du chapitre méthodologique .....	62
Chapitre III Etude comparative de <i>Q. robur</i> et <i>Q. petraea</i> .....	66
Introduction .....	66
Dépérissement des chênaies .....	66
Différenciation Ecologique des deux espèces.....	67
Le projet H2Oak (2014-en cours) : ( <i>Q.petraea</i> , <i>Q.robur</i> ).....	69
Objectifs .....	69
Article 2 : Etude comparative de <i>Q. robur</i> et <i>Q. petraea</i> (H2Oak 2015) .....	72
Article 3 : Deuxième étude Comparative entre <i>Q.robur</i> et <i>Q.petraea</i> (H2Oak 2017).....	112
Chapitre IV : Cause physiologique et/ou anatomique de la variabilité intra-spécifique de l'efficience d'utilisation de l'eau chez le chêne sessile ( <i>Q. petraea</i> ) .....	143
Dynamique de réponse stomatique à différents facteurs .....	144
Objectif.....	146
Article 4 : (H2Oak 2016).....	147
Chapitre V : Synthèse sur l'Ecologie des espèces.....	182
Croissance .....	182
Architecture racinaire .....	184
Profils racinaires.....	187
Traits foliaires.....	189
Traits stomatiques .....	190
Traits physiologiques .....	191
Efficience d'utilisation de l'eau chez <i>Q. robur</i> et <i>Q. petraea</i> .....	193
Description de la dynamique de réponse stomatique .....	201

<b>Conclusions</b> .....	213
<b>Bibliographie</b> .....	217

### **Publications liées à la thèse**

1: Théo Gerardin<sup>1,2</sup>, Cyril Douthe<sup>2</sup>, Jaume Flexas<sup>2</sup>, Oliver Brendel<sup>1,3</sup> (2018) Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environmental and Experimental Botany* 153: 188-197.

2: Théo P.H. Gérardin<sup>1</sup>, Didier Le Thiec and Oliver Brendel<sup>1,2</sup> (2019) Biomass accumulation drives whole plant transpiration efficiency differences between two related sympatric oaks species : importance of underground biomass production in response to drought in *Quercus robur* & *Quercus petraea* seedlings (soumission courant 2019 dans Environmental and Experimental Botany).

3: Théo P.H. Gérardin<sup>1</sup> and Oliver Brendel<sup>1,2</sup> (2019) Impact of a progressive drought on growth rate and gas exchange between *Quercus robur* and *Quercus petraea* (en cours de finalisation et sera soumis à publication après acceptation de l'article 2).

4: Théo P.H. Gérardin<sup>1</sup>, Didier LeThiec<sup>1,2</sup> and Oliver Brendel<sup>1,2</sup> (2019) What drives water use efficiency in sessile oak seedlings (*Quercus petraea*)? (en cours de finalisation et sera soumise à publication après acceptation de l'article 3).

### **Publications / communications supplémentaires**

5: Bogeat-Triboulot MB, Buré C, Gerardin T, Chuste PA, Le Thiec D, Hummel I, Durand M, Wildhagen H, Douthe C, Molins A, Galmés J, Smith HK, Flexas J, Polle A, Taylor G, Brendel O (2019) Additive effects of high growth rate and low transpiration rate drive differences in whole plant transpiration efficiency among black poplar genotypes. *Environmental and Experimental Botany* (soumise et acceptée Mai 2019 : doi 10.1016/j.envexpbot.2019.05.021).

6: Ripple WJ, Wolf C, Newsome TM, Galetti M, Alamgir M, Crist E ... & 15,364 scientist signatories from 184 countries (2017) World scientists' warning to humanity : a second notice. *BioScience* 67(12) : 1026-1028. (Signataire)

## Chapitre I : Introduction

Dans un contexte de prise de conscience des bouleversements climatiques actuels et à venir touchant notre planète ainsi que de leurs dangers, non seulement pour l'Humanité mais aussi l'ensemble du vivant, la question environnementale est plus que jamais d'actualité. Celle-ci s'impose comme probablement l'enjeu le plus décisif de ces prochaines décennies. Néanmoins, bien que largement abordée sur la scène publique en raison des nombreux aspects sociétaux touchés : aussi bien économiques, sanitaires, éthiques que philosophiques, la question environnementale est souvent sujette à controverses et source de désinvolture voire de déni de la part des politiques et des populations. Pourtant, l'influence humaine sur les changements climatiques ne laisse place à aucun doute, les émissions de gaz à effet de serre d'origine anthropique atteignant chaque année des taux record. Depuis désormais plus de trente années, le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) a été mobilisé afin de décrire, quantifier et évaluer l'ampleur ainsi que les conséquences probables des changements climatiques s'opérant. Si la température moyenne du globe s'est déjà élevée de 0.8 à 1.2°C depuis le début de l'ère industrielle, l'ensemble des modèles prédictifs proposés par les équipes scientifiques du GIEC s'accorde sur le fait que l'élévation de la température terrestre devrait se poursuivre et atteindre 1 à 2°C supplémentaires à la fin du 21<sup>e</sup> siècle (IPCC 2018). Outre l'élévation des températures telle que prédite par les experts, des événements climatiques extrêmes (épisodes de sécheresse, inondations, tempêtes ...) devraient se produire de manière récurrente et intense (Easterling et al., 2000), faisant ainsi peser sur des écosystèmes fragiles par nature une menace accrue de dérèglements ou dans les cas extrêmes, d'extinctions. Ces événements climatiques seront notamment caractérisés par des températures estivales excédant les températures favorables au bon fonctionnement physiologique des plantes (Mahan et al., 1995). Ces températures associées à des déficits hydriques ainsi que des changements atmosphériques tels que l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone sont susceptibles de provoquer des changements imprévisibles au sein des communautés végétales, modifiant profondément les cycles de l'eau et du carbone. De récentes études ont par ailleurs démontré à travers le monde que la plupart des écosystèmes forestiers étaient déjà impactés par ces dérèglements climatiques, mettant en relief des taux de mortalité croissants au sein des populations forestières, ce y compris au sein d'environnements habituellement considérés comme étant particulièrement favorables et peu exposés aux risques climatiques (Allen et al., 2010).

Les plantes sont constamment assujetties aux contraintes environnementales des milieux qu'elles colonisent ainsi qu'à leurs aléas. Par processus de sélection, elles ont au cours de l'évolution mis en place des mécanismes d'adaptation et d'acclimatation efficaces assurant leur pérennité (Durand 2009). Les végétaux ont ainsi colonisé une grande surface du globe en s'adaptant à des milieux

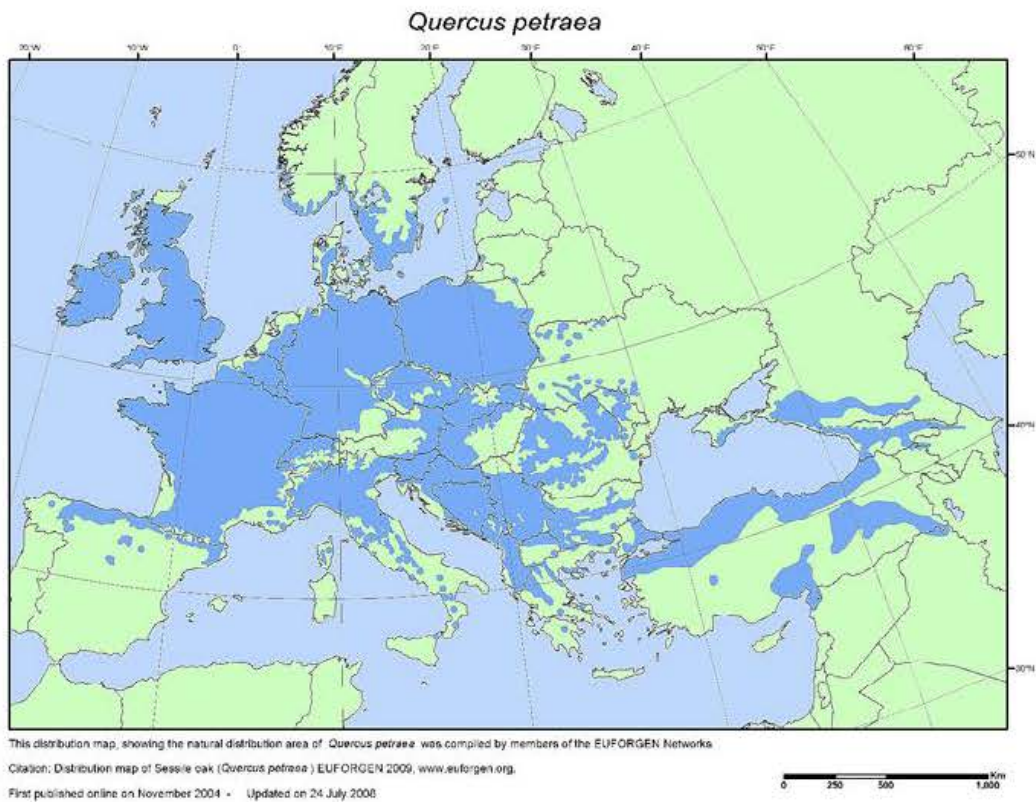
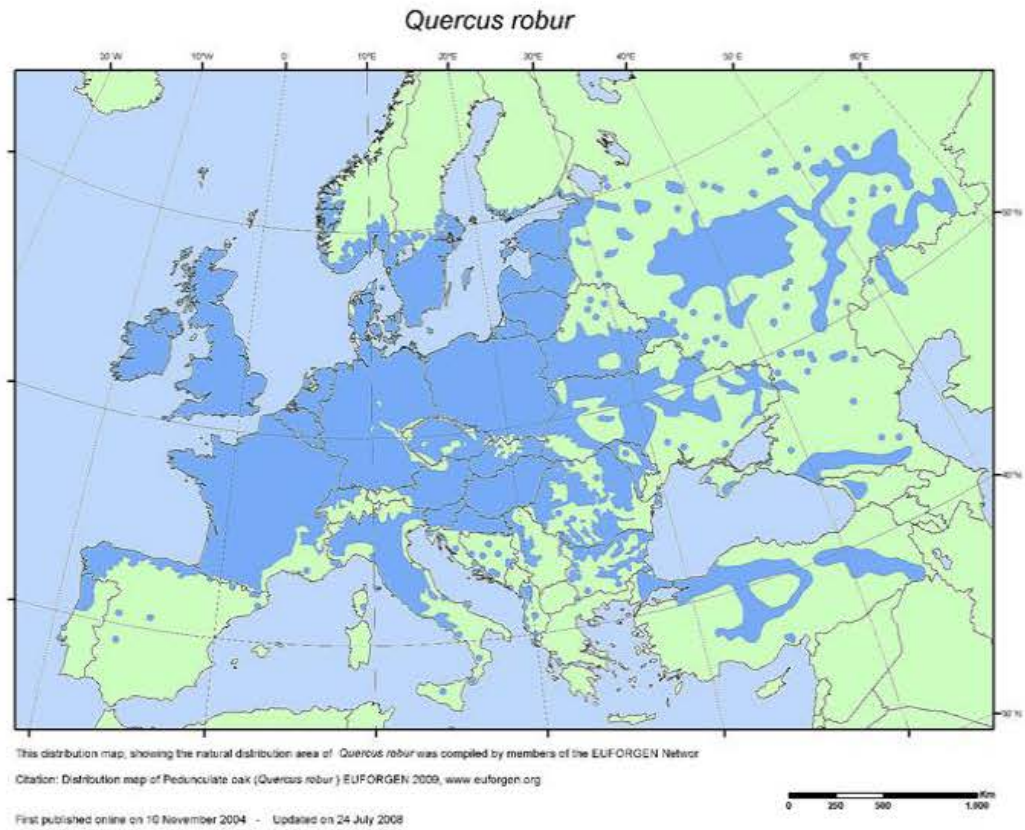
particulièrement divers. Il en résulte une remarquable diversité d'espèces. Parmi les contraintes biotiques et abiotiques déterminant les aires de répartition des espèces, la disponibilité en eau est sans conteste le facteur essentiel à l'installation et au développement des systèmes forestiers et plus largement du règne végétal. La sécheresse est la première cause environnementale à l'origine des chutes de productivité au sein des écosystèmes végétaux et constitue une menace pour la biodiversité mais aussi pour l'économie (Schulze et al., 1987 ; Chaves et al., 2002). En effet, il est par exemple estimé que la sécheresse ayant frappé l'Europe en 2003 fut à elle seule à l'origine de 16 milliards d'euros de pertes (European Environment Agency, 2017). Dans un contexte d'augmentation de la demande en bois due à la croissance démographique et économique ainsi qu'à la transition écologique vers des sources matérielles et énergétiques renouvelables, il ne fait aucun doute que la mitigation des effets de la sécheresse constituera un challenge majeur pour les écosystèmes forestiers et par extension pour l'Humanité.

### Le Chêne : sessile (*Q. petraea*) et pédonculé (*Q. robur*)

Parmi les écosystèmes forestiers, le chêne tient une place toute particulière. Au cours du temps, le chêne a endossé un rôle culturel majeur à travers de nombreux usages. A la fois source matérielle par son bois, alimentaire grâce aux glands qu'il produit, mais aussi d'énergie par ses propriétés combustibles, l'activité humaine s'est naturellement développée autour du chêne, celle-ci se déclinant sous bien des savoir-faire tels que la charpenterie ou la tonnellerie. Le chêne a ainsi imprégné notre culture, revêtant parfois un rôle sacré au sein de certaines civilisations (Grecques, Germanique, Slaves ou Celtes ; Aas et al., 2000) et devenant par endroits un symbole régional ou national affirmé. Plus qu'une ressource naturelle, le chêne est solidement enraciné dans notre patrimoine. Sa présence façonne aujourd'hui aussi bien nos paysages que notre imaginaire.

### Aires de répartitions

Parmi les représentants du genre *Quercus*, le chêne Pédonculé (*Quercus robur* L.) et le chêne Sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) sont les deux espèces sympatriques les plus communément répertoriées en Europe tempérée. Elles représentant à elles seules 22% de la production des essences forestières observées en France (soit 34% de la production des espèces feuillues) et recouvrent 5.4 millions d'hectares, soit 32% de la surface forestière française (IGN, 2018). Elles revêtent de fait une importance économique de premier ordre et constituent l'objet de recherche principal de ce travail de thèse. Les deux espèces ont colonisé une large aire de répartition s'étendant de la bordure Sud des pays scandinaves au Nord de la Méditerranée, parcourant l'Europe d'Ouest en Est de la péninsule ibérique jusqu'aux portes du Moyen-Orient. Ces essences sont néanmoins rarement répertoriées en régions alpines et septentrionales, dont les conditions climatiques s'éloignent de leurs niches écologiques de prédilection respectives.



**Figure 1** : Aires de répartition respectives de *Q.robur* et *Q.petraea* en Europe



### *Taxonomie du chêne et hybridation*

Le chêne regroupe un ensemble d'espèces d'arbres et d'arbustes appartenant au genre *Quercus* et à la famille des Fagaceae. La taxonomie des chênes (*Quercus spp.*) a intrigué et laissé perplexes de nombreux scientifiques au cours des siècles. Depuis Linnaeus qui en 1753 décrivait 12 espèces (Linnaeus, 1753) jusqu'à nos jours, la difficulté à déterminer les essences de chênes à travers l'Europe a maintes fois été soulevée. C'est en 1859 que Darwin dans son ouvrage « *On the origin of species* » mit en relief la complexité de la taxonomie du chêne (Darwin, 1859). Quelques années plus tard, Badington (1862) faisait état du même constat au sein des îles britanniques. De ces intrications taxonomiques résultèrent des fluctuations du nombre d'espèces reconnues au fil du temps, celui-ci atteignant son apogée dans le recueil « *Flora Europea* » (Schwarz's, 1964), faisant état de près de 320 différentes espèces. Ainsi la séparation d'ensembles d'espèces variés au sein d'unités taxonomiques à travers leurs plages géographiques constitue un domaine d'intenses recherches tout en suscitant le débat, la nature même de notion d'espèce étant toujours sujette à controverses (Mayr, 1942 ; van Valen, 1976 ; Manos et al., 1999). Par ailleurs, la propension de ces espèces à occuper des aires de répartition communes et donc leur caractère sympatrique ainsi que leur inter-fertilités donnent lieu à un brassage génétique important entre les espèces à l'origine d'individus hybrides combinant à la fois des traits physiologiques et morphologiques propres à chacune des deux espèces. L'ensemble de ces caractéristiques a donc pour conséquence d'accroître la difficulté de la tâche consistant à affiner la taxonomie du chêne ainsi que l'identification formelle des individus (Rushton, 1974, 1978). C'est avec l'avènement de la génétique que le corps scientifique a pu disposer des outils nécessaires résolvant ces difficultés en permettant la différenciation certaine des individus ainsi que de leurs hybrides. En effet, bien que les deux espèces affichent une forte proximité génétique à laquelle s'associe la complexité de détecter des marqueurs génétiques interspécifiques (Kremer & Petit, 1993 ; Petit et al., 1993), des régions génomiques clairement différenciées entre les deux espèces ont pu être identifiées (Bodénès et al., 1997). Il faut cependant noter que des efforts considérables de recherche ont été alloués avec succès à la différenciation morphologique des deux espèces (Dupouey, 1983 ; Dupouey & Badaeu, 1993 ; Ponton et al., 2004 ; Boratynski et al., 2008)

### *Gestion forestière*

En raison de ses nombreux usages, la demande en bois issu du chêne n'a cessé de croître, la gestion des populations de chênes a de fait des implications majeures dans la sylviculture moderne (Johnson et al., 2002). De par sa capacité à produire de larges volumes de bois utile, les populations de chênes sont fréquemment gérées soit sous la forme de futaies, soit de taillis (Hochbichler, 1993). La qualité de leur bois fait des chênes sessiles et pédonculés les espèces parmi les plus importantes d'un point de vue économique en Europe. Leur bois est notamment particulièrement apprécié en raison de sa dureté et de sa durabilité, il est donc largement utilisé pour la construction et la manufacture (Eaton

et al., 2016). Historiquement, le bois de chêne fut également la source matérielle principale utilisée pour la construction des navires (Jones, 1959). L'utilisation du bois de chêne est par ailleurs courante dans la réalisation des tonneaux de vin et de spiritueux, les composés tanniques du bois contribuant au développement des saveurs souhaitées par les maîtres de chai lors du vieillissement (Roloff et al., 2010). Le bois de chêne le plus précieux est produit au sein de peuplements mixtes à rotation longue (~150 ans) dont les sols sont riches en nutriments et en eau (Praciak, 2013). Ce type de gestion nécessite une attention toute particulière à la diversité d'espèces, leurs proportions ainsi que leur densité de population sur le site de production, ces paramètres ayant une grande influence sur la qualité du bois à travers le diamètre des troncs, la largeur des anneaux de croissance et la présence de nœuds dans le bois (Savill, 2013 ; Price, 2015).

Outre leurs nombreux rôles écosystémiques stabilisant les écosystèmes sous pression, les chênes constituent l'ossature aussi bien physique que biologique des sites qu'ils colonisent. Ils sont en effet le support de nombreuses espèces d'insectes et d'animaux dont ils constituent le foyer et/ou la source d'alimentation (Savill, 2013). Dotés d'une large plasticité de réponse aux perturbations environnementales, les chênes sessiles et pédonculés font montre d'une remarquable capacité d'acclimatation. L'un des enjeux majeurs pour la profession sylvicole au cours du XXI<sup>e</sup> siècle sera indubitablement l'adaptation de ses pratiques en adéquation avec le réchauffement climatique. L'ensemble des scénarii proposés par le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) y compris les plus optimistes, prévoit des changements significatifs de températures et de précipitations à l'échelle du globe. Si de nombreux dégâts sont à envisager au sein des forêts composées d'essences sensibles, le chêne plus tolérant à la sécheresse pourrait dans un premier temps profiter d'un avantage compétitif sur les autres espèces. Néanmoins face à l'ampleur et la rapidité des changements climatiques, cette plasticité de réponse à la sécheresse pourrait y compris chez le chêne atteindre ses limites. De fait, la réalisation d'études sur la réponse du chêne soumis aux contraintes environnementales futures est aujourd'hui cruciale afin d'apporter à la profession forestière les clés décisionnelles nécessaires à l'élaboration d'une stratégie forestière performante et adaptée.

## Notion de stress

Au sein d'un environnement soumis à de constantes fluctuations, une capacité d'adaptation rapide est fondamentale au bon maintien du fonctionnement des organismes en réponse aux divers stimuli et agressions auxquels ils ne peuvent se soustraire. A travers ces travaux de thèse, nous nous sommes attaché à décrire la réponse au stress hydrique des deux espèces sympatriques *Q. robur* et *Q. petraea*. Cependant, la notion de stress est pour le moins évasive, aussi dans un premier temps conviendrons-nous du sens premier que nous souhaitons associer à ce concept au sein de nos travaux de recherche.

La première définition à l'origine de l'acception moderne du concept de stress fut apportée par Hans Selye (1936), celui-ci décrivant le stress comme étant l'ensemble des réactions de l'organisme à une demande d'adaptation. Plus tard, Selye implémenta cette définition par le syndrome général d'adaptation. En outre, le syndrome général d'adaptation décrit les phases de réponse d'un système biologique face à un stress. L'ensemble du vivant manifeste ainsi une gamme de réponses au stress se traduisant par une stratégie d'évitement de la limitation du métabolisme, la protection du métabolisme primaire contre des perturbations fonctionnelles et structurales et finalement la réparation ou l'élimination des molécules endommagées (Pierce et al., 2005). Bien que cette définition fasse toujours référence, il est particulièrement fréquent dans la littérature traitant la réponse intégrée des plantes aux contraintes environnementales que le terme de stress arbore plusieurs acceptions désignant suivant le contexte l'état du système biologique, la réponse à la contrainte environnementale ou l'agent stressant lui-même (Durand thèse). Ainsi, par commodité de langage lorsque mentionnée dans ce manuscrit, la notion de stress désignera l'agent stressant. Nous parlerons également de plasticité de réponse ou de réponse au stress afin de décrire les processus physiologiques impliqués. Ce faisant, cette approche présente l'avantage de faciliter la description des différences entre espèces/groupes pour des niveaux de stress donnés.

L'ensemble du vivant afin de survivre se doit de maintenir un état de stabilité relative entre les composants de son milieu interne. Cet état est connu sous le terme d'homéostasie tel que proposé par Walter Bradford Cannon en 1932. Le concept d'homéostasie fait écho à la notion de stress ; tout facteur susceptible de perturber cet état équilibre peut être considéré comme un agent stressant et l'ensemble des mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie comme des réponses à ce stress. L'homéostasie et ses équilibres dynamiques revêtent donc une importance toute particulière en écophysiologie. La réponse à un stress se traduit par une plasticité phénotypique visant à rétablir un état de fonctionnement optimal et à l'équilibre d'un système biologique dans des conditions données. En absence de réponse à un agent stressant, c'est-à-dire lorsque le système biologique maintient son fonctionnement en dépit de la contrainte, nous parlerons de tolérance. Si en revanche le système biologique tend à se soustraire à l'agent stressant, nous parlerons de stratégie d'évitement. Lorsque l'intensité du stress aura dans un premier temps franchi les seuils de tolérance puis outrepassé les capacités d'évitement du système biologique, l'exposition au stress se soldera par la mort de l'organisme et donc par un échec en termes de fitness.

Les plantes sont des organismes sessiles, selon l'acception désignant comme sessile tout organisme vivant fixé sur son substrat. En conséquence, les plantes sont totalement assujetties aux variations de leur environnement, ne pouvant prendre la fuite. Or cet environnement est en constante évolution, de fait les espèces végétales opèrent rarement sous conditions optimales. Les plantes sont donc

constamment soumises à des situations de stress sans pour autant que celles-ci ne constituent une menace pour leur survie ou leur fonctionnement. Par ailleurs, Körner (2003) considère qu'un environnement stressant ne peut exister que si les espèces n'y sont pas adaptées. Selon cette logique il n'existerait donc pas d'environnements stressants à l'état naturel mais seulement des épisodes de stress associés par exemple à des événements climatiques extrêmes. En outre un stress est constitué d'une combinaison de plusieurs contraintes environnementales. Les plantes doivent ainsi intégrer des stimuli multiples aux voies de perception et de signalisation variées. Ainsi, le fonctionnement stomatique constitue un exemple de réponse plastique à une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques à la plante ; ce faisant les schémas de réponses stomatiques demeurent difficiles à résoudre. Ainsi, de nombreux signaux se conjuguent, nécessitant de placer le système biologique dans des conditions réalistes permettant de faire émerger des réponses ayant un sens biologique, nous nous attacherons à circonscrire ces travaux de thèse au stress hydrique. En effet, les végétaux ont développé des mécanismes de réponse propres à certains stress qu'il convient d'adresser au-delà du concept générique afin d'en saisir la spécificité.

### *Le stress hydrique*

L'eau (H<sub>2</sub>O), est une molécule fondamentale à la vie. Présente dans l'ensemble du Vivant, elle compose à elle seule jusqu'à 90% de la masse des végétaux. Au fil de l'évolution, les végétaux se sont affranchis des milieux aquatiques, colonisant peu à peu la surface terrestre. Par sa nature de solvant sélectif permettant de structurer des biopolymères mais aussi sa capacité à hydrolyser des liaisons atomiques des molécules générant ainsi de l'énergie chimique, l'eau est devenue par processus de sélections une molécule essentielle impliquée dans nombre des voies métaboliques particulièrement sophistiquées du Vivant. La photosynthèse en constitue un très bon exemple. L'eau est par ailleurs un milieu de diffusion stable de la chaleur ainsi qu'un dissipateur thermique efficace. Ces caractéristiques permettent au Vivant de conserver un équilibre thermique et de réguler l'activité enzymatique du métabolisme.

Le fonctionnement des végétaux est donc indissociable du régime hydrique auquel ils sont soumis. Tout changement de régime engendre de nombreuses conséquences physiologiques potentiellement stressantes pour les organismes (Schulze et al., 1987). La régulation stomatique des échanges gazeux foliaires permet les mouvements d'eau induits par la demande évaporative étant essentiels à la captation des minéraux du sol, au transport de la sève brute et élaborée au sein de la plante. L'eau agissant au cœur du fonctionnement des plantes, tout stress hydrique sera par ailleurs accompagné de stress secondaires tels que le stress osmotique ou le stress thermique à défaut d'une dissipation de chaleur suffisante par transpiration. Un stress hydrique peut être induit par deux modalités : l'excès ou la limitation en eau. Un excédent d'eau dans le substrat des végétaux provoquera un ralentissement

de la diffusion de l'oxygène vers les racines et par extension, l'hypoxie voire l'anoxie des tissus. L'état d'anoxie est défini comme le moment où la production d'ATP d'origine respiratoire devient négligeable par rapport à celle d'origine fermentaire, faute d'un apport en oxygène suffisant (Pradet et Bomsel, 1978). Il est notable que l'ensemble des végétaux supérieurs sont des organismes aérobies stricts incapables d'effectuer un cycle de développement en anoxie (Vartapetian, 1978). Néanmoins, les tissus végétaux sont en mesure de s'acclimater sans dommages irréversibles à des périodes d'hypoxie/anoxie plus ou moins longues.

La situation de stress hydrique par limitation de l'eau dans le sol peut quant à elle être induite soit par situation de gel rendant l'eau inaccessible à l'absorption racinaire, soit par absence due à l'évapotranspiration et/ou des précipitations insuffisantes. Ces deux cas peuvent induire une baisse drastique des teneurs en eau des tissus, qui par voie de conséquences sera à l'origine du stress. Face aux changements climatiques (IPCC, 2014), la sécheresse constitue la menace principale pesant sur les systèmes végétaux. Dans le cadre de ces travaux de thèses, nous traiterons le stress hydrique lorsque celui-ci est induit par une situation de sécheresse édaphique. Au sein de la nature, les conditions de stress sont induites par un déficit des précipitations. Néanmoins, les conséquences de ce déficit sont nettement influencées par différents facteurs tels que les propriétés physiques du sol, sa capacité de stockage et la demande évaporative de l'air, celle-ci étant hautement dépendante des températures ainsi que de l'humidité ambiante (Jones, 1992).

#### *Effet physiologique du stress hydrique*

Lorsque le stress hydrique est suffisamment intense pour induire une dessiccation des tissus, la perte d'eau peut être associée à une production de composés osmotiques au sein des cellules, une déformation des membranes ainsi qu'une perte de la pression de turgescence perturbant considérablement le comportement stomatique. Lorsque le stress est particulièrement sévère, l'intégrité membranaire peut alors être menacée et les protéines nécessaires au métabolisme dénaturées. L'ensemble de ces modifications fragilise l'état physiologique de la plante. En l'absence de mise en place de contre-mesures mitigeant l'impact du stress, l'activité photosynthétique de la plante s'en trouvera rapidement considérablement diminuée, réduisant la capacité de la plante à produire de la biomasse ainsi que les composés carbonés nécessaires à son métabolisme (Bréda et al., 2006). Plus précisément, la perte de turgescence provoque la déformation de la paroi cellulaire qui accompagnée d'une dessiccation induisent une polymérisation anormale des polysaccharides pariétaux (Moore et al., 2008). Par ailleurs, l'altération des photosystèmes ainsi que des antennes collectrices d'électrons par la sécheresse induira un stress oxydatif lui-même la cause de dommages moléculaires additionnels (Sanchez-Rodriguez et al., 2010). Il est également notable que l'activité du système antioxydant des plantes joue un rôle non négligeable dans le degré de tolérance des plantes

au stress hydrique et dans le comportement stomatique. Bien que les organismes végétaux disposent de stratégies de défense, le prolongement du stress accentue les risques d'accidents vasculaires par cavitation ainsi que la fragilisation du métabolisme entraînant alors la mort des individus (McDowell et al., 2008). Néanmoins, les végétaux sont généralement adaptés aux conditions hydro-climatiques auxquelles ils sont soumis, un niveau de stress létal est donc rarement atteint en conditions naturelles. Il n'est cependant pas rare d'observer des épisodes de dépérissement s'étalant sur plusieurs années au sein des populations de chênes d'Europe (Thomas et al., 2002).

#### *Tolérance et acclimatation au stress hydrique*

Par processus de sélection, les plantes ont pu mettre en place de nombreuses stratégies d'évitement afin de s'affranchir des effets délétères liés au stress hydrique. Chez de nombreux végétaux, l'adaptation à la sécheresse consiste avant tout à limiter les pertes en eau, y compris au détriment de leur croissance (McDowell et al., 2008). Il existe au sein du règne végétal un éventail d'adaptations anatomiques, physiologiques et biochimiques au stress hydrique (Bohnert et al., 1995). Face à l'exposition à la sécheresse, les phytohormones telles que la cytokinine, l'acide gibbérellique, l'auxine ou l'acide abscissique (ABA) sont impliquées dans l'adaptation au stress. A titre d'exemple, l'ABA synthétisé par les racines puis transporté au sein des feuilles joue un rôle déterminant dans la régulation des mouvements stomatiques et par voie de conséquence sur les échanges gazeux foliaires (Wilkinson & Davis, 2010).

Sur le plan morpho-anatomique, l'existence de la cuticule à la surface des tissus végétaux constitue probablement l'adaptation la plus efficace afin de limiter les pertes en eau ; ce trait fut par ailleurs essentiel à la colonisation des milieux terrestres par les végétaux. Chez les xérophytes, particulièrement tolérantes à la sécheresse, l'épaisseur mais aussi la composition de cette cuticule favorisent l'efficacité de son imperméabilisation. En raison de cette imperméabilisation, la quasi-totalité des échanges gazeux entre la plante et l'environnement ont lieu à travers les pores stomatiques. La disposition des stomates à l'abri du soleil sur la surface inférieure des feuilles ou enfoncés profondément dans l'épiderme ainsi qu'au sein de cryptes stomatifères au micro-climat plus humide permet de les protéger d'un environnement hostile (Hetherington & Woodward, 2003). L'investissement dans le système racinaire permet une meilleure prospection du sol en quête de nutriments et d'eau. Ce faisant, la plante est moins exposée à des potentiels hydriques du sol susceptibles de favoriser la cavitation des tissus vasculaires. En outre, une meilleure exploration du sol permet évidemment à la plante d'être plus difficilement touchée par un épisode de sécheresse, celle-ci ayant accès à une quantité d'eau accrue. Certaines espèces dont les phréatophytes se sont par exemple spécialisées dans la prospection en profondeur des sols atteignant parfois la nappe phréatique. Une autre stratégie consiste à réduire la surface transpirante afin de conserver l'eau. Il

n'est donc pas rare d'observer un phénomène d'abscission des feuilles ou des rameaux des arbres (Tardieu, 2005). Chez les plantes adaptées à la sécheresse, l'allocation préférentielle du carbone en faveur de l'appareil racinaire par rapport à la croissance aérienne permet entre autres d'assurer les deux fonctions de prospection et de limitation de la transpiration (Bréda et al., 2006 ; Markesteijn & Poorter, 2009).

Sur le plan physiologique les réponses des arbres à un faible potentiel hydrique du sol varient en fonction des espèces. Deux stratégies extrêmes sont possibles, l'une se traduisant par l'abaissement du potentiel hydrique des feuilles (réponse anisohydrique), l'autre par le maintien du potentiel hydrique au-dessus d'un certain seuil de tolérance (réponse isohydrique). Il existe par ailleurs un large éventail de stratégies intermédiaires (Tardieu, 1993 ; Tardieu & Simonneau, 1998 ; Ryan, 2011). Dans le cadre d'une stratégie isohydrique, la fermeture des stomates constitue une réponse systématique lors d'un déficit hydrique ayant pour effet le maintien d'un potentiel hydrique relativement constant au sein de la feuille. La sécheresse impacte également la photosynthèse en réduisant la surface foliaire mais aussi son efficacité par unité de surface. La réduction de l'activité photosynthétique peut être due à la fois à des restrictions métaboliques mais aussi à une limitation du CO<sub>2</sub> intra feuille par la fermeture stomatique (Tezara et al., 1999). Les restrictions métaboliques sous conditions de stress hydrique étant essentiellement liées au métabolisme du carbone photosynthétique (Lawlor & Cornic, 2002), l'efficacité de la photosynthèse dépendra des cycles de régénération de la RuBP et de l'activité de la RuBisCO (Medrano et al., 1997). La transition vers une voie d'assimilation du carbone de type C4 constituerait notamment une adaptation à des conditions hydriques contraignantes, permettant de réduire les pertes d'eau, la photorespiration et d'améliorer les performances photosynthétiques (Edwards & Walker, 1983). En sous-régime photosynthétique, l'excitation lumineuse induit l'accumulation de composés au potentiel oxydo-réducteur précurseurs des espèces oxygénées réactives à l'origine du stress oxydatif mentionné plus tôt dans ce manuscrit. Le stress oxydant est susceptible de causer des dégâts considérables à l'appareil photosynthétique (Lawlor & Cornic, 2002). Il existe néanmoins des mécanismes de photoprotection permettant de dissiper la chaleur issue de l'énergie lumineuse et la dissociation des photosystèmes des centres de réaction photosynthétique (Demming-Adams & Adams, 2006). La régulation des chaînes de transport des électrons est alors déterminante afin de limiter la formation du stress oxydant (Gratao & Polle, 2005). Par ailleurs, les plantes disposent d'une large gamme d'enzymes détoxifiantes (He et al., 2008) ainsi que d'antioxydants mobilisés en cas de stress hydrique (Selote & Khanna-Chopra, 2006).

Parmi les différents mécanismes de tolérance au stress hydrique, l'ajustement osmotique peut également être mobilisé. Il peut être défini comme le processus par lequel des composés osmotiques

s'accumulent au sein des cellules lorsque le potentiel hydrique baisse permettant le maintien de la turgescence cellulaire (Chaves & Oliveira, 2004). Sous conditions de stress, l'ajustement osmotique permet entre autres la conservation d'une conductance stomatique et d'une activité photosynthétique relativement élevées. Par ailleurs, à travers sa composante osmotique, le stress hydrique prolongerait le maintien de la croissance des végétaux ainsi que du volume hydrique des tissus foliaires (Serraj & Sinclair, 2002). Au-delà du stress, l'accumulation de certains composés osmotiques tels que la proline et la glycine jouerait également un rôle dans la détoxification des espèces oxygénées réactives occasionnant le stress oxydatif, assurant l'intégrité de la membrane cellulaire et la stabilisation de l'activité enzymatique (Ashraf & Foolad, 2007). Bien qu'il existe un ensemble de mesures osmo-protectrices, le stress provoque inévitablement une activité protéolytique lorsqu'il est prolongé (Simova-Stoilova et al., 2009). Indépendamment du stress oxydant, les espèces oxygénées réactives sont impliquées au sein de voies de signalisation diverses, notamment celles associées au comportement stomatique.

Bien qu'elle ne représente pas un mécanisme d'adaptation à la sécheresse en elle-même, la diversité génétique est susceptible de jouer un rôle déterminant dans la tolérance au stress d'une population (Tuberosa et al., 2003 ; Hamrick, 2004). A l'échelle interspécifique, il est clair que l'héritage de certains traits phénotypiques facilite la tolérance à la sécheresse (Adams & Kolb, 2005). Un tel phénomène est moins évident à au niveau intraspécifique. Néanmoins, chez de nombreuses espèces ligneuses, une diversité intraspécifique a été associée à la tolérance à la sécheresse, elle-même liée à la vulnérabilité à la cavitation (Kavanagh et al., 1999), la conductance hydrique (Comstock, 2000) ou l'efficacité d'utilisation de l'eau (Zhang et al., 1995 ; Roussel et al., 2009). Ce faisant, les populations affichant un haut degré de diversité génétique sont présumées être plus résilientes face au stress et potentiellement mieux préparées aux changements climatiques futurs (Hamrick, 2004 ; McDowell et al., 2008).

Si l'ensemble des mécanismes d'évitement et d'adaptation à la sécheresse devait s'avérer insuffisant, la mort des individus serait inexorable. Cependant, la mortalité en réponse au stress hydrique est un phénomène complexe. Il existe un nombre considérable d'études focalisées sur les origines de la mortalité chez les arbres, (Bossel, 1986 ; Bréda et al., 2006 ; McDowell et al., 2008). Parmi les causes possibles se dégagent trois hypothèses principales : celle de la mortalité induite par des agents biotiques, de la rupture du continuum hydrique au sein de la plante et celle de malnutrition carbonée (McDowell et al., 2008). En outre, l'hypothèse sous-jacente aux agents biotiques tels que les pathogènes ou les insectes ravageurs implique que les effets de la sécheresse induisent des changements démographiques chez les agents biotiques, qui indépendamment ou en conjonction des effets du stress hydrique fragiliseront l'organisme végétal (Manion, 1991 ; Fetting et al., 2007). Il est



par ailleurs prédit que les changements climatiques accentueront l'impact des agents biotiques sur la croissance et la mortalité des arbres (Tran et al., 2007). La mort par malnutrition carbonée serait induite par la réduction de l'activité photosynthétique due à une limitation stomatique. En absence d'un apport exogène en carbone, le métabolisme de la plante utilise ses réserves jusqu'à déplétion et arrêt total de son fonctionnement. Fragilisée, la plante est par ailleurs exposée aux agents biotiques (Marçais & Bréda, 2007). Finalement, la mortalité induite par rupture du continuum hydrique au sein de la plante est liée au phénomène de cavitation des tissus vasculaires. Une demande évaporative excessive couplée à un potentiel hydrique du sol extrême provoquent un risque d'embolie au sein des tissus stoppant la circulation des flux de sève nécessaires au fonctionnement des organismes. Les plantes adoptant une stratégie anisohydrique sont particulièrement sujettes à ce risque en raison de l'absence de régulation stomatique (West et al., 2008). Néanmoins, cette stratégie permet le maintien de l'activité photosynthétique pendant un épisode de stress.

Les conséquences de la mortalité des arbres induite par la sécheresse sont variables. Elles impactent avant tout le fonctionnement des écosystèmes et les cycles biogéochimiques qu'ils entretiennent avec leur environnement (Dale et al., 2000). En outre, la mortalité au sein de la canopée peut induire une réduction de l'assimilation photosynthétique du carbone à l'échelle de l'écosystème perturbant la fonction de puits de carbone stables des systèmes à l'équilibre (Kurz & Apps, 1999 ; Clark, 2004). L'éclaircissement au sein de la canopée est susceptible par la suite de provoquer une cascade d'interactions perturbant profondément les cycles hydriques et nutritifs des communautés végétales (Hughes et al., 2006). Bien que le changement climatique, à condition que celui-ci ne soit pas trop abrupt, puisse causer la migration des espèces sur le long terme, les événements généralisés de dépérissement des populations sont susceptibles de transformer radicalement les écosystèmes ainsi que leur fonctionnement (Mcdowell et al., 2008). L'étude des bases écophysologiques de ce phénomène constitue de fait un champ de recherche essentiel. Outre la capacité de l'humanité à mitiger les changements climatiques par des changements sociétaux profonds, la capacité d'adaptation et d'acclimatation des écosystèmes forestiers sera déterminante pour leur survie ainsi que le maintien de leur productivité. Dans cette optique, ainsi qu'au regard des risques croissants de stress hydrique, une stratégie prometteuse consiste à optimiser l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) des plantes.

### **L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE)**

L'efficacité d'utilisation de l'eau désigne le rapport entre la quantité de carbone assimilée par la photosynthèse et la quantité d'eau transpirée par la plante en retour. Au sein des systèmes forestiers, l'efficacité d'utilisation de l'eau établit le lien entre production de biomasse et gestion de l'eau par les plantes (Cernuzak et al., 2007a). Au regard des changements climatiques, l'efficacité d'utilisation

de l'eau permet d'établir les relations existantes entre les cycles de l'eau et du carbone qu'entretiennent les systèmes végétaux (Guehl et al., 1994). Ce trait physiologique suscite de fait un vif intérêt en agronomie ainsi qu'en foresterie (Bacon et al., 2004 ; Blum, 2009). L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) peut être intégrée à différentes échelles, raison pour laquelle plusieurs définitions de l'efficacité coexistent (Ponton et al., 2002 ; Cernuzak et al., 2007b ; Roussel et al., 2008,2009 ; Durand et al., 2019).

A l'échelle foliaire, l'efficacité d'utilisation de l'eau caractérise le ratio entre assimilation photosynthétique et pertes hydriques (Cowan & Farquhar, 1977). Il s'agit d'une mesure instantanée décrivant les échanges gazeux des plantes à un moment donné. Bien qu'il en existe deux acceptions, dans le cadre de ces travaux de thèse nous focaliserons notre approche sur l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i = A/g_s$ , exprimé en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  : Farquhar & Rashke, 1978 ; Meinzer et al., 1991) dans le but d'analyser des traits essentiellement dépendants de la physiologie de la plante. Où A est l'assimilation photosynthétique du carbone ( $A : \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) et  $g_s$ , la conductance stomatique pour la vapeur d'eau ( $g_s : \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). L'assimilation du  $\text{CO}_2$  (A) par la plante est le produit de la différence de fraction molaire de  $\text{CO}_2$  entre l'atmosphère et l'espace intracellulaire (respectivement  $C_a$  et  $C_i$ , toutes deux exprimées en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ air}$ ) et de la conductance stomatique pour le  $\text{CO}_2$  ( $g_c, \text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). En conséquence  $A=g_c*(C_a-C_i)$ . Par ailleurs, la vapeur d'eau diffuse 1.6 fois plus rapidement que le  $\text{CO}_2$ , de fait  $g_s=1.6*g_c$ . L'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque peut donc être exprimée telle que (Farquhar et al., 1982) :

$$W_i = A/g_s = (C_a - C_i)/1.6 = \left( C_a * \left( 1 - \frac{C_i}{C_a} \right) \right) / 1.6 \quad (1)$$

La seconde acception de WUE à l'échelle foliaire représente le ratio entre l'influx de  $\text{CO}_2$  dans la feuille (A) et l'efflux de vapeur d'eau par transpiration (E) au cours de la photosynthèse. Le calcul de la transpiration ne varie de la conductance stomatique que par l'intégration d'une composante environnementale ( $v : w_f - w_a$ , en  $\text{mmol H}_2\text{O mol air}^{-1}$ ) définie comme étant la différence entre la fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille ( $w_f : \text{mmol H}_2\text{O mol air}^{-1}$ ) et l'atmosphère ( $w_a : \text{mmol H}_2\text{O mol air}^{-1}$ ). Ce faisant, cet estimateur désigné « efficacité d'utilisation de l'eau instantanée » traduit le rapport A/E (avec  $E : g_s*v$ ) et s'exprime également en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ). L'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée peut donc être exprimée telle que :

$$W_{inst} = (C_a(1 - C_i/C_a)) / (1.6v) \quad (2)$$

A l'échelle « plante entière », l'efficacité est déterminée sur des périodes de temps variables. Cet estimateur de l'efficacité perd le caractère instantané des mesures foliaires pour comptabiliser l'accumulation de biomasse sèche (Bm) ainsi que l'eau consommée ( $\text{H}_2\text{O}$ ) sur une période donnée. Appelée « efficacité de transpiration (TE :  $\text{g Bm L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) », cette estimation de l'efficacité traduit

le fonctionnement à long terme des végétaux résultant de l'ensemble des processus physiologiques effectués par les plantes. Cependant l'estimation de TE est particulièrement contraignante puisqu'elle nécessite en effet de mettre en place un dispositif expérimental permettant de quantifier l'eau consommée ainsi que la récolte destructive du matériel végétal dans le but de déterminer la biomasse totale ayant été produite (Cernuzak et al., 2007b).

L'analyse spectrométrique des tissus biologiques permet de caractériser leur composition isotopique. Il existe deux isotopes stables du carbone :  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  dont les abondances naturelles varient. La composition isotopique en  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) d'un tissu résulte de la comparaison du ratio de ces deux isotopes pour le tissu biologique testé ( $R_{\text{tis}}$ ) à celui d'un échantillon standard ( $R_{\text{std}}$ ) :

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_{\text{tis}}}{R_{\text{std}}} - 1 \right) * 1000 \quad (3)$$

Néanmoins,  $\delta^{13}\text{C}$  est considérablement influencée par la fraction de  $\text{CO}_2$  dans l'air. Au cours de la fixation du carbone par les plantes, l'isotope  $^{13}\text{C}$  est discriminé en partie pendant les réactions de carboxylation associées à l'activité de la RuBisCO ainsi qu'au cours de sa diffusion à travers les tissus intercellulaires (Farquhar et al., 1989). Il existe tout un ensemble de processus de fractionnement contribuant à la discrimination des isotopes tels que de la dissolution et la diffusion du  $\text{CO}_2$  dans la phase liquide, la photorespiration ou la respiration nocturnes (Farquhar et al., 1989).

La discrimination isotopique du carbone ( $\Delta$ ) est définie de la manière suivante :

$$\Delta(\text{‰}) = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plante}}) / (1000 + \delta_{\text{plante}}) * 1000 \quad (4)$$

Farquhar et al., (1982) ont défini chez les plantes à métabolisme C3 un modèle pour cette même discrimination sur la base de deux principaux processus de fractionnement isotopique : la diffusion du  $\text{CO}_2$  à travers les stomates (a) et la carboxylation du ribulose bisphosphate par la RuBisCO (b). Il en résulte l'équation suivante :

$$\Delta = a + (b - a) * (C_i / C_a) \quad (5)$$

En raison de l'augmentation rapide de la concentration de  $\text{CO}_2$  liée à l'activité anthropique au cours de l'ère industrielle, la composition isotopique de l'air pour le carbone a considérablement évolué (Keeling et al., 1979). Par ailleurs, d'autres variables influencent cette concentration telles que la position au sein de la canopée (Schleser & Jayasekera 1985, Berry et al. 1997, Hanba et al. 1997), la précession des saisons (Mook et al., 1983) ou encore l'influence du nyctémère (Szaran, 1998). Ces évolutions nécessitent d'être prises en compte dans le cadre de l'étude comparative de mesures de la composition isotopique réalisées à des dates éloignées (Ponton et al., 2002). Cependant, dans le cadre de nos travaux, nous avons réalisé des mesures de la compositions isotopique foliaire sur des

individus juvéniles ayant été isolés au sein d'une serre, nos mesures ne devraient donc pas souffrir de ces contraintes expérimentales.

Dans le cadre de ces travaux de thèse nous avons exploré la diversité et la plasticité de WUE à travers ces différentes échelles, à savoir au niveau foliaire instantané : l'efficacité d'utilisation de l'eau, au niveau « plante entière » intégrée dans le temps l'efficacité de transpiration et la composition isotopique foliaire.

### *Intégration à différentes échelles*

En raison des relations existantes entre le rapport  $C_i/C_a$  et les deux estimateurs  $W_i$  et  $\Delta$  (respectivement 1 et 5),  $\Delta$  est négativement corrélé à l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque et positivement au rapport  $C_i/C_a$ .

$$W_i = A/g_s = (C_a/1.6) * ((b - \Delta)/(b - a)) \quad (6)$$

Cette relation théorique entre  $\Delta$  et  $W_i$  a été validée expérimentalement. Des corrélations négatives entre  $\delta$  et  $W_i$  ont ainsi été observées chez de nombreuses espèces herbacées (Farquhar et Richards, 1984 ; Hall et al., 1994) mais aussi ligneuses (Ehleringer, 1993, Sun et al., 1996) dont le chêne (Guehl et al., 1995 ; Ponton et al., 2001 ; Roussel et al., 2009). Suivant les cas, les mesures de composition isotopique des tissus végétaux peuvent ainsi constituer un outil fiable et pratique de l'estimation de WUE intégrée dans le temps.

Farquhar et Richards (1984) ont également établi une relation permettant de lier efficacité de transpiration (TE) et efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ).

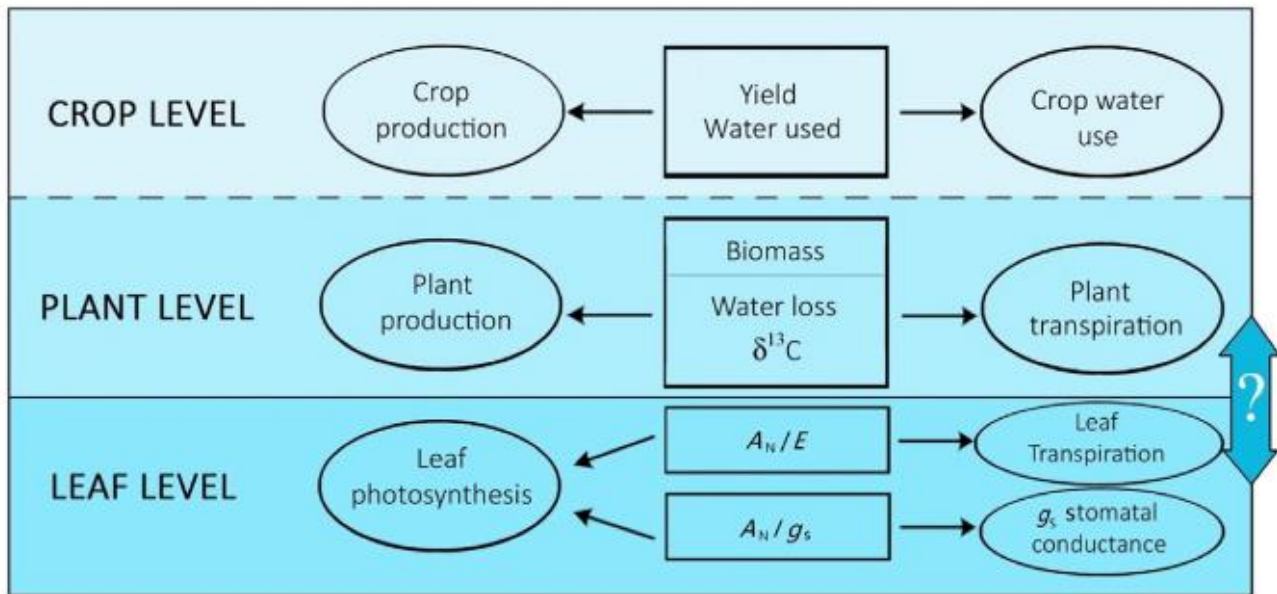
$$TE = (A/g_s) * (1/v) * (12/18 k) * (1 - \varphi) \quad (7)$$

D'après cette équation TE dépend alors des échanges gazeux foliaires, de la différence de pression de vapeur d'eau intégrée sur la période de temps d'estimation de TE, de la concentration en carbone de la plante (le rapport 12/18 désignant le ratio des masses molaires du carbone et de l'eau et k le rapport entre la masse de carbone et la masse végétale totale) et la proportion du carbone fixé dégagée par les processus non photosynthétiques ( $\varphi$ ).

De la même façon, il est possible de lier  $\Delta$  et TE :

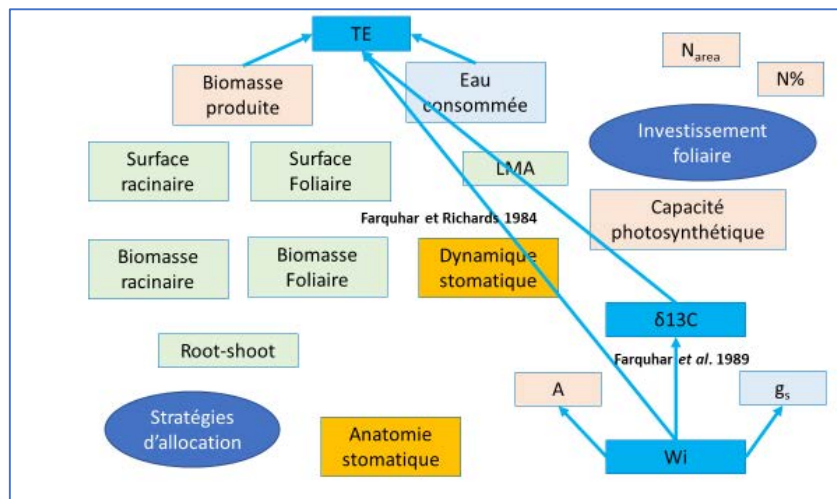
$$TE = (C_a/1.6 v) * ((b - \Delta)/(b - a)) * 12/18 k * (1 - \varphi) \quad (8)$$

Ainsi WUE peut être estimée à l'aide de différents estimateurs intégrés à des échelles spatiales et temporelles variables. L'utilisation privilégiée d'un estimateur dépend avant tout des contraintes liées au dispositif expérimental et de l'échelle à laquelle l'étude souhaite caractériser l'efficacité d'utilisation de l'eau.



**Figure 2 :** Visualisation des différentes échelles d'intégration de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) de la feuille à un système agricole/forestier. La double flèche indique le manque de connaissance sur la complexité des relations liant les différents estimateurs de l'efficacité (D'après Medrano et al., 2015).

Bien qu'il existe des relations théoriques entre ces différentes échelles d'estimation de l'efficacité de l'eau, celles-ci ne sont pas systématiquement validées expérimentalement. Il ne faut par ailleurs pas négliger le fait que les relations entre  $\Delta$ , TE et  $W_i$  sont dépendantes des biais de mesure inhérents à leurs méthodes d'acquisition. Les possibilités d'intégration temporelle de l'échelle instantanée à l'échelle de la saison de végétation et spatiale de l'échelle de la feuille à l'échelle de l'individu que permet l'utilisation des isotopes confèrent bien plus qu'une simple valeur d'estimateur de WUE à la discrimination isotopique mais une très forte potentialité d'outil de criblage écologique. Il est donc nécessaire d'étudier la fiabilité de l'extrapolation d'une échelle à une autre à travers la caractérisation des relations entre les différents estimateurs de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE : fig 2, 3). Dans les cas où celles-ci sont établies expérimentalement, les mesures de composition isotopique des tissu végétaux peuvent être considérées comme des estimations à long-terme de l'efficacité reflétant le compromis réalisé entre la maximisation des gains de carbone par l'assimilation et la minimisation des pertes associées à la transpiration (Ehleringer, 1993). De fait, de nombreux traits physiologiques et/ou anatomiques sont susceptibles d'être associées à la variabilité de  $\delta^{13}C$ . La composition isotopique constitue ainsi un indicateur du fonctionnement physiologique de la plante sous les conditions environnementales prévalentes lors de l'assimilation du carbone atmosphérique (Ehleringer & Cerling, 1995 ; Ponton et al., 2002).



**Figure 3:** Relations entre les différents estimateurs de l'efficacité ( $W_i$ ,  $\delta^{13}C$ , TE) et leurs composantes respectives (matérialisées par des flèches bleues).

### *Déterminisme génétique et environnemental de l'efficacité d'utilisation de l'eau*

La variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau est tributaire d'un déterminisme génétique et environnemental. En effet, l'ensemble des facteurs contribuant à la diffusion du  $CO_2$  depuis l'atmosphère jusqu'aux sites de carboxylation ainsi que la carboxylation elle-même influencent potentiellement WUE. De fait l'ensemble des paramètres environnementaux ayant un impact sur la régulation des échanges gazeux foliaires est susceptible d'impacter l'efficacité (Ponton et al., 2002). Ces types d'influences ont par ailleurs été mises en évidence expérimentalement, telles que l'augmentation de la concentration de  $CO_2$  qui est associée à une augmentation de WUE (Guehl et al., 1994 ; Cernuzak et al., 2019) ou l'impact de la disponibilité en eau du sol (Picon et al., 1996a ; Ponton et al., 2002) ou encore les conditions d'éclairement (Ponton et al., 2002). Outre le déterminisme environnemental, la diversité génétique est étroitement liée à l'efficacité d'utilisation de l'eau aussi bien chez les herbacées (Farquhar & Richards 1984 ; Hall et al., 1944) que chez les espèces ligneuses (Roussel et al., 2001 ; Brendel et al., 2008 ; Marguerit et al., 2014). Des régions du génome (loci) à effets quantitatifs associés à la variabilité phénotypique de WUE ont par ailleurs pu être identifiés (Brendel et al., 2002 ; Torti et al., 2005 ; Brendel et al., 2008 ; Marguerit et al., 2014). Cette approche génétique constitue un atout majeur pour la sélection d'individus visant à optimiser les traits associés à une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau.

### *Composantes de l'efficacité*

A l'échelle foliaire comme précédemment définie, l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ) est dissociable en deux composantes : l'assimilation de  $CO_2$  (A) et la conductance stomatique pour la vapeur d'eau ( $g_s$ ). Ainsi la variabilité de  $W_i$  entre individus et/ou espèces est associée aux variations de l'une ou l'autre de ces composantes soit aux deux. A travers une approche corrélative il est possible de déterminer l'influence des composantes de l'efficacité sur celle-ci. Il est alors possible de dégager

plusieurs cas de figure. En outre si les variations de  $A$  et  $g_s$  se compensent il ne sera pas possible de détecter une relation entre  $W_i$  et ses composantes. En revanche une relation négative entre  $W_i$  et ses deux composantes signifie que la variabilité de  $g_s$  est supérieure à celle de  $A$  (e.g., Thèse de Magali Roussel sur *Q. robur*). A contrario, une relation positive entre  $W_i$  et ses composantes serait le signe d'une variabilité de  $A$  supérieure à celle de  $g_s$ . Néanmoins, il n'est pas chose aisée que de dissocier les effets de l'une ou l'autre de ces composantes sur l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque, celles-ci étant généralement fortement corrélées positivement (Lauteri et al., 1997 ; Roussel et al., 2009 ; Marguerit et al., 2014). Il est cependant possible d'explorer l'influence des composantes de l'efficience à travers des facteurs physiologiques et structuraux dont la variabilité a elle-même été associée à celle de  $A$  et de  $g_s$ .

L'assimilation nette de  $CO_2$  ( $A$ ) est elle-même tributaire de processus fondamentaux impliqués dès la captation et la transduction des signaux lumineux, la diffusion du  $CO_2$  à travers les tissus végétaux jusqu'aux cellules assimilatrices et enfin l'ensemble des réactions biochimiques nécessaires à ces différentes étapes. De facto un ensemble de traits physiologiques et/ou anatomiques sont susceptibles d'être associés à la variabilité de l'assimilation. Chez le chêne sessile la masse surfacique foliaire (LMA) présente par exemple une forte variabilité intraspécifique (Bruschi et al., 2003a, 2003b). Par ailleurs l'épaisseur des feuilles est associée à un taux d'assimilation plus important (Terashima et al., 2001), cet état de fait créant potentiellement des disparités entre feuilles de lumière et feuilles d'ombre au sein de la canopée. Afin d'atteindre le site actif de la RubisCO pour y être assimilé, le  $CO_2$  atmosphérique doit diffuser à travers plusieurs composantes aux propriétés conductrices pour le  $CO_2$  variables : la couche limite, le stomate et le mésophylle. La conductance de couche limite est essentiellement dépendante de la morphologie foliaire et de sa structure en surface mais aussi et surtout du flux laminaire de l'air à la surface de la feuille. Ayant diffusé à travers la cavité stomatique (la conductance stomatique développée plus en avant), la conductance mésophyllienne régit le gradient de  $CO_2$  entre cette cavité et le milieu intracellulaire de la plante, séparés l'un de l'autre par le plasmalemme et les membranes chloroplastiques (Farquhar et al., 1980). Cette succession de conductances détermine ainsi la quantité de  $CO_2$  disponible à la photosynthèse (Von Caemmerer et al., 2004). Néanmoins, à ces contraintes de diffusion s'additionnent des limitations biochimiques imposées par d'une part l'activité de la Ribulose 1,5 bispohosphate Carboxylase Oxygenase (RubisCO) et la régénération du Ribulose 1.5 bisphosphate nécessaire à cette activité. Cette régénération est elle-même dépendante du transport d'électrons et donc associée à l'ensemble des processus impliqués dans la captation des stimuli lumineux environnementaux ainsi que dans leur transduction. En outre l'activité de la RubisCO et donc l'assimilation du Carbone peut être limitée par la vitesse maximale de carboxylation de la RubisCO ( $V_{max}$ ) et le flux maximal d'électrons à lumière saturante ( $J_{max}$ ). Il est par ailleurs notable que chez certaines espèces 75% de l'azote organique foliaire peut être attribué

à l'activité photosynthétique (chlorophylle, enzymes du cycle de Calvin ou encore protéine des thylakoïdes : Evans, 1989). En outre, la RubisCO représente à elle seule jusqu'à 40% de cet azote (Evans, 1989). De fait une carence en azote de la plante peut avoir des conséquences significativement délétères sur la capacité photosynthétique des végétaux et donc par extension sur leur aptitude à assimiler le CO<sub>2</sub> atmosphérique nécessaire au métabolisme et la production de biomasse.

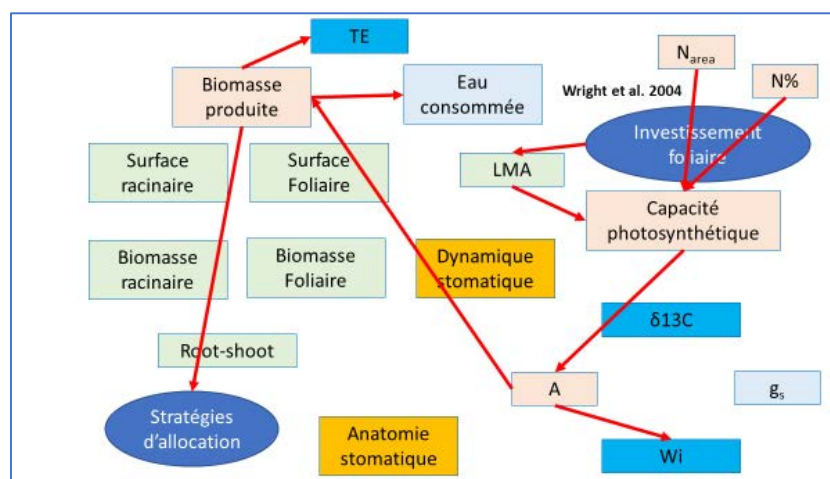
La conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g<sub>s</sub>) résulte du degré d'ouverture des stomates dont le rôle est d'optimiser les échanges gazeux au sein d'environnements changeants (Cowan et Farquhar, 1977). Par jeu de pression de turgescence en réponse aux facteurs environnementaux, les stomates sont animés d'un mouvement d'ouverture ou de fermeture (dont la dynamique est traitée plus en détail dans le second chapitre de ce manuscrit). Parmi ces stimuli, la lumière à travers son intensité et la qualité de son spectre (Sharkey & Raschke, 1981), la température ou encore le déficit de pression de vapeur d'eau entre la plante et l'atmosphère (Mott, 1988) sont déterminants. Par ailleurs des facteurs internes à la plante sont également susceptibles d'intervenir dans la régulation de la conductance stomatique, tels que l'intervention de phytohormones dont l'acide abscissique (ABA) ou encore l'accumulation de composés osmotiques. Il existe ainsi de nombreuses voies de signalisation stomatiques permettant de maintenir les fonctions fondamentales que sont l'assimilation du carbone atmosphérique et la régulation des pertes hydriques. Outre les considérations environnementales et les facteurs physiologiques intrinsèques à la plante, la morphologie des stomates et leurs propriétés mécaniques sont également à prendre en compte (Franks & Farquhar, 2007). Ainsi, la forme, la taille ou encore la densité des stomates (Aasamaa & Sober, 2011 ; Drake et al., 2013) mais aussi la pression mécanique exercée par les cellules épidermiques sur les cellules de garde influencent la conductance stomatique. Il ne faut par ailleurs pas négliger le fait que la conductance cuticulaire est intégrée aux mesures de conductance stomatique. Une proportion de l'eau perdue n'est donc pas directement imputable à la régulation stomatique, celle-ci pouvant atteindre jusqu'à 30% de la conductance totale d'une feuille pour la vapeur d'eau (Boyer et al., 1997). En outre les modifications de l'expression de certains gènes (Hetherington, 2001) ou encore du trafic membranaire (Blatt, 2000) peuvent être impliquées dans les mouvements stomatiques et d'eau qui en sont à l'origine. S'agissant par ailleurs de flux et d'efflux d'eau par jeu de pression de turgescence, il apparaît évident que le statut hydrique de la plante et par extension la disponibilité en eau de l'environnement seront essentiels au fonctionnement stomatique.

A l'échelle supérieure « plante entière » intégrant les échanges gazeux foliaires dans le temps, l'efficacité de transpiration traduit le compromis réalisé par les plantes entre gain de biomasse et l'ensemble de l'eau transpirée sur la même période. Ainsi, une faible consommation hydrique et une forte accumulation de biomasse seront à l'origine de fortes efficacités de transpiration. L'efficacité



de transpiration revêt donc par essence un intérêt stratégique en sylviculture ainsi qu'en agronomie, depuis longtemps associé à des programmes de sélection. Cet intérêt est d'autant plus prégnant au regard des changements climatiques actuels qui exercent une pression de sélection de plus en plus intense sur la capacité des arbres à maintenir leur croissance tout en limitant leur consommation en eau au sein d'un environnement de stress. En outre, un individu à la forte efficacité d'utilisation de l'eau essentiellement associée à une forte productivité ne sera pas nécessairement avantagé en cas de sécheresse. Si l'accumulation de biomasse est par définition une composante de l'efficacité de transpiration, l'allocation du carbone à l'origine de cette biomasse est un élément fondamental à prendre en considération. En effet, les schémas d'allocation du carbone constituent un facteur essentiel impliqué dans l'écologie des espèces (Figure 4). Une forte croissance aérienne s'effectue au détriment du développement racinaire, maximisant la surface transpirante tout en limitant potentiellement la capacité de prospection des sols et donc l'accès à l'eau de la plante. Dans le but d'adresser plus finement l'écologie des espèces ainsi que la différenciation de leurs niches écologiques respectives, il convient dès lors de caractériser ces schémas ainsi que la plasticité de ceux-ci sous des conditions de stress (notamment hydrique).

En raison du grand nombre de traits impliqués dans la décomposition de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) à ses différentes échelles d'intégration, WUE est un caractère complexe. La décomposition de WUE constitue de fait une approche prometteuse afin de mieux comprendre les traits et processus impliqués dans la différenciation écologique de *Q. robur* et *Q. petraea* ainsi que leurs possibles divergences de plasticité de réponse à la sécheresse.



**Figure 4 :** liens théoriques entre stratégies d'investissement foliaire (pourcentage d'azote N% ; masse surfacique des feuilles LMA et capacité photosynthétique), estimateurs de l'efficacité (Wi, TE) ainsi que leurs composantes respectives (A, Biomasse produite et eau consommée) et *in fine* les stratégies d'allocation du carbone réalisées par les plantes. Les flèches rouges matérialisent les relations supposées entre différentes variables étudiées.

## Objectifs

Dans un contexte annonçant des bouleversements climatiques majeurs, la compréhension des mécanismes grâce auxquels les plantes s'adaptent à leurs milieux constitue la clef de voûte de la recherche environnementale. *Q. robur* et *Q. petraea* sont deux espèces ligneuses particulièrement répandues en Europe. Bien que celles-ci partagent parfois les mêmes sites de population, la littérature s'accorde sur le fait qu'il existe une distinction nette entre les niches écologiques de ces deux espèces associées à leur comportement vis-à-vis de la disponibilité en eau des sites qu'elles colonisent. Ces études tendent par ailleurs à mettre en évidence une efficacité d'utilisation de l'eau supérieure chez *Q. petraea* susceptible de procurer un avantage sélectif face au stress hydrique. Face au dérèglement climatique, l'optimisation de l'efficacité d'utilisation de l'eau semble constituer un trait adaptatif déterminant dans l'acclimatation à la sécheresse. De nombreux travaux ont été entrepris dans le but de caractériser les divergences écologiques existantes entre *Q. robur* et *Q. petraea*. L'objectif principal de notre synthèse s'inscrivait dans la continuité de ces précédents efforts de recherche.

Afin de comprendre les mécanismes physiologiques et morphologiques à l'origine de la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau estimée à différentes échelles d'intégration, deux expérimentations de sécheresse contrôlée ont été menées en 2015 et 2017, explorant les différences interspécifiques d'utilisation de l'eau chez des individus juvéniles. En 2015 dans le but de favoriser l'expression d'une variabilité interspécifique à caractère génotypique, des jeunes plants originaires de la même région de peuplement se sont développés en serre dans des conditions identiques. Une partie de ces plants fut exposée à un stress hydrique dans le but de caractériser la plasticité de réponse de l'efficacité d'utilisation de l'eau à la sécheresse. En 2017, une seconde étude comparative fut menée, cette fois sur des provenances multiples dans le but d'élargir la gamme de variabilité intraspécifique. L'ensemble de ces jeunes plants fut alors assujéti à un stress hydrique progressif dans le but d'en caractériser l'impact sur la croissance et les échanges gazeux dans le temps.

En complément de ces études comparatives fut menée en 2016 une troisième expérimentation axée sur *Q. petraea*. Des jeunes plantes issues de provenances sélectionnées le long d'un gradient environnemental de stress hydrique ont grandi en serre. La moitié de ces plants fut exposée à un stress hydrique au cours de leur développement. Sur cette base expérimentale nous avons alors exploré la nature des traits anatomiques et physiologiques sous-jacents à l'efficacité d'utilisation de l'eau intégrée à différentes échelles chez le chêne sessile.

Par ailleurs, au cours de ces trois expérimentations il fut décidé d'employer une approche par description de la dynamique de réponse stomatique afin d'en explorer les possibles implications éco-physiologiques chez *Q. robur* et *Q. petraea*.

En résumé, l'ensemble de nos travaux avait vocation à répondre à ces trois questions principales :

*Existe-t-il des différences d'utilisation de l'eau conservées à différentes échelles d'intégration entre *Q. robur* et *Q. petraea* susceptibles d'expliquer les divergences entre leurs niches écologiques respectives ?*

*Quelles sont les traits physiologiques et anatomiques à l'origine de la variabilité des différents estimateurs de l'efficacité d'utilisation de l'eau ?*

*La dynamique de réponse stomatique en réponse à des stimuli environnementaux joue-t-elle un rôle significatif dans les échanges gazeux intégrés sur le long terme chez ces deux espèces ?*

La synthèse qui suit s'articule autour de quatre publications correspondant à quatre expérimentations distinctes menées entre 2015 et 2017. Le second chapitre de ces travaux constitue un chapitre introductif à la modélisation dynamique de la réponse stomatique et ses implications sur le fonctionnement intégré des plantes en utilisant une plante modèle, le tabac. Le troisième chapitre fait état des résultats obtenus dans le cadre de deux études comparatives explorant les divergences écologiques entre *Q. robur* et *Q. petraea* en réponse à un stress hydrique. Le quatrième chapitre explore plus particulièrement les causes physiologiques et/ou anatomiques de la variabilité intra-spécifique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le chêne sessile. Enfin, la question de la description dynamique de la réponse stomatique ayant été abordée dans l'ensemble de ces publications, un bilan final en est dressé en amont d'une synthèse de l'ensemble de nos travaux et des perspectives concluant ce mémoire.

## Chapitre II méthodologique : Modélisation dynamique de la réponse stomatique

### Introduction

Ce second chapitre fait office d'introduction méthodologique au modèle dynamique utilisé durant l'ensemble de ces travaux de thèse afin de décrire la réponse temporelle des stomates à des stimuli environnementaux.

Les stomates sont des pores répartis sur l'ensemble de la surface foliaires des végétaux. En fonction des espèces, les stomates sont situés sur les faces adaxiales et abaxiales des feuilles, certaines plantes disposant de stomates sur ces deux faces tandis que d'autres n'en possèdent que sur l'une d'entre elles, à l'instar des deux espèces de chênes faisant l'objet de ce travail de thèse dont les feuilles sont pourvues de stomates uniquement sur la face abaxiale. Ceux-ci jouent un rôle essentiel dans le contrôle des échanges gazeux foliaires des plantes en régulant à la fois les pertes en eau par transpiration et l'entrée du CO<sub>2</sub> atmosphérique nécessaire à l'assimilation par photosynthèse. Par ailleurs, la surface foliaire restante est recouverte d'une fine couche cuticulaire relativement imperméable. De fait, les stomates constituent une interface privilégiée entre les plantes et leur atmosphère à travers laquelle la majorité des échanges gazeux sont réalisés (Taiz & Zeiger, 2006). Indirectement, les stomates jouent également un rôle de refroidissement des feuilles à travers la transpiration.

A chaque instant les stomates sont caractérisés par un certain degré d'ouverture régulé par la différence de pression de turgescence entre les cellules de garde accompagnant les stomates et les cellules épidermiques, résultant de facteurs à la fois internes et externes à la plante / de l'état physiologique de la plante en réponse à son environnement. Ce degré d'ouverture permet la circulation des gaz au sein de la cavité sous stomatique et leur diffusion à travers la plante se traduisant en conductance stomatique pour l'eau et le CO<sub>2</sub>. Ainsi, un fort degré d'ouverture favorisera la diffusion des gaz et donc une conductance stomatique plus élevée, à l'inverse, une faible ouverture des stomates limitera les échanges entre la plante et son atmosphère. Le degré d'ouverture des stomates ainsi que la conductance stomatique qui en résulte sont sensibles à de multiples influences environnementales. La réponse des stomates au microclimat local (statut hydrique de la plante, la quantité de lumière ainsi que la qualité du spectre lumineux, humidité de l'air, température, [CO<sub>2</sub>] atmosphérique) a donc été extensivement étudiée et les réponses à ces facteurs, finement décrites (Jarvis, 1976 ; Jones, 1992, 1998 ; Monteith, 1995). Cependant, le développement d'approches intégratives complètes intégrant la réponse stomatique à de multiples facteurs environnementaux demeure entravé par la complexité de leurs interactions ainsi que des possibles couplages entre ces

différents facteurs, auxquels s'additionne le fait que l'ensemble des mécanismes impliqués dans la captation, la transduction et la traduction des stimuli environnementaux en une réponse stomatique finale n'aient pas encore été totalement élucidés. Ainsi, régulée aussi bien par des signaux intrinsèques que par les interactions que la plante entretient avec son environnement, la pression de turgescence du complexe stomatique fluctue constamment au cours du cycle journalier des végétaux résultant en mouvements d'ouvertures et de fermetures d'amplitudes et de rapidités variées.

### Description de la dynamique de réponse stomatique ( $g_s$ )

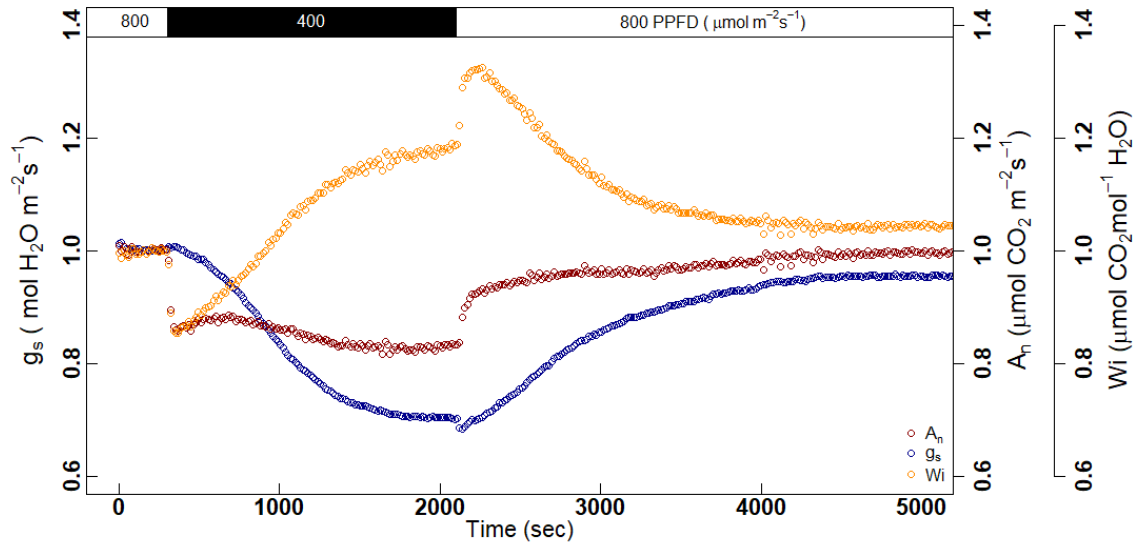
La modélisation constitue un outil particulièrement adapté et efficace à des fins prédictives, de simulation et d'intégration à des échelles diverses. De fait, l'assimilation du carbone atmosphérique par photosynthèse ainsi que les pertes hydriques par transpiration, respectivement estimées à travers la conductance pour le  $CO_2$  et  $H_2O$ , s'inscrivent parmi les fonctions physiologiques ayant été massivement sujettes à modélisation au cours des dernières décennies (Damour et al., 2010). Les échanges gazeux entre les plantes et l'atmosphère ont ainsi été modélisés à des échelles et temporalités diverses. En écologie, certaines approches consistent à décrire la réponse globale d'un système végétal. Néanmoins, cette échelle d'approche ne permet généralement pas d'appréhender les mécanismes impliqués dans la réponse stomatique aux conditions environnementales. A une échelle réduite, de nombreux modèles intégrés uniquement au niveau de la plante ou de la feuille ont été proposés (Damour et al., 2010). La majorité de ces modèles sont empiriques, basés sur les corrélations statistiques entre les facteurs environnementaux, internes aux plantes et la conductance stomatique ( $g_s$ ). Par ailleurs, seule une faible proportion de ces modèles adopte des approches fondamentalement mécanistiques. La littérature dispose ainsi de nombreux modèles semi empiriques reposant sur des hypothèses physiologiques et intégrant un nombre variable de facteurs influant sur le degré d'ouverture stomatique. La majorité des modèles développés sont des modèles dits « steady states » n'intégrant pas le délai de réponse des stomates à un changement environnemental. La réponse temporelle des stomates à un changement environnemental a longtemps été négligée malgré quelques travaux préliminaires (Kirschbaum et al., 1988). Ce n'est que récemment que des modèles décrivant plus finement la dynamique de réponse stomatique ont été proposés (Damour et al., 2010 ; Vialet-Chabrand et al., 2013b). En effet, établir clairement l'ensemble des mécanismes impliqués dans la réponse des stomates à leur environnement, comprendre l'ensemble des couplages et interactions des différents stimuli et intégrer la vitesse de réponse à laquelle les plantes répondent à ces stimuli pourrait alors revêtir une importance majeure dans un contexte de changements climatiques afin d'anticiper la manière dont les stomates intégreront les changements en  $[CO_2]$ , température, humidité de l'air et du sol.

## Impacts de la dynamique de réponse stomatique sur les échanges gazeux foliaires

Les stomates contrôlent les échanges gazeux entre la feuille et l'environnement. En conséquence, les ajustements de l'ouverture stomatique aux changements de conditions environnementales et des facteurs internes à la plante déterminent la diffusion de CO<sub>2</sub> au sein de la feuille ainsi que la perte d'eau par transpiration (Lawson, 2018). De fait, la régulation des flux gazeux à travers la feuille est essentielle au maintien d'une température foliaire viable ainsi qu'à l'assimilation du carbone atmosphérique nécessaire à la production de biomasse tout en conservant une balance hydrique fonctionnelle au sein de la plante. La relation entre l'assimilation et la conductance stomatique est démontrée de longue date (Wong et al., 1979). Néanmoins, la réponse stomatique est généralement plus lente que la réponse photosynthétique (Lawson & Blatt, 2014 ; Lawson & Vialet-Chabrand, 2018). Il en résulte une réponse asynchrone des deux composantes de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ayant potentiellement pour conséquence l'induction d'une efficacité transitoire suboptimale (Matthews et al., 2017 ; McAusland et al., 2016). La caractérisation de la dynamique de réponse fait depuis peu l'objet d'une grande attention, néanmoins l'ensemble des mécanismes physiologiques impliqués ainsi que les facteurs influençant la réponse temporelle des stomates restent à être finement élucidés.

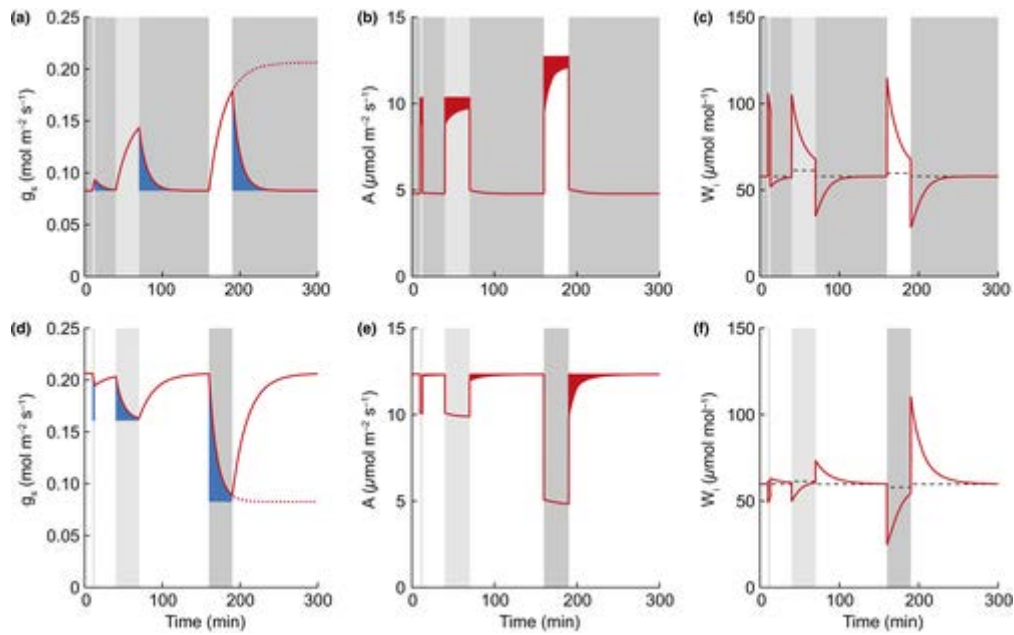
La lumière est l'un des paramètres environnementaux impactant à la fois l'assimilation photosynthétique du carbone ( $A_n$ ) et la conductance stomatique ( $g_s$ ). Dûe à la couverture nuageuse ainsi qu'à l'ombrage au sein de la canopée causé par la superposition des feuilles ou par les plantes voisines, la quantité de lumière atteignant une feuille fluctue au cours de la journée. Les feuilles sont ainsi soumises à des phases d'illumination ou d'obscurité (respectivement nommés « sunfleck » et « shadefleck » au sein de la littérature) dont les durées varient de quelques secondes à quelques heures (Lawson & Vialet-Chabrand, 2018). Des variations inter et intra-spécifiques considérables de la rapidité et de l'amplitude de réponse de la conductance stomatique en réponse à un changement de lumière ont été observées (Cardon et al., 1994 ; Elliot-Kingston et al., 2016 ; McAusland et al., 2016). Celles-ci dépendent aussi bien du type des cellules de garde (Hetherington & Woodward, 2003 ; McAusland et al., 2016) que des conditions de croissance (Qu et al., 2016 ; Hepworth et al., 2018) ou encore de l'intensité du stimulus environnemental (Elliot-Kingston et al., 2016 ; Hepworth et al., 2018). Par ailleurs, l'énergie lumineuse perçue par la plante est également susceptible de générer des fluctuations rapides mais néanmoins importantes de la température foliaire et par extension du déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère, deux stimuli environnementaux auxquels les stomates sont également sensibles. L'intensité ainsi que la durée des signaux lumineux influencent les réponses temporelles de l'assimilation, la conductance stomatique et l'efficacité d'utilisation de l'eau qui en résulte (Vialet-Chabrand et al., 2016). Ce faisant, un changement abrupt de lumière

constitue un ensemble de stimuli complexe, impliquant des voies de signalisation multiples. L'amplitude de réponse stomatique entre deux steady-state ainsi que la rapidité de cette réponse a des implications sur la limitation qu'exerce la conductance stomatique sur l'assimilation et l'efficacité d'utilisation de l'eau qui en résulte (Kaiser et al., 2015 ; figure 5).



**Figure 5** : Visualisation de la dynamique de réponse de l'assimilation en carbone ( $A_n$  : courbe rouge), de la conductance stomatique ( $g_s$  : courbe bleue) et d'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque qui en résulte ( $W_i$  : courbe jaune) à la suite de changements de lumière chez un jeune chêne sessile. Les valeurs ont été normalisées sur la base du steady-state initial.

Sur la base de modélisations, une réponse synchrone de  $A_n$  et  $g_s$  induirait une augmentation théorique de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque en raison d'un meilleur couplage de ses deux composantes (Lawson & Blatt, 2014). Un faible stimulus lumineux n'implique pas nécessairement un changement de conductance stomatique, bien qu'il puisse influencer l'assimilation (Lawson et al., 2012). Des changements plus intenses et de longue durée peuvent en revanche induire une réponse d'ouverture ou de fermeture stomatique à la forme sigmoïdale plus ou moins rapide. La rapidité de réponse aura de larges implications sur la relation qu'entretiennent la conductance stomatique et l'assimilation. Ainsi, la disposition des plantes à répondre rapidement à leur environnement semble essentielle à l'optimisation des échanges gazeux et ce plus particulièrement chez les plantes soumises à des conditions de stress hydrique pour lesquelles l'adoption d'un comportement stomatique plus rapide s'avérerait avantageux en termes d'efficacité d'utilisation de l'eau (figure 6).



**Figure 6** : Représentation schématique de la réponse temporelle de la conductance stomatique, de l'assimilation en carbone et de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ) suite à des phases d'illumination (a-c) ou d'obscurcissement (d-f) de différentes durées et intensités. Les portions sous fond blanc représentent les phases lumineuses et les portions sous fond gris, les phases d'obscurité. Les zones bleues illustrent les pertes non nécessaires d'eau (par rapport à  $A$ ) en raison d'une réponse de la conductance stomatique asynchrone et lente. Les zones rouges illustrent la limitation de  $A$  par la conductance stomatique lors de l'ouverture stomatique. Les lignes pointillées noires (c,f) schématisent  $W_i$  dans les cas théoriques pour lesquels la réponse de  $g_s$  est instantanée suite au changement de lumière (d'après Lawson & Vialet-chabrand 2018).

### Facteurs influençant la dynamique

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer la rapidité de réponse stomatique à un stimulus environnemental, la morphologie stomatique a souvent été proposée. En outre, les différentes morphologies et les propriétés mécaniques qui en découlent sont susceptibles d'expliquer les différences de dynamique entre différentes espèces et écotypes. Ainsi, chez les fougères, la réduction des avantages mécaniques des cellules épidermiques par rapport aux cellules de garde serait à l'origine de mouvements plus rapides par leurs stomates (Franks & Farquhar, 2007).

La réduction de la taille des cellules de garde entourant le pore stomatique a pour effet d'augmenter le ratio de la surface membranaire par rapport au volume de la cellule. En partant du principe que le nombre de canaux de transport par unité de surface demeure constant, une diminution de la taille des cellules de garde devrait théoriquement accélérer proportionnellement le flux de composés osmotiques par unité de volume. Il en résulterait ainsi une réponse stomatique plus rapide (Schlüter et al., 2003; Tanaka et al., 2013; Franks and Farquhar, 2007; Drake et al., 2013; Lawson & Blatt, 2014). Une série de modèles intégrant la morphologie des cellules de garde et du complexe stomatique (Doheny-Adams et al., 2012 ; Dow et al., 2014 ; Lehman & Or, 2015) ainsi que l'activité de transport membranaire (Chen et al., 2012; Wong et al., 2012; Lawson & Blatt, 2014) tendent à conforter l'influence de l'anatomie stomatique sur la vitesse de réponse. Cependant ces relations ne

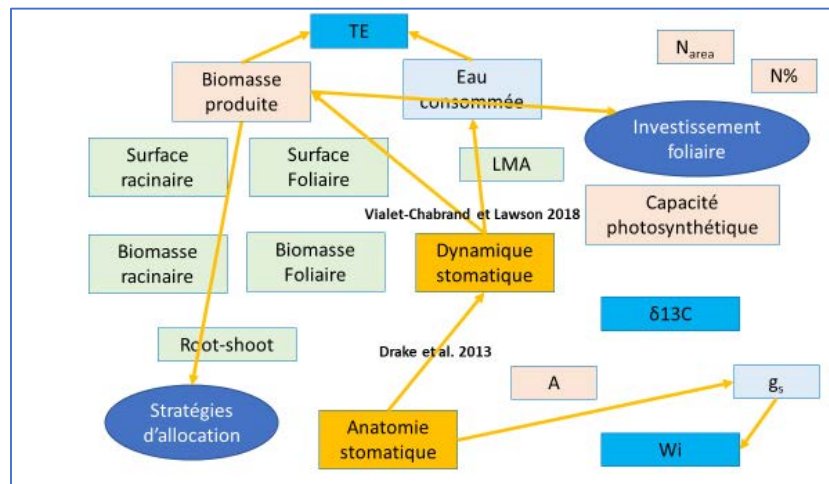


seraient pas systématiquement valides lorsque l'on considère une large gamme d'espèces (Elliott-Kingston et al., 2016 ; McAusland et al., 2016). Ainsi Elliott-Kingston et al., (2016) dans une étude examinant la diversité de la rapidité de fermeture stomatique parmi des espèces aux écotypes variés ne fut pas en mesure d'établir cette relation entre morphologie stomatique et rapidité de réponse. McAusland et al., (2016) parvinrent au même constat parmi une gamme d'espèces de grande culture disposant de stomates de type elliptiques. Néanmoins, un ensemble de traits sont susceptibles d'influencer la rapidité de réponse indépendamment de la taille ou de la densité stomatique, tels que le nombre de cellules subsidiaires impliquées dans les échanges osmotiques, l'expression génique des canaux hydriques ainsi que des transporteurs des composés osmotiques ou encore l'activité biochimique au sein des cellules de garde (Farquhar et al., 2007). De récents travaux ont par ailleurs mis en évidence un impact des niveaux de transcription des facteurs nécessaires au développement des cellules subsidiaires sur la dynamique de réponse stomatique ainsi que la conductance stomatique (Raissig et al., 2017).

Par ailleurs, la mise en place de l'architecture stomatique au cours du développement de la feuille influencerait le comportement des stomates. La majorité des espèces végétales suivent en effet la règle du « one-cell spacing » au cours du développement épidermique, règle suivant laquelle lors de leur mise en place les stomates sont séparés les uns des autres par au moins une cellule épidermique (Geisler et al., 2000 ; Peterson et al., 2010; Pillitteri & Dong, 2013). Il existe cependant un certain nombre d'espèces s'étant affranchies de ces schémas de développement, à l'image du genre *Begonia* (Nebauer, 1967 ; Papanatsiou et al., 2017). Une telle architecture stomatique chez *Begonia* est interprétée comme étant une adaptation à une niche écologique imposant une faible demande évaporative. Outre les schémas d'architectures, la structure interne des stomates pourrait également jouer un rôle dans les mouvements stomatiques à travers l'organisation des filaments d'actine (Eisinger et al., 2012) ainsi que les propriétés physiques de la paroi cellulaire (Woolfenden et al., 2017).

Ainsi, l'anatomie stomatique (taille, densité...) est susceptible d'impacter d'une part la conductance stomatique et donc  $W_i$  mais aussi d'autre part la dynamique de réponse aux changements environnementaux (Drake et al., 2013). Cette même dynamique de réponse stomatique peut à son tour influencer le gain de biomasse et la consommation hydrique des plantes sur le long terme et donc l'efficacité de transpiration (TE ; Vialet-Chabrand et Lawson, 2018; Papanastasiou et al., 2019). Si l'accumulation de biomasse est par définition une composante de l'efficacité de transpiration, l'allocation du carbone à l'origine de cette biomasse est un élément fondamental à prendre en considération. En effet, comme mentionné plus tôt au sein de ce manuscrit les schémas d'allocation et d'investissement du carbone constituent un facteur essentiel impliqué dans l'écologie des espèces.

Dans le but d'adresser plus finement l'écologie des espèces ainsi que la différenciation de leurs niches écologiques respectives, il convient dès lors de caractériser ces schémas, la plasticité de ceux-ci sous des conditions de stress (notamment hydrique) et leurs possibles relations avec dynamique de réponse stomatique (Figure 7).



**Figure 7** : liens théoriques entre anatomie stomatique (tailles, densité, longueur... des stomates) et paramètres descriptifs de la réponse dynamique à un changement environnemental ( $\tau$ ,  $\lambda$ , SL) ainsi que leurs possibles influences sur les échanges gazeux foliaires intégrés dans le temps (TE et ses composantes) et *in fine* les stratégies d'allocation et d'investissement du carbone réalisées par les plantes. Les flèches jaunes matérialisent les relations explorées dans le cadre de ces travaux

### Considérations biochimiques des mouvements stomatiques

Les mouvements stomatiques sont la résultante de changements de pression de turgescence liés à l'ajustement osmotique en réponse aux flux potassiques ( $K^+$ ), chloriques ( $Cl^-$ ) et d'anions organiques (malate) à travers la membrane plasmique et le tonoplaste (Blatt, 2000). La rapidité de réponse stomatique est donc intrinsèquement liée à l'activité de transport des solutés ainsi que la sensibilité de leurs voies de signalisation aux stimuli environnementaux (Lawson & Blatt, 2014 ; Lawson & Vialet-chabrand, 2018). Le transport est déterminé par la densité ainsi que la capacité d'action des transporteurs disposés à la surface membranaire, elle-même liée au ratio de surface par volume des cellules et donc par extension à la taille des stomates (Franks et Farquhar, 2007). Cependant, il existe une large diversité interspécifique de l'activité de transport indépendante des traits anatomiques des stomates expliquant potentiellement le manque de corrélation entre rapidité de réponse et taille stomatique observé dans les récentes études traitant ce sujet (Lawson & Blatt, 2014). La manipulation des flux ioniques constitue une approche valable dans le but d'explorer la rapidité de réponse des stomates. Cependant l'osmorégulation ainsi que les voies de transduction des signaux au sein des cellules stomatiques sont des phénomènes complexes qu'il convient d'adresser à des fins d'optimisation des échanges gazeux foliaires et *in fine* de l'efficacité d'utilisation de l'eau des plantes.

## Objectifs

Il semblerait que la dynamique de réponse stomatique puisse jouer à long terme un rôle non négligeable sur l'efficacité d'utilisation de l'eau des végétaux. L'accélération des mouvements stomatiques permet théoriquement d'améliorer l'assimilation de carbone et de limiter les pertes en eau inutiles par les plantes, optimisant ainsi leur efficacité d'utilisation de l'eau (Papanatsiou et al., 2019). A ce jour de nombreuses études ont exploré la rapidité de réponse stomatique parmi une large gamme d'espèces associant la variabilité interspécifique observée à l'anatomie stomatique. Néanmoins, les informations dont nous disposons pour décrire la dynamique de réponse demeurent lacunaires. Par ailleurs il n'existe que peu d'études ayant étudié l'impact des conditions de croissance sur la dynamique de réponse stomatique. De récentes études ont suggéré que le statut hydrique des plantes (Qu et al., 2016 ; Haworth et al., 2018) mais aussi la disponibilité en lumière (Matthews et al., 2018) au cours de leur développement influenceraient considérablement la réponse stomatique. L'asymétrie entre fermeture et ouverture stomatique constitueraient également une adaptation des écotypes végétaux à des environnements spécifiques notamment vis-à-vis de l'accès à la lumière et à l'eau (Ooba & Takahashi, 2009 ; Vico et al., 2011). Une asymétrie plus marquée due à une ouverture stomatique lente traduirait ainsi un comportement conservateur vis-à-vis de l'eau ; à l'inverse une ouverture rapide optimiserait l'assimilation carbonée. Ce caractère est donc susceptible de traduire le compromis qu'effectuent les plantes entre fixation du carbone et perte hydrique, afin de limiter le coût que requièrent les mouvements stomatiques en termes d'énergie et de changements osmotiques.

Les résultats ici mentionnés ont été obtenus suite à une étude sur le tabac réalisée au sein du laboratoire d'écologie et de physiologie végétale de l'Université des îles Baléares dans le cadre de la labellisation "Agreenium" par l'institut agronomique, vétérinaire et forestier de France (IAVFF). Outre l'aspect méthodologique, cette expérience a été réalisée dans le but de répondre à deux questions principales:

- Les conditions environnementales de croissance impactent-elles la dynamique de réponse stomatique suite à un changement d'intensité lumineuse chez *Nicotiana tabacum*?
- La morphologie stomatique impacte-t-elle cette même dynamique de réponse?

Article 1: *Gerardin et al. 2018: Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in Nicotiana tabacum : Environmental and Experimental Botany* (publié: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.019>)

## Article 1: Introduction à la dynamique de réponse stomatique

### **Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum***

Authors: Théo Gerardin<sup>1,2</sup>, Cyril Douthe<sup>2</sup>, Jaume Flexas<sup>2</sup>, Oliver Brendel<sup>1,3</sup>

Adresses:

<sup>1</sup> Université de Lorraine, AgroParisTech, INRA, Silva, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup> Research Group on Plant Biology under Mediterranean Conditions, Universitat de les Illes Balears, Instituto de Investigaciones Agroambientales y de Economía del Agua (INAGEA), Carretera de Valldemossa Km 7.5, Palma de Mallorca, Illes Balears 07121, Spain

<sup>3</sup> Corresponding author postal address: Oliver BRENDEL, INRA, UMR Silva, F-542802 CHAMPENOUX, France

Tel : 0033.383394100

Emails:

[theo.gerardin@inra.fr](mailto:theo.gerardin@inra.fr), [cyrildouthe@me.com](mailto:cyrildouthe@me.com), [jaume.flexas@uib.es](mailto:jaume.flexas@uib.es), [oliver.brendel@inra.fr](mailto:oliver.brendel@inra.fr)

**Keywords: drought, dynamic response, irradiance, shade, stomatal conductance**

Published in Environmental and Experimental Botany 153 (2018) 188–197

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.019>

Received 9 February 2018; Received in revised form 24 May 2018; Accepted 24 May 2018

## **Abstract**

Recent work has made progress in describing stomatal dynamics in terms of speed, amplitude of response, lag time and response time. However, little is known about the impact of growth conditions on the rapidity of stomatal movements, and their relationship with stomatal morphology within a species. We measured stomatal dynamics during opening and closing in response to changes in irradiance in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) grown under “Control”, “Drought” and “Shade” treatments. Growth conditions strongly changed the rapidity of stomatal conductance response to irradiance. The “Drought” treatment considerably accelerated the response and “Shade” treatment slowed it down when compared to “Control”. We confirmed for the “Control” treatment the known asymmetry of response, with closing faster than opening, but interestingly the asymmetry disappeared under both treatments. Only stomatal density and index were affected by the growing conditions, not stomatal size and form. Thus, the observed variation in stomatal closing and opening speed and related parameters (amplitude, lag time, response time) was not related to the size of the stomata, and only a marginal relationship between speed of the stomatal response and stomatal density was observed. These results suggest that physiological factors might be the main driver of variations in stomatal conductance dynamics within a species grown under different environmental conditions.

## **Highlights**

Growth conditions (drought/shade) change dynamics of stomatal response to irradiance

Growth conditions (drought/shade) change asymmetry between opening and closing

Within species variation in stomatal speeds were not explained by stomatal size

## **Introduction**

Stomatal morphology and their movements (opening and closing) are key components controlling exchange of water vapour and CO<sub>2</sub> between the leaf and the atmosphere, expressed as stomatal conductance ( $g_s$ ). Stomatal conductance per leaf surface is mainly determined by stomatal density, size, pore area (aperture) and their distribution.

Since plants are subjected to a fluctuating environment through a diurnal cycle, with important variations of irradiance, vapour pressure deficit between the leaf and the atmosphere (VPD), temperature and soil water deficit, they need to balance gas exchange by adjusting stomatal conductance continuously during the day (Schulze and Hall, 1992; Pearcy et al., 2000). Usually stomata respond to low CO<sub>2</sub>, low VPD and high irradiance by increasing their level of aperture, inducing an increase of  $g_s$  and vice versa (Outlaw, 2003; Haworth et al., 2018). Nevertheless, these environmental changes usually occur concomitantly, making  $g_s$  a complex resultant of various signals induced by their own signalling pathways and in a hierarchical manner (Lawson & Morison 2004; Lawson et al., 2010; Aasamaa & Sober, 2011; Haworth et al., 2018).

To describe the stomatal behavior numerous steady-state models of  $g_s$  have been proposed (reviewed in Damour et al., 2010). However stomatal conductance variations induced by environmental changes are not instantaneous and show a temporal response that can be described by dynamic models (Violet-Chabrand et al., 2017). Changes in stomatal aperture are performed via variations of water content of the guard cells, which are in turn produced by fluxes of potassium ions (K<sup>+</sup>) in or out of the guard cell (Blatt, 2000; Shimazaki et al. 2007). Kirschbaum et al. (1988) proposed a temporal model where the dynamic response of  $g_s$  to irradiance was first initiated by a biochemical signal responding to the environmental change, followed by an osmotic adjustment inside the guard cells resulting in stomatal opening. The combination of these processes described the response of  $g_s$  as a sigmoidal curve. The dynamic change of  $g_s$  to atmospheric environmental variations takes from a few minutes to almost an hour, depending on species and irradiance variation (Vico et al., 2011; McAusland et al., 2016). Compared to stomatal dynamics in response to changes in irradiance, the variation of net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A_n$ ), if not limited by  $g_s$ , varies much faster, usually within a few seconds. A few studies highlighted the importance of response times of photosynthesis for carbon uptake (reviewed in Kaiser et al., 2018), however as these are generally an order of magnitude faster than changes in  $g_s$ , variation in the latter might be dominant in non-synchronicity situations.

Irradiance is the main environmental driver of photosynthesis, therefore the stomatal response to fluctuating light has been extensively studied (Kirschbaum et al., 1988; Shimazaki et al., 2007; Lawson et al., 2010 ; McAusland et al., 2016 ; Kardiman and Raebild, 2017 ; Matthews et al., 2018). Over time these fluctuations drive the temporal dynamics of carbon gain, water loss and by extension plants water use efficiency (Lawson and Blatt, 2014). Stable environmental conditions rarely occur in nature, therefore field measurements of  $g_s$  are unlikely to reach steady-states values (Lawson et al., 2010) resulting in decoupled  $A_n$  and  $g_s$  measures and

a non-representative  $W_i$  estimation (Lawson et al., 2010; McAusland et al., 2016, Violet-Chabrand et al. 2017). A non-synchronicity in the temporal response between  $A_n$  and  $g_s$  can have repercussions on carbon fixation, the water lost by transpiration and long-term water use efficiency (McAusland et al., 2016). Due to the importance of dynamic stomatal regulation, modelling of  $g_s$  responses to environmental changes can improve the up-scaling of  $CO_2$  and water vapour exchange from the leaf to the canopy level (Violet-Chabrand et al., 2017). To parametrize such models, it is important to gain knowledge on the impact of growth conditions on the stomatal dynamics.

Morphological traits such as stomatal density and size regulate steady-state values of  $g_s$  (Franks and Farquhar, 2001) and set the theoretically achievable maximum stomatal conductance by the plant (Dow et al., 2014). A variation in stomatal morphology can lead to improved instantaneous and long-term water use efficiency, by impacting directly only  $g_s$ , but not  $A$  (Doheny et al., 2012; Franks et al., 2015). It has also been shown that an increase in  $g_s$  under high irradiance conditions was associated to an increase of stomatal density (Schlüter et al., 2003). Stomatal morphology and patterning is known to be influenced by both environmental growth conditions and plant hormones (Woodward, 1987; Hetherington and Woodward, 2003; Casson and Gray, 2008; Kardiman and Raebild, 2017). In tobacco leaves, Thomas et al. (2004) observed a 12.7-24.2% decrease of stomatal index (ratio between number of stomata to total number of epidermal cells) of developing leaves exposed to shading compared to a control treatment. Although growth conditions varying in atmospheric  $CO_2$  concentration and irradiance have been shown to impact stomatal morphology, little is known about other environmental factors such as soil water stress. Jones (1977) showed for barley that a reduction of soil water availability could result in a decrease in stomatal index, but this is not always consistent as reported for groundnut (Clifford et al., 1995), where the stomatal index was not changed by water stress.

It has been hypothesized (Hetherington and Woodward, 2003; Drake et al. 2013, Raven, 2014; Kardiman and Raebild 2017) that stomatal traits such as density and size might be involved in the temporal response of  $g_s$  to an environmental change. These studies, based mainly on among species comparisons, suggested that a smaller stomatal size resulted in a faster stomatal response due to the higher surface-to-volume ratio and the lower subsequent solute transport required to drive stomatal movements (Lawson et al., 2014). Other recent evidence using a very large spectrum of species, including ferns, cycads, conifers, and angiosperms (Elliot-Kingston et al., 2016) had not found a relationship between stomatal size and closing speed, however the authors suggest a relationship with the atmospheric  $CO_2$  levels during species diversification. Variations in stomatal size are often linked to variations in stomatal density by a negative correlation (Franks and Beerling, 2009; Doheny-Adam et al., 2012). Moreover, the product of size and density gives the overall stomatal exchange surface per leaf surface, suggesting that stomatal density could also act as driver of stomatal dynamics. Also, the relationship between stomatal response times and the shape of the guard cells (Hetherington and Woodward, 2003; Franks and Farquhar, 2007; McAusland et al., 2016) and their

patterning (Papanatsiou et al., 2016) have been studied. It has been shown that the stomatal shape (dumbbell or elliptical) might be a determinant driver of stomatal speed as dumbbell-shaped guard cells species tend to display faster responses to environmental fluctuations (Hetherington and Woodward, 2003; MacAusland et al., 2016). Moreover, the stomatal shape and patterning might confer different mechanical advantages via cell osmotic and turgor pressures influencing the rapidity of stomatal response (Franks and Farquhar, 2007). However, other parameters than stomatal morphology, such as variations in ion and water transport within guard cells, are likely to impact the speed of stomatal responses (Lawson and Blatt, 2014).

Growth conditions such as shade and soil water deficit have been shown to determine steady state stomatal conductance, however, only a few studies examined their influence on stomatal dynamics. In these studies, drier conditions have been related to faster stomatal response to irradiance (Vico et al., 2011; Lawson and Blatt., 2014; Qu et al., 2016a) suggesting an influence of plant water balance on the rapidity of stomatal response. In addition, Martins et al. (2016) demonstrated in conifers and ferns a major impact of leaf hydraulic status on  $g_s$  response time to vapour pressure deficit variations. However, less is known about the impact of different light environments during growth on the dynamics of stomatal responses to a change in irradiance. Matthew et al. (2018) have shown faster stomatal responses with an increased amplitude for *Arabidopsis thaliana* grown under fluctuating high light, compared to plants grown under shaded conditions. However, the acclimation of stomatal dynamics to the light environment might be species specific. Kardiman and Raebild (2017) showed that, although the dynamics of stomata of most tested species remained unaffected by their light environment, early successional species displayed faster stomatal responses when grown under shade conditions compared to the ones grown under full light, while late successional species displayed the opposite behaviour.

Differences in the speed of stomatal dynamics to a variation in irradiance have been shown among species and within individuals of the same species (Vico et al., 2011; McAusland et al., 2016). Stomatal speed has also been linked to plant functional types and environmental factors (Vico et al., 2011): graminoids tended to display shorter responses than forbs, woody gymnosperms or angiosperms and plants from dryer climates seemed to exhibit faster responses. Moreover, many species show an asymmetric response between stomatal opening and closing, ie, over 60% of the species reviewed by Ooba and Takahashi (2003) displayed a faster opening. Ooba and Takahashi (2003) argued that such an asymmetry could be related to the environmental growth conditions of the different species, where a light limited environment might favour a more rapid opening of stomata. However, Woods and Turner (1971) have suggested that a faster stomatal closure would reduce the temporal decoupling between  $A_n$  and  $g_s$  while a slower opening would reduce water loss without reducing  $A_n$  when  $g_s$  is not limiting, especially under well-watered conditions. Such a temporal asymmetry of stomatal movements might lead to a reduced transpiration and thus translate a conservative stomatal behaviour. Moreover, a slow opening might prevent situations of a continued  $g_s$  increase after  $A_n$



has reached light saturation, which would result in an excessive water loss compared to carbon gains (Kirschbaum et al., 1988; Lawson et al., 2010; Vialet-Chanbrand et al., 2017). The literature therefore suggests that the asymmetry between opening and closing of stomata might have an important ecological impact, depending on the growing conditions.

Thus, our main objectives were to analyse:

the impact of three different growth conditions (control, shade and drought) on the parameters conditioning the temporal response of  $g_s$  to step variations in irradiance;

the relationship between stomatal morphology and the dynamics of stomatal responses

The dynamics of the temporal stomatal response to a step variation in irradiance was characterised by using the Vialet-Chabrand et al (2013) model, which decomposes the sigmoidal response into a) the delay of stomatal response, b) the response time constant and c) the amplitude of stomatal movements. From the latter two parameters a maximal speed can be calculated. The stomatal response has been tested for opening and closing, which allowed also to estimate the asymmetry for the dynamic parameters.

## ***Material and methods***

### ***Plant material and Experimental design***

The experiment lasted for 8 weeks and was carried out on eighteen plants of *Nicotiana tabacum* L. wild type (cv. Petite Havana SR1), grown at the University of the Balearic Island (UIB), Palma, Spain, 39°38'11.9"N 2°38'49.7"E in autumn 2015. Seeds were germinated in petri boxes with humidified filter paper and after one week transferred into 2L pots filled with 1/3 (V/V) of perlite and organic soil, respectively.

The two weeks old seedlings were then randomly divided into three growing condition groups until the end of the experiment 6 weeks later: "Control" (6 plants), "Shade" (7 plants) and "Drought" (5 plants). The "Control" treatment was characterized by ambient growth irradiance (400-450  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and well-watered conditions. The "Shade" treatment was characterized by low irradiance (40  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and the same well-watered conditions as in the "Control" treatment. The irradiance compensations point estimated from steady-state irradiance response curves (data not shown) were estimated at 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for "Control" and 27  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for "Shade" treatments; 90% of maximum A was reached at about 1100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for "Control" and at about 990  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for "Shade". Plants in "Control" and "Shade" treatments were watered every second day with Hoagland's solution, 50% dilution. The "Drought" treatment was characterized by the same ambient growth irradiance as the "Control" treatment, but the plants were submitted to a soil water deficit. The water deficit was controlled by weighing the pots at field capacity and watering to 50% of the weight. During the experiment the field capacity weight was retested on the plants of the "Control" treatment on a regular basis and the difference assumed to be the plant growth and added to the target weights of the "Drought" treatment. Before application of the treatments, the last emergent leaf was marked to ensure gas exchange measurement were done on leaves grown under treatment conditions. Other conditions in the growing chamber were 25°C, air relative humidity 50-60% and a photoperiod of 12h/12h (8:00-20:00).

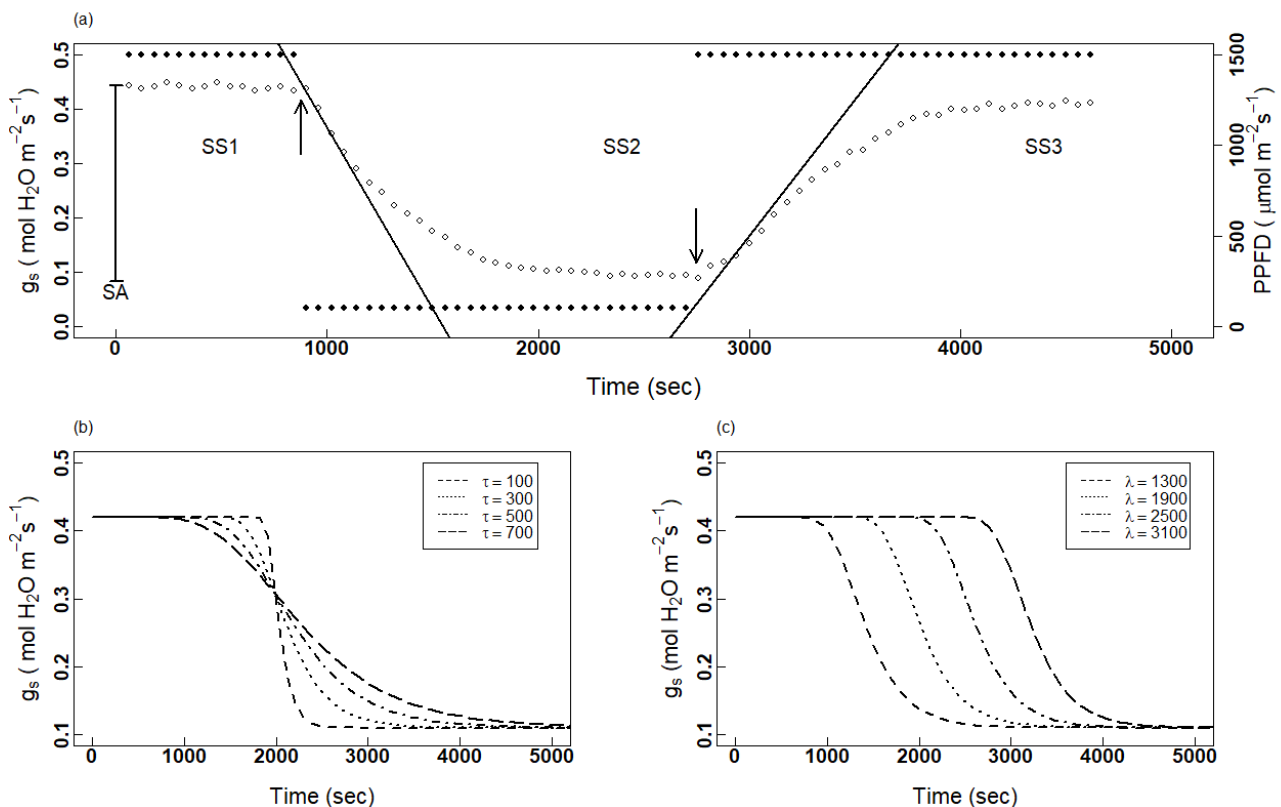
### ***Measurement of leaf water potential***

To determine the plant water status, midday leaf water potential ( $\Psi$ ) was measured in fully expanded leaves with a Scholander pressure chamber (Soil moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA). At the end of the experiment, seven leaves were measured for the control treatment from different plants and 4 leaves for each, the shade and the drought treatment.

### ***Gas exchanges measurements***

Gas exchange was measured using a portable photosynthesis system (LI-COR 6400; LI-COR, Lincoln, NE, USA) equipped with a 2cm<sup>2</sup> leaf chamber (Li-6400-40). Measured were: net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ), stomatal conductance for water vapour ( $g_s$ ) and leaf internal CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ) (see Table 1 for units). All measurements were carried out between 10:00 and 19:00 h (Central European summer time). For each plant measured, gas exchange measurements were performed on the youngest, mature, fully expanded leaf, which

was grown under treatment conditions. This leaf has been measured three times at different days and different times during the day and a plant mean has been used in all statistics. Overall, the measurement of the stomatal response curves has taken 18 days. The environmental parameters inside the chamber were kept constant during the acclimation phase with  $[CO_2]$  entering the chamber of  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , block temperature of  $25^\circ\text{C}$ , air flow of  $300 \mu\text{mol min}^{-1}$  and a PPFD of  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (red/blue irradiance 90/10%, respectively) until the leaf reached a steady-state of  $g_s$  (SS1; Fig. 1a). Then a measurement cycle consisted of two step changes in irradiance: first I) a single step change to low irradiance inducing stomatal closure and then II) a single step change back to the original high irradiance, inducing a stomatal reopening. For the low irradiance step, the PPFD was lowered from  $1500$  to  $100 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  until the plant reached a new steady-state (SS2). After 10 minutes under this new steady-state, the PPFD was set back to its initial setting at  $1500 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and measurements were recorded until a new steady state was reached (SS3). The stomata were considered in steady-state when  $g_s$  did not vary more than  $\sim 0.005 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  during 10min. This resulted in a standard deviation over the 10 minutes of  $0.0015 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Data during the response curves were logged every 60sec. "Steady-state" data as mentioned through the manuscript were calculated for SS1 and SS2 as the mean of 5 points after stabilization of  $g_s$ , before each irradiance change (Fig. 1a).



**Figure 1:** Illustration of the stomatal kinetics under irradiance changes. a: Example of a measured stomatal closure and opening (white dots) provoked by a change in irradiance (black dots). Black arrows represent the irradiance changes, the black lines are the maximal slopes (SL<sub>max</sub>) of both opening and closing sequences and the amplitude of the stomatal response (SA). b: Simulation of the impact of increasing values by 200secs steps of  $\tau$  (response time) on the curvature, and c: Simulation of the impact of 600secs steps increasing values of  $\lambda$  (lag time) on the stomatal delay.

### ***Stomata morphology***

At the end of the experiment one leaf was sampled from five plants per treatment to determine the stomatal morphology of leaves on the abaxial and adaxial faces. Specifically, the following parameters were measured : the stomatal density (SD), epidermal cell density (CD), stomatal index (SI) defined as  $SD/(SD+CD)$ , length of the stomatal guard cell complex (GCL), guard cells width (GCW), stomatal surface (SS) defined as an ellipse area:  $\pi*(GCL/2)*(GCW/2)$  and guard cell shape (GSH) defined as the ratio  $GCL/GCW$ .  $1\text{cm}^2$  portions of the leaves were collected and nail polish imprints of both leaf surfaces were taken using adhesive film and applied on microscope slides for analysis. Stomata and epidermis cells were counted in the obtained images using the ImageJ2 software (Schindelin et al. 2015). Six ( $500*370\mu\text{m}$ ) images for both abaxial and adaxial surfaces of the leaf used for gas exchange were taken per leaf (~200 stomata measured by treatment). For all stomatal morphology traits, mean values of adaxial and abaxial surfaces were used for ANOVA and correlations with gas exchange results, as gas exchanges is done for the whole leaf.

### ***Model description***

The stomatal responses of the irradiance curves were adjusted using a sigmoidal model based on Vialet-Chabrand et al. (2013). The sigmoidal model allows the estimation of parameters describing the temporal response of the stomata to an environmental change. The following equation was used:

$$g_s = r_0 + (G - r_0) * \exp\left(-\exp\left(\frac{\lambda-t}{\tau}\right)\right)$$

where  $g_s$  is the fitted stomatal conductance,  $r_0$  is the starting value of the stomatal conductance (first steady-state obtained after the plant acclimation to the environmental conditions inside the Licor chamber,  $g_{\min}$  or  $g_{\max}$ ),  $G$  the ending value of stomatal conductance (second steady-state reached after the full stomatal response to the irradiance change,  $g_{\max}$  or  $g_{\min}$ ),  $\lambda$  is the lag time of the stomatal response (time needed to reach the inflection point of the curve from the moment of the irradiance change in each curve), and  $\tau$  the response time. Compared to the sigmoidal equation used by Vialet-Chabrand et al. (2013), here,  $\lambda$  is mathematically independent from  $\tau$ . From these parameters, the maximum slope ( $SL_{\max}$ ) as estimator of the speed of the stomatal response, can be calculated as:

$$SL_{\max} = (1/\tau) * (G - r_0)/\exp$$

Where  $(G-r_0)$  represents the amplitude of the stomatal response (SA). Increasing values of  $\tau$  will affect the curvature of the stomatal response, the smaller a  $\tau$  value is, the stronger the curvature and the higher  $SL_{\max}$  will be, so the more rapidly  $g_s$  will increase/decrease.

This model was adjusted using the function “nlnmb” of R (Team RC, 2015). To facilitate the adjustment of the sigmoidal model, five data points during the steady state before changing the irradiance were first included in the model adjustment. This affects only the lag time  $\lambda$ , which was then corrected by subtracting the added time period. The model adjustment is sensitive to the starting point and including five steady state

points made the starting steady state  $g_s$  more robust and decreases the dependency of the adjustment on measurement noise.

As SS1 and SS3 values for gas exchange variables were not significantly different (pairwise t-test  $p > 0.05$ ) the mean amplitude between closing and opening in response to the step-change in irradiance were calculated for  $A_n$  and  $g_s$  as absolute and relative values (SA and RSA, respectively; Table 1) :

$$SA_{A_n} = ((A_n \text{ SS1} - A_n \text{ SS2}) + (A_n \text{ SS3} - A_n \text{ SS2})) / 2$$

$$SA_{g_s} = ((g_s \text{ SS1} - g_s \text{ SS2}) + (g_s \text{ SS3} - g_s \text{ SS2})) / 2$$

$$RSA_{A_n} = (((A_n \text{ SS1} - A_n \text{ SS2}) / A_n \text{ SS1}) + ((A_n \text{ SS3} - A_n \text{ SS2}) / A_n \text{ SS3})) / 2$$

$$RSA_{g_s} = (((g_s \text{ SS1} - g_s \text{ SS2}) / g_s \text{ SS1}) + ((g_s \text{ SS3} - g_s \text{ SS2}) / g_s \text{ SS3})) / 2$$

For the adjusted dynamic parameters, we also calculated the ratio between opening and closing, representing the asymmetry of the response. Further, the ratio between  $\tau$  and  $\lambda$  was calculated, to characterise the relative impact of different treatments on both parameters.

### **Statistical analysis**

Before statistical analysis, a mean was calculated for all repeated measurements on one leaf (~3). This allowed the estimation of leaf level parameters for gas exchange traits, which facilitated the comparison with leaf morphology traits. All subsequent statistics were based on mean-leaf values.

All statistical analyses were performed with R (Team RC, 2015). Treatment effects were analysed as a one factorial design analysis of variance (ANOVA). Significant differences were considered at  $p < 0.05$ . When the ANOVA showed a significant treatment effect, a Post-Hoc test using Tukey-HSD (package R, "agricolae") was used to estimate significance of inter-group differences. Correlations were estimated using the Pearson method and p-values were adjusted for multiple comparisons using the "p.adjust" function with the "FDR" method.

## **Results**

### ***Steady-state gas exchange parameters under three different growing conditions***

The different growing conditions significantly affected  $\Psi$  of tobacco plants, with the highest value for the “Shade” treatment ( $-0.37 \pm 0.06$  Mpa), without being significantly different from the “Control” treatment ( $-0.51 \pm 0.09$  Mpa,  $p > 0.05$  TukeyHSD), while the “Drought” treatment significantly decreased  $\Psi$  to  $-1.46 \pm 0.18$  Mpa ( $p > 0.05$  TukeyHSD).  $A_n$  values measured under saturating irradiance (SS1, see Fig. 1) were significantly different among treatments, where the “Control” treatment showed the highest value and “Shade” the lowest (Table 1).  $g_s$  values differed among the treatments, showing the highest values in “Control” and the lowest in “Drought”. These strong differences for  $A_n$  and  $g_s$  were associated with significantly different  $C_i$  among treatments, with the highest  $C_i$  in the “Shade” and the lowest under “Drought”.

Decreasing irradiance from high to low intensity (SS1 to SS2, see Fig. 1),  $A_n$  and  $g_s$  decreased drastically as expected (Table 1), but not  $C_i$ .  $A_n$  and  $g_s$  were lower in “Drought” than in “Control” and “Shade”. For  $C_i$ , no significant differences were detected among the three steady-states, within each treatment. Interestingly, when measurement-irradiance was increased back to high intensity (SS3), plants recovered in each case to the same values as for SS1, for each parameter and whatever the growing conditions.

### ***Amplitude of response under changing measuring irradiance***

For both  $A_n$  and  $g_s$ , their respective variations were similar during closing and opening as there was no significant difference between the two high-irradiance steady state measurements (SS1 and SS3; pairwise t-test  $p > 0.05$ ) indicating a full reopening, therefore the analysis of the absolute and relative amplitude of the responses (SA and RSA (%), respectively) was based on the mean values of closing and opening sequences (presented in Table 1). The absolute amplitude of the A response ( $SA_{A_n}$ ) was highest for “Control” and lowest for “Shade, where the absolute amplitudes for  $g_s$  ( $SA_{g_s}$ ) were highest for “Control”, but lowest for “Drought”. Although the SA were significantly different among treatments for both A and  $g_s$ , the relative amplitudes (RSA) were only significantly lower for the “Shade” treatment for both traits.

**Table 1:** Means per treatment ( $\pm$  standard error of the mean) of net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A_n$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), internal CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ) at each steady-state reached during the measurement cycle (SS1-SS2-SS3, see Figure 1a for details). The amplitude of variation of the parameters between each steady state (SA and RSA, respectively in absolute values and percentage). For  $C_i$ , amplitude of variations was not shown as no differences between the steady states were observed. Different letters show the significant differences among treatments using a Tukey-HSD test. “\*” represents the significant differences between two steady states from a paired t-test at  $p < 0.05$ . There was no significant difference between SS1 and SS3, which was therefore not indicated in the table.

Treatments		SS1		SS2		SS3		SA		RSA (%)
Control	$A_n$	19.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> (15)	*	4,7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> (16)	*	20.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> (16)		15.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> (15)		77.0 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup> (15)
Drought	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	11.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup> (18)	*	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (17)	*	12.1 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup> (17)		8.9 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup> (17)		75.2 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup> (17)
Shade		8.5 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup> (18)	*	3.7 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup> (18)	*	7.9 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup> (18)		4.6 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup> (18)		54.2 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup> (18)
Control	$g_s$	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup> (15)	*	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> (16)	*	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup> (16)		0.28 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> (15)		72.6 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup> (15)
Drought	( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0.08 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup> (18)	*	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> (17)	*	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup> (17)		0.06 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup> (17)		71.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup> (17)
Shade		0.22 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> (18)	*	0.1 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> (18)	*	0.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> (18)		0.11 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> (18)		54.2 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup> (18)
Control	$C_i$	292.0 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup> (15)	ns	312.5 $\pm$ 9 <sup>a</sup> (16)	ns	286.4 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup> (16)	-	-		-
Drought	( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	160.3 $\pm$ 11.9 <sup>c</sup> (18)	ns	193.5 $\pm$ 11 <sup>b</sup> (17)	ns	159.7 $\pm$ 15.9 <sup>b</sup> (17)	-	-		-
Shade		320.3 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup> (18)	ns	323.5 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup> (18)	ns	316.0 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup> (18)	-	-		-

### ***Kinetics parameter of stomatal response under irradiance changes***

During the closing sequence (from SS1 to SS2), the response time ( $\tau$ ) ranged from  $\sim 90$  s for the faster responses to  $\sim 600$  s for the slowest (Table 2). Each treatment was significantly different from each other, with “Shade” (slowest) < “Control” < “Drought” (fastest). Interestingly, we only observed significantly different  $\tau$  values between opening and closing sequence for the “Control” treatment, with an asymmetrical response of  $\sim 2$  times slower opening, whereas “Drought” and “Shade” did not show significantly asymmetric responses.

**Table 2:** Kinetic parameters for opening and closing sequence, with  $\tau$  the time constant (sec),  $\lambda$  the delay of stomatal response to reach the inflection point (sec) and  $SL_{\text{max}}$  the maximal slope of the response. Different letters show the significant differences between treatments from an ANOVA model including treatment effects followed by a post-hoc Tukey test. (. \* show the significant differences between closing and opening from a paired t-test ( $P$ -values < 0.05), so a significant difference indicates an asymmetric response.

Treatment		Closing SS1-SS2		Opening SS2-SS3	Ratio Closing/Opening
Control	$\tau$	378 $\pm$ 38 <sup>a</sup> (15)	*	695 $\pm$ 118 <sup>a</sup> (16)	0.59 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> (15)
Drought	(sec)	87 $\pm$ 4 <sup>c</sup> (18)	ns	101 $\pm$ 18 <sup>b</sup> (17)	1.09 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> (17)
Shade		577 $\pm$ 38 <sup>b</sup> (18)	ns	637 $\pm$ 52 <sup>a</sup> (18)	0.92 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup> (18)
Control	$\lambda$	348 $\pm$ 15 <sup>a</sup> (15)	*	693 $\pm$ 41 <sup>a</sup> (16)	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> (15)
Drought	(sec)	151 $\pm$ 9 <sup>c</sup> (18)	*	430 $\pm$ 81 <sup>b</sup> (17)	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> (17)
Shade		278 $\pm$ 16 <sup>b</sup> (18)	*	495 $\pm$ 21 <sup>b</sup> (18)	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> (18)
Control		1.08 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup> (15)	ns	0.99 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> (16)	-
Drought	$\tau/\lambda$	0.58 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup> (18)	*	0.25 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup> (17)	-
Shade		2.09 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> (18)	*	1.3 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> (18)	-
Control	$SL_{\text{max}}$	-3.13 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup> (15)	*	1.79 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> (16)	-1.84 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup> (15)
Drought	( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2} \times 10^5$ )	-3.16 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup> (18)	*	3.72 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup> (17)	-0.97 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> (17)
Shade		-0.96 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> (18)	*	0.75 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> (18)	-1.33 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup> (18)

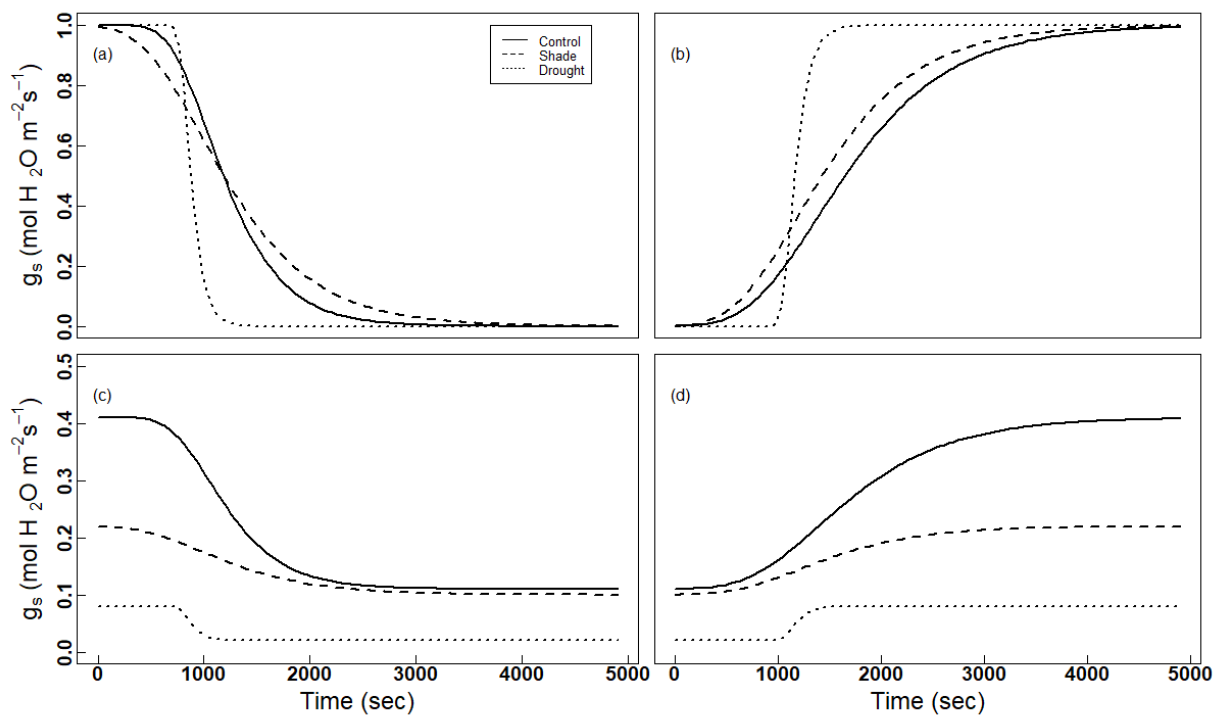
The lag time of the response ( $\lambda$ ) showed a different pattern compared to  $\tau$ . During the closing sequence, “Drought” showed again the shortest delay (fastest response, lowest  $\lambda$  values), then “Shade” treatment, then “Control” (longest delay, highest  $\lambda$  values). In all treatments,  $\lambda$  was significantly higher for the opening than for the closing sequence (Table 2), with the strongest  $\lambda$  asymmetry for the “Drought” treatment while the ratios were similar between “Shade” and “Control” treatments.

For the “Control” treatments,  $\lambda$  and  $\tau$  showed very similar values (ratio  $\tau/\lambda \sim 1$ ) in both closing and opening sequences, for “Drought” and “Shade” treatments a significant deviation from unity was observed but in opposite directions: the “Drought” treatment induced a shift to a longer  $\lambda$ , whereas the “Shade” treatment induced a shift to higher  $\tau$ .

$SL_{\max}$  for closing was significantly slower in the “Shade” treatment, whereas for opening it was significantly faster for the drought treatment. This was due to the strong asymmetry observed for the “Control” treatment, which was much smaller in the “Drought” and “Shade” treatments.

In Figure 2, the mean of the estimated parameters for each treatment was applied to the sigmoidal model to visualize the differences in the responses, using a normalized  $g_s$  scale (setting  $g_{\min}$  to 0 and  $g_{\max}$  to 1; Fig. 2a and Fig. 2b), as well as the measured  $g_s$  values (Fig. 2c and 2d). Plant from the “Drought” treatment reach the new steady state after the step change in irradiance significantly more rapidly compared to the other two treatments. As the normalized graphs do not depend on the amplitude, they illustrate the difference between the “Control” and “Drought” treatments in terms of  $\tau$  and  $\lambda$ : for a similar overall response time, the “Shade” treatment shows a shorter time lag of the response.





**Figure 2:** Fitted stomatal dynamics induced by changes in light intensity in closing (a, c) and opening (b, d) sequences. Plain lines are for “Control”, simple dashed are for “Shade” and dotted lines are for “Drought” treatment. Figures (a) and (b) show normalized conductance responses, whereas the absolute values of  $g_s$  are shown in Figures (c) and (d). Each curve was estimated by using the mean values of the dynamic parameters from Table 2 and the sigmoidal model.

### ***Stomatal morphology in response of different growing treatments***

No significant differences were found between abaxial and adaxial faces for the considered stomatal traits. Overall, the stomatal ratio abaxial/adaxial for the measured tobacco plants was  $2.46 \pm 0.4$  while the epidermal cell ratio was lower at  $1.39 \pm 0.1$ .

Significantly lower SD and CD as well as SI values were observed for the "Shade" treatment (Table 3), whereas no significant differences among treatments were observed for GCW, GSH and SS,

**Table 3:** Stomatal morphology means for treatments. GCL: guard cell length ( $\mu\text{m}$ ), GCW: pore width ( $\mu\text{m}$ ), SS: stomatal surface ( $\mu\text{m}^2$ ), GSH: stomatal shape (GCL/GCW), SD: stomatal density ( $\text{mm}^{-2}$ ), CD: epidermis cell density ( $\text{mm}^{-2}$ ), SI: stomatal index (SD/SD+CD). Different letters show the significant differences between the treatments (Tukey-HSD).

Treatment		Value
Control	GCL	$33.1 \pm 1.2^a$ (5)
Drought	( $\mu\text{m}$ )	$35.1 \pm 1.7^a$ (5)
Shade		$34.0 \pm 0.5^a$ (5)
Control	GCW	$26.7 \pm 0.8^a$ (5)
Drought	( $\mu\text{m}$ )	$26.4 \pm 0.8^a$ (5)
Shade		$24.1 \pm 0.3^a$ (5)
Control	SS	$695 \pm 55.2^a$ (5)
Drought	( $\mu\text{m}^2$ )	$731 \pm 73^a$ (5)
Shade		$666 \pm 22^a$ (5)
Control	GSH	$1.24 \pm 0.02^b$ (5)
Drought		$1.33 \pm 0.03^{ab}$ (5)
Shade		$1.41 \pm 0.02^a$ (5)
Control	SD	$126 \pm 7^a$ (5)
Drought	( $\text{mm}^{-2}$ )	$131 \pm 12^a$ (5)
Shade		$58 \pm 8^b$ (5)
Control	CD	$478 \pm 15^a$ (5)
Drought	( $\text{mm}^{-2}$ )	$544 \pm 73^a$ (5)
Shade		$318 \pm 25^b$ (5)
Control	SI	$0.2 \pm 0.01^a$ (5)
Drought		$0.19 \pm 0.01^a$ (5)
Shade		$0.15 \pm 0.01^b$ (5)

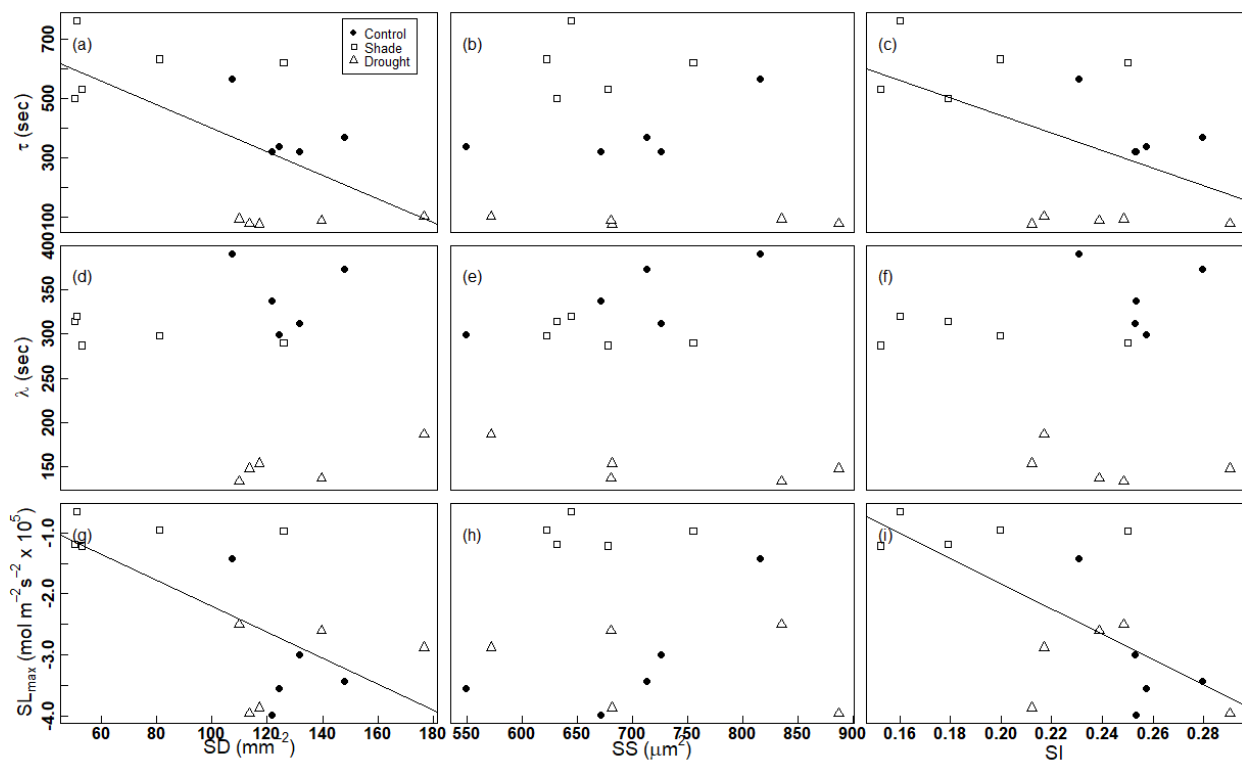
**Table 4** Correlation table of dynamic parameters and the stomatal morphology across treatments. The upper-right triangle displays the number of observations and the p-values (with “\*\*\*\*” for  $p < 0.001$ ; “\*\*\*” for  $p < 0.01$  and “\*\*” for  $p < 0.05$ , corrected for multiple comparisons using FDR), while the lower-left displays the r-values (Pearson test). With the dynamic parameters:  $\tau$ ,  $\lambda$ ,  $SL_{max}$  (where closing slopes are negative), their closing/opening ratio, the absolute amplitude of stomatal conductance response (SA), and the stomatal parameters: GCW (guard cells width), GCL (guard cells length), SS (stomatal size), SD (stomatal density), and SI (the stomatal index).  $n=15-18$ , bold r-values are highly significant (\*\*\*).

	$\tau_{cl}$	$\tau_{op}$	$\lambda_{cl}$	$\lambda_{op}$	$SI_{max\ cl}$	$SI_{max\ op}$	$\tau_{ratio}$	$\lambda_{ratio}$	$SL_{max\ ratio}$	$SA_{cl}$	$SA_{op}$	GCW	GCL	SS	SD	SI
$\tau_{cl}$		***18	**18		***18	***18		**18							*15	*15
$\tau_{op}$	0,83		***18	***18	*18	***18	**18	*18	***18	*18						
$\lambda_{cl}$	0,66	0,87		***18		*18	**18	*18	***18	**18	*18					
$\lambda_{op}$	0,46	0,75	0,9			*18	**18		***18	**18	**18					
$SI_{max\ cl}$	0,78	0,48				***18		*18							*15	**15
$SI_{max\ op}$	-0,85	-0,76	-0,58	-0,47	-0,78		*18	.	*18							
$\tau_{ratio}$		-0,62	-0,67	-0,69		0,55			***18		**18					
$\lambda_{ratio}$	0,68	0,51	0,48		0,48	-0,44										*15
$SL_{max\ ratio}$		-0,71	-0,79	-0,84		0,54	0,83			**18	**18					
$SA_{cl}$		0,59	0,84	0,85					-0,77		***18					
$SA_{op}$			0,77	0,82			-0,69		0,69	0,96						
GCW													**15	***15		*15
GCL												0,68		***15		
SS												0,9	0,93			
SD	-0,63					-0,64										**15
SI	-0,52					-0,69		-0,54				0,64		0,45	0,72	

### Cross-correlations between stomatal kinetics and morphology

The dynamic parameters  $\tau$ ,  $\lambda$ ,  $SL_{max}$  and SA displayed significant and high correlations between their opening and closing values (Table 4).  $\tau$ ,  $\lambda$  and  $SL_{max}$  also correlated with each other, especially within the same irradiance change sequences, except for  $\lambda$  vs.  $SL_{max}$  where the correlations were lower or not significant during opening and closing respectively. However, within the same sequence, SA did only correlate with  $\lambda$  and not with  $\tau$  or  $SL_{max}$ .

There were no correlations between  $\tau$ ,  $\lambda$ ,  $SL_{max}$ , SA and the stomatal size parameters (GCW, GCL, SS). For closure,  $\tau$  and  $SL_{max}$  showed small negative correlations with SD and SI (Fig. 3), associating more stomata with faster responses. The  $\tau$  relationships were more clearly driven by the treatments differences than the  $SL_{max}$  relationships (Fig. 3). Whereas  $\lambda$  did not correlate with stomatal size or density parameters, its asymmetry ( $\lambda$  ratio) correlated negatively with SI, expressing a tendency for the opening delay to be longer with more guard cells per total cells.



**Figure 3:** Cross correlations between dynamic parameters of the closing sequences ( $\tau$  – time constant,  $\lambda$  – lag time and  $SL_{max}$  – maximum slope) and stomatal parameters (SS -stomatal size, SD -stomatal density and SI -the stomatal index). Black dots for “Control”, white squares for “Shade” and white triangles for “Drought” treatment.

## **Discussion**

### **Treatments impact on steady states values**

Under the high irradiance conditions of SS1 and SS3, both treatments reduced  $g_s$  and  $A$  compared to control, where “Drought” had a stronger impact on  $g_s$  and “Shade” a stronger impact on  $A$ . The latter is probably due to a reduced photosynthetic capacity for the plants of the “Shade” treatment (confirmed by unpublished data). Stomatal closure under drought is a well studied response (Turner, 1974; Tardieu and Davies, 1992; Giorio et al., 1999), whereas the stomatal closure under shade might be due to a  $C_i$  mediated signal to optimize the leaf internal  $CO_2$  concentration (Mott, 1988).

### **Impact of the treatments on the dynamic response to irradiance**

Kirschbaum et al. (1988) proposed a dynamic model in which the response to irradiance was hypothesized to be composed of three functional steps: first, a biochemical signal that responds directly to irradiance, then the subsequent variation of osmotic potential causing finally the movement of water, in/out the guard cells, inducing the actual stomatal movement. From our model we extracted two parameters ( $\tau$  and  $\lambda$ ) both expressed as time constants, where  $\lambda$  (as a lag time estimate) could be related to the time needed for the first biochemical signal induction, such as the phototropin I and II or zeaxanthin (Demming-Adams et al., 1989; Christie, 2007). Further,  $\tau$ , describing the steepness of the sigmoidal shape (Fig. 1b), could be related to the response time of the stomatal movement itself, which might be related to the ion and water fluxes operating during stomatal movements (Blatt, 2000).

Similarly to the steady state parameters, the dynamic response to irradiance has been significantly changed by both treatments and resulted in contrasting stomatal behaviours in terms of opening and closing. For the “Control” treatment, the range values of  $\tau$ ,  $\lambda$  and  $SL_{max}$  were comparable to a study on multiple species (including *Nicotiana tabacum*) using a similar dynamic model and irradiance variations (McAusland et al., 2016). This study also showed a strong relationship between  $\tau$  and  $SL_{max}$  across species. The different treatments used in our study allowed a more detailed analysis of the overall coordination between lag and response times. The “Drought” treatment decreased lag ( $\lambda$ ) and response ( $\tau$ ) times for opening as well as closing, with a stronger impact on closing for  $\lambda$ , but a stronger impact on opening for  $\tau$ . No impact of drought was visible for  $SL_{max}$  due to a simultaneous decrease in amplitude. It has been suggested that plants from drier climates or experiencing a drought stress showed similar faster responses (Vico et al., 2011; Lawson and Blatt, 2014). To the best of our knowledge, only a few other studies have investigated experimental drought impact on the dynamic of stomatal response (Qu et al., 2016; Haworth et al., 2018). Both studies observed faster responses associated to drought during stomatal closing, however, Haworth et al. (2018) found no impact of drought on the opening sequence, which differs from our results. Therefore, literature results as well

as our study seem to suggest an increase in stomatal speed under drought, however a conclusion on a differential impact between opening and closing will still need more experimental evidence. However, the coordinated response of the two time constants towards more rapid stomatal responses (reduced  $\tau$  and  $\lambda$  values) during drought suggest a tighter coupling between  $A_n$  and  $g_s$ . This might reduce the loss of water, both at the instantaneous and long-term scale (McAusland et al. 2016) and thereby improve water use efficiency.

To our knowledge, only few studies have estimated stomatal dynamics on experimental shade or low irradiance growth conditions (Kardiman and Raebild, 2017; Matthews et al., 2018). Our results on  $\tau$  and  $SL_{max}$  for closing tended to be in agreement with the previous studies in which shade grown plants displayed slower stomatal responses to irradiance, however for opening no differences to “Control” was shown. Whereas for the lag time ( $\lambda$ ) an acclimation in the opposite direction to a faster response, similarly to the “Drought” treatment, was shown. These results suggest that response ( $\tau$ ) and lag times ( $\lambda$ ) not only acclimated independently to the prevailing environmental treatments, but also that opening and closing mechanisms were not affected similarly by environmental conditions. Such differences between opening and closing response times ( $\tau$ ) might be partly due to the differential ion flux pathways involved in solute uptake and loss involved in stomatal opening and closing, respectively (Blatt, 2000; Shimazaki et al., 2007; Lawson and Blatt 2014). Moreover, Haworth et al (2018) have suggested that the free-ABA content might also have a large influence of the speed of stomatal movements. The acclimations observed for lag time might be more dependent on signalling pathways for irradiance signals (Blatt, 2000), but also via leaf internal  $CO_2$  concentration, modified by the irradiance impact on photosynthesis (Hiyama et al. 2017).

There was a strong asymmetry towards slower stomatal opening in the “Control” treatment for  $SL_{max}$  as well as  $\tau$  and  $\lambda$ . After Woods and Turner (1971) an asymmetry in this direction might be an adaptation to reduce water loss as a fast-stomatal closing allows a tighter coupling between  $A_n$  and  $g_s$  thus reducing excessive loss of water (Tinoco-Ojanguren and Pearcy, 1992; Ooba and Takahashi, 2003). Whereas a slower opening might avoid overshooting situations where stomata continue to open after an increase in irradiance, even when photosynthesis is actually saturated (MacAusland et al., 2016). However, no asymmetry was found for the “Drought” treatment concerning  $SL_{max}$  and  $\tau$ , suggesting a stronger impact of drought on the physiological mechanisms affecting the opening speed. Whereas for the  $\lambda$  the asymmetry was even significantly stronger under drought, suggesting that the speed of the biochemical signalling of the irradiance change was more increased for closing, even if also the opening lag time was more rapid compared to control.

Ooba and Takahashi (2003) suggested that light limited environments would favour a more rapid increase in  $g_s$  as a faster stomatal opening allows a better gas exchanges coupling and should theoretically increase the overall  $CO_2$  uptake. The experimental “Shade” treatment used here did increase the response time for closing relatively more than for opening, however this was not seen for the closing speed, which was actually reduced more for closing. By dissecting the speed into several parameters as  $\tau$ , the response time (independent of amplitude), the amplitude itself and  $\lambda$ , the lag time, we were able to show that these parameters were affected differently, both “Drought” and “Shade” treatments equilibrated the response times between opening and closing, whereas the asymmetry of the lag time was significantly accentuated by the “Drought”. This could suggest that irradiance response signalling pathways as well as physiological mechanisms relating to stomatal movements might be different between opening and closing and acclimate differently to environmental constraints. However, to substantiate such a hypothesis, more detailed studies are necessary on the molecular level.

#### ***Acclimation of stomatal morphology to drought and shade***

Plants are known to adjust stomatal density, index and size during leaf development to the prevailing environmental conditions (Rawson and Craven, 1975; Carins Murphy et al., 2012; Kalve et al., 2014; McAusland et al., 2016). The decrease of stomatal density (SD) with increasing atmospheric  $CO_2$  concentration is well documented (Woodward, 1987; Pal et al., 2005; Franks and Beerling, 2009); however, there is no clear consensus about the impact of drought on stomatal morphology. Theodorou et al. (2013) observed antagonistic responses of SD among genotypes of grapevine cultivars submitted to drought. Similar contrasting results have been reported in tree (Laajimi et al., 2011) or grass species (Xu and Zhou, 2008). Concerning shade growth conditions, most of the literature suggests a decrease of SD (Brodribb and Jordan, 2011; Aasamaa and Aphalo, 2016; Kardiman and Raebild, 2017; Matthews et al., 2018), linked to a lower stomatal index (SI) (Ashton and Berlyn, 1994, Sun et al., 2003; Aasamaa and Aphalo, 2016). In this study, tobacco plants displayed no acclimation to water deficit in terms of stomatal size, density or index, despite the high intensity of the water stress during the whole growing period, and thus the development of the measured leaves. However, the plants grown under shade displayed a significantly reduced SD, linked to a decrease in SI but no change of the stomatal size, which corroborates the literature results on woody and herbaceous species other than tobacco (Gay and Hurd, 1975; Aasama and Aphalo 2016; Carins-Murphy et al., 2016; Kardiman and Raebild, 2017). The lack of such a correlation in our study suggests that the decrease in stomatal density under “Shade” was due to an impact on stomatal patterning during leaf development.

### ***Relationship between dynamic parameters and stomatal morphology***

Most of the studies on the relationship between stomatal morphology and dynamics report a faster stomatal response associated with smaller stomata or a higher stomatal density (Hetherington and Woodward 2003; Franks and Farquhar, 2007; Drake et al., 2013; Raven, 2014, Xiong et al., 2017). Nevertheless, other recent studies did not detect any significant correlation between stomatal density, size and the rapidity of response (Haworth et al., 2015; Aasamaa and Aphalo, 2016; Elliot-Kingston et al., 2016). Most of these studies focused on the inter-specific diversity while only one explored within species variation induced by an experimental shade (Aasama and Aphalo, 2016). In all of these studies the rapidity of response was expressed as speed that is  $g_s$  variation over time. In our study we were able to decompose the speed of stomatal response ( $SL_{max}$ ) into several parameters ( $\tau$  and  $SA_{g_s}$ ) and put in evidence that the similar  $SL_{max}$  found in “Control” and “Drought” treatments resulted from significantly different response times ( $\tau$ ) and amplitude of stomatal response and therefore very different dynamic responses under these two treatments (Table 2). McAusland et al., (2016) have used a similar model and have found across species with elliptical shaped stomata that pore length correlated with speed ( $SL_{max}$ , for opening only), probably related to the amplitude of the response (strong correlation with steady state  $g_s$ ), but not with the response time ( $\tau$ ). In our study, within one species but across treatments, we did not find any correlation between dynamic parameters and guard cell length, width or surface, similarly to Aasama and Aphalo (2016). This result might be due to the low variability of stomatal sizes within species, despite the range of environmental conditions. However, there were significant correlations between stomatal density or index and closing related parameters such as  $SL_{max}$  and  $\tau$ . For the latter this was clearly a co-variation related to the differences among treatments, however for  $SL_{max}$  this was less clear (Fig. 3) and might therefore suggest an effect of the number of stomata on stomatal closing, with more stomata resulting in faster dynamics. Such a more rapid stomatal response with higher stomatal density had already been suggested for opening sequences by Vialet-Chabrand et al (2016) using simulations. Finally, the observation of strong differences in stomatal dynamics without (and not related to) a strong variation in stomatal size leads us to the conclusion that within-species, acclimation of stomatal lag and response times involve other mechanisms than stomatal morphology. Such mechanisms could include physiological de-/activation of ion transport in the stomatal guard cells, or a genetic control on the expression of ion transport channels.

### ***Conclusion***

In this study we highlighted the strong impact of “Drought” and “Shade” treatments on the dynamic response of stomata to variations in irradiance in tobacco plants. The rapidity of response was affected



by both treatments but in different ways, where “Drought” reduced both the delay and response times (both faster), “Shade” treatment also reduced the delay but slowed the response time, thus significantly changing the shape and thus the dynamic of the response. Moreover, we show different stomatal dynamics between opening and closing sequences among treatments, suggesting the existence of different signalling pathways and/or mechanisms involved in the asymmetrical response to irradiance in tobacco plants. However, these tests were only performed with one very large step change in irradiance. An important perspective would be to confirm the coherence of these results with step changes of different amplitudes and different starting irradiances.

The impact of the “Shade” treatment on the stomatal dynamics could be an indication that when introducing such dynamics into canopy scale models, a different parameterization between sun and shade leaves might have to be taken into account. To gain a more mechanistic insight into the acclimation of stomatal dynamics to the growth environment, a more molecular approach would be necessary to observe short-term variations of guard-cell gene expression, ion channel functioning or abundance.

#### ***Declaration of interest***

All authors disclose any financial or personal conflict of interest.

#### ***Author contributions***

TG, CD, OB designed the experiment, CD and JF provided study material and environment, TG and CD conducted the experiment, TG, CD, OB did the data analysis, and TG, CD, OB, JF wrote the manuscript and were involved in the interpretation and critical discussion of the results, OB and JF obtained funding.

#### ***Acknowledgement***

TG acknowledges the PhD grant from the H2Oak ANR-14-CE02-0013 project. The research stay of TG was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE) and financial support of INRA / DARESE. JF and CD acknowledge funding from the MINECO project CTM2014-53902-C2-1-P.

## ***Bibliography***

- Aasamaa, K., Söber A., 2011. Responses of stomatal conductance to simultaneous changes in two environmental factors. *Tree Physiol.* 31: 855–864
- Aasamaa, K., Aphalo, P.J., 2016. The acclimation of *Tilia cordata* stomatal opening in response to light, and stomatal anatomy to vegetational shade and its components. *Tree Physiol.* 37, 209-219
- Ashton, P.M.S., Berlyn, G.P., 1994. A comparison of leaf physiology and anatomy of *Quercus* (section *Erythrobalanus-Fagaceae*) species in different light environments. *Am J Bot.* 81, 589–597
- Blatt, M.R., 2000. Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16, 221-241
- Brodribb, T.J., Jordan, G.J., 2011. Water supply and demand remain balanced during leaf acclimation of *Nothofagus cunninghamii* trees. *New phytologist.* 192, 437-448
- Carins Murphy, M.R., Jordan, G.J., Brodribb, T.J., 2016. Cell expansion not cell differentiation predominantly co-ordinates veins and stomata within and among herbs and woody angiosperms grown under sun and shade. *Annals of Botany.* 118, 1127-1138
- Carins Murphy, M.R., Jordan, G.J., Brodribb, T.J., 2012. Differential leaf expansion can enable hydraulic acclimation to sun and shade. *Plant, Cell & Environment.* 35, 1407–1418.
- Casson, S., Gray, J.E., 2008. Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist.* 178, 9-23
- Christie, J.M., 2007. Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol.* 58, 21-45
- Clifford, S.C., Black, C.R., Robert, J.A., Stronach, I.M., Singleton-Jones, P.R., Mohamed, A.D., Azam-Ali, S.N., 1995. The effect of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis hypogaea* (L.)). *J Exp Bot.* 46, 847-852
- Demming-Adams, B., Winter, K., Kruger, A., Czygan, F.C., 1989. Light Response of CO<sub>2</sub> Assimilation, Dissipation of Excess Excitation Energy, and Zeaxanthin Content of Sun and Shade Leaves. *Plant Physiol.* 90, 881-886
- Doheny-Adams, T., Hunt, L., Franks, P.J., Beerling, D.J., Gray, J.E., 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367, 547–555
- Dow, G.J., Berry, J.A., Bergmann, D.C., 2014. The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 201, 1205–1217
- Drake, P.L., Froend, R.H., Franks, P.J., 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J Exp Bot.* 64, 495–505
- Engineer, C., Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Israelsson-Nordstrom, M., Azoulay-Shemer, T., Rappel, W.J., Iba, K., Schroeder, J., 2016. CO<sub>2</sub> sensing and CO<sub>2</sub> regulation of stomatal conductance: advances and open questions. *Trends Plant Sci.* 21, 16-30

- Elliot-Kingston, C., Haworth, M., Yearsley, J.M., Batke, S.P., Lawson, T., McElwain, J.C., 2016. Does Size Matter? Atmospheric CO<sub>2</sub> May Be A Stronger Driver of Stomatal Closing Rate Than Stomatal Size in Taxa That Diversified under Low CO<sub>2</sub>. *Front Plant Sci.* 7, 1253
- Franks, P.J., Beerling, D.J., 2009. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 10343–10347
- Franks, P.J., Doheny- Adams, T., Britton- Harper, Z.J. and Gray, J.E., 2015. Increasing water- use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, 207, 188-195
- Franks, P.J, Farquhar, G.D., 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol.* 143, 78–87
- Gay, A.P., Hurd, R.G., 1975. The influence of light on stomatal density in the tomato. *New Phytol.* 75, 37-46
- Giorio, P., Sorrentino, G., d’Andria, R., 1999. Stomatal behavior, leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. *Env Exp Bot.* 42, 95-104
- Haworth, M., Killi, D., Materassi, A., Raschi, A., 2015. Coordination of stomatal physiological behaviour and morphology with carbon dioxide determines stomatal control. *American Journal of Botany.* 102, 677-688
- Haworth, M., Marino, G., Cosentino, S. L., Brunetti, C., De Carlo, A., Avola, G., . & Centritto, M., 2018. Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany.* 147, 116-124.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901–908
- Hiyama, A., Takemiya, A., Munemasa, S., Okuma, E., Sugiyama, N., Tada, Y., Murata, Y., Shimazaki, K.I., 2017. Blue light and CO<sub>2</sub> signals converge to regulate light-induced stomatal opening *Nat. Commun.* 8, 1284
- Jones, H.G., 1977. Transpiration in barley lines with differing stomatal frequencies. *J Exp Bot* 28, 162–168
- Kardiman, R., Ræbild, A., 2017. Relationship between stomatal density, size and speed of opening in Sumatran rainforest species, *Tree Physiology*, <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx149>
- Kaiser, E., Morales, A. and Harbinson, J., 2018. Fluctuating light takes crop photosynthesis on a rollercoaster ride. *Plant physiology*, 176, 977-989.
- Kalve, S., Fotschki, J., Beeckman, T., Vissenberg, K., Beemster, G.T.S., 2014. Three-dimensional patterns of cell division and expansion throughout the development of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* 65, 6385–6397.

- Kirschbaum, M.U.F., Gross, L.J., Percy, R.W., 1988. Observed and modelled stomatal responses to dynamic light environments in the shade plant *Alocasia macrorrhiza*. *Plant Cell Environ.* 11, 111–121
- Laajimi, N.O., Boussadia, O., Skhiri, F.H., Teixeira da Silva, J.A., Rezgui, S., Hellali, R., 2011. Anatomical adaptations in vegetative structures of Apricot tree (*Prunus armeniaca* L.) cv. ‘Amor El Euch’ grown under water stress. *Fruit, Vegetable and Cereal Sci. Biotech.* 5, 46-51
- Lawson, T., Blatt, M.R., 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol.* 164, 1556–1570
- Lawson, T., Morison, J.I.L., 2004. Stomatal function and physiology. In AR Hemsley, I Poole, eds, *The Evolution of Plant Physiology; from whole plants to ecosystem*. Elsevier, Amsterdam, pp. 217–242
- Lawson, T., von Caemmerer, S., Baroli, I., 2010. Photosynthesis and stomatal behaviour. In UE Lüttge, W Beyschlag, B Büdel, D Francis, eds, *Progress in Botany*. Springer, Berlin, pp. 265–304
- Martins, S.C., McAdam, S.A., Deans, R.M., DaMatta, F.M. and Brodribb, T.J., 2016. Stomatal dynamics are limited by leaf hydraulics in ferns and conifers: results from simultaneous measurements of liquid and vapour fluxes in leaves. *Plant, cell & environment.* 39, 694-705
- Matthews, J.S., Vialet-Chabrand, S.R. and Lawson, T., 2018. Acclimation to fluctuating light impacts the rapidity and diurnal rhythm of stomatal conductance. *Plant physiology.* 176, 1939-1951
- McAusland, L., Vialet-Chabrand, S., Davey, P., Baker, N.R., Brendel, O., Lawson, T., 2016. Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol.* 211, 1209–1220
- Merilo, E., Laanemets, K., Hu, H., Xue, S., Jakobson, L., Tulva, I., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, P.L., Schroeder, J.I., Broschè, M., Kollist, H., 2013. PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness-, and CO<sub>2</sub>-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiol.* 162, 1652-1668
- Mott, K.A., 1988. Do Stomata Respond to CO<sub>2</sub> Concentrations Other Than Intercellular. *Plant Physiol.* 86, 200–203
- Ooba, M., Takahashi, H., 2003. Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecol Modell.* 164, 65–82
- Outlaw, W.H., 2003. Integration of cellular and physiological functions of guard cells. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 22, 503–529
- Pal, M., Rao, L.S., Jain, V., Srivastava, A.C., Pandey, R., Raj, A., Singh, K.P., 2005. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen on wheat growth and photosynthesis. *Biolo. Plantarum.* 49, 467-470
- Percy, R.W., Schulze, E.D., Zimmermann, R., 2000. Measurement of transpiration and leaf conductance. *Plant Physiological Ecology*, pp. 137-160
- Qu, M., Hamdani, S. and Bunce, J.A., 2016. The physiology and genetics of stomatal adjustment under fluctuating and stressed environments. *Applied Photosynthesis-New Progress*

- Qu, M., Hamdani, S., Li, W., Wang, S., Tang, J., Chen, Z., Song, Q., Li, M., Zhao, H., Chang, T., 2016a Rapid stomatal response to fluctuating light: an under-explored mechanism to improve drought tolerance in rice. *Funct. Plant Biol.* 43, 727–738
- Raven, J.A., 2014. Speedy small stomata? *J Exp Bot.* 65, 1415–1424
- Rawson, H., Craven, C., 1975. Stomatal development during leaf expansion in tobacco and sunflower. *Australian Journal of Botany.* 23, 253–261
- Schindelin, J.; Rueden, C. T., Hiner, M. C., Eliceiri K.W., 2015 The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Rep Dev.* 82,518-529
- Schlüter, U., Muschak, M., Berger, D., Altmann, T., 2003. Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *J Exp Bot.* 54, 867-874
- Schulze, E.D., Hall, A.E., 1982. Stomatal responses, water loss and CO<sub>2</sub> assimilation rates of plants in contrasting environments. *Physiological Plant Ecology II*, pp. 181-230
- Shimazaki, K.I., Doi, M., Assmann, S., Kinoshita, T., 2007. Light Regulation of Stomatal Movement. *Annu Rev Plant Biol.* 58, 219-247
- Sun, B., Dilcher D.L., Beerling D.J., Zhang C., Yan D., Kowalski E. 2003. Variation in Ginkgo biloba L. leaf characters across a climatic gradient in China. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100,7141–7146
- Tardieu, F., Davies, W.J., 1992. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiol* 98, 540-545
- Team, R. C., 2015. R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria: 2014. R: A language and environment for statistical computing, 2013
- Theodorou, N., Koundouras, S., Zioziou, E., & Nikolaou, N. (2013). Responses of leaf stomatal density and anatomy to water deficit in four winegrape cultivars (*Vitis vinifera* L.). AMPELOS 2013 - 3<sup>rd</sup> international symposium on trends in world vitiviniculture development conference; 30-31 May 2013 Santorini island, Greece
- Thomas, P.W., Woodward, F.I., Quick, W.P., 2004. Systemic irradiance signaling in tobacco. *New Phytol.* 161, 193-198
- Tinoco-Ojanguren, C, Pearcy, R.W., 1992. Dynamic stomatal behavior and its role in carbon gain during lightflecks of a gap phase and an understory Piper species acclimated to high and low light. *Oecologia.* 92, 222–228
- Turner, N.C., 1974. Stomatal behavior and water status of maize, sorghum, and tobacco under field conditions II. At low soil water potential. *Plant Physiol.* 53, 360-365
- Tuteja, N., 2007. Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior.* 2, 135-138
- Vico, G., Manzoni, S., Palmroth, S., Katul, G., 2011. Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytol.* 192, 640–652

- Uhl, S., Dreyer, E., Brendel, O., 2013. Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* 36, 1529-1546
- Violet-Chabrand, S., Matthews, J.S.A., Brendel, O., Blatt, M.R., Wang, Y., Hills, A., Griffiths, H., Rogers, S. and Lawson, T., 2016. Modelling water use efficiency in a dynamic environment: an example using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 251, 65-74
- Violet-Chabrand, S.R.M., Matthews, J.S.A., McAusland, L., Blatt, M.R., Griffiths, H., Lawson, T., 2017. Temporal Dynamics of Stomatal Behavior: Modeling and Implications for Photosynthesis and Water Use. *Plant Physiol*. 174, 603-613
- Woods, D.B., Turner, N.C., 1971. Stomatal response to changing light by four tree species of varying shade tolerance. *New Phytol*. 70, 77-84
- Woodward, F.I., 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO<sub>2</sub> from preindustrial levels. *Nature*. 327, 617-618
- Xiong, D., Douthe, C., Flexas, J., 2017. Differential coordination of stomatal conductance, mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance in response to changing light across species. doi: 10.1111/pce.13111
- Xu, Z., Zhou, G., 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot*. 59, 3317-3325

## Synthèse du chapitre méthodologique

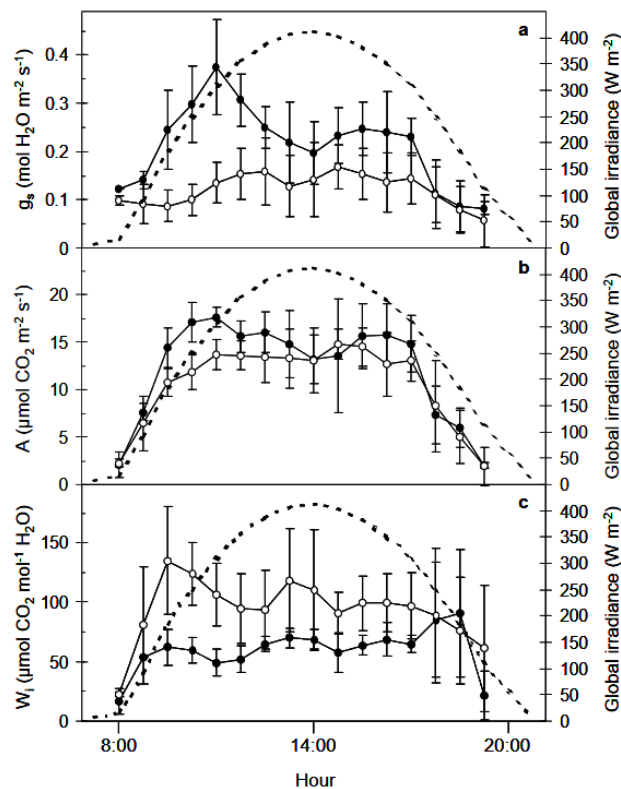
Les données présentées ci-dessus démontrent l'impact des conditions de croissance sur la dynamique de réponse stomatique. Lorsque les plantes grandissent sous des conditions environnementales différentes, la dynamique de réponse stomatique à un changement de lumière s'en trouve fortement altérée. Il est par ailleurs notable que ces altérations sont spécifiques aux facteurs environnementaux limitants propres à chaque groupe de traitement. Ainsi, une exposition à la sécheresse n'a pas les mêmes conséquences qu'une croissance sous ombrage sur la dynamique de réponse stomatique. Au cours de cette expérimentation, des plants de tabacs (*Nicotiana tabacum*) ont grandi pendant 21 jours en étant exposés à un stress hydrique ou un faible accès à la lumière. Une campagne de mesure visant à caractériser la dynamique de fermeture puis d'ouverture stomatique ainsi que l'asymétrie de ces deux séquences fut alors menée. Au-delà des mesures d'échanges gazeux foliaires, l'utilisation d'un modèle dynamique nous a permis de décrire la réponse stomatique par trois paramètres distincts ( $SL_{max}$ ,  $\lambda$  et  $\tau$ ),  $\tau$  étant une constante de temps dessinant l'allure de la courbe,  $\lambda$  étant le délai de réponse de la conductance stomatique (le temps entre le changement de lumière et l'atteinte du point d'inflexion de la sigmoïde). La pente max ( $SL_{max}$ ) est calculée en intégrant l'amplitude du changement de conductance d'un état stable (steady-state) à l'autre et de la constante  $k$ ,  $SL_{max}$  décrit une vitesse de réponse maximale suite au changement du paramètre environnemental.

### *Impact de la morphologie stomatique sur la dynamique de réponse à la lumière*

Dans cet article, nous avons également testé la possible relation entre morphologie stomatique et vitesse de réponse. Il faut préalablement noter que le traitement de stress hydrique n'a pas eu d'impact sur la morphologie stomatique en comparaison du groupe témoin. En revanche, les plants de tabac s'étant développés sous ombrage affichent une densité stomatique (SD) ainsi qu'un index stomatique (SI) significativement plus faible que les autres traitements sans pour autant diverger des deux autres groupes en termes de taille des stomates (SS). Si dans le cas d'une croissance à faible lumière un impact de l'anatomie stomatique sur la rapidité des mouvements stomatiques à la lumière n'est pas à exclure, l'absence de différence d'anatomie entre les groupes témoins et sous stress hydrique suggère que la diversité des réponses temporelles de  $g_s$  observées n'est pas liée à la morphologie chez les plants de tabac.

### Perspectives au regard de nos travaux sur les chênes

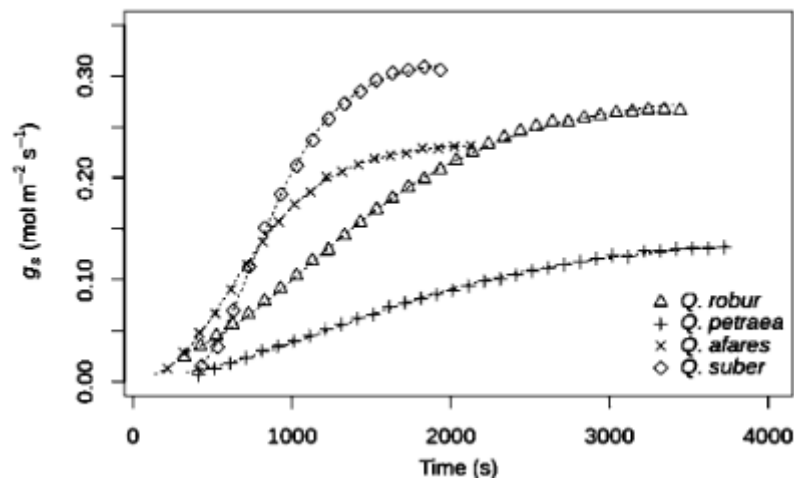
Outre les considérations théoriques de l'impact de la dynamique de réponse des stomates aux stimuli environnementaux, nous avons mis en évidence par ces travaux que les conditions de croissance pouvaient considérablement impacter la dynamique de réponse à la lumière chez les plantes indépendamment des caractéristiques anatomiques des stomates. Il n'existe que peu d'études traitant la dynamique de réponse temporelle chez le chêne. Dans un premier temps, Roussel et al., (2009) observèrent des comportements stomatiques particulièrement divergents au cours de cinétiques journalières monitorant les échanges gazeux foliaires ( $A$ ,  $g_s$ ,  $W_i$ ) chez deux génotypes sélectionnés pour leurs efficacités d'utilisation de l'eau extrêmes (hautes et faibles valeurs de discrimination isotopique :  $\Delta^{13}C$  : figure 8). En outre, les plants sélectionnés pour leur faible efficacité affichaient des valeurs de conductance stomatique bien plus élevées que le groupe de forte efficacité, caractérisé par une ouverture stomatique relativement plus rapide et de fortes amplitudes en début de matinée, résultant en des valeurs de  $W_i$  élevées tout le long de la journée. Ces travaux préliminaires insufflèrent donc l'idée qu'il pourrait exister des comportements stomatiques impactant l'assimilation et l'eau consommée au cours d'un cycle diurne et par extension à l'efficacité d'utilisation de l'eau intégrée sur le long terme.



**Figure 8** : Exemple de cinétique journalière de la conductance stomatique (a), de l'assimilation de  $CO_2$  (b) et de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque qui en résulte ( $W_i$ ) : d'après la thèse de Magali Roussel.



Par la suite, au cours de ses travaux de thèse, Silvère Vialet-Chabrand (Fig 9) mit en évidence une large diversité interspécifique de réponses stomatiques à la lumière au cours de cinétiques journalières et de changement instantanés d'irradiance chez cinq espèces de chênes faisant état d'une importante diversité au niveau de l'anatomie stomatique et de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (Vialet-chabrand et al., 2013b).



**Figure 9** : Diversité de la réponse stomatique à une augmentation de la lumière de 0 à 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  chez le genre *Quercus* (D'après Vialet-Chabrand Thèse)

Par l'usage de la modélisation dynamique des échanges gazeux foliaires, il mit en relief l'importance de l'intégration en continu des variations microclimatiques afin de décrire les variations de  $g_s$  chez le chêne. Explorant la réponse temporelle de  $g_s$  à un changement brutal des conditions environnementales, Vialet-chabrand (2013c) identifia également une réponse différentielle à la lumière bleue entre les chênes sessiles et pédonculés. En effet l'exposition à différentes qualités du spectre lumineux entraînait une diminution plus forte de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque chez *Q. robur*. En complément de ces différences interspécifiques de perception du spectre lumineux, il observa une diversité de perception du niveau de  $\text{CO}_2$  dans la feuille, les chênes afares et liège présentant une réponse différentielle à celle de *Q. robur* et *Q. petraea*. Cependant ces travaux ne furent réalisés que sur un nombre restreint de plants et ne sont donc probablement pas représentatifs des espèces.

Cet ensemble d'éléments laisse supposer que la dynamique de réponse stomatique pourrait jouer un rôle majeur dans les échanges gazeux qu'entretiennent *Q. robur* et *Q. petraea* avec leur environnement, particulièrement lorsque ceux-ci sont intégrés sur le long terme (Efficacité de transpiration). Les disparités de réponses entre ces deux espèces pourraient également être associées à la différenciation de leurs niches écologiques respectives. Ce faisant, dans un effort

d'identification et de caractérisation des traits sous-jacents impliqués dans la diversité et la plasticité de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez ces deux espèces, la modélisation et la description de la réponse temporelle de  $g_s$  à des stimuli environnementaux (lumière,  $CO_2$ , VPD) constitueront des axes majeurs de réflexion au sein des chapitres suivants de ce manuscrit.

## Chapitre III Etude comparative de *Q. robur* et *Q. petraea*

### Introduction

L'approche écophysio­logique du fonctionnement des plantes constitue sans surprise l'interface entre Ecologie et Physiologie. Ce champ de recherche permet d'appréhender les mécanismes d'adaptation aux pressions de sélection exercées par l'environnement et d'identifier le rôle des traits physiologiques impliqués dans les mécanismes de survie et de productivité des plantes au sein de leur environnement naturel. Ce type d'approche est à l'origine d'avancées majeures en termes de compréhension des mécanismes d'adaptation à des facteurs environnementaux spécifiques tels que la température, la lumière ou la disponibilité en eau. Couplés aux approches génomiques et moléculaires, les progrès apportés par l'Ecophysio­logie nous renseignent sur l'ensemble des cascades d'interactions impliquées aussi bien à l'échelle biochimique, physiologique qu'au niveau des performances globales de la plante ainsi que leurs déterminismes génétiques. Il est par ailleurs possible d'étendre l'approche écophysio­logique à un champ plus large lorsqu'il s'agit d'aborder les conséquences évolutives des traits biochimiques, physiologiques et morphologiques appliquées à l'échelle des populations ou des communautés végétales. Néanmoins, cette approche se confronte à la difficulté d'intégrer l'échelle foliaire-individuelle à l'échelle supérieure des populations et communautés, due notamment aux différentes échelles de temps impliquées. Cette étape d'intégration n'en demeure pas moins essentielle dans l'objectif de lier les mesures physiologiques de terrain aux autres domaines de recherche en écologie et biologie des populations.

### Dépérissement des chênaies

Le chêne, à l'instar de toute autre espèce végétale est assujéti aux risques de son environnement. Au fil des siècles, ces aléas se sont traduits par des épisodes de dépérissement récurrents au sein des populations de chênes (Bréda et al., 2006), notamment au cours de l'Histoire récente, rapports d'archives et relevés dendrochronologiques faisant état d'évènements de stress au cours des trois dernières décennies (Thomas et al., 2008). *Quercus robur* et *Quercus petraea* n'échappèrent pas à ce phénomène. Le déclin de leurs populations respectives fut décrit au sein de nombreuses nations d'Europe, la France n'étant pas en reste (Delatour, 1983 ; Macaire, 1984 ; Thomas et al., 2002). Typiquement, ces épisodes de déclin se caractérisent par un éclaircissement généralisé du peuplement, s'étendant sur une large aire de répartition et s'accompagnant d'un faible taux de mortalité. En outre, la couronne foliaire subit une abscission anormale des rameaux associée à une mortalité des bourgeons et des

branches. A ces symptômes s'additionnent parfois décoloration des feuilles, nécrose de certains tissus et réduction de la croissance radiale de l'arbre (Hartmann and Blank, 1992). Devant l'ampleur d'un tel phénomène, la communauté scientifique et les professionnels du secteur forestier furent amenés à s'interroger sur les causes de ces dépérissements mais aussi sur la différenciation écologique des chênes sessiles et pédonculés, les deux espèces étant inégalement frappées. En effet, les premières études réalisées révélèrent une apparente fragilité de *Q. robur*, celui-ci étant plus durement touché que son homologue *Q. petraea* (Becker & Levy 1982, Durand et al., 1983, Svolba & Kleinschmit, 2000). Déterminer les origines précises du dépérissement des arbres n'est néanmoins pas chose aisée et les connaissances actuelles sur la mortalité des arbres ainsi que leurs mécanismes de tolérance aux stress environnementaux ne sont pas entièrement explicités. En Europe centrale, de nombreux facteurs aux origines biotiques et abiotiques furent associés au dépérissement des populations de chênes. En outre, Thomas et al., (2002) proposèrent un modèle conceptuel d'intégration de ces différents facteurs et parvinrent alors à la conclusion que la défoliation entomologique par les insectes ravageurs combinée à des épisodes climatiques extrêmes tels que les sécheresses estivales ou les gelées hivernales constituaient les combinaisons de facteurs susceptibles d'être à l'origine des épisodes de déclin les plus sévères. Par ailleurs, ils identifièrent que les caractéristiques hydromorphiques des sites de peuplement étaient un élément particulièrement important impliqué dans la sensibilité au stress. Ainsi, bien que lourd de conséquences, c'est à travers l'étude du dépérissement des chênaies que s'est ouverte la voie vers la caractérisation des différences écologiques entre *Q. robur* et *Q. petraea*.

### Différenciation Ecologique des deux espèces

*Q. petraea* et *Q. robur* sont deux espèces co-occurrentes sur de nombreux sites en Europe. Elles y constituent des forêts mixtes au sein desquelles les deux espèces partagent un certain nombre de caractéristiques communes. Le chêne sessile et le chêne pédonculé sont des arbres avec une large aire de répartition colonisant une large amplitude de territoires. Cependant ils sont préférentiellement représentés sur les sols fertiles et relativement humides, conditions dans lesquelles les deux espèces deviennent dominantes au sein des systèmes forestiers (Eaton et al., 2016 ; Ellenberg, 2009). Toutefois, les chênes ne forment que rarement des forêts monospécifiques et doivent souvent faire compétition avec le Hêtre. Ainsi elles peuvent également être présentes en tant qu'espèces secondaires dans des forêts mixtes de basse altitude lorsque les sols et le climat le permettent (Ellenberg, 2009 ; Bohn et al., 2000). Les deux espèces sont capables de présenter un caractère pionnier en raison de la gamme d'environnements sur

lesquels ils sont capables de se développer. En raison de leur débourrement relativement tardif au cours de l'année, les deux espèces sont rarement exposées aux risques de gelées hivernales (Praciak et al., 2013). Les deux espèces développent des systèmes racinaires profonds leur conférant un ancrage solide et leur permettant de prospector le sol efficacement (Praciak et al., 2013 ; Savill, 2013). Malgré les nombreux traits communs aux deux espèces, leurs niches écologiques de prédilection divergent considérablement l'une de l'autre. Ainsi *Q. robur* affiche une tendance à grandir sur des sols chargés sous un climat plus continental ainsi que des régions humides le long des cours d'eau parfois sujettes aux inondations. En revanche, *Q. petraea* est considéré comme étant plus tolérant au stress hydrique, il se développe aisément sous un climat atlantique et des sols drainés et acides moins chargés en nutriments et parfois particulièrement rocheux. Il n'est pas rare de le répertorier le long des pentes ou au sommet de petits reliefs (Praciak et al., 2013 ; Jones, 1959; Savill, 2013 ; Aas et al., 2000 ; Aas et al., 2012). Les deux espèces sont exigeantes en terme d'accès à la lumière, plus particulièrement *Q. robur* (Praciak et al., 2013 ; Savill, 2013). De manière générale il est donc admis que *Q. robur* et *Q. petraea* présentent des niches écologiques clairement différenciées notamment par rapport à l'accès à l'eau et à leurs tolérances respectives pour le stress hydrique.

Bien qu'il soit communément admis au sein de la littérature que *Q. petraea* soit disposé à une meilleure tolérance à la sécheresse que *Q. robur*, nécessité est de mentionner l'existence d'une large gamme de tolérance à ce stress au sein du genre *Quercus* (Table 1 : d'après Dickson & Tomlinson, 1996). Aussi convient-il de relativiser l'étude comparative réalisée dans le cadre de ces travaux de thèse à l'échelle du genre *Quercus*.

Species name	Common name	Water Stress
<i>Q. rubra</i>	Northern red oak	Sensitive
<i>Q. shumardii</i>	Shumard oak	Sensitive
<b><i>Q. robur</i></b>	<b>Pedunculate oak</b>	<b>Sensitive</b>
<b><i>Q. petraea</i></b>	<b>Sessile oak</b>	<b>Intermediate</b>
<i>Q. velutina</i>	Black oak	Intermediate
<i>Q. coccinea</i>	Scarlet oak	Intermediate
<i>Q. macrocarpa</i>	Bur oak	Intermediate
<i>Q. muehlenbergii</i>	Chinkapin oak	Intermediate
<i>Q. marilandica</i>	Blackjack oak	Tolerant
<i>Q. stellata</i>	Post oak	Tolerant
<i>Q. laevis</i>	Turkey oak	Tolerant
<i>Q. gambelii</i>	Gambel oak	Tolerant

**Table 1** : Classification relative de la tolérance à un stress hydrique de quelques espèces du genre *Quercus*. (D'après Dickson & Tomlinson 1996)

Afin d'éviter de trop nombreuses récurrences entre articles et corps de texte de ce manuscrit, l'état de l'art traitant les différences écophysiologiques sur les plans anatomiques et physiologiques entre les espèces est intégré au dernier chapitre de synthèse de ces travaux.

### Le projet H2Oak (2014-en cours) : (*Q.petraea*, *Q.robur*)

Dans un contexte de changements climatiques, l'optimisation de la production de biomasse et la limitation de la consommation en eau par les plantes revêtent une importance toute particulière en gestion forestière. Focalisé sur la diversité des traits adaptatifs liée à l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE), le projet ANR H2Oak a été initié en 2014 sous l'égide du Docteur Oliver Brendel (coordinateur de ces travaux). Les objectifs de ce projet sont de déterminer dans quelle mesure WUE et les traits sous-jacents de l'efficacité jouent un rôle en termes d'incidence sur le fitness, d'adaptation de différentes provenances de chênes en fonction de leurs provenances et donc leurs conditions environnementales d'origine et s'il existe une diversité génétique suffisante au sein des populations pour répondre à la demande adaptative future liée aux changements climatiques. En outre, H2Oak combine des approches d'écologie des populations et d'écophysiologie de la plasticité de réponse à la sécheresse soutenues par les apports de la génétique des populations. Ce travail de thèse s'inscrit au sein du volet écophysiologique du projet H2Oak. De manière générale, H2Oak aspire à identifier chez le chêne les régions du génome associées à l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE), de caractériser la diversité de plasticité de réponse à la sécheresse ainsi que d'établir une liste de gènes candidats à l'aide de populations acclimatées à un gradient de stress hydrique, afin d'étudier l'adaptation de leurs régénérations naturelles au sein d'un système de sylviculture.

### Objectifs

Ce deuxième chapitre avait pour objectif de déterminer les causes physiologique et/ou anatomiques de la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) à travers plusieurs échelles d'intégration de l'efficacité, allant de mesures instantanées d'échanges gazeux foliaires en conditions naturelles ou contrôlées ( $W_i$ ) à des mesures intégrées dans le temps de la composition isotopique foliaire ( $\delta^{13}C$ ) et l'efficacité de transpiration (TE). Nous nous sommes par la suite attachés à décrire les éventuelles différences observables entre les deux espèces de chênes aussi bien en conditions non limitantes qu'en conditions de stress hydrique, explorant ainsi la plasticité de réponse à la sécheresse de WUE et de ses traits sous-jacents chez *Q. robur* et *Q. petraea*.

Afin de répondre à ces objectifs, deux expérimentations ont été réalisées en 2015 et en 2017.

Au cours de la première année de thèse (2015) nous avons réalisé une première étude comparative entre *Q. robur* et *Q. petraea*. A cette fin, nous avons planté en serre des glands provenant de deux forêts monospécifiques originaires de la même région forestière (Vallée de la Soane). La moitié des jeunes chênes devant par la suite être assujettie à une forte sécheresse expérimentale, nous avons préalablement constitué des sous-groupes au sein de chaque espèce sur les bases d'un screening phénotypique de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque (Wi). Cette sélection initiale assurant une gamme d'efficacité comprenant des phénotypes extrêmes ainsi qu'une distribution gaussienne des phénotypes d'efficacité au sein de chaque sous-groupe. Suite à cette sélection, la moitié des plantes fut soumise à des conditions hydriques limitantes. Un ensemble de campagnes de mesures explorant les échanges gazeux foliaires ainsi que la dynamique de réponse stomatique à la lumière fut alors réalisée. Les plantes furent enfin récoltées et tout un ensemble de variables biologiques mesuré (détaillé dans la première publication de ce chapitre : Article 2). Il faut par ailleurs noter que pendant l'ensemble de cette expérimentation la consommation hydrique individuelle des plantes fut comptabilisée grâce à un dispositif automatique d'arrosage et de pesée permettant à l'issue de la récolte d'estimer l'efficacité de transpiration des chênes (TE). Cette expérimentation fut également l'occasion de co-encadrer un stage pédagogique d'initiation à la recherche (Clark Raveloson - Master 1), dans la continuité de la mission de doctorant contractuel chargé d'enseignement exercée en parallèle de ces travaux de thèse (deux années).

Lors de la seconde étude comparative (2017), nous avons étudié 2 provenances de *Q. petraea* et 2 populations de *Q. robur* sélectionnées en fonction d'un gradient de stress hydrique des sites de provenance afin d'élargir la variabilité intra-spécifique de chaque espèce. Une approche différente de mise en place du stress fut choisie, l'ensemble des jeunes arbres ont ainsi été progressivement soumis à des conditions de stress hydrique de plus en plus intenses (détaillées dans la deuxième publication de ce chapitre : Article 3). Ce faisant, nous avons pu explorer la plasticité de réponse des échanges gazeux foliaires de ces deux espèces à une sécheresse progressive. En parallèle de ce suivi nous avons monitoré la dynamique de croissance radiale et verticale des jeunes plants. Additionnellement, deux campagnes de mesures d'échanges gazeux foliaires sur les mêmes pousses furent menées à deux stades spécifiques de la mise en sécheresse, espacées d'un mois l'une de l'autre : l'une en début d'expérimentation sous conditions non limitantes, l'autre à un stade de sécheresse modérée, nous permettant d'explorer à travers d'autres mesures la plasticité de réponse des échanges gazeux foliaires mais aussi de la capacité photosynthétique ainsi que la dynamique de réponse stomatique à la lumière des

deux espèces de chênes. Cette seconde étude comparative offrit également la possibilité de rédiger ainsi que co-encadrer un stage de recherche (Jimmy Wyss - Master 2).

L'approche par modélisation de la dynamique des échanges gazeux foliaires constitue une part importante de ces travaux de thèse. Cette approche fut en effet employée au cours de l'ensemble des quatre expérimentations réalisées entre 2015 et 2017. Une synthèse de ces travaux est par ailleurs dressée dans le dernier chapitre de ce manuscrit. Les campagnes de mesures de dynamique réalisées en 2015 (publication 2) constituèrent les travaux préliminaires de cette approche, nous permettant d'explorer chez les deux espèces la vitesse de réponse stomatique ainsi que sa plasticité de réponse à la sécheresse. A l'instar de WUE, nous avons visé à déterminer les traits physiologiques et/ou anatomiques liés à la dynamique de réponse stomatique à la lumière ainsi que WUE elle-même à travers ses différentes échelles d'intégration. Nous avons décidé de poursuivre les travaux exploratoires de 2015 en réitérant des campagnes de mesures de la dynamique stomatique au cours de l'expérimentation de 2017 (publication 3) et complétant les autres travaux réalisés sur le sujet (publication 1 : chapitre II (tabac) et publication 4 chapitre IV (*Q. petraea* uniquement)). Ces campagnes avaient également pour objectifs d'explorer la plasticité de la dynamique sous sécheresse. Néanmoins, il fut décidé de modifier légèrement le protocole de mesures (intensité des changements de lumière ainsi que leur nombre) afin d'explorer dans une plus large mesure la dynamique de réponse des stomates à la lumière.

Les résultats de ces deux études comparatives sont présentés au sein de ce chapitre sous forme de deux publications relatives spécifiquement à chacune des expérimentations. Ces deux publications sont synthétisées et mises en perspective dans le dernier chapitre de ce manuscrit.



## Article 2 : Etude comparative de Q. robur et Q. petraea (H2Oak 2015)

### ***Biomass accumulation drives whole plant transpiration efficiency differences between two related sympatric oaks species: importance of underground biomass production in response to drought in Quercus robur & Quercus petraea seedlings***

Théo P. H. Gérardin<sup>1</sup>, Didier Le Thiec and Oliver Brendel<sup>1,2</sup>

Adresses:

<sup>1</sup>Université de Lorraine, AgroParisTech, INRA, Silva, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup>Corresponding author postal address: Oliver Brendel, INRA, UMR Silva, F-54280 CHAMPENOUX, France

Tel : 00 33 383394100

ORCID :

Théo P.H. Gérardin: <https://orcid.org/0000-0002-5427-6470>

Didier Le Thiec: <https://orcid.org/0000-0002-4204-551X>

Oliver Brendel: <https://orcid.org/0000-0003-3252-0273>

Emails: tgerardin.phd@gmail.com, didier.lethiec@inra.fr, [oliver.brendel@inra.fr](mailto:oliver.brendel@inra.fr)

Keywords: drought, dynamic response, root system, transpiration efficiency, growth, oak

#### **Highlights**

- Oaks species display faster stomatal dynamics to light under water stressed conditions
- Different irradiance closing steps induce similar dynamic responses regardless of the stomatal amplitude
- Q. petraea and Q. robur seedlings display similar growth and gas exchanges rates under progressive drought

## **Abstract**

While most of comparative studies between the two sympatric and closely related oak species (*Q. robur* and *Q. petraea*) established differences in water use efficiency, not much is known about the underlying traits driving these differences. We assessed water use efficiency at different temporal levels from leaves instantaneous gas measurements to whole plants transpiration efficiency and measured numerous physiological and morphological traits on *Q. petraea* and *Q. robur* seedlings grown under control and drought conditions. Our objectives were to determine the plasticity of water use efficiency to drought and to which physiological as well as morphological factors these differences were related. We found no species difference for intrinsic water use efficiency, however, *Q. robur* seedlings displayed significantly higher transpiration efficiency than *Q. petraea* in both treatments. These differences were mainly driven by differences in biomass accumulation rather than water use, especially due to variation in the root biomass. Both species also differed in their carbon allocation strategy as a probable acclimation to water stress, *Q. petraea* invested relatively more in its root systems than *Q. robur* although globally producing less biomass. At the leaf level, drought increased the speed of stomatal dynamics to irradiance changes, whereas no response of stomatal morphology was detected. Although faster dynamics under water stressed conditions were in accordance with previously hypothesized contribution of stomatal dynamics to whole plant water use, no clear links were established for oaks seedlings.

**Table 1** : List of abbreviation

var	unit	Variable explanation	n obs
LS	cm <sup>2</sup>	Total plant Leaf surface	59
FRS	cm <sup>2</sup>	Fine roots surface	FRS=FRBm/RMA*1000 22
RSSr	-	Rootshoot surface ratio	FRS/LS 22
LBm	g	Leaf biomass	62
LMA	g /cm <sup>2</sup>	Leaf mass area	FBm/ LS 59
LRWC	%	Leaf relative water content	32
Osm	mmol/ kg	Leaf osmolarity	32
SBm	g	Stem biomass	62
BBm	g	Branch biomass	60
Bn	-	Branch number	62
RMA	mg /cm <sup>2</sup>	Fine root masse per area	22
CRBm	g	Coarse root biomass	23
FRBm	g	Fine root biomass	23
CFRBm	g	Fine and Coarse Root biomass	CRBm+FRBm 62
CRBmr	%	Coarse root proportion	CRBm / RBm 23
FRBmr	%	Fine root proportion	FRBm / RBm 23
Rr	-	Coarse/fine roots ratio	CRBm/FRBm 23
TRn	-	Tap root number	62
TRBm	g	Tap root biomass	62
TRBmr	%	Overall tap root proportion	TRBm / UGBm 62
RBm	g	Root biomass	TRBm+CRBm+FRBm 62
WBm	g	Woody biomass	BBm + SBm 62
AGBm	g	Above ground biomass	BBm + SBm + LBm 62
TBm	g	Total biomass	AGBm+RBm 62
RS	-	Root-shoot ratio	RBm / AGBm 62
FS	-	Foliar-shoot ratio	LBm / AGBm 62
BSr	-	Branch over stem biomass ratio	BBm/SBm 62
H	cm	Plants final height	62
D	mm	Plants final diameter	62
OL	μm	Ostiole length	32
GCL	μm	Guard cells length	32
GCW	μm	Guard cells width	32
SC	-	Stomatal pore coefficient	OL/GCL 32
SS	μm <sup>2</sup>	Stomatal size	$\pi*(GCL/2)*(GCW/2)$ 32
SD	stomata / mm <sup>2</sup>	Stomatal density	32
TWCS	L/cm <sup>2</sup>	Total Water Consumption standardized by plant surface	TWC/LS 59
BmS	g/cm <sup>2</sup>	Biomass produced standardized by plant surface	Bm/LS 54
TWC	L	Total Water Consumption during the TE monitoring period	62
Bm	g	Biomass produced during the TE monitoring period	TBm - iB 57
iBm	g	Initial biomass	62
TE	g.L <sup>-1</sup>	Transpiration efficiency	Bm/H2O 57
δ <sup>13</sup> C		<sup>13</sup> C isotopic composition in leaves	30
N	%	Nitrogen concentration in leaves	30
C	%	Carbon concentration in leaves	30
Vmax	μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Maximum RubisCo activity	27
Jmax	μmol e <sup>-</sup> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Maximum potential electron transport rate	27
A <sub>n</sub> aci	μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Carbon assimilation from Aci curves at 400ppm CO <sub>2</sub>	27
g <sub>s</sub> aci	mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Stomatal conductance from Aci curves at 400ppm CO <sub>2</sub>	27
	μmol CO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup>		
Wi aci	H <sub>2</sub> O	Intrinsic water use efficiency from Aci curves at 400ppm CO <sub>2</sub>	A aci / g aci 27
A <sub>n</sub> PPF	μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Net CO <sub>2</sub> assimilation from response curves at SS1	26
g <sub>s</sub> PPF	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Stomatal conductance from response curves at SS1	26
wi	μmol CO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup>		
PPFD	H <sub>2</sub> O	Intrinsic water use efficiency from response curves	An- PPF / g <sub>s</sub> - PPF 26
Ci PPF	μmol mol <sup>-1</sup>	Internal CO <sub>2</sub> concentration from light curves	26
λ cl	sec	Closing lag time	25
τ cl	sec	Closing response time	25
SL cl	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-2</sup>	Closing maximal slope	25
λ op	sec	Opening lag time	22
τ op	sec	Opening response time	22
SL op	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-2</sup>	Opening maximal slope	22
τ r	-	Tau closing/opening ratio	τ cl / τ op 22
λ r	-	Lambda closing/opening ratio	λ cl / λ op 22

SLr	-	Slope closing/opening ratio	SL cl / SL op	22
SA	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Stomatal amplitude of variation during light curves		25
RSA	%	Relative stomatal amplitude of variation during light curves		25
Gstart	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Stomatal conductance at steady state SS1		25
gend	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Stomatal conductance at steady state SS2/SS3		25
NT	mg.min <sup>-1</sup>	Nocturnal transpiration		62
DT	mg.min <sup>-1</sup>	Daily transpiration (including day and night)		62
NTS	mg.min <sup>-1</sup> /cm <sup>2</sup>	Nocturnal transpiration per leaf surface	NT/SF	59
DTS	mg.min <sup>-1</sup> /cm <sup>2</sup>	Daily transpiration per leaf surface	DT/SF	59
NDR	%	Nocturnal transpiration proportion over the day	(NT/DT)*100	62

## Introduction

The two most common oak species in western Europe, *Quercus robur* and *Quercus petraea* are two sympatric broad-leaf forest tree species displaying different ecological behaviours despite a high genetic proximity (Bacilieri et al. 1995, Scotti-Saintagne et al. 2004). *Q. robur* is frequent on soils with high nutrient and water availability (Lévy et al. 1992) whereas *Q. petraea* is more likely to be found on well drained soils. However, *Q. robur* is able to colonize habitats not matching its actual ecological niche which led to *Q. robur* occurrences on soils with poor nutrient availability or short water storage as a result of management practices and because both species display pioneering ecological characteristics (Becker and Lévy, 1982).

Oaks are affected by recurrent and important decline episodes whose main cause has been identified as drought (Landmann et al. 1993), however, the symptoms and several other causal factors involved in such declines vary in many european countries (Thomas et al. 2002). Despite their sympatric repartition, it has often been reported that *Q. robur* was subjected to severe declines after drought events while *Q. petraea* was much less affected (Bréda et al. 1993). The reasons of such different ecological requirements have not been clearly assessed.

Various studies have investigated the possible ecophysiological traits involved in the differences in drought tolerance between the two-oak species. *Q. robur* has often been described as more vulnerable to water-stress due to higher reductions of stomatal conductance as well as water potential induced by drought compared to *Q. petraea* (Cochard et al. 1992, Tyree and Cochard 1996, Gieger et al. 2002). Both species were recorded with different levels of hydraulic conductivities in roots and shoots, ultimately leading to differences in cavitation resistance (Nardini et al. 1999), but also displayed contradictory results in other publications with similar root hydraulic conductivity and pressure (Rasheed-Depardieu et al. 2012). Moreover, similar responses to drought of the two species were described, such as similar afternoon water potentials (Gieger et al. 2005) and same turgor loss thresholds and osmotic pressures at maximum turgor (Thomas et al. 2000).

Differences in biomass allocation between the two species have also been observed. From the numerous studies on growth and biomass production figuring both species, *Q. robur* seedlings have

almost always been described as producing more biomass and growing faster than *Q. petraea* under well irrigated, as well as drought stress conditions (Ponton et al. 2001, Kuster et al. 2013). However, similar growth rates and thresholds of growth drought response have also been reported for both species (Sanders et al. 2014). For belowground traits, lower root dry mass to root surface area ratios in *Q. petraea* (Nardini et al 1999) or shallower root systems in *Q. robur* (Bréda et al. 1993) have been observed. In both oak species, an increased production of fine-roots has also been identified as an acclimation to drought (*Q. robur*: Osonobi & Davies 1981, Van hees 1997; *Q. petraea* : Thomas 2000), However, Gieger et al. (2002) suggested that both species acclimated differently to drought, *Q. petraea* by reducing its leaf mass and *Q. robur* by maintaining the leaf mass but slightly increasing the fine roots biomass.

Regarding leaf morphology, higher values of total leaf biomass and area have been reported in *Q. robur* (Günthardt-Goerg et al. 2013) However, contrasting results have been published for leaf mass per area (LMA), i.e. both species have been described with similar LMA values (Thomas et al. 2000, Günthardt-Goerg et al. 2013) while higher LMA in *Q. robur* seedlings were described in another study (Steinbrecher et al. 2013). Moreover, the leaf morphology of both species is known to change with trees aging (Kleinschmit et al. 1995), contributing to the difficulty to draw a firm conclusion on their interspecific differences. Only a few studies reported differences associated to different ecological behaviours between the two species such as lower leaf area and biomass in *Q. petraea* compared to *Q. robur* in response to drought (Gieger et al. 2005). Overall it seems that differences between the two species depend much on the experimental set-up. Furthermore, there is a lack of information about the differences between the two-oak species under control conditions and soil water deficit for the traits related to the stomatal anatomy and behaviour as well as estimations of whole plant water use efficiency.

At any time, plants are functioning by compromising between the uptake of CO<sub>2</sub> for carbon assimilation and water vapour loss through gas exchange via the stomata. This compromise is often referred as water use efficiency (WUE) and can be studied at several levels. At the leaf level, WUE is an instantaneous and direct calculation of the ratio between the net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A_n$ ) and the stomatal conductance for water vapour ( $g_s$ ) named intrinsic water use efficiency ( $W_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). Farquhar and Richards (1984) established a negative relationship between  $W_i$  and the bulk leaf isotopic decomposition for <sup>13</sup>C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) allowing a practical proxy estimation of  $W_i$  on large sample sizes.  $\delta^{13}\text{C}$  in wood material integrates (non-linearly) over time and across the trees crown but remains a reliable estimate of leaf level  $W_i$ . At the whole plant level and over time, WUE can be integrated as the ratio between the overall dry biomass produced by the plant and its total water consumption over the same period and is referred as transpiration efficiency (TE,  $\text{g L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). The calculation of TE requires a

precise monitoring of the water consumed as well as the final, destructive harvesting of the plants. Due to these experimental constraints, estimations of TE in tree species are rare in the literature (Guehl et al. 1993, Cernuzak et al. 2007, Roussel et al. 2009). Numerous studies focused on water use efficiency through its different estimators either in *Q. robur* (i.e. Picon et al. 1996, Welander et al. 2000, Roussel et al 2009) or in *Q. petraea* (Guehl et al. 1995, Chevillat et al. 2005). However, fewer studies investigated both species (i.e Wagner et al. 1997, Steinbrecher et al. 2013, Rasheed-Depardieu et al. 2015) and only a few of them were comparative studies assessing the differences between the two-oak species (Thomas et al. 2000, Ponton et al. 2002, Pflug et al. 2015). Interspecific differences have been reported, *Q. petraea* displaying generally a higher water use efficiency than *Q. robur* (Epron and Dreyer 1993; Ponton et al. 2001 ) but this is not always consistent in literature since both species sometimes display similar values (Thomas et al. 2000, Hu et al. 2013) or even possible opposite observations (Thomas et al. 2008 : not tested statistically). However, the small number of comparative studies and the fact that highly different experimental designs prevent to draw any firm conclusion about the inter-specific differences based on the current literature. Furthermore, WUE in oak has also been associated with a large intraspecific variability (Brendel et al. 2008) and plasticity under drought (Ponton et al 2002). At the leaf level, stomatal conductance ( $g_s$ ) has been reported as the main driver of  $W_i$  under both control (Roussel et al. 2009a; *Q. robur*) and drought conditions (Ponton et al. 2002; both species) underlying the important role of the stomatal regulation on gas exchange. However, to our knowledge, no comparative study has been conducted on *Q. robur* and *Q. petraea* using an experimental drought to explore differences in stomatal regulation and their impact on the different levels of WUE as well as other underlying physiological and morphological traits.

Leaf level WUE depends largely on stomatal regulation, which in turn depends on morphology as well as physiology. Morphological traits such as stomatal density and size have been found to set the maximal aperture of the stomata and therefore the maximal stomatal conductance (Franks & Farquhar 2001, Dow et al. 2014). Variations in stomatal morphology have been linked to variations in instantaneous and long-term WUE through  $g_s$  (Doheny-Adams et al 2012, Franks et al. 2015), suggesting that stomatal morphology might be an interesting target for manipulation to improve WUE (Violet-chabrand et al. 2017). Moreover, in a *Q. robur* full-sib family Roussel et al. (2008) established a relationship between the expression of ERECTA, a gene known to modulate stomatal density and WUE (Masle et al. 2005) as their results shown a co-variation between  $W_i$ ,  $g_s$  and ERECTA expression.

Leaves are submitted to a rapidly fluctuating atmospheric environment with strong variations of light, vapor pressure deficit between the leaf and the atmosphere (VPD), temperature and/or soil water deficit and therefore a need to balance gas exchange by adjusting the stomatal conductance continuously during the diurnal cycle (Percy et al. 2000). Compared to stomatal dynamics in response

to changes of irradiance, the variation of net CO<sub>2</sub> assimilation, if not limited by  $g_s$ , varies much faster, usually a few seconds. Therefore, a short-term fluctuation of environmental conditions can lead to a temporal decoupling between  $A_n$  and  $g_s$  (Lawson et al. 2010; McAusland et al. 2016, Vialet-Chabrand et al. 2017). Such non-synchronicity in temporal responses of gas exchanges may have major repercussions on the carbon fixation through photosynthesis, the water lost by transpiration and thus the water use efficiency (Lawson et al. 2010). Vico et al. (2011) linked plant functional types and water availability to stomatal responses, where plants from dryer climates displayed faster stomatal responses. Ooba and Takahashi (2003) observed among numerous species an asymmetric stomatal response between closing and opening and suggested that the symmetry might be related to the growing conditions and provide ecological advantages during dynamic gas exchanges such as improved assimilation associated to a faster opening under light limited environments. Furthermore, Roussel et al. (2008) put in evidence highly divergent daily time-courses of stomatal conductance between extreme WUE genotypes of oaks seedlings. Altogether, these results tend to suggest a link between WUE and the dynamic response to environmental changes.

Studies have investigated the dynamics of stomatal response and photosynthesis to fluctuating light (Kirschbaum et al. 1988; Lawson et al. 2010; McAusland et al. 2016; Kardiman and Raebild, 2018; Matthews et al. 2018). Over time, these fluctuations drive the temporal dynamics of carbon gain, water loss and by extension plants water use efficiency (Lawson and Blatt, 2014).

While numerous studies on water use efficiency characterization among the two oaks species have been published, the physiological and morphological traits underlying WUE variations were not assessed systematically and there is therefore a lack of knowledge of the origin of the differences in TE observed. We explored TE and underlying traits at different levels of integration. Our main objectives were to:

(i) characterize the impact of drought on TE and underlying traits, (ii) assess the differences between two oak species for TE and underlying traits as well as their plasticity to drought and (iii) identify which morphological and physiological traits drive the variability in TE independently of species and treatment.

## **Material and methods**

### **Plant material and experimental design**

The experiment was carried out on *Q. robur* and *Q. petraea* at the National Institut of Agronomical Research (INRA), Champenoux, France (48°45'8"N, 6°20'28"E, 259m). The acorns used were collected in 2015 from mature trees of *Q. robur* and *Q. petraea* in natural oaks pure stands in the « Vallée de la Saône », France, respectively in the Communal forest of Perrigny-sur-l'Ognon and the Domanial forest of Longchamp. The sites were characterised by similar atmospheric (or climatic) conditions. Collected acorns from both species were weighed and then sown in 6L pots filled with a 5/3/2 (V/V/V) mixture of sand, peat and silty-argillaceous forest soil, respectively. The seedlings stayed during the early spring 2015 in a nursing greenhouse for two weeks and then were transferred in a greenhouse equipped with a robotic system allowing automatized plants (Bogeat et al. 2019, Durand et al. 2019) weighting and watering in which they stayed during the whole experiment (for six months from sowing on March 3<sup>rd</sup> to the final harvest on September 2<sup>nd</sup>). Each pot was watered to reach an individual target-weight aiming to a given soil water content. 64 of the 72 available positions of the robotic system were used for the plants included in the experiment, 4 additional positions were occupied by 4 nonplanted empty pots (two for each water treatment) dedicated to the calculation of soil water evaporation, used in the correction of plants total water consumption. The two species were positioned alternatively in the six rows of the robotic system and submitted to the same growing conditions: natural growth light and well irrigated conditions (irrigated daily) until drought establishment, while being well fertilized during the whole experiment (two treatments of 15g Nutricot T100, 13:13:13 NPK and micronutrients; Fertil SAS, Boulogne-Billancourt, France ). Initially two acorns were sown in each pot to ensure a successful establishment and an intra-specific diversity, resulting in 64 acorns per species. After a first screening of *W<sub>i</sub>* (described below), one of the two plants in a pot was harvested, to maximize diversity in *W<sub>i</sub>* by keeping intentionally the *WUE* extremes within each species. The remaining 32 plants of each species were allocated to drought and control groups, maintaining a maximum diversity of *W<sub>i</sub>* for each group.

### **Measurement of soil water status and drought establishment**

The volumetric soil water content was measured by time domain reflection (TRIME-TDR; IMKO GmbH, Ettlingen, DE) in each pot at about 10cm depth on a regular basis of 1 measurement per week throughout the experiment. Air temperature inside the greenhouse followed the environmental variations but never exceeded 25°C due to a cooling system in the study facility. All the plants were allowed to grow under well irrigated and fertilized conditions for 4 months (soil water content above 25%). Then in early July the weighting target of every plants were lowered in order to reach 23%



volumetric soil water content ( SWC; 85% of relative extractable water content:  $REW_{soil}$ ) and 9% SWC (17% of  $REW_{soil}$ ) of volumetric soil water content under control and drought treatments until the end of the experiment 2 month later.

$$REW_{soil} = ((SWC - SWC_{wilt\ point}) / (SWC_{field\ capacity} - SWC_{wilt\ point})) * 100$$

With SWC at wilting point =3%: SWC at field capacity =33%

### ***Gas exchanges measurements***

The initial screening of  $W_i$  was conducted with a gas exchange system (Li-Cor 6200; LI-COR, Lincoln, NE, USA). Leaves from the first and second flushes were selected. Net  $CO_2$  assimilation rate (A) and stomatal conductance for water vapour ( $g_s$ ) were measured then  $W_i$  was calculated as the ratio between A and  $g_s$ . 7 measures (4 on one first flush leaf and 3 one second flush leaf per plant) were made in order to characterize the water use efficiency variability among species. Based on these measurements, we established one population following a normal distribution for  $W_i$  in each species, later divided among treatments (see annexe 2 for further information).

### ***Stomatal kinetics under light change***

Gas exchanges were measured using a portable photosynthesis system (Li-Cor 6400; LI-COR, Lincoln, NE, USA) equipped with a 2 cm<sup>2</sup> leaf chamber. All measurements were carried out between 07:00 and 17:00 h (Universal Time). The environmental parameters inside the chamber were kept constant during the acclimation phase with  $CO_2$  concentration entering the chamber of 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , block temperature of 25°C, air flow of 300  $\mu\text{mol min}^{-1}$  and a PPF of 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  until the plant achieved a steady-state for stomatal conductance. Then the PPF was lowered to 400  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  until the plant reached a new steady-state. After 10 minutes under this new steady-state, the PPF was set back to its initial setting at 800  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . This allowed us to perform complete  $g_s$  response curves with stomatal closure kinetic followed by an opening kinetic. All the measurements were conducted on mature leaves grown from the third flush under control treatments. Each data point during the response curve was logged every 30s.

“steady state” data as mentioned in table E and through the manuscript were selected after stabilization of  $g_s$  (standard deviation of  $g_s < 0.0025$  at each steady state), before and after each light change (SS1, SS2 and SS3). “-PPFD” suffix added to gas exchange parameters as mentioned in tables and in the manuscript refers to gas-exchange measurements extracted from the high light steady state SS1.

### ***Dynamic model description***

The stomatal responses of the irradiance curves were adjusted using a sigmoidal model based on Vialet-Chabrand et al. (2013) as modified by Gerardin et al. (2018). The sigmoidal model allows the estimation of parameters describing the temporal response of the stomata to an environmental change. The following equation was used:

$$g_s = g_0 + (G - g_0)e^{-e^{\left(\frac{\lambda-t}{\tau}\right)}}$$

Where  $g_s$  is the fitted stomatal conductance,  $g_0$  is the starting value of the stomatal conductance (first steady-state obtained after the plant acclimation to the environmental conditions inside the Licor chamber),  $G$  the ending value of stomatal conductance (second steady-state reached after the full stomatal response to the irradiance change),  $\lambda$  is a time constant describing the lag time of the stomatal response (time needed to reach the inflection point of the curve from the moment of the irradiance change in each curve), and  $\tau$  is another time constant describing the response through the steepness of the curve. From these parameters, the maximum slope (SL) as estimator of the speed of the stomatal response, has been calculated as:

$$SL = \frac{G_{end} - g_{start}}{\tau \cdot e}$$

$\tau$  is the response time and describes the steepness of the curvature, the lower a  $\tau$  value is, the stronger the curvature and the higher SL will be, so the “faster” stomata will move. Whereas  $\lambda$  is the lag time of the stomatal response from the environmental change to the inflection point of the curve. Compared to the sigmoidal equation used by Vialet-Chabrand et al. (2013), here,  $\lambda$  is independent from  $\tau$  and thus SL. For the adjusted parameters ( $\lambda$ ,  $\tau$  and SL) we also calculated the ratios of each parameter between the closing and opening sequences ( $\lambda_r$ ,  $\tau_r$  and  $SL_r$ , respectively), describing the degree of asymmetry of the light curves response. “-cl” and “-op” suffixes as mentioned throughout the manuscript refer to the parameters estimated from the closing and opening sequence respectively.

The amplitude of  $g_s$  variation (SA) was calculated as the difference between the mean steady-state at high irradiance (SS1 and SS3) and the steady-state at low irradiance (SS2) as either (SS1-SS2) or (SS3-SS2). The dynamic model was adjusted using the function “nlminb” of R (R Core Team 2015). To facilitate the adjustment of the sigmoidal model, five data points during the steady state before changing the irradiance were first included in the model adjustment. This impacts only the lag time  $\lambda$ , which was then corrected by subtracting the added time-period. The model adjustment is sensitive to

the starting point and including five steady state points allows the starting steady state  $g_s$  to be more robust as well as decreases the dependency of the adjustment on measurement noise.

### ***Photosynthetic capacity***

Photosynthetic capacity was estimated using the same portable photosynthesis system as described above (LI-COR 6400; LI-COR, Lincoln, NE, USA). All measurements were carried out between 09:00 and 18:00 h (Central European summertime). The environmental parameters inside the chamber were kept constant during the acclimation phase at 400 ppm CO<sub>2</sub>, with temperature regulated at 25°C, flow at 300 and a photonflux density at 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . All the measurements were conducted during three measurements campaigns, one on mature leaves from the second flush (F2, control conditions), one on mature leaves from the third flush (the same leaves as used for light response curves) before the beginning of water deficit treatments (F3) and the last campaign on the same flush and leaves as F3 after that plants were subjected to their respective treatment conditions setting (F3T). “-Aci” suffix added to gas exchange parameters as mentioned throughout the manuscript refers to gas exchange measurements extracted after plant acclimation to the conditions in the LI-COR chamber (described above) A/C<sub>i</sub> curves were performed changing the [CO<sub>2</sub>] entering in the chamber using the following sequence: 400, 300, 200 150, 100, 50, 0, 400, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500 and 2000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Between each [CO<sub>2</sub>] step, the leaves acclimated to new conditions for 2-3 minutes before logging..Aci curves were fitted using the “fitaci” function from the “plantecophys” Rstudio package based on the Farquhar-Berry-von Caemmerer model of photosynthesis and intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Duursma, 2015) allowing the estimation of the maximal potential electron transport rate (J<sub>max</sub>) and the maximum RubisCo activity (V<sub>max</sub>).

### ***Biomass measurements***

#### ***Final harvest***

At the end of the experiment, heights (H) and diameters (D) were measured then all the plants harvested. The branches (BBm), stems (SBm), leaves (FBm) were dried at 65°C until the sample reached a stable dry weight. The total plant leaf surface area was also measured (LS). Additionally, the woody biomass (WBm) and above ground biomass (AGBm) and leaf masse area (LMA) were also calculated (see table A for units and calculations).

The root biomass (RBm) has been measured for all the plants, and separated into the biomass for taproots (TRBm), coarse roots (CRBm) and fine roots (FRBm), where the fine roots were defined by diameters inferior to 1mm. Total roots other than taproots was also calculated ( CFRBm = CRBm + FRBm). The tap roots were counted (TRn) and separated from the smaller roots (diameter <1cm). All

roots were dried at 65°C and weighted (balance type). The separation of coarse and fine roots was only done for 24 seedlings randomly chosen among the plants used for light curves, The proportion of CRBmr and FRBmr was calculated in regard to CFRBm, the ratio between coarse and fine roots ( $R_r = \text{CRBm} / \text{FRBm}$ ) was calculated, and the proportion of TRBm was estimated relative to RBm. For each of the 24 seedlings for which fine roots were separated, a subsample was analysed using the WinRHIZO software (v. Pro 2009c, Regent Instrumentals, Québec, Canada) in order to determine the root mass area (RMA). This was then used to estimate the total plant fine root surface area (FRS) and then the root-leaf surface ratio (RSSr). From these biomass estimations the ratio between root and total shoot biomasses was calculated (RS) as well as the total dry biomass of the plants (TBm).

During the final harvest, per plant, two 3<sup>rd</sup> flush-leaves, close to the leaf used for gas exchange, were sampled from the 32 plants used for light curves to determine their relative water content (LRWC) as well as their osmolarity (Osm). These leaves had grown under the treatment conditions. These leaves were weighed (fresh mass MF) right after the harvest and then rehydrated in the dark for 24h. One leaf was used to measure the osmotic potential using a Vapour Pressure Osmometer (WESCOR 5500, Utah, USA), the other leaf was weighed at full turgor (MFT), dried at 65°C and reweighed (MD). The LRWC was estimated as  $(\text{MF}-\text{MD})/(\text{MFT}-\text{MD}) \times 100\%$ . In addition, the leaf of each plant used for gas exchange measurements was collected and split in half. One half was used for the analyse of nitrogen (N) and carbon (C) contents and carbon isotopic discrimination ( $\delta^{13}\text{C}$ ). The other half was used to characterize the stomatal morphology (described below).

### ***Stomatal morphology***

At the end of the experiment all the leaves used for gas exchanges (one per plant) were sampled in order to determine the stomatal morphology. The following parameters were measured: the stomatal density (SD), the ostiole length (OL), the length of the stomatal guard cell complex (GCL), the ratio between the ostiole and guard cell lengths (SC:  $\text{OL}/\text{GCL}$ ), guard cells width (GCW) and the stomatal size (SS: defined as an elliptical area  $\pi \times (\text{GCL}/2) \times (\text{GCW}/2)$ ). Since both species only display stomata on the inferior surface of the leaves, 1cm<sup>2</sup> portions were collected and nail polish imprints were taken of the adaxial surface using adhesive film then applied on microscope slides for analysis. Stomata and epidermis cells were counted in the obtained pictures using the ImageJ2 software. Six (500\*370µm) images were taken per plants and 10 stomata measured per pictures.

### ***Transpiration efficiency estimation***

To estimate TE, the total water consumption (TWC) of the plants has been measured by adding each watering cycle over a four months period from May to the final harvest in September In addition, the

water soil evaporation of 4 unplanted pots (2 control and 2 drought) has been measured and summed and the average water evaporation subtracted to the total water consumption of each plant.

Since the seedlings were 3 months old when the water consumption monitoring started, initial biomass had to be estimated.

The seedlings not selected by the screening of  $W_i$  (see above) were harvested and used to estimate the initial biomass (iBm) of the remaining plants at the start of water consumption monitoring. The heights were measured then the seedlings were harvested, dried and weighted resulting in the following allometry.

$$iBm = 0.025884 * (H^{0.9402055}) \quad r^2=0.92 \quad n=30$$

with iBm, the initial dry mass and H the height of the plants at the moment of the estimation.

At the beginning of the water consumption monitoring, the heights of the remaining plants were measured and their iBm estimated using this allometry. The actual biomass produced during the 4 months water monitoring period was estimated as  $B_m = T_{bm} - iB_m$ , and then TE was calculated as:

$$TE = (B_m / TWC)$$

Additionally,  $B_m$  and TWC were standardized to the final foliar surface area ( $B_mS$  and  $TWCS$ : table A)

### ***Nocturnal and daily transpiration estimation***

To estimate the nocturnal transpiration (NT) five weighting kinetics were performed based on hourly weightings for a whole day. The nocturnal period was defined by the nautical twilight for sunset and sunrise definitions resulting in the 23:00-4:00 period of measurement. However, it appeared from one night of hourly weightings that the stomatal opening did not occur before 5:00. We also tested if starting the period of measurements at 22:00 would have any significant impact on NT, which didn't. Thus, to increase precision, the data included in the calculation of NT covered an extended period between 22:00-5:00, whereas for the estimation of DT, the period 5:00-22:00 of the day before was used. As water losses estimations, the unplanted pots were used to correct the water evaporation from soil surface. The time separating each weighting was used to estimate a transpiration flux. Along each weighting kinetic, the daily transpiration (DT over 24h) including NT was also calculated and the proportion of NT over DT estimated (NDR). Similarly to  $B_m$  and TWC, the nocturnal and daily transpiration were standardised to the plants foliar surface (NTS and DTS, respectively).

### ***Statistical analysis***

All statistical analyses were performed with R (R Core Team (2015)). Treatments and species effects were analysed as a two-factorial design by analysis of variance (ANOVA). Significant differences were considered at  $P < 0.05$ . When the ANOVA found a significant treatments and/or species effect, a Post-Hoc test using Tukey-HSD test (package R, “agricolae”) was used to define inter-groups differences. To analyse the relationships between transpiration efficiency and its underlying traits, ANCOVA was used with treatment and species as fixed factors and a covariate. Partial  $R^2$  for the covariate were estimated from Type I sum of squares for the covariate against the total sum of squares. p-values were adjusted for multiple comparisons using the “p.adjust” function with the “FDR” method

## **Results**

### **Drought effect**

#### **Biomass traits**

Overall most of the morphological traits were significantly affected by the drought treatment (Table 2). Globally, both species produced significantly less TBm under drought than control treatment which also translated in significantly lower RBm and AGBm under water stressed conditions. Despite such reductions in above and root biomass, the root/shoot ratio (RS) remained similar to the ones found in the control groups. However, the fine root surface to leaf surface ration (RLSr) decreased significantly under drought. In accordance with the globally reduced biomass, both species displayed significantly reduced LS and only tendencies for lower leaf biomass (LBm) which led to similar LMA between drought and control groups. Among the leaf related traits, the ratio between leaf and above ground woody biomass (FS) was the only one to significantly increase for both species under drought condition. In addition, both species displayed lower WBM under stress due to significantly reduced SBm and tendencies for lower values of BBm. Interestingly, all groups displayed similar heights (H), however, in both species, the diameter (D) was reduced under stress.

Similarly, to others morphological traits, almost all root related traits displayed significantly lower values under drought regardless of the species. Both species displayed lower RBm due to significantly lower CRBm and tendencies for lower FRBm which led to lower Rr under drought. TRn were similar inside each treatment, regardless of the species while TRBm was significantly lower under stress condition which along with the lower values of UGBm led to similar TRBmr between the groups.

Additionally, even though leaves had grown when treatment conditions were achieved, no so significant drought effect was found for the stomatal traits (OL, GCL, GCW, SC, SS, SD), however, both leaf nitrogen and carbon concentration were respectively found significantly and slightly increased under drought.

#### **Physiology**

Under drought conditions the steady-state gas exchange measurements ( $A_n$ ,  $g_s$ ) extracted from ACi and irradiance response curves were found significantly lower under drought for both species (Table 3), as was photosynthetic capacity ( $J_{max}$ ,  $V_{max}$ ). In addition, the daily transpiration (DT) as well as total water consumption per leaf surface (TWCS) were significantly lower under drought while NT was not affected by the drought.

Under drought condition, both species displayed significantly faster stomatal responses to irradiance changes, by displaying lower lag time ( $\lambda$ ) as well as response times ( $\tau$ ). The lower  $\tau$  resulted in significantly higher SL values under drought, even though SA also decreased significantly.

The reduced assimilation and stomatal conductance led to significantly higher intrinsic water use efficiency ( $W_i$ ) under drought in both species also associated with significantly less negative values of isotopic composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in the leaves used for gas exchanges. Similarly, both species displayed significantly higher transpiration efficiencies (TE) under drought conditions linked to significantly reduced transpiration (TWC), even though also biomass growth was reduced (Bm) Despite such decrease in transpiration both species displayed same levels of LRWC regardless of the treatment (Table 2), while Osm was found significantly increased under drought condition.

### ***Species differences and interaction with drought***

#### ***Morphology***

Both species displayed significant species effects on many variables (Table 2). Globally, regardless of the treatment, *Q. robur* produced more total biomass (TBm) than *Q. petraea*, which was mainly due to a higher root biomass (RBm) but also higher woody biomass (WBm), still resulting in significantly higher root/shoot ratio (RS) in *Q. robur*. The stronger growth in *Q. robur* was associated with higher diameters. However no significant difference was found for the mass of the acorns of the two species (4.3g for *Q. robur* and 4.1g for *Q. petraea*, t-test  $P=0.41$ ), whereas a large variation of acorn masses were observed (1.7g to 8.1g). For leaf related traits, *Q. robur* showed significantly lower LMA and less leaves per above ground biomass (FS) than *Q. petraea*.

Most of the species differences were found for the underground biomass related traits. *Q. robur* produced systematically more RBm than *Q. petraea*. When divided in coarse and fine roots (CRBm and FRBm, respectively), *Q. robur* still displayed significantly higher biomass production for CRBm, while there was only a tendency for FRBm, resulting in significantly higher Rr in *Q. robur*. Additionally, both species produced similar TRBm, however *Q. petraea* produced a higher number of tap roots (TRn). These differences in coarse, fine and tap roots biomass led to significantly lower proportion of tap roots (TRBmr) in the underground biomass for *Q. robur* groups.

Moreover, no differences between species were found for the stomatal traits (OL, GCL, GCW, SC, SS, SD) as well as the nitrogen and carbon leaves concentration (N and C, respectively).

Overall, there were strong treatment and species effects on many morphological variables. The only interaction effect detected in the analysis of variance was related to the root biomass (RBm), *Q. robur* displaying more reduced RBm under drought than *Q. petraea*. However, the post-hoc analysis using



Tukey HSD test (Table 2) suggested some stronger drought responses of *Q. petraea* related to less fine root surface and biomass, as well as less coarse and tap root biomass, a lower fine root proportion but a higher leaf proportion, compared to *Q. robur*, which showed a significant reduction of overall root

**Table 2:** Morphological traits. Model wise p-values were adjusted for FDR and effect significances were only presented for models with p<0.05

	QPC	QPD	QRC	QRD	sp	ttmt	int
LS	4113,54 ± 286,87a	3258,42 ± 401,73a	4115,24 ± 194,8a	3574,93 ± 164,75a		*	
FRS	7229,6 ± 412,77a	3204,48 ± 307,39b	7849,34 ± 1088,54a	5122,37 ± 534,27ab		**	
RLSr	2,01 ± 0,27a	1,19 ± 0,22a	2,2 ± 0,29a	1,36 ± 0,19a		*	
LBm	29,61 ± 2,2a	23,49 ± 2,36a	25,26 ± 1,35a	23,45 ± 1,07a		.	
LMA	7,16 ± 0,18a	7,28 ± 0,21a	6,15 ± 0,18b	6,6 ± 0,2ab	***		
LRWC	90,42 ± 0,51a	92,62 ± 1,01a	91,67 ± 0,63a	91,2 ± 0,5a			
Osm	700,75 ± 16,51c	857,63 ± 13,71a	715,5 ± 37,52bc	794,25 ± 14,48ab		***	
BBm	9,75 ± 1,62ab	8,13 ± 1,39b	13,42 ± 1,32a	9,06 ± 0,99ab		.	
Bn	6,44 ± 1,15a	5,56 ± 1,3a	7,5 ± 1,43a	7,36 ± 1,83a			
RMA	2,63 ± 0,19a	3,98 ± 0,57a	2,85 ± 0,46a	3,97 ± 0,36a		*	
CRBm	31,11 ± 4,18a	14,97 ± 0,58b	43,45 ± 3,99a	32,72 ± 2,9a	**	**	
FRBm	18,79 ± 1a	12,75 ± 1,16b	19,92 ± 1,79a	19,59 ± 0,63a	.	.	
CFRBm	43,14 ± 3,77bc	32,94 ± 2,26c	86,34 ± 8,88a	54,15 ± 3,34b	***	***	*
CRBmr	61,45 ± 2,37b	54,4 ± 1,62c	68,49 ± 1,04a	62,14 ± 1,95ab	**	**	
FRBmr	38,55 ± 2,37b	45,6 ± 1,62a	31,51 ± 1,04c	37,86 ± 1,95bc	**	**	
Rr	1,63 ± 0,15b	1,21 ± 0,08b	2,2 ± 0,11a	1,67 ± 0,13b	**	**	
TRBr	40,73 ± 2,15a	39,24 ± 2,04a	25,1 ± 1,85b	30,65 ± 2,02b	***		
TRBm	28,77 ± 2,22a	20,94 ± 1,38b	26,97 ± 1,89ab	23,89 ± 1,97ab		*	
TRn	2,19 ± 0,37a	2,38 ± 0,29a	1 ± 0b	1,21 ± 0,11b	***		
RBm	71,9 ± 5,08bc	53,87 ± 2,67c	113,3 ± 9,43a	78,04 ± 3,72b	***	***	
SBm	44,69 ± 4,74a	25,04 ± 2,15b	47,64 ± 4,17a	36,73 ± 2,87ab		***	
WBm	54,44 ± 4,22ab	32,16 ± 2,2c	61,06 ± 3,64a	45,79 ± 2,59b	*	***	
AGBm	84,04 ± 5,9ab	55,65 ± 4,12c	86,32 ± 4,24a	69,24 ± 3,36b		***	
TBm	155,94 ± 9,4b	109,53 ± 5,99c	199,62 ± 11,33a	147,27 ± 5,69b	***	***	
RS	0,9 ± 0,07b	1,01 ± 0,06ab	1,34 ± 0,11a	1,15 ± 0,07ab	**		
FS	0,56 ± 0,04b	0,74 ± 0,05a	0,43 ± 0,03b	0,52 ± 0,02b	***	**	
BSr	0,34 ± 0,13a	0,34 ± 0,07a	0,35 ± 0,06a	0,27 ± 0,04a			
H	135,07 ± 13,94a	103,03 ± 6,9a	132,08 ± 11,04a	130,85 ± 11,62a			
D	12,09 ± 0,58ab	10,53 ± 0,32b	13,23 ± 0,42a	12,05 ± 0,4ab	*	**	
OL	14,03 ± 0,2a	13,77 ± 0,38a	13,81 ± 0,3a	13,98 ± 0,3a			
GCL	25,87 ± 0,35a	26 ± 0,6a	26,68 ± 0,47a	26,42 ± 0,38a			
GCW	18,09 ± 0,25a	18,38 ± 0,37a	18,76 ± 0,27a	18,41 ± 0,18a			
SC	54,32 ± 0,8a	52,96 ± 0,49a	51,77 ± 0,56a	52,94 ± 0,89a			
SS	368,1 ± 9,12a	376,53 ± 14,55a	393,53 ± 11,88a	382,06 ± 7,79a			
SD	555,13 ± 24,51a	621,25 ± 33,91a	586,13 ± 20,68a	535,63 ± 40,55a			
N	1,72 ± 0,12b	2,32 ± 0,11a	2,09 ± 0,08ab	2,25 ± 0,12a		**	
C	45,34 ± 0,65b	45,59 ± 0,33ab	45,55 ± 0,22ab	47 ± 0,19a		.	

biomass under drought as well as a lower coarse to fine roots ratio. It needs to be noted, however, that the separation of coarse and fine roots was based on a lower sample number than TRBm, CFRBm and TRBm, these results need to be interpreted with caution. Post-hoc tests also suggested for *Q. petraea* a higher osmotic adjustment and more leaf nitrogen under drought.

### Physiology

No difference between species was found for the steady state gas exchange measurements ( $A_n$ ,  $g_s$ ) extracted from both ACi and irradiance response curves when hydric regimes were applied (Tables 3, 5), despite a slight tendency for higher assimilations values in *Q. robur*. The same results were found for the photosynthetic capacity, both species displaying similar  $J_{max}$  and  $V_{max}$  values inside each treatment. Similar nocturnal (NT) and diurnal transpirations (DT) were found in both species, NT accounting for about 6% of the daily transpiration.

**Table 3** : Means per groups ( $\pm$  SE) of water use estimators and their components, with the Assimilation ( $A_n$ ), the stomatal conductance ( $g_s$ ), intrinsic water use efficiency ( $W_i = A_n/g_s$ ) of light curves and A-ci curves at high irradiance steady-state values (PPFD and  $A_{-ci}$  respectively), the transpiration efficiency (TE), the water consumption (TWC), the biomass accumulation of the plant (Bm) and the isotopic discrimination ( $\delta^{13}C$ ). Different letters show the significative differences among groups from the ANOVA model including treatments and species effects followed by a post-hoc Tukey test. Overall species (SP), and treatment (T) and interaction effect (SP\*T) are presented as is: (P values: "\*\*\*\*" for  $P < 0.001$ ; "\*\*\*" for  $P < 0.01$ ; "\*\*" for  $P < 0.05$ ). Model wise p-values were adjusted for false discovery rate ("fdr" method) and effect significances were only presented for significant models with  $p < 0.05$ .

	QPC	QPD	QRC	QRD	SP	T	SP*T
Wi PPFD	93,1 $\pm$ 9,44a	124,87 $\pm$ 11,86a	86,85 $\pm$ 6,55a	130,19 $\pm$ 17,51a		*	
$A_n$ PPFD	10,51 $\pm$ 1,17b	5,63 $\pm$ 0,72c	14,74 $\pm$ 1,04a	5,84 $\pm$ 0,7c	.	***	*
$g_s$ PPFD	0,12 $\pm$ 0,02ab	0,05 $\pm$ 0,01b	0,18 $\pm$ 0,03a	0,05 $\pm$ 0,01b		***	
Wi Aci	89,48 $\pm$ 9,43b	123,78 $\pm$ 7,82a	85,69 $\pm$ 3,3b	133,29 $\pm$ 11,05a		***	
A Aci	12,07 $\pm$ 1,61a	5,62 $\pm$ 0,89b	14,21 $\pm$ 1,34a	6,08 $\pm$ 1,05b		***	
$g_s$ Aci	0,15 $\pm$ 0,03a	0,05 $\pm$ 0,01b	0,17 $\pm$ 0,02a	0,05 $\pm$ 0,01b		***	
TE	4,07 $\pm$ 0,15c	5,23 $\pm$ 0,16a	4,62 $\pm$ 0,14b	5,4 $\pm$ 0,14a	*	***	
TWC	37,03 $\pm$ 2,12a	20,31 $\pm$ 0,84b	40,93 $\pm$ 2,15a	26,52 $\pm$ 1,00b	*	***	
Bm	153,9 $\pm$ 9,54b	107,94 $\pm$ 5,26c	197,83 $\pm$ 11,53a	143,03 $\pm$ 6,02b	***	***	
TWCS	9,37 $\pm$ 0,49a	6,63 $\pm$ 0,39b	9,99 $\pm$ 0,41a	7,52 $\pm$ 0,28b		***	
BmS	37,37 $\pm$ 1,48b	33,99 $\pm$ 2,3b	47,26 $\pm$ 1,83a	40,08 $\pm$ 1,62b	***	*	
NT	21,8 $\pm$ 3,75a	19,73 $\pm$ 3,09a	20,13 $\pm$ 2,34a	22,14 $\pm$ 2,26a			
DT	368,46 $\pm$ 30,27ab	288,29 $\pm$ 25,98b	428,69 $\pm$ 19,09a	343,62 $\pm$ 18,83ab	.	**	
NDr	6 $\pm$ 0,63a	6,77 $\pm$ 0,69a	4,89 $\pm$ 0,47a	6,34 $\pm$ 0,56a			
NTS	0,05 $\pm$ 0,01a	0,06 $\pm$ 0,01a	0,05 $\pm$ 0,01a	0,06 $\pm$ 0,01a			
DTS	0,93 $\pm$ 0,08a	0,95 $\pm$ 0,04a	1,06 $\pm$ 0,04a	1,02 $\pm$ 0,04a			
$\delta^{13}C$	-27,88 $\pm$ 0,52ab	-26,87 $\pm$ 0,31a	-28,22 $\pm$ 0,36b	-27,33 $\pm$ 0,14ab		*	
$V_{max}$	49,33 $\pm$ 7,03a	41,32 $\pm$ 8,03a	64,16 $\pm$ 6,71a	36,66 $\pm$ 7,35a		*	
$J_{max}$	85,95 $\pm$ 10,3ab	53,41 $\pm$ 12,7b	114,19 $\pm$ 12,06a	62,46 $\pm$ 13,34b		**	

Within each treatment, both species displayed the same dynamic responses for all the parameters ( $\tau$ ,  $\lambda$  and SL) for both closing and opening sequences (Table 4). However, a few differences appeared while comparing both sequences, for  $\tau$  both species only displayed tendencies for slower responses during the opening sequence, while for  $\lambda$ , only *Q. robur* displayed significantly slower opening than closing. Similarly to the other two parameters when found significant, the response was faster (lower SL values) during opening than closing for both species at the exception of the « QPC » group. Additionally, no difference was found between species for the amplitude of response to irradiance for the two sequences in both, absolute (SA) and relative terms (RSA) and both closing and opening sequences displayed similar amplitudes.

**Table 4** : Kinetics parameters for opening and closing sequences (means  $\pm$  SE), with  $\tau$  the response time (sec),  $\lambda$  the delay of stomatal response to reach the inflection point (sec), SL the maximal slope of the response and the amplitude of variation (closing SS1-SS2 and opening SS2-SS3) of the parameters between each steady state (SA and RSA (%)), respectively in absolute values and percentage). Different letters show the significative differences between groups from the ANOVA model including treatment and species effects performed on closing and opening sequences separately and followed by a post-hoc Tukey test. ( $n = 4-8$  repeated measurements per group). The significant differences between the opening and closing sequence computed by a paired t-test are presented as is (P values: “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*\*” for  $P < 0.05$ ), so a significative difference indicates an asymmetric response.

		closing		opening	Cl/op
QPC		309 $\pm$ 66a	.	296 $\pm$ 26ab	0,68 $\pm$ 0,01a
QPD	$\tau$	121 $\pm$ 20c	ns	147 $\pm$ 31b	0,91 $\pm$ 0,11a
QRC	(sec)	227 $\pm$ 23ab	.	359 $\pm$ 73a	0,75 $\pm$ 0,13a
QRD		131 $\pm$ 9bc	.	212 $\pm$ 36ab	0,68 $\pm$ 0,1a
	SP				
	T	***		*	
QPC		395 $\pm$ 58a	.	395 $\pm$ 42ab	0,77 $\pm$ 0,14a
QPD	$\lambda$	131 $\pm$ 15b	ns	137 $\pm$ 16b	0,96 $\pm$ 0,05a
QRC	(sec)	367 $\pm$ 41a	*	518 $\pm$ 86a	0,76 $\pm$ 0,07a
QRD		169 $\pm$ 17b	*	225 $\pm$ 31b	0,8 $\pm$ 0,11a
	SP			*	
	T	***		***	
QPC		4,5 $\pm$ 0,18a	ns	3,9 $\pm$ 0,15a	1,62 $\pm$ 0,18a
QPD	SL	7,3 $\pm$ 0,17a	*	4,0 $\pm$ 0,12a	1,98 $\pm$ 0,32a
QRC	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ )	9,6 $\pm$ 0,17a	**	5,9 $\pm$ 0,16a	1,95 $\pm$ 0,33a
QRD		5 $\pm$ 0,14a	*	3,7 $\pm$ 0,15a	1,91 $\pm$ 0,36a
	SP				
	T				
QPC		0,03 $\pm$ 0b	ns	0,03 $\pm$ 0,01ab	
QPD	SA	0,02 $\pm$ 0b	ns	0,01 $\pm$ 0b	
QRC	( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0,06 $\pm$ 0,01a	ns	0,05 $\pm$ 0,01a	
QRD		0,02 $\pm$ 0b	ns	0,02 $\pm$ 0,01ab	
	SP				
	T	**		*	
QPC		-26,68 $\pm$ 3,66a	ns	-23,07 $\pm$ 1,12a	
QPD	RSA	-39,08 $\pm$ 2,81a	ns	-28,04 $\pm$ 2,97a	
QRC	(%)	-32,92 $\pm$ 3,9a	ns	-29,62 $\pm$ 5,53a	
QRD		-30,61 $\pm$ 2,97a	ns	-28,83 $\pm$ 3,66a	
	SP				
	T				

Additionally, over the water consumption monitoring period, *Q. robur* transpired significantly more water (TWC) and produced more biomass (Bm) than *Q. petraea* regardless of the treatments. The differences in Bm and TWC led to significantly higher transpiration efficiency values for *Q. robur* in both treatments, but under drought treatment this difference was slightly smaller (Table 3).

The similar gas exchange measurements led to similar intrinsic water use efficiency (Wi) between the two species inside each treatment. In addition, both species displayed no differences for isotopic discrimination in the leaves used for gas exchanges ( $\delta^{13}\text{C}$ ).

### ***Decomposing WUE efficiency in components***

All correlations were based on an ANCOVA, taking into account species and drought effects (see Table 5). These correlations are therefore independent from species or treatment induced variations and represent overall plant functioning of these oaks. Between the two components, TE did not correlate with TWC, but only positively with biomass increase (Bm) and by extent most of the biomass traits. Both components (Bm and total water consumption TWC) displayed significant correlations with each other. Most of the biomass traits correlated positively with Bm, however clearly most of the total biomass variation was explained by fine and coarse root biomass, followed closely by leaf biomass and surface. Similarly, TWC positively correlated with most of the biomass traits, displaying the highest values for TBm ( $R^2 = 0.28$ ) and CRBm ( $R^2 = 0.28$ ) as well as displaying high values for leaves related traits such as LBm and LS ( $R^2 = 0.17$  and  $0.21$ , respectively). It is also worth to notice that none of the stomatal morphological features correlated with any of TE components traits nor TE itself. However, bulk leaf  $\delta^{13}\text{C}$  negatively correlated with both TWCS and DTS ( $R^2 = 0.23$  and  $0.22$ , respectively) while positively correlating with LBm and LMA ( $R^2 = 0.16$  and  $0.21$ , respectively). Among physiological traits, the only significant correlation detected for gas exchange measurements was found between TE and Wi-PPFD at SS2 ( $R^2 = 0.07$ ). TE displayed a stronger correlation with the time integrated estimator of Wi, the bulk leaf  $\delta^{13}\text{C}$  ( $R^2 = 0.29$ ). Additionally, no correlation was found for the photosynthetic capacity traits and only a few tendencies were detected for dynamics traits ( $0.05 < P \text{ values} < 0.1$ ), TWC showing a small positive correlation with  $\tau_{\text{cl}}$  ( $R^2 = 0.05$ ), BmS displaying a small negative correlation for  $\text{SL}_{\text{cl}}$  ( $R^2 = 0.14$ ),  $\text{SL}_{\text{op}}$  correlating with Bm and BmS ( $R^2 = 0.1$  and  $0.17$ , respectively) while SLr displayed the only significant positive correlation with TWC ( $R^2 = 0.08$ ) as well as a positive tendency for Bm ( $R^2 = 0.19$ ). Total water consumption (TWC) was clearly driven by daily water consumption (DT:  $R^2 = 0.23$ ), however variation in nocturnal transpiration also played a smaller significant role (NT:  $R^2 = 0.07$ ). These correlations were also found when standardized to the leaf surface with DTS, TWCS and BmS both correlating positively with the latter ( $R^2 = 0.25$  and  $0.18$ , respectively). In addition, both TWC and Bm were negatively correlated with leaf nitrogen N ( $R^2 = 0.12$  and  $0.08$ , respectively).

	model TE	model TWC	model TWCS	model Bm	model BmS	model $\delta 13c$
TWCS	(-)0.07*				(+)0.33***	(-)0.23 *
BmS	(+)0.06*		(+)0.26***	(+)0.04.		
TE			(-)0.07*	(+)0.16***	(+)0.08*	(+)0.41 ***
TWC				(+)0.38***		
Bm	(+)0.16***	(+)0.25***			(+)0.05.	(+)0.08.
LS		(+)0.21***	(-)0.16***	(+)0.25***	(-)0.13**	
FRS				(+)0.19.	(+)0.18.	
RSLr					(+)0.36*	
LBm	(+)0.06*	(+)0.17***	(-)0.15***	(+)0.27***	(-)0.07*	(+)0.16 *
LMA	(+)0.09**			(+)0.05.	(+)0.06*	(+)0.21 *
SLA	(-)0.1**			(-)0.07.	(-)0.06*	(-)0.25 **
LRWC						
Osm	(+)0.07*			(+)0.1.		
SBm		(+)0.05*		(+)0.05.		
BBm		(+)0.04*	(-)0.05*	(+)0.08**		(+)0.13.
CRBm		(+)0.28**		(+)0.42***		
FRBm		(+)0.19*		(+)0.34***		
CFRBm	(+)0.13***	(+)0.13***		(+)0.3***	(+)0.09*	
CRBmr		(+)0.1.				
FRBmr		(-)0.1.				
Rr		(+)0.09.				
TRBm	(+)0.03.	(+)0.07**		(+)0.12***		
TRn						
RBm	(+)0.14***	(+)0.17***		(+)0.38***	(+)0.11**	
WBm	(+)0.04*	(+)0.16***		(+)0.2***		
AGBm	(+)0.06*	(+)0.21***		(+)0.28***		(+)0.11.
TBm	(+)0.16***	(+)0.28***		(+)0.51***	(+)0.15	
RS	(+)0.03.				(+)0.12**	(-)0.15 *
FS			(-)0.19***		(-)0.17***	
H		(+)0.03.		(+)0.05.		
D	(+)0.06*	(+)0.06**		(+)0.09**		
$\delta 13c$	(+)0.29***		(-)0.18*	(+)0.07.		
N		(-)0.12*		(-)0.08.		
C						
Vmax						
Jmax						
SL <sub>cl</sub>					(-)0.14.	
$\tau_{cl}$		(+)0.05.				
$\lambda_{cl}$						
$\tau_{op}$						
SL <sub>op</sub>				(+)0.1.	(+)0.17.	
$\lambda_{op}$						
$\tau_r$						
$\lambda_r$						
SL <sub>r</sub>		(+)0.08*		(+)0.19.		
Wi- PAR (SS2)	(+)0.07*					
NT		(+)0.07**		(+)0.07.		
DT		(+)0.23***		(+)0.24***		
NTS						
DTS	(-)0.06*		(+)0.25***		(+)0.18***	(-)0.22 *

**Table 5:** Major ANCOVA results obtained by models testing  $\delta^{13}C$ , TE and its components (TWC, Bm, TWCS, BmS) against morphological and physiological traits. Including the correlations sign, partial  $R^2$  of the covariate and its P-value: “\*\*\*” for  $P < 0.001$ ; “\*\*” for  $P < 0.01$ ; “\*” for  $P < 0.05$  and “.” for  $0.1 > P > 0.05$ . (see annexe X or supplementary data for full table) With:  $lm(\text{Model variable} \sim \text{Treatment effect} + \text{Species effect} + 1 \text{ covariate})$

## **Discussion**

### ***Drought impact on morphological traits***

In the present study we aimed to characterize the impact of a severe drought on oak growth. As expected, under drought conditions, both species displayed a commonly reported response by producing globally less biomass in both above and belowground compartments (Bréda et al. 2008). Nevertheless, fine root biomass proportion relatively increased under drought, in relation to coarse roots in both species. As such a drought response of root biomass allocation has been observed before (Guehl et al. 1994), it might enhance drought tolerance by providing an improved access to soil water supply. Despite these decreased biomass productions in the drought treatment, height growth was not affected, whereas diameter growth was significantly reduced. Both, stomatal conductance and assimilation were reduced by more than 50 % in the drought treatment, probably limiting overall carbon availability in these young seedlings for growth, especially as the available LS was also less under drought. As the drought effect on photosynthetic capacity was small, the reduction in assimilation was probably rather due to an increased stomatal limitation. However, both species displayed a significant osmotic adjustment under this severe drought, maintaining the leaf relative water content at levels similar to non-stressed seedlings.

### ***Species differences in morphological traits***

Additionally, we explored the differences between the two oaks species susceptible to explain their respective ecological requirements. Most of the interspecific differences were found for root related traits both under control conditions and in response to drought. The root biomass (including both coarse and fine roots) appeared to be the only biomass traits for which the species displayed different responses to drought. Although, *Q. robur* systematically displayed higher root biomass production, it was more strongly reduced under drought than for *Q. petraea*. Despite similar above ground biomass observed in both species within each treatment, under control conditions *Q. robur* invested more in the root system than *Q. petraea* which, at first glance might seem in discordance with the latter known higher tolerance to drought, as efficiency of trees in terms of water relations depends on their ability to absorb water at rates allowing the avoidance of internal hydraulic failure due to a high evaporative demand (Bréda et al. 2008). By dissecting root biomass into coarse and fine roots we were able to show that *Q. petraea* produced proportionally more fine roots than coarse compared to *Q. robur*. This resulted in a similar fine root biomass as well as fine root surface in both species. Furthermore, both

species displayed interspecific differences for taproots, as most *Q.petraea* seedlings produced several taproots, whereas *Q.robur* seedlings very rarely had more than one. However, the overall biomass invested into tap roots was not different between the species. These results suggest that carbon allocation in seedling root systems is invested in a more efficient way by *Q. petraea* in term of water uptake by fine roots than *Q.robur*, thus compensating for the lower overall root biomass, but perhaps also providing an improved soil exploration due to several tap roots. Moreover, root traits displayed a different plasticity to drought in both species, therefore the soil-to-root interface might constitute a key component in the drought tolerance of the two oaks species. However, contrasting results were also reported in young oaks trees for which root growth was unaffected by two progressive severe droughts with rewatering while shoot and stem growth substantially declined (Arend et al. 2013). Such difference might be attributable to the severe drought applied in our study as well as the different experimental designs especially in term of available soil volume of root prospection. The differences in root traits between the two species observed in our study might suggest more complex and ramified root system by *Q. petraea* compared to *Q. robur* from an early stage of development which is in agreement with previous results which observed an increase in the root-leaf ratio under moderate drought in both species (Thomas & Gausling, 2000) as well as under severe drought in young sessile oaks (Thomas, 2000). This suggest that the differences in the structure of the root systems found between the two species might partly explain the observed difference in ecological niche of *Quercus* species (Dickson & Tomlinson 1996; Thomas et al. 2000).

### ***Nocturnal and diurnal transpirations***

To improve our understanding about the overall water consumption in oaks trees, we monitored their water loss over a daily course. As expected, under drought the seedlings consumed less, presumably due to the lower stomatal conductance as well as lower leaf surface which was positively correlated with TWC. Both species displayed similar nocturnal transpiration (NT) in both treatments. This might indicate that in oaks seedlings, no acclimation mechanism allows to reduce nocturnal water loss under stress. During night the cuticular conductance contribute to water loss, however, a significant nocturnal stomatal conductance has often been detected in numerous species (Zeppel et al., 2010) as well as among oaks species (Violet-Chabrand PhD thesis, 2013). Such water loss occurring at night might constitute a considerable cumulative water loss, especially for adult trees as we estimated NT to account for ~6% of the total daily water consumption, when summer nights represented only about five hours. Such results are comparable to previous night time transpiration values observed in oaks seedlings which were quite substantial by ranging from 4 to 33% of day time values (Violet-chabrand PhD thesis, 2013) thus confirming that in seedling the maintenance of open stomata during the night might play an important contribution to the plant water budget (Dawson et al. 2007).



### ***Stomatal dynamics and morphology in response to drought***

Another aim of our study was to assess the plasticity of the stomatal dynamic response to drought. Light is considered as the main driver of photosynthesis and stomatal conductance changes under natural conditions (Shimazaki et al. 2007). Therefore, we explored stomatal temporal responses induced by a decrease followed by an increase in irradiance displayed by oaks seedlings. Both species clearly showed faster dynamic responses under drought. Previous studies on stomatal dynamic recorded similar faster responses under water limited environments (reviewed by Vico et al. 2011; Tobacco: Gerardin et al. 2018), sometimes associated with increased transient water use efficiency (rice: Qu et al. 2016) as modelled by Lawson and Blatt (2014). Such faster stomatal responses have been hypothesized to translate water conservative behaviours (Vico et al. 2011; Lawson and Blatt 2014; McAusland et al. 2016) as faster closing might lead to an improved coupling between  $A_n$  and  $g_s$ , thus ultimately higher  $W_i$ . Moreover, there was a clear asymmetrical response to irradiance for all three dynamic parameters in both species, characterized by a faster closing which remained unchanged under drought treatment. Symmetry of dynamic response to irradiance has rarely been reported in literature, although it has been suggested that asymmetrical responses might contribute to water loss as well as  $CO_2$  uptake (Ooba & Takahashi 2003; Lawson et al. 2010, 2012; Vialet-Chabrand et al. 2013; McAusland et al. 2016). Faster closing than opening would be associated with a water conservative behaviour (Tinoco-Ojanhuren & Pearcy, 1993) and has been recorded among various species (McAusland et al. 2016). Recently, Gerardin et al. (2018) highlighted a plasticity to drought in *Nicotiana tabacum* for the degree of symmetry in response to irradiance either accentuated or reduced depending on the dynamic parameter. Such results are in contradiction with the present stomatal behaviours expressed by oaks seedlings, thus hinting for species-specific behaviours in drought acclimation regarding stomatal opening and closing processes.

In many species stomatal morphology has been shown to be impacted by growth conditions (Casson and Gray 2008; Kardiman and Raebild 2018; Gérardin et al. 2018). However, in our study stomatal morphology of the used third flush leaves were not significantly changed by the drought treatment, which is in accordance with Guehl et al. (1994) for stomatal density in *Q. petraea*. Stomatal morphology has been linked to the rapidity of stomatal response. It has been observed that stomatal features could be associated with faster dynamic response which in turn might be associated with higher water use efficiency (Hetherington & Woodward 2003; Drake et al. 2013; Raven 2014). Various studies established clear variations among species for such stomatal dynamics traits and stomatal features such as stomatal size and density (McAusland et al. 2016). Interestingly, we observed no drought effect for any stomatal morphological traits. Therefore, the faster responses observed under drought stress cannot be attributed to changes in stomatal morphology. Hence, we assume that the

observed variability in dynamics among individuals as well as treatments might rather rely on physiological processes such as ion transport activity (Lawson and Blatt 2014) or  $\text{Cl}^-$ -mediated stomatal responses (Buckley et al. 2013) as previously proposed in species with elliptical shaped guard cells (Hetherington & Woodward 2003; Franks & Beerling 2009; McAusland et al. 2016).

### ***Species differences for stomatal dynamics***

For none of the stomatal dynamic traits a significant species difference could be detected and also no species to treatment interaction, suggesting that in terms of rapidity of stomatal reactions to changes in irradiance *Q. robur* and *Q. petraea* show similar behaviours, while a within species and inter leaf variability exists. We observed also no difference between the two species for stomatal morphology related traits.

### ***Species differences in $W_i$ and WUE, gas exchange***

Overall the gas exchange measurements were comparable to previous studies performed on the two oaks species (Ponton et al. 2002; Epron and Dreyer 1993; Steinbrecher et al. 2013) and suggested that both species displayed highly similar assimilation rates as well as stomatal conductance in control as well as in drought conditions, with some exceptions. *Q. robur* displayed slightly higher assimilation rates and stomatal conductance under well irrigated conditions as well as a stronger decrease in assimilation rate under drought compared to *Q. petraea*. However, the photosynthetic capacity was not significantly different between the species. This could suggest a stronger drought impact on carbon assimilation via stomatal limitations in *Q. robur* seedlings, which could influence plant growth and survival in field grown trees. When detected, these small differences between species were in accordance with previous works also showing higher stomatal conductance and assimilation rate for *Q. robur* (Epron and Dreyer 1993; Ponton et al. 2002). However, in these two studies, the observed differences in gas exchange led to significantly higher  $W_i$  for *Q. petraea*, which was not the case in our study.

### ***Interspecific variability in water use efficiency and $\delta^{13}\text{C}$ .***

In the present study, due to similar assimilation rates and stomatal conductance, the species displayed similar intrinsic water use efficiencies within each treatment. Nevertheless, it was clear that the stomatal conductance was the main driver of  $W_i$  variability rather than carbon assimilation in both species as well as under both hydric treatments. This confirms the previous results obtained in these oaks species attributing most of  $W_i$  variability to  $g_s$  (Roussel et al. 2009a, 2009b; Ponton et al. 2001), hence stressing the importance of stomatal regulation in gas exchange balance. In addition, similarly to the direct  $W_i$  estimations, also for bulk leaf  $\delta^{13}\text{C}$  measurements no significant species difference was

detected. Our results do therefore not corroborate the higher  $W_i$  observed for *Q. petraea* recorded on mature trees originated from the same natural stand (Epron and Dreyer, 1993) or  $\delta^{13}C$  (both in wood cellulose and leaves) measured in neighbouring trees (Ponton et al. 2001) or seedlings from pure stands in the same forest under control conditions (Ponton et al. 2002). Nevertheless, it is worth mentioning that these experimental designs were slightly divergent from the approach chosen in our experiment, as we grew seedlings originated from typical *Q. robur* or *Q. petraea* pure stands within a same provenance region and conducted a preliminary phenotypic screening on a larger number of individuals, thus maintaining a maximum  $W_i$  variability in the measured seedlings.

### **Transpiration efficiency**

One of our main objectives was to study water use efficiency integrated at different levels, thus in addition to  $W_i$  and  $\delta^{13}C$  measurements we monitored the water consumption as well as biomass production of the plants throughout the experiment, allowing us to estimate the whole plant transpiration efficiency (TE). To the authors knowledge, this was the first attempt to study drought as well as species differences for TE in *Q. robur* and *Q. petraea*. The transpiration efficiency values found in this study ranged from  $\sim 4.1$  g DM L<sup>-1</sup> to 5.4 which are similar to observations found by Roussel et al. (2009) in *Q. robur* seedlings for which TE covered a range from 4.8 to 5.5 g DM L<sup>-1</sup>. Scaled up TE at the whole plant level is indeed rarely seen in literature as its estimation is a laborious process integrating measurements over a long period (Roussel et al. 2009; Cernuzak et al. 2007, Guehl et al., 1994). In addition, as transpiration efficiency does not necessarily reflect leaf gas exchange performed by plants, upscaling from  $W_i$  to TE is not straightforward. Indeed, various processes such as respiratory carbon losses, production of volatile carbonated compounds and non-photosynthetic loss of water are likely to induce a discrepancy between these two WUE estimators (Farquhar & Richards, 1984). For instance, in our study, nocturnal transpiration accounted for  $\sim 6\%$  of the daily water consumption regardless of the species and treatments. Nevertheless, in agreement with the sampling strategy and following the same trend than  $W_i$  and  $\delta^{13}C$ , transpiration efficiency significantly increased under drought for both species.

### **Species differences**

The only significant WUE difference observed between *Q. robur* and *Q. petraea* was found in transpiration efficiency for which *Q. robur* displayed higher values than *Q. petraea*, especially under non-stressed condition, no significant difference was found for either  $\delta^{13}C$  or  $W_i$ . This difference in TE was mainly due to the greater biomass production of *Q. robur* seedlings in both treatments. Nevertheless, most of the studies assessing oaks growth often described higher growth rates observed in *Q. robur* mature trees and seedlings compared to *Q. petraea*.

The theoretical relationship between  $W_i$  and  $\delta^{13}C$  has been confirmed experimentally in various studies on oaks (Guehl et al. 1994; Picon et al. 1996; Ponton et al. 2002; Roussel et al. 2009). We detected a significant correlation between leaf level integrated intrinsic water use efficiency ( $\delta^{13}C$ ) and TE, which suggests that partly the whole plant TE still depends on  $g_s$ , as variations in  $W_i$  were more strongly determined by  $g_s$  than  $A_n$ . Our results demonstrated that upscaling from intrinsic water efficiency to whole plant transpiration efficiency might not always be straightforward. Indeed, the similar  $W_i$  as well as  $\delta^{13}C$  variations found among species inside each treatment were not repeated for transpiration efficiency, for which *Q. robur* displayed significantly greater values.  $W_i$  is measured either under standardized conditions or is an instantaneous snapshot of plant functioning, which might not be representative of the combined functioning of all leaves. However, already the temporal integration at “one leaf level” using  $\delta^{13}C$  showed that a higher leaf level  $W_i$  could explain part of the higher whole plant TE. We also only detected a single relationship between low irradiance steady states  $W_i$  ( $W_i$ -PPFD SS2) and TE. Such observation could suggest that low irradiance gas exchanges were more representative of the plant gas exchanges integrated over the whole TE monitoring than high irradiance steady states. Although Roussel et al. (2009) previously established a strong relationship between  $W_i$  and transpiration efficiency measured the on the same day in a *Q. robur* full sib family, our results hinted toward the fact that steady states  $W_i$ , although being similar at low and high irradiance, were not representative of integrated gas exchanges throughout the experimentation. Thus, leading to the observed discrepancy between  $W_i$  and the other two WUE estimators. Brendel et al. (2008), whom also found low correlations between  $\delta^{13}C$  and  $W_i$  obtained in field measurements, suggested that environmental influence on gas exchange might induce noise in  $W_i$  estimation leading to the weak relationships. Such discrepancy between whole plant water use efficiency and intrinsic water use had already been observed in *Q. robur*, the two traits were reported as uncoupled (Guehl et al. 1995). Despite the contrasting results observed between various WUE estimators, bulk leaf  $\delta^{13}C$  proved itself as a reliable proxy for TE, as ANCOVA models detected relatively high correlations between the two traits ( $R^2 = 0.29^{**}$  and  $0.41^{***}$ : see table 5). Such findings suggest that leaf isotopic discrimination ( $\delta^{13}C$ ) might be used instead of transpiration efficiency in future large screening experiments, avoiding the particularly constraining and time consuming TE estimation.

### **Correlations : biomass traits and TE (components)**

Overall, transpiration efficiency variations were driven directly by the biomass accumulation rather than water use throughout the experiment, while the biomass itself was mostly depending on underground biomass traits. In addition, water use was positively correlated to the total plant biomass and especially leaves surface and biomass. Therefore, even though  $W_i$  was mainly driven by stomatal conductance stressing the importance of stomatal regulation on gas exchange, once upscaled to whole

plant, the biomass setting the transpiring leaf area plays a determinant role in TE. Furthermore, neither the accumulated biomass or water use correlated with  $A_n$  or  $g_s$ , respectively. For instance, Li et al. (2011) reported carbon loss reaching up to 25% of assimilation rates re-emitted as isoprene in *Q. robur* leaves submitted to heat stress. Thus, one cannot exclude that an intra-specific variability in these processes might be involved in the observed TE differences between the two species (Steinbrecher et al. 2013).

To our knowledge, this study was the first comparing stomatal morphology between *Q. robur* and *Q. petraea*. For *Q. robur*, stomatal density had been linked within a full-sib family to the variability of intrinsic water use efficiency, probably through the expression of gene ERECTA and its impact on stomatal density and size (Roussel et al. 2008). However, the lack of correlations (ANCOVA) between  $\delta^{13}C$  and stomatal morphology that we found for both species regardless of the treatments does not corroborate such a relationship or at least suggest that there was an insufficient stomatal density variability in our populations to detect any correlation.

### ***Correlations dynamic***

In this study we were unable to link the dynamics parameters significantly with transpiration efficiency or its components (TWC and Bm), when accounting for species and treatment differences. However, establishing such relations might be difficult on the within species level, where variations in stomatal speeds might not be sufficient to impact the whole plant growth and water use. Also, single leaf measurements of stomatal dynamics were performed, which might not accurately represent the whole plant functioning. Such experiments tend to point out that one single leaf dynamic properties are in fact unlikely to reflect the dynamics of the whole plant at a given point in time. Therefore, further studies are needed to understand the temporal response of oaks seedlings to environmental changes to accurately estimate a whole plant dynamic state eventually linkable with long-term gas exchange integrations.

### ***Conclusion***

Using seedlings of *Q. robur* and *Q. petraea* originating from natural pure stand, we showed that both species displayed highly similar responses to drought characterized by the similar levels of gas exchanges and the same faster dynamics to transient irradiance. Most of the detected differences between the two species were found in their biomass allocation, especially in the root related traits which indicated the establishment of a more ramified root system by *Q. petraea* possibly linked to a better tolerance to drought and a higher soil prospection capability. On the other hand, *Q. robur* distinguished itself from *Q. petraea* by producing globally more biomass which is in accordance with its pioneer attribute often described. In contradiction with most of the literature, no differences

between species for intrinsic water use efficiency were detected. However, for the first time we showed greater transpiration efficiency in *Q. robur* than *Q. petraea* seedlings. In addition, the expected relationship between  $W_i$  and  $\delta^{13}\text{C}$  was respected. Furthermore,  $\delta^{13}\text{C}$  and TE displayed a relatively tight correlation with each other which led us to conclude that steady state gas exchange were not representative of a time integrated water use efficiency. Nevertheless, we confirmed previous works proposing stomatal conductance as the main  $W_i$  driver in oaks and highlighted the importance of biomass production and leaf surface on TE variability. However, we were unable to link temporal response dynamics to irradiance as well as stomatal anatomy with the latter. Which, altogether with the observed discrepancy suggest that a huge part of the mechanisms involved in TE diversity remains unveiled.

Our study suggested different strategies in root development displayed by both species from a young age, exploring these differences in field and assessing whether these strategies are maintained by older trees might greatly improve our understanding of species differences as well as mechanism involved in their respective drought tolerance. In addition, little is known about dynamics under transient irradiance. The faster responses displayed by both species although not linked to TE nor water consumptions hinted toward an acclimation of dynamics to drought. Hence further studies using different irradiance steps might contribute to assess a potential key role of dynamics in drought tolerance and water balance.

### ***Declaration of interest***

All authors disclose any financial or personal conflict of interest.

### ***Author contributions***

OB and DLT designed the experiment, OB provided study material and environment, TG, and OB conducted the experiment, TG, OB did the data analysis, and TG, OB and DLT wrote the manuscript and were involved in the interpretation and critical discussion of the results, OB obtained funding.

### ***Acknowledgements***

TG acknowledges the PhD grant from the H2Oak ANR-14-CE02-0013 project. This study was part of the interdisciplinary « H2Oak » research project aiming to investigate the diversity for adaptative traits related to water use in two European white oaks (*Quercus robur* and *Quercus petraea*). the UMR Silva is supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12- LABXARBRE-01 )

We thank Cyril Buré for the help with growing the seedlings and setting up the experiment on the robotic system. Clark and Maxime for their help in harvesting the roots, ONF for harvesting of the seeds, Marie-Beatrice Bogeat-Triboulot for help with the WinRhizo root surface measurements and everyone who helped during the final harvest

**Annexe 1** : Means per groups ( $\pm$  SE) of Assimilation ( $A_n$ ), Stomatal conductance ( $g_s$ ), internal  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ), water use efficiency ( $W_i = A_n/g_s$ ) at each steady-state reached during the measurement cycle (with SS1 the steady-state value at the beginning of the sequence with high light intensity, SS2 the steady-state value obtained at the end of the stomatal closure phase and SS3 the final steady state value when come-back to high). Different letters show the significative differences among groups from the ANOVA model including treatments and species effects tested followed by a post-hoc Tukey test. The significant differences between two steady states from a paired t-test are presented as is (P values: "\*\*\*\*" for  $P < 0.001$ ; "\*\*\*" for  $P < 0.01$  and "\*\*" for  $P < 0.05$ ).

STEADY STATE		SS1		SS2		SS3
QPC		10,28 $\pm$ 1,14b	*	8,33 $\pm$ 1,19ab	*	11,07 $\pm$ 0,22a
QPD	$A_n$ - PPFD	6,7 $\pm$ 0,4bc	***	4,59 $\pm$ 0,49bc	***	5,4 $\pm$ 0,87b
QRC	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	14,68 $\pm$ 1,06a	***	11,28 $\pm$ 0,98a	**	14,28 $\pm$ 1,17a
QRD		5,87 $\pm$ 0,6c	**	4,57 $\pm$ 0,6c	***	6,27 $\pm$ 0,83b
	SP	.				**
	T	***		***		***
	SP*T	**				
QPC		0,11 $\pm$ 0,02ab	*	0,08 $\pm$ 0,01ab	ns	0,12 $\pm$ 0,02ab
QPD	$g_s$ - PPFD	0,06 $\pm$ 0,01b	**	0,03 $\pm$ 0b	**	0,04 $\pm$ 0,01b
QRC	( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0,17 $\pm$ 0,03a	***	0,12 $\pm$ 0,02a	**	0,17 $\pm$ 0,02a
QRD		0,05 $\pm$ 0,01b	**	0,04 $\pm$ 0,01b	*	0,06 $\pm$ 0,01b
	SP					*
	T	***		***		***
	SP*T					
QPC		231,62 $\pm$ 16,01a	.	216,31 $\pm$ 11,28a	ns	228,01 $\pm$ 21,17a
QPD	$C_i$ - PPFD	204,04 $\pm$ 19,63a	ns	199,09 $\pm$ 33,08a	ns	192,26 $\pm$ 18,21a
QRC	$\mu\text{mol mol}^{-1}$	233,04 $\pm$ 11,4a	**	211,95 $\pm$ 14,13a	*	233,14 $\pm$ 8,54a
QRD		175,32 $\pm$ 24,27a	ns	169,86 $\pm$ 16,62a	ns	179,41 $\pm$ 19,89a
	SP					
	T	*				*
	SP*T					
QPC		95,1 $\pm$ 10,37a	ns	102,24 $\pm$ 7,07a	ns	94,01 $\pm$ 13,35ab
QPD	$W_i$ - PPFD	121,88 $\pm$ 6,62a	.	135,41 $\pm$ 4,53a	ns	119,34 $\pm$ 10,64ab
QRC	$\mu\text{mol mol}^{-1}$	90,55 $\pm$ 6,39a	*	103,55 $\pm$ 8,72a	*	88,51 $\pm$ 5,3b
QRD		129,78 $\pm$ 15,08a	ns	135,87 $\pm$ 10,96a	ns	128,85 $\pm$ 12,29a
	SP					
	T	**		**		**
	SP*T					



**Annexe 2:** Photosynthetic parameters for the three A-ci campaigns of measurements (means per groups  $\pm$  SE), with the Assimilation ( $A_{n-Aci}$ ), the Stomatal conductance ( $g_{s-Aci}$ ), intrinsic water use efficiency ( $W_i = A_n/g_s$ ), the maximum rate of carboxylation ( $V_{max}$ ) and the maximum rate of electron transport ( $J_{max}$ ). Different letters show the significative differences among groups from the ANOVA model including treatments and species effects followed by a post-hoc Tukey test. The significant differences between two campaign from a paired t-test are presented as is (P values: “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$ ; “\*\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*\*” for  $P < 0.05$ ).

		F2		F3		F3T
QPC		14,58 $\pm$ 1,14a	ns	12,54 $\pm$ 2,17a	ns	12,07 $\pm$ 1,61a
QPD	$A_{A-Ci}$	16,98 $\pm$ 1,54a	ns	14,53 $\pm$ 0,42a	****	5,62 $\pm$ 0,89b
QRC	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	13,63 $\pm$ 1,38a	ns	16,42 $\pm$ 1,54a	ns	14,21 $\pm$ 1,34a
QRD		15,23 $\pm$ 2,19a	ns	12,35 $\pm$ 1,79a	*	6,08 $\pm$ 1,05b
	SP					
	T					***
	SP*T			.		
QPC		0,15 $\pm$ 0,01a	ns	0,11 $\pm$ 0,03a	ns	0,15 $\pm$ 0,03a
QPD	$g_{A-Ci}$	0,2 $\pm$ 0,02a	*	0,12 $\pm$ 0,01a	****	0,05 $\pm$ 0,01b
QRC	( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0,17 $\pm$ 0,03a	ns	0,2 $\pm$ 0,03a	ns	0,17 $\pm$ 0,02a
QRD		0,19 $\pm$ 0,03a	ns	0,14 $\pm$ 0,02a	**	0,05 $\pm$ 0,01b
	SP			*		
	T					***
	SP*T					
QPC		98,53 $\pm$ 5,55a	.	123,37 $\pm$ 9,58a	*	89,48 $\pm$ 9,43b
QPD	$W_i_{A-Ci}$	89,06 $\pm$ 6,89a	*	121,69 $\pm$ 7,62ab	ns	123,78 $\pm$ 7,82a
QRC	( $A/g_s$ )	88,23 $\pm$ 5,39a	ns	89,3 $\pm$ 6,86c	ns	85,69 $\pm$ 3,3b
QRD		80,97 $\pm$ 3,97a	ns	90,63 $\pm$ 4,88bc	*	133,29 $\pm$ 11,05a
	SP			***		
	T					***
	SP*T					
QPC		47,12 $\pm$ 3,79b	ns	37,19 $\pm$ 7,37b	ns	49,33 $\pm$ 7,03a
QPD	$V_{max}$	54,07 $\pm$ 5,01b	ns	47,29 $\pm$ 2,96b	ns	41,32 $\pm$ 8,03a
QRC		80,78 $\pm$ 3,98a	.	95,68 $\pm$ 7,57 a	*	64,16 $\pm$ 6,71a
QRD		84,41 $\pm$ 8,53a	ns	78,18 $\pm$ 7,39a	**	36,66 $\pm$ 7,35a
	SP	***		***		
	T					*
	SP*T			*		
QPC		92,45 $\pm$ 11,96b	ns	89,88 $\pm$ 17,98b	ns	85,95 $\pm$ 10,3ab
QPD	$J_{max}$	118,79 $\pm$ 13,98ab	ns	107,96 $\pm$ 9,09ab	**	53,41 $\pm$ 12,7b
QRC		141,26 $\pm$ 9,74a	ns	168,23 $\pm$ 19,55a	*	114,19 $\pm$ 12,06a
QRD		152,69 $\pm$ 10,46a	ns	119,32 $\pm$ 16,45ab	*	62,46 $\pm$ 13,34b
	SP	***		*		.
	T					**
	SP*T			*		

**Annexe 3:** Means  $\pm$  SE of intrinsic water use efficiency (Wi-m) from pre-selection measurements on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> flushes of oaks seedlings. Lower case letters display groups differences from a two factorial anova model including treatment and species effects (checking for sampling bias).

Groups (n=8/group)	Wi-m	Shapiro-Wilk normality test
QRC	116 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	ns
QRD	124 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	ns
QPC	100 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	ns
QPD	96 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	ns

**Annexe 4:** Ancova table of dynamic parameters, the stomatal anatomy, the water use efficiency estimators and their components (two factorial ancova model including treatment and species effects). The upper-right triangle displays the P-values (with “\*\*\*” for P<0.001; ”\*\*” for P<0.01 and ”\*” for P<0.05), while the lower-left displays the r-values (Pearson test). With the dynamic parameters:  $\tau$ ,  $\lambda$ , SL, their ratio ( $\tau$ ), and the stomatal parameters: GCW (guard cells width), GCL (guard cells length), SS (stomatal size), SD (stomatal density). n=23-32, bold r-values are highly significant (\*\*\*)

	TE	Bm	TWC	TWCS	BmS	δ13C	Wi PPFD	A <sub>n</sub> PPFD	g <sub>s</sub> PPFD	Osm	λcl	λop	λr	τcl	τop	τ	SLcl	SLop	SLr	OL	GCL	GCW	SS	SD	
RSD	15.1	31.3	34.5	24.1	20.4	3.9	32.7	50.9	75.8	11.6	64.8	67.4	26.8	51.4	60.4	37.4	54.6	78.0	41.6	5.8	4.9	4.2	8.3	15.6	
TE			**	***		***	*	**	***	***	**	*		**	*										
Bm			***	**	***			*			**	**	*	**	*	*									
TWC	-0.39 (24)	<b>0.90</b> (54)		***	***	*	*	***	**	**	***	***		***	**										
TWCS	-0.56 (54)	0.35 (54)	0.56 (54)		**	***	*	***	***	*															
BmS		0.56 (54)	0.44 (54)	0.73 (54)				*										*							
δ13C	<b>0.78</b> (23)		-0.43 (30)	<b>-0.64</b> (28)			**	***	***	**	***	**		*	**										
Wi	0.51 (24)		-0.45 (26)	-0.48 (26)		0.46 (26)		*	***	*	*														
A <sub>n</sub>	-0.59 (24)	0.52 (24)	<b>0.61</b> (26)	<b>0.70</b> (26)	0.44 (24)	-0.66 (26)	-0.43 (26)		***	**	***														
PPFD			0.56 (26)	<b>0.68</b> (26)		-0.69 (26)	-0.65 (26)	<b>0.92</b> (26)		**	***	**													
g <sub>s</sub> PPFD			<b>-0.58</b> (27)	-0.43 (28)		0.52 (30)	0.40 (26)	-0.62 (26)	-0.65 (26)		***	**		**	*										
Osm	-0.74 (22)	0.59 (22)	<b>0.76</b> (24)	0.43 (22)		-0.68 (24)	-0.68 (24)	0.67 (24)	0.66 (24)	-0.68 (25)		***	**	**	*										
λcl	-0.53 (19)	0.67 (19)	0.71 (21)			-0.63 (21)		0.63 (21)	0.56 (21)	<b>-0.61</b> (21)	<b>0.90</b> (19)			***	***	*									
λop		-0.51 (19)										-0.55 (19)				***									
λr	-0.64 (22)	0.56 (22)	0.69 (24)	0.43 (24)		-0.44 (24)				<b>-0.53</b> (25)	<b>0.85</b> (22)	<b>0.80</b> (19)													
τcl	-0.52 (19)	0.55 (19)	0.57 (21)	0.51 (21)		-0.60 (21)				<b>-0.46</b> (22)	<b>0.75</b> (19)	<b>0.86</b> (19)	-0.5 (19)	<b>0.79</b> (19)											
τop		-0.46 (19)										-0.44 (19)	0.67 (19)		-0.66 (19)										
τ					-0.44 (22)			-0.53 (24)	-0.55 (24)																
SLcl																									**
SLop																	<b>-0.83</b> (19)	***		*	*	*	*	*	*
SLr																	0.47 (19)		*	*	*	*	*	*	*
OL																	-0.46 (22)				***	***	***	***	**
GCL																	-0.43 (22)			0.74 (32)	***	***	***	***	**
GCW																				0.57 (32)	0.72 (32)	***	***	***	**
SS																				0.71 (32)	0.94 (32)	0.92 (32)	***	*	
SD																				-0.44 (22)	0.53 (22)	-0.48 (32)	-0.58 (32)	-0.39 (32)	*

## Bibliography

- Bacilieri R, Ducouso A, Kremer A (1995) Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of Northwest of France *Silvae Genetica* 44 : 1-9.
- Becker M, Lévy G. (1982) Le dépérissement du chêne en forêt de Tronçais : les causes écologiques. *Ann Sci For* 39:439–444.
- Bréda N, Cochard H, Dreyer E, Granier A (1993) Field comparison of transpiration, stomatal conductance and vulnerability to cavitation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* under water stress. *Ann For Sci* 50:571–582.
- Brendel O, Le Thiec D, Saintagne C, Kremer A, Guehl JM (2008) Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genet Genomes* 4:263–278.
- Cernusak L, Winter K, Aranda J, Turner B, Marshall J (2007) Transpiration efficiency of a tropical pioneer tree (*Ficus insipida*) in relation to soil fertility, *J Exp Bot* 58:3549–3566.
- Chevillat VS, Siegwolf RTW, Pepin S, Körner C (2005) Tissue-specific variation of  $\delta^{13}\text{C}$  in mature canopy trees in a temperate forest in central Europe. *Bas Appl Ecology* 6:519–534.
- Cochard H, Bréda N, Granier A, Aussenac G (1992) Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q pubescens* Willd, *Q robur* L). *Ann For Sci* 49:225–233.
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L (2010). An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Environ* 33:1419–1438
- Dawson TE, Burgess SSO, Tu KP, Oliveira RS, Santiago LS, Fisher JB, Simonin K a, Ambrose AR (2007) Night time transpiration in woody plants from contrasting ecosystems. *Tree Physiology* 27:561–575
- Dickson RE, Tomlinson PT (1996) Oak growth, development and carbon metabolism in response to water stress, *Ann For Sci* 53:81–196.
- Doheny-Adams T, Hunt L, Franks PJ, Beerling DJ, Gray JE (2012) Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:547–555.
- Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC (2014) The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 201:1205–1217.
- Duursma RA, (2015) Plantecophys - An R Package for Analysing and Modelling Leaf Gas Exchange Data. *PLoS ONE* 10, e0143346. doi:10.1371/journal.pone.0143346.
- Epron D, Dreyer (1993) E. Long- term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.] in a natural stand. *New Phytol* 125:381–389.
- Farquhar GD, Richards RA (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-

- use efficiency of wheat genotypes. *Func Plant Biol* 11:539–552.
- Franks PJ, Farquhar GD (2001) The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiol* 125:935–942.
- Franks PJ, Doheny- Adams T, Britton- Harper ZJ, Gray JE (2015) Increasing water- use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytol* 207:188–195.
- Gérardin T, Douthe C, Flexas J, Brendel O. (2018) Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environ Exp Bot* 153:188–197.
- Gieger T, Thomas FM (2002) Effects of defoliation and drought stress on biomass partitioning and water relations of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Basic Appl Ecol* 3:171–182.
- Gieger T, Thomas FM (2005) Differential response of two Central-European oak species to single and combined stress factors. *Trees* 19:607–618.
- Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P (1994) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiol* 14:707–724.
- Günthardt- Goerg MS, Kuster TM, Arend M, Vollenweider P (2013) Foliage response of young central European oaks to air warming, drought and soil type. *Plant Biology* 15:185–197.
- Hu B, Simon J, Rennenberg H (2013) Drought and air warming affect the species-specific levels of stress-related foliar metabolites of three oak species on acidic and calcareous soil, *Tree Physiology*, 33 : 489–504.
- Jones HG (1994) *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kaiser E, Morales A, Harbinson J (2018) Fluctuating light takes crop photosynthesis on a rollercoaster ride. *Plant Physiol* 176, 977–989.
- Kardiman R, Ræbild A (2018) Relationship between stomatal density, size and speed of opening in Sumatran rainforest species. *Tree Physiol* 38:696-705
- Kirschbaum MUF, Gross LJ, Percy RW (1988) Observed and modelled stomatal responses to dynamic light environments in the shade plant *Alocasia macrorrhiza*. *Plant Cell Environ* 11:111–121.
- Kleinschmit JRG, Bacilieri R, Kremer A, Roloff A (1995) Comparison of morphological and genetic traits of pedunculate oak (*Q. robur* L.) and sessile oak (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genetica*, 44:256–269.
- Kuster M, Schleppei P, Hu B, Schulin R, Günthardt-Goerg MS (2013) Nitrogen dynamics in oak model ecosystems subjected to air warming and drought on two different soils. *Plant Biol* 15:220–229.
- Landmann G, Becker M, Delatour C, Dreyer E, Dupouey JL (1993) Oak dieback in France: historical and recent records, possible causes, current investigations. In *Rundgespräche der*

- Kommission für Ökologie Bd 5 (ed. Bayerische Akademie der Wissenschaften), pp. 97-114. Verlag F. Pfeil, Munich.
- Lawson T, Blatt MR (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* 164:1556–1570.
- Lawson T, von Caemmerer S, Baroli I (2010) Photosynthesis and stomatal behavior. In Lüttge U, Beyschlag W, Büdel B, Francis D (eds) *Progress in botany*, vol 72. Springer, Berlin/Heidelberg, pp 265–304
- Lévy G, Becker M, Duhamel DA (1992) Comparison of the ecology of pedunculate and sessile oaks: radial growth in the Centre and Northwest of France. *For Ecol Manage* 55:51–63.
- Masle J, Gilmore SR, Farquhar G (2005) The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* 436: 866–870.
- Matthews JS, Vialet-Chabrand SR, Lawson T (2018) Acclimation to fluctuating light impacts the rapidity and diurnal rhythm of stomatal conductance. *Plant Physiol* 176:1939–1951.
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, Baker NR, Brendel O, Lawson T (2016) Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol* 211:1209–1220.
- Nardini A, Tyree, M T (1999) Root and shoot hydraulic conductance of seven *Quercus* species. *Ann For Sci* 56, 371–377.
- Ooba M, Takahashi H (2003) Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecol Modell.* 164:65–82.
- Osonubi O, Davies WJ (1981) Root growth and water relations of oak and birch seedlings. *Oecologia* 51(3) : 343-350.
- Pearcy RW, Schulze ED, Zimmermann R (2000) Measurement of transpiration and leaf conductance. In: Pearcy R.W., Ehleringer J.R., Mooney H.A., Rundel P.W. (eds) *Plant Physiological Ecology*. Springer, Dordrecht pp 137–160.
- Picon C, Guehl J, Aussenac G (1996) Growth dynamics, transpiration and water-use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO<sub>2</sub> and drought. *Ann For Sci* 53:431–446.
- Pflug EE, Siegwolf R, Buchmann N, Dobbertin M, Kuster TM, Günthardt-Goerg MS, Arend M (2015) Growth cessation uncouples isotopic signals in leaves and tree rings of drought-exposed oak trees. *Tree Physiol* 35:1095–1105.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Feuillat F, Bodénès C, Dreyer E (2001) Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell Environ* 24:861–868.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Dreyer E (2002) Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiol* 22:413–422.

- Qu M, Hamdani S, Li W, Wang S, Tang J, Chen Z, Song Q, Li M, Zhao H, Chang T (2016) Rapid stomatal response to fluctuating light: an under-explored mechanism to improve drought tolerance in rice. *Funct Plant Biol* 43:727–738.
- Rasheed-Depardieu C, Parelle J, Tatin-Froux F, Parent C, Capelli N (2015) Short-term response to waterlogging in *Quercus petraea* and *Quercus robur*: A study of the root hydraulic responses and the transcriptional pattern of aquaporins. *Plant Physiol Biochem* 97:323–330.
- Roussel M, Le Thiec D, Montpied P, Guehl JM, Brendel O. (2009) Diversity of water use efficiency in a *Quercus robur* family: contribution of related leaf traits. *Ann For Sci* 66:408-417.
- Roussel M, Dreyer E, Montpied P, Le-Provost G, Guehl JM, Brendel O (2008) The diversity of  $^{13}\text{C}$  isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family is associated with differences in intrinsic water use efficiency, transpiration efficiency, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* 60 : 2419–2431.
- Sanders TGM, Pitman R, Broadmeadow MSJ (2014) Species-specific climate response of oaks (*Quercus* spp.) under identical environmental conditions. *iforest* 7:61.
- Scotti-Saintagne C, Mariette S, Porth I, Goicoechea P, Barreneche T, Bodénès C, Burg K, Kremer A. (2004) Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics* 168:1615–1626.
- Shimazaki KI, Doi M, Assmann S, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58:219–247.
- Steinbrecher R, Contran N, Gugerli F, Schnitzler JP, Zimmer I, Menard T, Günthardt-Goerg MS (2013) Inter- and intra-specific variability in isoprene production and photosynthesis of Central European oak species. *Plant Biology* 15 :148-156.
- Thomas FM (2000) Growth and water relations of four deciduous tree species (*Fagus sylvatica* L., *Quercus petraea* [Matt.] Liebl., *Q. pubescens* Willd., *Sorbus aria* [L.] Cr.) occurring at central-European tree-line sites on shallow calcareous soils: physiological reactions of seedlings to severe drought, *Flora* 195.
- Thomas FM, Blank R, Hartmann G (2002) Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For Pathol* 32:277–307.
- Thomas FM, Gausling T (2000) Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Ann For Sci* 57:325–333.
- Tyree M, Cochard H (1996) Summer and winter embolism in oak: impact on water relations. *Ann For Sci* 53:173–180.
- Van Hees A (1997) Growth and morphology of pedunculate oak (*Quercus robur* L) and beech (*Fagus sylvatica* L) seedlings in relation to shading and drought. *Ann For Sci* 54:9–18.
- Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O (2013) Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Environ* 36:1529–1546.

- Violet-Chabrand SRM, Matthews JSA, McAusland L, Blatt MR, Griffiths H, Lawson T (2017) Temporal dynamics of stomatal behavior: modeling and implications for photosynthesis and water use. *Plant Physiol* 174:603–613.
- Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G (2011) Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytol* 192:640–652.
- Wagner P, Dreyer E (1997) Interactive effects of waterlogging and irradiance on the photosynthetic performance of seedlings from three oak species displaying different sensitivities (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. rubra*). *Ann For Sci* 54:409–429.
- Welander N, Ottosson B (2000) The influence of low light, drought and fertilization on transpiration and growth in young seedlings of *Quercus robur* L. *For Ecol Manage* 127:139–151.
- Zeppel M, Tissue D, Taylor D, Macinnis-Ng C, Eamus D (2010) Rates of nocturnal transpiration in two evergreen temperate woodland species with differing water-use strategies. *Tree Physiology* 30:988–1000.



## Article 3 : Deuxième étude Comparative entre *Q.robur* et *Q.petraea* (H2Oak 2017)

**Title: Different Impact of a progressive drought on growth rate and gas exchange between *Quercus robur* and *Quercus petraea***

Authors: Théo Gerardin<sup>1</sup>, Oliver Brendel<sup>1,2</sup>

Adresses:

<sup>1</sup> Université de Lorraine, AgroParisTech, INRA, Silva, F-54000 Nancy, France

<sup>3</sup> Corresponding author postal address: Oliver BRENDEL, INRA, UMR Silva, F-542802 CHAMPENOUX, France

Tel : 0033.383394100

ORCID :

Théo P.H. Gerardin: <https://orcid.org/0000-0002-5427-6470>

Oliver Brendel: <https://orcid.org/0000-0003-3252-0273>

Emails: tgerardin.phd@gmail.com, [oliver.brendel@inra.fr](mailto:oliver.brendel@inra.fr)

**Keywords: drought, dynamic response, irradiance, stomatal conductance, growth, oak**

### Highlights

-Different irradiance closing steps induce similar dynamic responses regardless of the stomatal amplitude

-*Q. petraea* and *Q. robur* seedlings display similar growth and gas exchanges rates under progressive drought although *Q. robur* tended to be sensitive to drought stress earlier.

## **Abstract**

Recent studies have made major progress in describing stomatal dynamics in terms of speed and amplitude of response. Most of past studies described stomatal dynamics as a stomatal conductance variation over a given period of time which is highly dependent of the response amplitude and therefore, the environmental factor inducing stomatal movement. Gas exchange and growth were followed for *Q.petraea* and *Q.robur* during a progressive drought. *Q.robur* had a slightly earlier height growth phenology and was able to maintain diameter growth under medium drought, and even though an earlier stomatal response to progressive drought was observed compared to *Q.petraea*, *robur* was overall able to maintain higher stomatal conductance, assimilation rate, however resulting in a similar intrinsic water use efficiency. Additionally in this study, we measured stomatal dynamics during both opening and closing sequences in response to several different changes in irradiance in two related oaks species (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) firstly, under non-limited conditions, then, when oaks seedlings were submitted to an intermediate drought stress. We assessed the temporal response to irradiance changing steps using a dynamic model providing parameters describing the response. Both species displayed similar stomatal behaviours in term of irradiance induced dynamic response, characterized by faster stomatal movements under drought stress and comparable asymmetrical responses regardless of the treatments. Surprisingly two irradiance closing steps of different intensity led to similar kinetics despite divergent stomatal conductance amplitudes induced.

## **Introduction**

*Quercus robur* and *Quercus petraea* are two sympatric broad-leaved tree species able to hybridize with each other and displaying different ecological behaviours despite a close genetic proximity (Kremer et al., 1993). Adult *Q.robur* trees have been found less resistant to drought episodes than *Q.petraea* (Becker and Levy, 1982; Landmann et al., 1993) and are often distributed on soils with more water as well as nutrient supplies (Levy et al., 1992; Bréda et al., 1993). In addition, higher death rates were reported in *Q.robur* seedlings under severe drought than in *Q.petraea* (Vivin et al., 1993). Soil water deficit is therefore a major environmental constraint to assess. Granier et al., (1999) observed that forest trees including *Q.petraea* experienced a linear loss of canopy transpiration under increasing water stress. Based on these observations Granier et al., (2000) suggested that under 0.4 relative extractible water (REW) most forest trees started experiencing drought stress.

Drought has been found to reduce height and diameter growth in adult *Q.robur* trees stronger and earlier than in *Q.petraea* (Becker 1982; Fonti et al 2013; Friedrich et al., 2008). However, it is less clear under non limited conditions as *Q.robur* has been reported to display higher height growth rates (Ponton et al. 2001,2002; Dobrovolny et al.,2016; Gerard et al., 2009; Parent et al., 2011) and contrasting results were also observed with similar diameter growth rates between the two species (Gieger et al., 2005; Collet et al., 2017) or even higher radial growth in *Q.petraea* (Becker 1986; Lévy et al.,1992). Moreover, Jensen et al. (2000), put in evidence a strong geographical cline for growth in *Q. robur* and *Q.petraea* associated with considerable regional variations that might partly explain the contrasting results observed in literature.

Only a few comparative studies of water use efficiency between the two species have been conducted. In these, *Q.petraea* has been reported with higher intrinsic water use efficiency at the leaf level than *Q.robur* (Epron and Dreyer 1993; Ponton et al., 2001,2002) but contrasting results were also observed, *Q.robur* displaying higher water use efficiency (Thomas et al.,2008) or both species showing no differences (Thomas et al., 2000; Hu et al., 2013). However, the fact that, different water use efficiency estimators were used as well as various experimental designs deployed prevents to draw any firm conclusions about the observed differences. Furthermore, under both control and drought stressed conditions *Q.robur* seedlings were depicted with higher transpiration efficiency than *Q.petraea* Gerardin et al., 2019 (unpublished yet)

Recently, seedlings of the two species from close geographic provenances were reported with comparable stomatal features such as stomatal size and stomatal density, as well as similar stomatal dynamic responses to light under both non-limited and water stressed conditions (Gerardin et al., 2019 (2015)).

### ***Response to dynamic light***

Irradiance is considered as the main driver of photosynthesis (Shimazaki et al., 2007). Therefore, through the years, steady-state responses to irradiance have been extensively studied. However, such steady-states conditions are unlikely to occur since non-fluctuant conditions are rarely found in nature (Jones, 2013, Vialet-chabrand et al., 2017) as across the day, cloud cover, sun course as well as shading provided by overlapping leaves and neighbouring plants induce numerous fluctuations in irradiance intensity and spectral quality (Way and Pearcy, 2012).

Thus, Incident irradiance on plants leaves is a highly fluctuating environmental factor (i.e. in understory species), causing both dynamic changes in photosynthesis (Kaizer et al., 2018) and stomatal movements (Lawson et al., 2010). The stomatal movements induced by environmental changes translate into temporal processes taking from minutes to hours to reach new steady-states depending on the species (Vico et al., 2011; McAusland et al., 2016) and the magnitude of the irradiance change (Lawson et al 2012; Lawson & Blatt, 2014). The nearly instantaneous photosynthetic response leads to highly uncoupled responses between assimilation and stomatal conductance, which, in turn leads to strong dynamic variations of their balance, known as intrinsic water use efficiency (McAusland et al., 2016). Differences in speed of stomatal movements in response to irradiance has been found among species (Ooba and Takahasi, 2003; Franks and Farquhar, 2007; Drake et al., 2013; Vialet-Charbrand et al., 2013; McAusland et al., 2016) as well as plant functional types (Vico et al., 2011). Moreover, growth conditions impacts were also put in evidence, drier conditions being associated with faster stomatal responses to irradiance (Vico et al., 2011; Qu et al., 2016; Gerardin et al., 2018). However contrasting results were also reported in poplar trees (Durand et al., 2019). Irradiance growth conditions were also associated with altered stomatal responses (Kardminan and Raebild, 2017; Gerardin et al., 2018; Matthews et al., 2018). To describe stomatal behaviour, numerous steady-state models of  $g_s$  have been developed (reviewed in Damour et al., 2010) and recently dynamic models have been proposed as reliable alternatives (reviewed in Vialet-Chabrand et al., 2017). Many of the early models initially estimated  $g_s$  response to irradiance as a time for  $g_s$  to reach another steady state or a given percentage of the global response (Wood and Turner, 1971; Grantz and Zeiger, 1986, Dumont et al., 2013). Another approach was later proposed estimating the rapidity of response by using a regression fit to the linear part of  $g_s$  response, hence, providing an estimate of the maximum rate of  $g_s$  response (Tinoco-Ojanguren and Pearcy, 1992; Naumburg et al., 2001, Drake et al., 2013). Thus, the temporal response of  $g_s$  has been extensively studied in terms of amplitudes and rapidity. However, Vialet-Chabrand et al. (2017) suggested that these approaches could be biased for being too dependent of steady states  $g_s$  estimations as well as the linearity of the initial  $g_s$  response. Therefore, sigmoidal or exponential dynamic models were proposed (Vialet-chabrand et al., 2013), allowing a fine characterization of both

linear and nonlinear parts of  $g_s$  response curves. Several studies have been using such models to characterise the stomatal response to changes in irradiance (McAusland et al., 2016; Gerardin et al., 2018; Gerardin et al., 2019) and VPD (Durand et al., 2019). However, to our knowledge, these publications have not investigated how the different kinetics parameters depends on different applied irradiance step variations. Gerardin et al., (2019) recently showed that for an irradiance step of 400 PPFD, *Q. robur* and *Q. petraea* did not differ in their dynamic of stomatal response under both non-limited and water stressed conditions.

### **Objectives**

The description of *Q. robur* and *Q. petraea* ecology is well documented for adult trees; however, it subsists a gap of knowledge about seedlings and the ecophysiological differences between the two species to fully assess the requirements of their respective ecological niches. In addition, contradictory results were reported. Moreover, providing empirical data about the dynamic stomatal response to irradiance, its asymmetry as well as plasticity to water-stressed conditions might provide new insights to understand the underlying functional and physiological basis involved in drought tolerance and ecology of species.

- i) Characterize the impact of a progressive, controlled drought on growth, gas exchanges and photosynthetic capacity of *Quercus petraea* and *Quercus robur* seedlings
- ii) Study the impact of a medium drought on the dynamic of stomatal response of both species to different step changes in irradiance

## **Material and methods**

### **Plant material and Experimental design**

The experiment was carried out on greenhouse grown *Q. robur* and *Q. petraea* seedlings at the National Institut of Agronomical Research (INRA), Champenoux, France (48°45'8"N, 6°20'28"E, 259m). Acorns used for this experiment were collected in autumn 2015 from mature trees of *Q. robur* and *Q. petraea* originating from 4 pure stands in Northern and North-Eastern France chosen based on water availability gradients in order to represent intra-specific variability. The acorns were initially sown in spring 2016 in 1L pots filled with a mixture of forest soil mixed with pine barks/flax loam and sand 8/2 (v/v), and grown in a shaded common garden. In spring 2017, 12 seedlings originating from 2 different provenances per species were transferred in 6L pots containing a sand, peat and silty-argillaceous forest soil mixture 5/3/2 (v/v/v) inside a greenhouse equipped with a robotic system allowing automatized plant weighting and watering as well as a precise volumetric soil water content (VH for volumetric humidity) monitoring in which they stayed during the whole experiment (for six months from April to August).

Conveyors moved the plants to a weighing and watering station 1-3 times per day during the whole experiment. Each pot was watered to reach an individual target weight calibrated against VH. For each plant, VH was measured regularly on a weekly basis and after a drought level change every day for 3 days. The plant-soil-pot system was weighted directly after VH determination. At the start of the experiment all pots were watered manually to field capacity (~35% of VH). Over the experiment a correlation was established between VH and mass for each pot individually. Allometric correlations based on diameter were used to compensate for plant biomass growth determined previously (Gerardin et al., 2019). The plants were positioned alternatively by species in the greenhouse and first submitted to the same non-limiting growing conditions: natural growth light and well fertilized and irrigated at 70% of the field capacity to avoid water logging until the beginning of the drought. Two *Q. petraea* seedlings died during the greenhouse acclimation period, leaving 12 and 10 plants of *Q. robur* and *Q. petraea*, respectively.

### **Measurement of soil water status and drought establishment**

The volumetric soil water content was measured by time domain reflection (TRIME-TDR; IMKO GmbH, Ettlingen, DE) in each pot at about 10cm depth on a regular basis of 1 measurement per week throughout the experiment to adjust the watering adequately to the aimed drought levels. The air temperature inside the greenhouse followed the environmental variations while never exceeding 25°C due to a cooling system in the facility. The one-year old plants acclimated under well irrigated and

fertilized conditions for 1 months with a soil relative extractable water (REW) >70% and Nitrocote 15g per pot.

The relative extractable water was calculated as  $REW = ((HV - Fp) / (Fc - Fp)) * 100$  where HV is the volumetric soil water content, Fp is the HV of wilting point assumed to be at 4% and Fc is the HV at field capacity of each pot/plant .

Then all the plants were progressively submitted to increasing drought levels by stabilising several steps spread over a two months period (from 70% to 25%REW passing by 60-40-35-30% REW levels). The first low REW step was established based on the general drought response threshold detected by Granier (1990) in forest trees species.

#### -Growth monitoring

The height (H) and the diameter (D) of the plants were measured on a regular basis (every two to three days) throughout the whole experiment. The monitoring started in late April (115<sup>th</sup> DoY) and finished in mid-July (205<sup>th</sup> DoY). The height and diameter growth rates (HGR and DGR, respectively) were also calculated from date to date as:

$$HGR = (H_{+1} - H) / (t_{+1} - t)$$

$$DGR = (D_{+1} - D) / (t_{+1} - t)$$

With H; the height at a given date, H+1 the height at the following date, D; the diameter at a given date, D+1; the diameter at the following date, t; the DoY at a given date, and t+1; DoY at the following date. Additionally, the height and diameter growth rates (HGR' and DGR', respectively) were calculated over the non-stressed period (including the 70 and 60% REW steps over 39 days) as well as over the dry period (including the 40, 35 and 30% REW steps over 37 days) and used in the lower and upper correlations matrix, respectively (Table 3).

#### ***Gas exchange monitoring***

The gas exchange monitoring was performed using a portable photosynthesis system (LI-COR 6200; LI-COR, Lincoln, NE, USA). Measurements of net CO<sub>2</sub> assimilation rate (A<sub>n</sub>), stomatal conductance for water vapour (g<sub>s</sub>) were made on a regular basis at each REW level (70-60-40-35-30-25% REW) throughout the whole experiment. For each plant, the measurements were repeated on the same fully sunlit third-flush leaf grown under non-stressed conditions. The monitoring started in late May (143<sup>th</sup> DoY) and finished in mid-July (198<sup>th</sup> DoY). Overall 25 measurements were done per plant.

#### ***Stomatal dynamics under light change***

Two campaigns of measurements were performed on the plants. The first under well irrigated conditions (70%REW level) and the second when plants were submitted to a moderate drought (35% REW level, below the assumed water stressing threshold). Each campaign lasted 1-2weeks and both were spaced from each other by one month. For each plant, all the measurements (well irrigated and drought) were performed on the same third-flush, mature, fully expanded leaf grown under non-stressed conditions.

Dynamic gas exchange was measured using a portable photosynthesis system (LI-COR 6400; LI-COR, Lincoln, NE, USA) equipped with a 2cm<sup>2</sup> leaf chamber (Li-6400-40). Measured were: net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ), stomatal conductance for water vapour ( $g_s$ ). All measurements were carried out between 10:00 and 19:00 h (Central European summer time). The environmental parameters inside the chamber were kept constant during the acclimation phase with [CO<sub>2</sub>] entering the chamber of 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , block temperature of 25°C, air flow of 300  $\mu\text{mol min}^{-1}$  and a PPFD of 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (red/blue irradiance 90/10%, respectively) until the leaf reached a steady-state of  $g_s$ . Then a measurement cycle consisted of three step-changes in irradiance reaching another steady state: first A) a single step-change to intermediate irradiance (from 1200 to 400  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD) inducing a stomatal closure, then B) a single step-change back to the original high irradiance (400 to 1200  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), inducing a stomatal reopening and C) a third single step-change to low irradiance (1200 to 100  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The stomata were considered in steady-state when  $g_s$  did not vary more than  $\sim 0.005 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  during 10min. Data during the response curves were logged every 60sec. “Steady-state” data as mentioned through the manuscript were calculated for each light level as the mean of 5 points after stabilization of  $g_s$  (SD  $\sim 0.001 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The obtained response curves were adjusted using the following model.

### ***Dynamic Model description***

The stomatal responses of the irradiance curves were adjusted using a sigmoidal model based on Vialet-Chabrand et al., (2013) allowing the estimation of dynamic parameters describing the temporal response of the stomata to an environmental change. The following equation was used:

$$g_s = g_0 + (G - g_0) * \exp(\exp(\lambda - t/\tau))$$

Where  $g_s$  is the fitted stomatal conductance,  $g_0$  is the starting value of stomatal conductance (first steady-state obtained after the initial plant acclimation to the environmental conditions inside the Licor chamber right before the irradiance change,  $g_s$  sat or  $g_s$  low),  $t$  is the time,  $G$  is the ending value of stomatal conductance (second steady-state reached after the full stomatal response to the irradiance change,  $g_s$  sat or  $g_s$  low),  $\lambda$  is a time constant describing the lag time of the stomatal response corresponding to the time needed to reach the inflection point of the curve from the moment of the



irradiance change, and  $\tau$  another time constant describing the response through the steepness of the curve (see Gerardin et al., 2018 for a visual representation of the parameters). From these parameters, the maximum slope (SL) as an estimator of the speed of the stomatal response, has been calculated as:  $SL = (1/\tau) * (G - g_0) / \exp$

Where  $|(G - g_0)|$  represent the stomatal amplitude of the response ( $\delta g_s$ ). Increasing values of  $\tau$  will affect the curvature of the stomatal response, the smaller a  $\tau$  value is, the stronger the curvature and the higher SL will be, so the more rapidly  $g_s$  will increase/decrease (illustrated in Gerardin et al 2018). The curves were fitted by the model using the function “nlminb” of R (TEAM RC, 2015). The adjustment of the sigmoidal model included five data points during the steady state before changing the irradiance thus delaying the time to reach the inflection of the curves and therefore increasing the values of the lag time  $\lambda$ . These values were then corrected by subtracting the added time period to accurately describe the time needed from the light change. As the model adjustment is sensitive to the starting point values, including five steady state points made the starting steady state  $g_s$  more robust and decreases the dependency of the adjustment on measurement noise. The assimilation, conductance and water use efficiency at saturated and low light steady values are mentioned throughout the manuscript as “sat” and “low” respectively.

Additionally, the symmetry of response between the closing (A) and opening (B) sequences has been calculated for each dynamic parameter ( $\tau_r$ ,  $\lambda_r$  and  $SL_r$ ) as the ratio closing/opening.

### ***A/Ci curves***

Similarly to the stomatal kinetic, two campaigns of measurements were performed. First under well irrigated conditions (70%REW level) and the second when plants were submitted to a moderate drought (35% REW level). Gas exchange was measured using a portable photosynthesis system (LI-COR 6400; LI-COR, Lincoln, NE, USA) equipped with a 2cm<sup>2</sup> leaf chamber. All A-Ci curves were carried out between 09:00 and 18:00 h (Central European summer time). The environmental parameters inside the chamber were kept constant during the acclimation phase at 400 ppm CO<sub>2</sub>, with temperature regulated at 25°C, flow at 300 and a photonflux density at 1000  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . All the gas exchange measurements were performed on the same third-flush, mature, fully expanded leaf grown under non-stressed conditions used for kinetics measurements. ([CO<sub>2</sub>] sequence: 400-350-300-200-100-0-400-450-600-700-900-1200-1500-1800) “-Aci” suffix added to gaz exchange parameters as mentioned throughout the manuscript refers to the gaz exchange measurements extracted from A-ci curves after the initial step. Aci curves were fitted using the R package “plantecophys” (R core team, 2015) based on the Farquhar-von Caemmerer-Berry model of leaf photosynthesis: FvCB model (Farquhar et al., 1980).

### ***Statistical analysis***

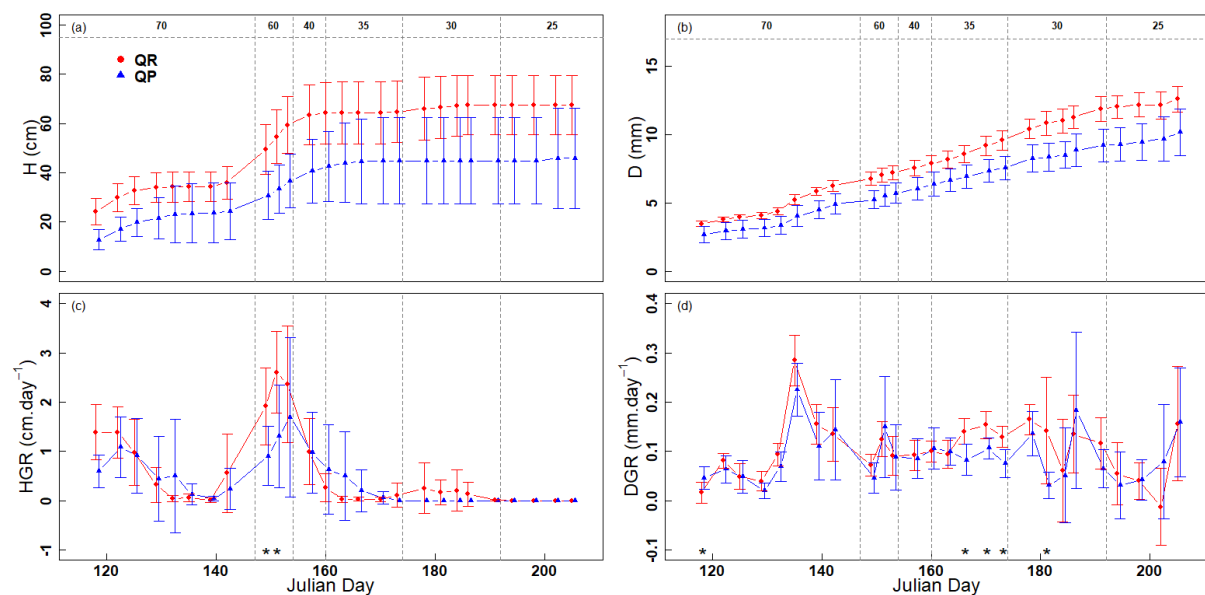
All statistical analyses were performed with R (R Core Team (2015)). Effects were analyzed as a two or three factorial design by analysis of variance (ANOVA, Type III error). Significant differences were considered at  $P < 0.05$ . With the following models used: Table 1,2,3 : Species\*Treatment\*Lightstep Type III /Table 4,5 : Species\*Treatment Type III. The interactions were only shown when found significant

When the ANOVA was found significant, a Post-Hoc test using the Tukey-HSD test (package R, "agricolae") was used to define inter-groups differences. Correlations were estimated using the Pearson method and p-values were adjusted for multiple comparisons using the "p.adjust" function with the false discovery rate method "FDR".

## Results

### Growth monitoring (Fig 1)

From the beginning of the measurement to the end of the monitoring QR displayed higher H (Fig1a) than QP. During the whole experiment the plants followed a very similar growing pattern alternating growing and stabilized periods, from day 118 to 129 the height increased in both species: from  $\sim 24.3\text{cm}$  to  $\sim 34.1\text{cm}$  and  $\sim 12.8$  to  $\sim 21.7\text{cm}$  in QR and QP respectively, QR starting at higher growing rates compared to QP:  $1.4$  and  $0.6\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$  respectively (Fig1c). Then the plant height stabilized for about 10 days after which the plants of both species started the second leaf growth flush, almost doubling in height from day 142 to day 160 slightly earlier in QR and slightly delayed to day 170 in QP: from  $\sim 36.1$  to  $\sim 64.2\text{cm}$  and  $\sim 24.4$  to  $\sim 44.8\text{cm}$  in QR and QP respectively. During this growth peak, HGR was significantly higher in QR, with a maximum rate at  $\sim 2.6\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$  at day 151 while QP reached  $\sim 1.7\text{cm}\cdot\text{day}^{-1}$  2 days later (Fig 1c), increasing the height gap between both species. Then the height remained stable in both species until the end of the experiment at day 205 at the exception of a small increase of HGR around day 180.

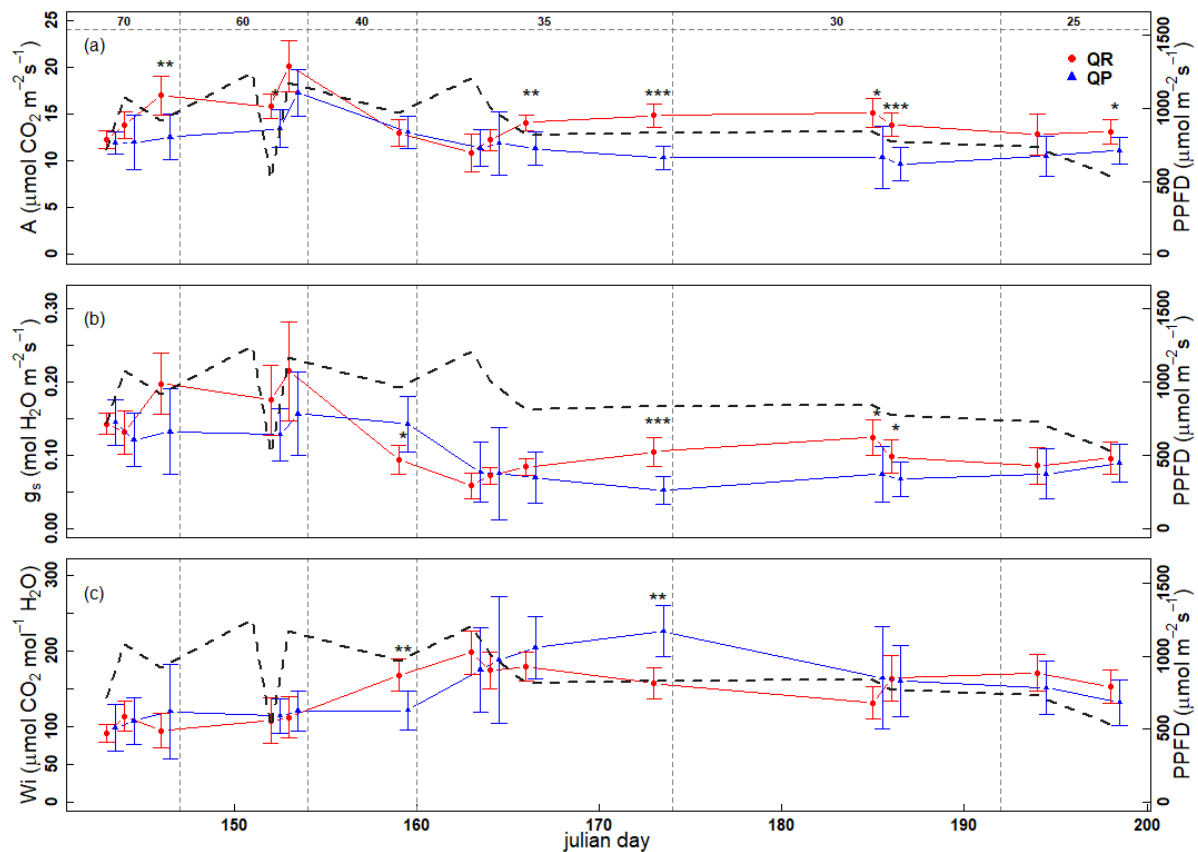


**Figure 1 :** The height (a,c) and diameter (b,d) growth monitoring. With red dots for QR and blue triangles for QP, the PPFd in black dotted line and the %REW step changes in vertical dotted line. The differences of growth rates between species at a given date from a t-test are presented as : P values : “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*\*” for  $P < 0.05$ . To avoid overlapping values and improve the visibility, QP monitoring has been shifted by a day. The relative growth rates are presented in Annexe II

As for H, both species displayed very similar D growing pattern starting and finishing with higher values in QR than QP. Unlike H, the diameter grew constantly during the experiment displaying accelerated growth periods (Fig 1d). Overall, the plants grew in diameter from  $3.5$  to  $12.6\text{mm}$  and  $2.7$  to  $10.2\text{mm}$  in QR and QP respectively (Fig 1b). Both species displayed similar starting DGR values from day 118 to

129, then the DGR rapidly increased in both species from 0.04 to 0.28mm.day<sup>-1</sup> and 0.02 to 0.22mm.day<sup>-1</sup> in QR and QP respectively at day 135(Fig 1d). This coincided with the end of the resting phase for height growth, just before the new flush. Then, both species followed the same growing pattern, the DGR slightly decreased and fluctuated from 0.5 to 1.5mm.day<sup>-1</sup> for the rest of the experiment while QR displayed significantly higher DGR between days 166-181.

### Gaz exchange monitoring (Fig 2)



**Figure 2** : The monitoring of the net assimilation carbon rate : A (a), the stomatal conductance  $g_s$  : (b) and the water use efficiency  $W_i$  : (c) through the experiment (mean  $\pm$  SD). With red dots for QR and blue triangles for QP, the PPFD in black dotted line and the %REW step changes in vertical dotted line. The differences between species at given date from a t-test are presented as : P values : “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*\*” for  $P < 0.05$ . To avoid overlapping values and improve the visibility, QP monitoring has been shifted by a day. See Annexe 1 for Tuckey-HSD results.

At the beginning of the experiment when the plants were submitted to non-stressed conditions (% REW 70 and 60), both species displayed similar  $A_n$  values  $\sim 12.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Then,  $A_n$  slightly increased in both species QR displaying significantly higher values than QP at days 144 and 152. After that,  $A_n$  decreased again to similar values  $\sim 13.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in both species for the 40%rew step and  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the beginning of the 35%rew step. The assimilation rate remained at this level for the rest of the

experiment for QP, while it slightly re-increased and stabilized in QR resulting in significantly higher  $A_n$  values  $\sim 14 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  till the experiment end at day 198 (Fig 2a).

The stomatal conductance  $g_s$  followed a similar starting pattern, both species displaying similar values under non-stressed conditions, then  $g_s$  dropped significantly in QR during the 40% REW step while it remained constant in QP (Fig 2b). For QP the  $g_s$  values started to drop at the first measurement during the 35% REW level, reaching similar values as QP. Then the stomatal conductance remained relatively constant till the end of the experiment in QP while it re-increased similarly to  $A_n$  in QR, resulting in significantly higher  $g_s$  between days 173-186.

The similar  $A_n$  and  $g_s$  values resulted in similar  $W_i \sim 110 \mu\text{mol mol}^{-1}$  in both species under non-stressed conditions (Fig 2c). Then  $W_i$  increased to  $\sim 168 \mu\text{mol mol}^{-1}$  concomitantly to the  $g_s$  drop in QR at the 40% REW step while it remains stable in QP. The  $W_i$  continued to increase in QR at the beginning of 35%rew step and fluctuated around a relatively constant level for the rest of the experiment While  $W_i$  values in QP started to increase at the beginning and reached their highest values at the end of the of the 35% REW step concomitantly to the lowest  $g_s$  values resulting in significantly higher  $W_i$  in QP than QR. Then QP  $W_i$  values slightly decreased to similar values than QR until the end of the monitoring (Fig 2c). See annexe I for the Tuckey-HSD table by days and species.

### ***Dynamic response to irradiance***

Both oak species displayed similar dynamic response for all three parameters ( $\tau$ ,  $\lambda$  and SL) during both wet and drought campaigns (Table 1). The responses were significantly faster under drought for all three parameters sequences (lower values for  $\tau$  and  $\lambda$  and higher SL values). Additionally, in the two campaigns,  $\tau$  and  $\lambda$  of both closing sequences (A and C) were not significantly different whereas SL values showed a significant difference between A and C sequences. All three parameters were significantly different between the closing and opening sequences of the same irradiance step (A and B, respectively) with slower stomatal movements during opening. This can be seen in the  $\tau_r$  and  $\lambda_r$  values, which were inferior to 1, whereas values of SL<sub>r</sub> were superior to 1. This asymmetry was not significantly affected by the drought treatment.

**Table 1** : Dynamic parameters from the two campaigns of irradiance response curves (means +SE), with tau the response time, L : the lag time and SL ; the maximal slope. With uppercase letters referring to the light step (see Fig 1) and the lower case letters presenting the results of Post-hoc Tukey test when STEP effect was found significant. As no interactions between factors were found interactions lines do not figure in the table. ( $n = 10-12$  observations per group and Anova P values: “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$ ; ”\*\*\*” for  $P < 0.01$ , ”\*\*” for  $P < 0.05$  and for  $0.05 > P > 0.1$ , “.”)

species	step			Wet	Drought
QP	A	1		287 ± 57ab	86 ± 7bc
QR	A			159 ± 29abc	86 ± 9c
QP	B	2	τ	359 ± 102a	126 ± 21abc
QR	B		(sec)	320 ± 103a	168 ± 22abc
QP	C	1		176 ± 29abc	63 ± 6c
QR	C			143 ± 28abc	78 ± 8c
SP	.				
STEP	***				
TTMT	***				
SP*T	.				
QP	A	1		243 ± 40abc	121 ± 22c
QR	A			231 ± 23bc	163 ± 15c
QP	B	2	λ	425 ± 132ab	203 ± 19bc
QR	B		(sec)	435 ± 90a	210 ± 22bc
QP	C	1		202 ± 29bc	129 ± 11c
QR	C			225 ± 25bc	148 ± 14c
SP					
STEP	***				
TTMT	***				
SP*T					
QP	A	2		1.15 ± 0.38b	1.59 ± 0.36ab
QR	A			2.04 ± 0.4ab	1.67 ± 0.21ab
QP	B	1	SL	0.88 ± 0.36b	1.43 ± 0.46ab
QR	B		(m <sup>-2</sup> s <sup>-2</sup> )	1.00 ± 0.25b	0.89 ± 0.17b
QP	C	3		2.35 ± 0.64ab	3.24 ± 0.58a
QR	C			3.3 ± 0.7a	3 ± 0.31a
SP					
STEP	***				
T					

### ***Steady state measurements and amplitudes of response***

Both species displayed similar  $g_s$  values at saturating light steady-states from each light change curves  $\sim 0.11 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , overall  $g_s$  decreased significantly under drought conditions. At low light steady state, no difference between species was observable  $g_s$  stabilized at  $\sim 0.067$  for A and B sequences during the control while it stabilized at significantly lower values for C  $\sim 0.03$ . The same pattern between A, B and C was observable during the drought campaign (Table 2).

The absolute amplitude of stomatal response  $\delta g_s$  was significantly reduced under drought conditions for all three sequences. In additions,  $\delta g_s$  was significantly higher during the C sequence than the two others. The same variations were observable in  $\Delta g_s$  with the highest relative amplitude in C  $\sim 70\%$ , but the responses were similar during both campaigns (Table 2).

$A_n$  followed a similar trend to  $g_s$  during the wet campaign, at saturating light there was still no difference between light sequences but this time QR displayed significantly higher values than QP. Similarly to  $g_s$ , the assimilation values were significantly reduced under drought conditions, QR still displaying higher rates than QP. At low light steady states, A and B had similar values slightly higher in QR and similarly to  $g_s$ , the lowest  $A_n$  were obtain after the C sequence, reaching  $\sim 2.4$  and  $\sim 2.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  under wet and drought conditions respectively. The differences between the Wet and drought campaigns were still significant, wet reduced at low light steady state (Table 2).

The absolute and relative amplitude of response of assimilation,  $\delta A_n$  and  $\Delta A_n$ , respectively, followed the same pattern than  $\delta g_s$  and  $\Delta g_s$ , the highest amplitude of response being observed in the C sequences  $\sim 80\%$ ,  $\delta A_n$  being reduced under drought and both campaigns displaying similar  $\Delta A_n$  (Table 3).

Regarding  $W_i$  both species displayed similar values at high steady state during both campaign,  $W_i$  being significantly higher under drought conditions. At low light steady state there was still no differences between species and  $W_i$  values were still slightly higher under drought conditions, however this time  $W_i$  was significantly lower in C than the two other sequences during both campaigns following the higher  $\Delta A_n$  than  $\Delta g_s$  (Table 3).

**Table 2** : Steady state gaz exchange measurements from each campaign (means + SE), with  $A_n$  the CO<sub>2</sub> net assimilation rate,  $g_s$  the stomatal conductance and  $W_i$  the intrinsic water use efficiency at saturating light (-sat) and low light (-low). uppercase letters refer to the light step and the lower case letters present the results of a Post-hoc Tuckey test. ( $n = 10-12$  observations per group and P values: “\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; ”\*\*” for  $P < 0.01$ , ”\*” for  $P < 0.05$  and , “. ” for  $0.05 > P > 0.1$ ).

		Wet	Drought			Wet	Drought
QP	A	0.1 ± 0.01a	0.08 ± 0.01a	QP	A	0.053 ± 0.01abc	0.047 ± 0.01abcd
QR	A	0.13 ± 0.02a	0.09 ± 0.01a	QR	A	0.069 ± 0.01a	0.049 ± 0abcd
QP	B	$g_s$ -sat 0.11 ± 0.02a	0.09 ± 0.01a	QP	B	$g_s$ -low 0.066 ± 0.01ab	0.050 ± 0.01abcd
QR	B	0.12 ± 0.01a	0.09 ± 0.01a	QR	B	0.069 ± 0.01a	0.051 ± 0abc
QP	C	0.11 ± 0.02a	0.07 ± 0.01a	QP	C	0.031 ± 0bcd	0.021 ± 0d
QR	C	0.12 ± 0.01a	0.08 ± 0.01a	QR	C	0.027 ± 0cd	0.023 ± 0cd
SP		.	.	SP		.	.
STEP		.	.	STEP	***	.	.
TTMT	***	.	.	TTMT	***	.	.
QP	A	10.7 ± 0.82ab	9.48 ± 1.14ab	QP	A	5.92 ± 0.91a	6.18 ± 0.88a
QR	A	13.32 ± 0.84a	10.5 ± 0.69ab	QR	A	8.04 ± 0.85a	6.73 ± 0.46a
QP	B	$A_n$ -sat 10.72 ± 0.87ab	9.87 ± 1.12ab	QP	B	$A_n$ -low 7.42 ± 0.79a	6.68 ± 0.86a
QR	B	12.62 ± 0.72ab	10.28 ± 0.8ab	QR	B	8.31 ± 0.48a	6.76 ± 0.5a
QP	C	11.31 ± 0.93ab	8.5 ± 0.69b	QP	C	2.44 ± 0.31b	2.09 ± 0.32b
QR	C	12.49 ± 0.73ab	10.12 ± 0.74ab	QR	C	2.35 ± 0.2b	2.16 ± 0.27b
SP	**	.	.	SP	*	.	.
STEP		.	.	STEP	***	.	.
TTMT	***	.	.	TTMT	*	.	.
QP	A	111.66 ± 7.98a	125.19 ± 6.52a	QP	A	117.89 ± 7.13abc	131.11 ± 6.2ab
QR	A	110.24 ± 8.25a	128.24 ± 7.2a	QR	A	124.66 ± 6.25ab	140.63 ± 6.95a
QP	B	$W_i$ -sat 108.58 ± 12.95a	116.57 ± 5.38a	QP	B	$W_i$ -low 119.74 ± 9.69abc	131.09 ± 6.45ab
QR	B	115.89 ± 8.45a	123.63 ± 6.81a	QR	B	126.06 ± 6.24ab	135.45 ± 6.51a
QP	C	111.51 ± 11.26a	121.59 ± 4.56a	QP	C	79.51 ± 3.99d	99.03 ± 12.3bcd
QR	C	110.59 ± 9.23a	126.48 ± 8a	QR	C	88.7 ± 5.9cd	91.97 ± 7.44cd
SP		.	.	SP		.	.
STEP		.	.	STEP	***	.	.
TTMT	**	.	.	TTMT	*	.	.



**Table 3** : Amplitudes of responses to irradiance changes (mean +SE) with  $\delta$  and  $\Delta$  the absolute and relative amplitudes, respectively). uppercase letters refer to the light step and the lower case letters present the results of a Post-hoc Tuckey test. ( $n = 10-12$  observations per group and P values: “\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; ”\*\*” for  $P < 0.01$ , ”\*” for  $P < 0.05$  and for  $0.05 > P < 0.1$ , “.”).

species	step		Wet	Drought
QP	A		4,78 ± 0,66cd	3,3 ± 0,37d
QR	A		5,27 ± 0,44cd	3,78 ± 0,32d
QP	B	$\delta An$	3,3 ± 0,43d	3,19 ± 0,45d
QR	B		4,31 ± 0,42cd	3,52 ± 0,48d
QP	C		8,87 ± 0,76ab	6,75 ± 0,97bc
QR	C		10,14 ± 0,72a	7,96 ± 0,71ab
SP	.			
STEP	***			
T	***			
QP	A		-46 ± 6,01a	-36,14 ± 3,44a
QR	A		-41,11 ± 4,17a	-35,8 ± 1,76a
QP	B	$\Delta An$	-31,22 ± 4,44a	-33,17 ± 3,87a
QR	B		-33,91 ± 2,53a	-32,94 ± 3,04a
QP	C		-78,55 ± 2,03b	-76,07 ± 2,3b
QR	C		-80,73 ± 1,84b	-77,94 ± 2,49b
SP	.			
STEP	***			
T	***			
QP	A		0,05 ± 0,01bc	0,03 ± 0,01c
QR	A		0,06 ± 0,01abc	0,04 ± 0,01c
QP	B	$\delta g_s$	0,05 ± 0,01bc	0,04 ± 0,01bc
QR	B		0,05 ± 0,01bc	0,03 ± 0,01c
QP	C		0,08 ± 0,01ab	0,06 ± 0,01abc
QR	C		0,09 ± 0,01a	0,06 ± 0,01abc
SP	.			
STEP	***			
T	***			
QP	A		-50,63 ± 4,47a	-39,68 ± 1,86a
QR	A		-49,24 ± 3,48a	-41,08 ± 2,89a
QP	B		-38,65 ± 5,26a	-40,98 ± 2,18a
QR	B	$\Delta g_s$	-39,83 ± 3,04a	-38,57 ± 3,58a
QP	C		-71,1 ± 2,11b	-67,96 ± 3,94b
QR	C		-76,12 ± 2,58b	-71 ± 2,04b
SP	.			
STEP	***			
T	*			

### **Photosynthetic capacity**

The photosynthetic capacity was significantly reduced under drought in both species,  $V_{max}$  and  $J_{max}$  displaying lower values than under control condition, moreover QR displayed significantly higher  $V_{max}$  values than QP especially under control conditions. Thus, overall QR displayed higher  $A_n$  rates associated with a better photosynthetic capacity.

**Table 4 :** Photosynthetic capacity values from Aci curves. Different letters show the significative differences between groups from a two factors ANOVA model including treatment and species effects followed by a post-hoc Tukey test. ( $n = 22$  observations per group and P values: "\*\*\*\*" for  $P < 0.001$ ; "\*\*\*" for  $P < 0.01$  and "\*\*" for  $P < 0.05$ ).

species	Parameter	Control	Drought
QP	$V_{max}$	$51,5 \pm 5,5ab$	$42,2 \pm 5,4b$
QR		$72,4 \pm 7,5a$	$51,9 \pm 5,0ab$
SP	*		
T	*		
SP*T			
QP	$J_{max}$	$82,1 \pm 14,4ab$	$55,4 \pm 7,0b$
QR		$105,8 \pm 8,1a$	$67,8 \pm 6,7b$
SP	.		
T	***		
SP*T			

### **Correlation matrix**

Intrinsic water use efficiency is calculated as the ratio between assimilation rate and stomatal conductance. These two components are linked by a nonlinear relationship and known to influence each other variations (i.e stomatal limitation other  $A_n$ ). The present results suggested that  $W_i$  variations among treatments for both light saturated as well as field measurements were mainly driven by  $g_s$ .(Table 5)

Although we found highly different dynamics between irradiance steps, especially between the opening the sequence and the two others, regardless of the treatments, our results have shown a globally coordinated dynamic response between the different irradiance steps under control conditions since all parameters displayed relatively high correlations between each others. Under drought, the stress seemed to disrupt the previous coordination as most of the correlations disappeared. Nevertheless, correlations between same parameters were still observable (exception made of  $\tau_c/\tau_b$  and  $\lambda_a/\lambda_b$ ) thus indicating the maintenance of common mechanisms involved in the response to several irradiance steps under drought stress.

Interestingly, the asymmetry of response between closing and opening was systematically driven by variations in the opening sequences parameters (as shown by the negative correlations found for  $\tau_r/\tau_b$ ,  $\lambda_r/\lambda_b$  and  $SL_r/SL_b$ ) in both treatments.

In addition, all dynamic parameters extracted from the first irradiance step (A) appeared to correlate negatively ( $\tau$  and  $\lambda$ ) and positively (SL) to the photosynthetic capacity (equivalent correlations for  $V_{max}$  and  $J_{max}$  which themselves correlated with each other). Interestingly field measurements Intrinsic water efficiency were negatively correlated with photosynthetic capacity as well as positively with dynamics parameters.

Surprisingly, when found significant, we observed the opposite relationships between  $W_i$  and dynamic parameters under water stressed conditions (negative correlations for  $\lambda_a/W_i$ ,  $\lambda_b/W_i$  and positive for  $SL_b/W_i$ ,  $SL_c/W_i$ ). Additionally, irradiance curves were performed at different period of the throughout the experiment. Therefore, we tested a potential hour of measurements effect on dynamic parameters and  $g_s$  steady state values. No effect was detected on any of the parameters (ANOVA  $P > 0.05$  ; data unshown).

**Table 5 :** Correlation matrix between the dynamic parameters ( $\tau, \lambda, SL$ ), their closing/opening ratios ( $\tau_r, \lambda_r, SL_r$ ), the photosynthetic parameters ( $V_{max}$  and  $J_{max}$ ), gas exchange monitoring measurements ( $A_n-m, g_s-m, W_i-m$ ) and the growth rates ( $DGR'$  and  $HGR'$ ) under control conditions (lower matrix) et drought condition (upper matrix). R-value, P-value and number of observations are presented for each parameters with P values : “\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*” for  $P < 0.05$ .

	$\lambda_a$	$\lambda_b$	$\lambda_c$	$\lambda_a$	$\lambda_b$	$\lambda_c$	SLa	SLb	SLc	$\lambda_r$	$\lambda_r$	SLr	$A_n-m$	$g_s-m$	$W_i-m$	$V_{max}$	$J_{max}$	DRG	HRG	
$\lambda_a$		0,62**(20)	0,49*(21)				-0,53*(21)		-0,49*(21)											
$\lambda_b$	0,87***(17)					0,66**(20)		-0,53*(20)	-0,5*(20)	-0,63**(20)	-0,45*(20)	0,66**(20)								
$\lambda_c$	0,82***(18)	0,74**(16)												0,69***(20)	-0,66**(19)					
$\lambda_a$	0,84***(22)	0,69**(17)	0,76***(18)			0,76***(21)					0,5*(20)									-0,48*(19)
$\lambda_b$	0,85***(17)	0,94***(17)	0,69**(16)	0,76***(17)		0,47*(20)					0,57**(20)	0,46*(20)								
$\lambda_c$	0,67**(18)	0,69**(16)	0,84***(18)	0,88***(18)	0,74**(16)															
SLa	0,74***(22)	-0,62**(17)	-0,65**(18)	-0,65**(22)	0,65**(17)	-0,54*(18)		0,81***(20)	0,83***(21)											
SLb	-0,72**(17)	-0,63**(17)	-0,67**(16)	-0,72**(17)	0,66**(17)	-0,7*(16)	0,92***(17)		0,79***(20)				0,57**(20)							0,47*(19)
SLc	-0,7**(18)	-0,66**(16)	0,78***(18)	0,72***(18)	0,67**(16)	-0,65**(18)	0,91***(18)	0,9***(16)					-0,47*(20)							0,57**(21)
$\lambda_r$		-0,51*(17)			-0,51*(17)															
$\lambda_r$		-0,59*(17)			0,66**(17)					0,75***(17)										
SLr	0,63**(17)			0,69**(17)				-0,56*(17)												
$A_n-m$															0,71***(20)					0,51*(19)
$g_s-m$														0,64***(22)		0,86***(19)				
$W_i-m$	0,6**(22)			0,58**(22)			-0,46*(22)	-0,5*(17)	-0,48*(18)				-0,52*(22)	0,89***(22)						
$V_{max}$	-0,68**(18)			-0,58*(18)	-0,54*(14)		0,52*(18)						0,56*(18)		-0,58*(18)					0,58**(20)
$J_{max}$	-0,66**(20)			-0,55*(20)	-0,57*(16)		0,53*(20)							0,52*(20)	-0,61**(20)	0,69**(18)				
DRG																				
HRG																				0,54*(22)

**Table 6:** Correlation matrix between the steady states values ( $A_n$ ,  $g_s$ ,  $W_i$ ), gaz exchange monitoring efficiencies ( $W_i$ -m and  $W_{inst}$ -m) and growth rates ( $DGR'$  and  $HGR'$ ) under control conditions (lower matrix) et drought condition (upper matrix). R-value, P-value and number of observations are presented for each parameters with P values : “\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*” for  $P < 0.05$ .

	$g_s$ sat	$g_s$ low	$A_n$ sat	$A_n$ low	$W_i$ sat	$W_i$ low	$W_i$ -m	$W_{inst}$ -m	$DGR'$	$HGR'$
$g_s$ sat		0,93 *** 21	0,87 *** 21	0,88 *** 21	-0,70 *** 21				0,48 * 21	
$g_s$ low	0,92 *** 22		0,81 *** 21	0,89 *** 21	-0,68 *** 21	-0,44 * 21			0,51 * 21	
$A_n$ sat	0,73 *** 22								0,44 * 21	0,44 * 21
$A_n$ low	0,80 *** 22		0,83 *** 22						0,49 * 21	
$W_i$ sat	-0,86 *** 22	-0,76 *** 22		-11,66		0,71 *** 21				
$W_i$ low	-0,67 *** 22	-0,61 ** 22			0,84 *** 22		0,58 ** 20	0,62 ** 20		
$W_i$ -m	-11,22		-10,56	-10,78	0,54 ** 22			0,96 *** 20		
$W_{inst}$ -m	-11,22		-12,54	-10,78	0,55 ** 22		0,98 *** 22			
$DGR'$										
$HGR'$									0,53 * 22	

## **Discussion**

### **Drought impact on growth**

We monitored the growing patterns of oaks seedlings during their second season of vegetation marked by a progressive drought. Both species displayed highly similar growth patterns for both height and diameter across the experiment although *Q. robur* displayed higher initial heights and diameters as well as a few episodes of higher growth rates. These observations match previous works on the same species (Levy et al., 1992) and might partly explained the pioneer behavior often reported for *Q. robur*. Interestingly, the two species seemed to alternate Height and diameter maximal growing periods, the establishment of the 3rd flush matching with the height growth peak around the 150th DoY. Nevertheless, such pattern was suggested in a previous study on oaks seedlings (Payan, 1982) and alternate growing patterns between height and roots biomass were also reported inside the Quercus family (Willaume & Pagès, 2011). Moreover, plants diameter kept growing until the end of the monitoring at more erratic rates. Such behaviors might suggest a strategy of acclimation to drought by breaking the rhythmic growth patterns and switching the available structural carbon allocation into others compartments such as storage organs. Thus, avoiding the emergence of new flushes and by extension more transpiring surface.

Furthermore, In the present study we did not established any relationship between diameter and height growth rates and the others recorded parameters over the well irrigated period. However, during drought, we established a link between gaz exchanges at both saturating and low light steady states and the diameter growth rate. It is worth noticing that these correlations with diameter growth were slightly higher than for the stomatal conductance than assimilation rates and yet very close which might indicate a stomatal limitation over CO<sub>2</sub> assimilation driving the diameter growth rate. However, the apparent rhythmic growth rates in oak during flushes establishment and therefore a nonlinear growth may complexify any interpretations, especially since a flush-establishment period overlapped both non stressed and droughted conditions.

### **Drought response impact on gas exchanges**

In order to characterize the drought response of the two oaks species, we performed two campaigns of measurements before and during drought stress (at 70 et 40% REW, respectively) from which we extracted steady states data. Additionally, we monitored gaz exchanges on a weekly basis during the whole experiment. Gaz exchange whether extracted from steady states measurements (Aci and irradiance response curves) or from the monitoring tended to converge to the same conclusions despite a few discordancy. Overall, both species displayed equivalent responses to drought by decreasing  $g_s$  and  $A_n$  while increasing  $W_i$  and the only difference between species was higher

assimilation rates in *Q. robur* associated with better photosynthetic capacity regardless of the water status. However, as indicated in the introduction, the few comparative publications available in the literature display numerous conflicting results about differences between the two species in  $W_i$ . Thus in some studies both species displayed similar  $W_i$  levels (Scuiller 1990 ; Vivin et al., 1993 ; Thomas & Gausling 2000) while others suggested higher  $W_i$  in *Q. petraea* than *Q. robur* mostly attributed to differences in stomatal conductance (Epron & Dreyer, 1993 ; Ponton et al., 2001 ; Roussel et al., 2009a). Overall, interspecific differences tends to be consistent in adults trees, *Q. petraea* displaying a higher  $W_i$  while reports on seedlings seems more conflicting. In accordance with our steady states measurements, during most of the monitoring *Q. robur* showed higher assimilation rates than *Q. petraea* as well as stomatal conductance and despite two antagonistic  $W_i$  measurements, both species followed globally the same trend over the progressive drought, reaching what seemed to be their maximal plasticity to drought under 35%rew. Nevertheless, it is worth noticing that during the transition from 60%rew to 40% the stomatal conductance of *Q. robur* dropped leading to significantly higher  $W_i$  than *Q. petraea* whose stomatal conductance dropped at lower REW during the 40-35%rew transition. Such results might indicate the existence of different drought triggering thresholds between the two species but in order to either comfort or disregard this thesis another experiment including more repetitions as well as a more refine design of REW steps would be required. Furthermore, one must take into account that both gaz exchange methods used in the present study carry their own restrictions. Steady states measurements although being recorded under controlled conditions are unlikely to occur in nature as plants are submitted to a highly fluctuant environment and might therefore, provide a biased view of gaz exchanges far from the actual field conditions. On the other hand, field monitoring is prone to less accurate gaz exchange estimations which is susceptible to hide fine variations in  $CO_2$  uptake as well as stomatal conductance. Therefore we will remain careful by concluding that both species displayed similar responses to drought as well as  $W_i$  levels and that the differences in assimilation rates are likely to be involved in the better growth observed in *Q. robur* seedlings providing a strong competitive advantage.

### ***Stomatal dynamics***

#### ***Acclimation to drought***

Along with gas exchange measurements, two campaigns of irradiance response curves were performed in order to assess drought impact on stomatal dynamics as well as differences in dynamics between irradiance steps of different magnitudes. Kirschbaum et al. (1988) proposed a dynamic model in which the response to irradiance was hypothesized to be composed of three functional steps: first, a biochemical signal that responds directly to irradiance, then a subsequent variation of osmotic potential and a final water transportation in/out guard cells, inducing the actual stomatal movement.

We applied a dynamic model on the obtained sigmoidal responses to irradiance from which we extracted two parameters expressed as time constants independent of stomatal amplitudes and describing the shape of the response curves.  $\lambda$  was defined as a lag time estimate related to the first biochemical signal response induced by the irradiance change while  $\tau$  described the steepness of the sigmoid curve likely linked to ion and water fluxes operating during stomatal movements (Blatt, 2000). The third dynamic parameter provided by the model was a maximal stomatal response slope estimate (SL) dependent of the actual amplitude of  $g_s$ .

Both species displayed matching dynamic responses regardless of the treatments or, the irradiance steps (A, B, C) for all three dynamic parameters. These, results are consistent with our previous study on the same species in which *Q. robur* and *Q. petraea* exhibited the same stomatal behavior characterized by faster responses under drought stress (Gerardin et al., 2019) and is comforted by the few other studies assessing stomatal dynamics under water stress also highlighting faster responses in drier climate (Vico et al., 2011) and experimental drought (Qu et al., 2016 ; Haworth et al., 2018). It is also worth mentioning that other factors were also reported to impact stomatal dynamics such as irradiance growth levels (Kardiman and Raebild, 2017 ; Matthews et al., 2018 ; Gerardin et al., 2018), stomatal features (Franks and Farquhar, 2007 ; Drake et al., 2013 ; Raven 2014 ; Aasama and Aphalo, 2016 ; Xiong et al., 2017) or stomata functional type (McAusland et al., 2016). Most of the studies assessing the relationship between stomatal morphology and dynamics reported faster responses associated with smaller stomata as well as higher stomatal density. Nevertheless, in Gerardin et al., (2019) seedlings of the same age from the same species displayed analogous stomatal features under both non limited and experimental drought conditions. Furthermore, no relationship between dynamic parameters and stomatal traits were established. Thus, we assumed in the present study that stomatal morphology did not play any significant role in the observed dynamics variability.

### **Symmetry of dynamic parameters**

Very few studies explored the symmetry of response between stomatal closing and opening. Ooba and Takahashi (2003) found that most species from irradiance-limited environment displayed mostly asymmetrical responses marked by faster opening than closing. Such behaviour has been suggested to help overcome the stomatal limitation that constrain  $CO_2$  diffusion during stomatal opening and therefore, improve  $CO_2$  net assimilation (Lawson et al., 2010, 2012; Vialet-Chabrand et al., 2013; McAusland et al., 2016). However, Ooba & Takahashi (2003) also suggested through modelling that the asymmetry controls water use by transpiration rates rather than carbon gain under fluctuating irradiance. In previous studies, we found conflicting results about drought impact on the symmetry of stomatal response to irradiance. In tobacco plants submitted to water stress conditions, the



asymmetry decreased compared to control plants due to relatively faster opening (Gerardin et al., 2018). Despite such differences in drought acclimation among species, the previous study that we conducted on *Quercus robur* and *Quercus petraea* seedlings (Gerardin et al., 2019) is consistent with the results of the present work, both experiment revealing slower opening responses than closing, no modifications of the symmetry under drought stress and comparable symmetry values between the two species. Such consistent results tend to suggest that even if dynamic response asymmetry plays a role in CO<sub>2</sub> uptake or water loss it doesn't seem to take a part in the acclimation process to drought in young oaks seedlings neither in the differentiation of their respective ecological niche.

### ***Comparison of irradiance steps***

First of all, the matching closing and opening sequences (A and B) displayed the same amplitudes of stomatal conductance as well as assimilation rates in both absolute and relative terms (~45% stomatal reduction compared to the saturating steady states). Furthermore, as expected the closing sequence induced by a more intense irradiance step (C) resulted in a stomatal closure of a larger extent (~70%).

Interestingly, the three dynamic parameters followed the same trend when plants were submitted to a drought stress and although the  $\delta g_s$  and  $\delta A_n$  were reduced due to the stress and their relative responses remained slightly unchanged. Such results might indicate that despite numerous physiological functions impaired under drought such as photosynthetic capacity some processes involved in the response to irradiance remain fully operational.

As hinted by the depiction of the symmetry, differences between irradiance steps dynamics were found. Regardless of the treatment, opening sequences (B) were systematically slower for all three parameters than their counter part closing sequences induced by the same antagonistic irradiance step (A), but also the second closing sequence (C). Nevertheless, while we may have expected well differentiated dynamics associated with each irradiance steps. For both closing sequences (A and C), relative and absolute amplitudes ( $g_s$  and  $A_n$ ) were significantly different, resulting also in a difference in maximal slope (SL), whereas the time constants ( $\lambda$  and  $\tau$ ) were not affected by the magnitude of the irradiance step. These results may imply that some of the mechanisms involved in the response to irradiance are not proportional to the intensity of the stimuli but rather its nature or are unrelated and dependant of completely different factors such as plant intrinsic properties. Obviously, such assumption would require further experiments including a wider range of irradiance steps tested for both stomatal opening and closing.

Such findings highlight the importance of decomposing the temporal response into parameters describing specific aspects of the dynamics, otherwise interesting differences or in our case similitudes

would remain unveiled if a more direct approach had been employed. Moreover, our results hinted the coexistence of plastic and invariant process involved in the dynamic response to irradiance

### **Conclusion**

In this study, we highlighted the impact of drought on the dynamic response of stomata to several step variations in irradiance in *Q.petraea* and *Q.robur* seedlings. Drought treatment led to faster dynamics in both species. The similar dynamics displayed by the two species tends to suggest that in oak the temporal response to irradiance might not be involved in the differentiation of their respective ecological requirements. However, such assertion needs to be confirmed in a bigger extent in the near future. Additionally, the progressive drought reached an extent at which vertical growth was altered and diameter growth strongly reduced in both species. Gas exchanges were also significantly reduced leading to an increase of water use efficiency. Nevertheless, *Q.robur* seemed to be more sensitive to the progressive drought by displaying these changes at a higher water availability than *Q.petraea*, thus hinting toward species specific drought-response threshold. Such result might have considerable implications in regard of their respective ecological niches. An important perspective would be to confirm the coherence of these results with further progressive drought experiments.

### **Declaration of interest**

All authors disclose any financial or personal conflict of interest.

### **Author contributions**

OB and TG designed the experiment, OB provided study material and environment, TG, and OB conducted the experiment, TG, OB did the data analysis, and TG, OB wrote the manuscript and were involved in the interpretation and critical discussion of the results, OB obtained funding.

### **Acknowledgements**

TG acknowledges the PhD grant from the H2Oak ANR-14-CE02-0013 project. This study was part of the interdisciplinary « H2Oak » research project aiming to investigate the diversity for adaptive traits related to water use in two European white oaks (*Quercus robur* and *Quercus petraea*). The UMR Silva is supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01)

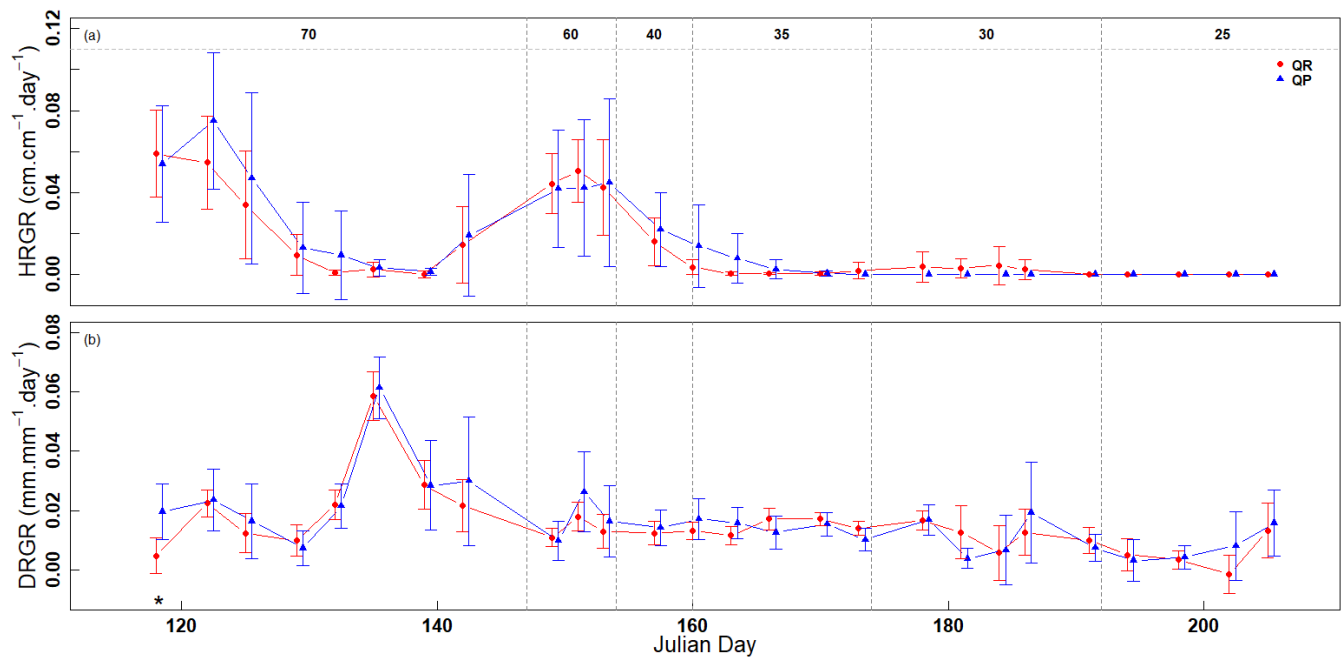
We thank Cyril Buré for the help with growing the seedlings and setting up the experiment on the robotic system. Jimmy for their help in measurements, ONF for harvesting of the seeds.

## Annexe

**Annexe 1 :** Gaz exchange monitoring (An, gs and Wi° results by date. Letters present the results of a Post-hoc Tuckey-HSD test on a two way ANOVA (species and DoY).

%REW		70			60		40	35				30		25	
DoY		143	144	146	152	153	159	165	164	166	173	191	192	200	204
QR	An	bcd	bcd	ab	abc	a	bcd	bcd	bcd	bcd	bc	bc	bcd	bcd	bcd
QP		bcd	bcd	bcd	bcd	ab	bcd	cd	bcd	cd	d	cd	d	cd	cd
QR	gs	abcd	abcde	ab	abc	a	de	de	de	de	cde	de	cde	de	cde
QP		abcd	bcde	abcde	abcde	abcd	abcd	de	de	de	e	de	de	de	de
QR	Wi	d	cd	d	cd	cd	abcd	abc	abcd	abcd	abcd	bcd	abcd	abcd	abcd
QP		d	cd	cd	cd	dc	cd	abcd	abcd	abcd	abcd	abcd	abcd	abcd	abcd

**Annexe 2 :** The relative height (a) and diameter (b) growth rates (RHGR and DRGR, respectively). With RGR calculated from date to date as  $RGR = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1)$  (see Hoffmann and Poorter 2002). With red dots for QR and blue triangles for QP and the %REW changes in vertical dotted line. The differences of growth rates between species at a given date from a t-test are presented as : P values : “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*” for  $P < 0.05$ . To avoid overlapping values and improve the visibility, QP monitoring has been shifted by a day.



### **Bibliography Article 3 / H2Oak 2017**

- Aasamaa K, Aphalo PJ (2016) The acclimation of *Tilia cordata* stomatal opening in response to light, and stomatal anatomy to vegetational shade and its components. *Tree Physiol.* 37: 209-219
- Becker M, Lévy G (1982) Le dépérissement du chêne en forêt de Tronçais. Les causes écologiques. *Ann. Sci. For.*, 39: 439-444.
- Becker M, Lévy G (1986) Croissance radiale comparée de chênes adultes (*Quercus robur* L. et *Q. petraea* [Matt. ] Liebl.) sur sol hydromorphe acide. Effet du drainage. *Acta Oecol., Oecol. Plant.* 7 (21): 121-143.
- Bréda N, Cochard H, Dreyer E, Granier A (1993) Field comparison of transpiration, stomatal conductance and vulnerability to cavitation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* under water stress. *Ann For Sci* 50:571–582.
- Collet C, Manso R, Barbeito I (2016) Coexistence, association and competitive ability of *Quercus petraea* and *Quercus robur* seedlings in naturally regenerated mixed stands. *For. Ecol. Manage.* 390 : 36–46.
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, cell & Environ* 33: 1419–1438.
- Dobrovolný P et al (2016) Recent growth coherence in long-term oak (*Quercus* spp.) ring width chronologies in the Czech Republic. *Clim Res* 70 :133–141.
- Drake PL, Froend RH, Franks PJ (2013) Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J Exp Bot* 64: 495–505.
- Dumont J, Spicher F, Montpied P, Dizengremel P, Jolivet, Y, Le Thiec, D (2013) Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO<sub>2</sub> and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* × *Populus nigra* genotypes. *Environmental Pollution*, 173, 85-96.
- Durand M, Brendel O, Buré C, Le Thiec D (2019) Altered stomatal dynamics induced by changes in irradiance and vapour-pressure deficit under drought : impacts on the whole plant transpiration efficiency of poplar genotypes. *New Phytologist* 222 :1789-1802.
- Epron D, Dreyer E (1993) Long- term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.] in a natural stand. *New Phytol* 125:381–389.
- Farquhar GD, Caemmerer S Von, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthesis CO<sub>2</sub> fixation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149: 78–90.
- Fonti P, Heller O, Cherubini P, Rigling A, Arend M (2013) Wood anatomical responses of oak saplings exposed to air warming and soil drought. *Plant Biol* 15:210–219.
- Franks PJ, Farquhar GD (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol* 143: 78–87.
- Friedrichs DA *et al* (2008) Complex climate controls on 20th century oak growth in Central-West Germany. *Tree Physiol.* 29 : 39–51.

- Gérard B, Alaoui-Sossé B, Badot PM (2009) Flooding effects on starch partitioning during early growth of two oak species. *Trees* 23(2) : 373.
- Gerardin T, Douthe C, Flexas J, Brendel O (2018) Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environ Exp Bot*.
- Gerardin et al., 2019 (unpublished yet)
- Gieger T, Thomas FM (2005) Differential response of two Central-European oak species to single and combined stress factors. *Trees* 19:607–618.
- Granier A, Breda N, Biron P, Villette S (1999) A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecological modelling*, 116(2-3) : 269-283.
- Granier A, Ceschia E, Damesin C, Dufrêne E, Epron D, Gross P, Lucot E (2000) The carbon balance of a young beech forest. *Functional ecology*, 14(3) : 312-325.
- Grantz D, Zeiger E (1986) Stomatal responses to light and leaf-air water vapor pressure difference show similar kinetics in sugarcane and soybean. *Plant Physiology* 81, 865-868.
- Haworth M, Marino G, Cosentino SL, Brunetti C, De Carlo A, Avola G, Centritto M (2018) Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 147: 116-124.
- Hu B, Simon J, Rennenberg H (2013) Drought and air warming affect the species-specific levels of stress-related foliar metabolites of three oak species on acidic and calcareous soil, *Tree Physiology*, 33 : 489–504.
- Jensen JS (2000) Provenance Variation in Phenotypic Traits in *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Danish Provenance Trials. *Scand. J. For. Res.* 15 : 297–308.
- Jones HG (2013) *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge university press.
- Kaiser E, Morales A, Harbinson J (2018) Fluctuating light takes crop photosynthesis on a rollercoaster ride. *Plant physiology*, 176: 977-989.
- Kardiman R, Ræbild A (2017) Relationship between stomatal density, size and speed of opening in Sumatran rainforest species. *Tree physiology*, 38(5), 696-705.
- Kirschbaum MUF, Gross LJ, Pearcy RW (1988) Observed and modelled stomatal responses to dynamic light environments in the shade plant *Alocasia macrorrhiza*. *Plant, Cell Environ* 11: 111–121.
- Kremer A, Petit R (1993) Gene diversity in natural populations of oak species. *Annales des Sciences Forestières* 50 : 186-203.
- Landmann G, Becher M, Delatour C, Dreyer E, Dupouey JC (1993) Oak dieback in France: historical and recent records, possible causes, current investigations. *Rundgespräch der Kommission fuer Oekologie (Germany)*.
- Lawson T, von Caemmerer S, Baroli I (2010) Photosynthesis and Stomatal Behaviour. in 265–304 doi:10.1007/978-3-642-13145-5\_11

- Lawson T, Blatt MR (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* 164: 1556–70.
- Lawson T, Kramer DM, Raines CA (2012) Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 23: 215–220.
- Lévy G, Becker M, Duhamel DA (1992) Comparison of the ecology of pedunculate and sessile oaks: radial growth in the Centre and Northwest of France. *For Ecol Manage* 55:51–63.
- Matthews JS, Vialet-Chabrand SR, Lawson T (2018) Acclimation to fluctuating light impacts the rapidity and diurnal rhythm of stomatal conductance. *Plant physiology*. 176: 1939-1951.
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, Baker NR, Brendel O, Lawson T (2016) Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol* 211: 1209–1220.
- Naumburg E, Ellsworth DS, Katul GG (2001) Modeling dynamic understory photosynthesis of contrasting species in ambient and elevated carbon dioxide. *Oecologia* 126(4) : 487-499.
- Ooba M, Takahashi H (2003) Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecol Modell* 164: 65–82.
- Parent C, Crèvecoeur M, Capelli N, Dat JF (2011) Contrasting growth and adaptive responses of two oak species to flooding stress : role of non- symbiotic haemoglobin. *Plant, cell & environment* 34(7) : 1113-1126.
- PAYAN E (1982) Contribution à l'étude de la croissance rythmique chez de jeunes chênes pedoncules, quercus pedunculata ehrh (Thèse).
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Feuillat F, Bodénès C, Dreyer E (2001) Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell Environ* 24:861–868.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Dreyer E (2002) Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiol* 22:413–422.
- Qu M, Hamdani S, Li W, Wang S, Tang J, Chen Z, Song Q, Li M, Zhao H, Chang T, Chu C, Zhu X (2016) Rapid stomatal response to fluctuating light : an under-explored mechanism to improve drought tolerance in rice. *Funct Plant Biol* 43: 727–738.
- Raven JA (2014) Speedy small stomata? *J Exp Bot* 65: 1415–1424.
- Scuiller I (1990) Exploration de la variabilité des comportements écophysologiques de semis de chênes blancs européens soumis à la sécheresse (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58: 219–247.
- Team RC (2015) R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria: 2014. R: A language and environment for statistical computing, 2013.
- Thomas FM (2008) Recent advances in cause-effect research on oak decline in Europe. *CAB Reviews : Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3(037) : 1-12.

- Thomas FM, Gausling T (2000) Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Ann For Sci* 57:325–333.
- Tinoco-Ojanguren C, Pearcy, RW (1992) Dynamic stomatal behavior and its role in carbon gain during lightflecks of a gap phase and an understory Piper species acclimated to high and low light. *Oecologia* 92(2) : 222-228.
- Violet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O (2013) Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment*. doi: 10.1111/pce.12086.
- Violet- Chabrand SRM, Matthews JSA, McAusland L, Blatt MR, Griffiths H, Lawson T (2017) Temporal dynamics of stomatal behavior : modeling and implications for photosynthesis and water use. *Plant Physiology* 174: 603–613.
- Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G (2011) Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytol* 192: 640–652 181.
- Vivin P, Aussenac G, Lévy G (1993) Differences in drought resistance among three deciduous oak species grown in large boxes. *Annales des Sciences Forestières* 50 : 221-233.
- Way DA, Pearcy, RW (2012) Sunflecks in trees and forests : from photosynthetic physiology to global change biology. *Tree physiology*, 32(9) : 1066-1081.
- Willaume M, Pagès L (2011) Correlated responses of root growth and sugar concentrations to various defoliation treatments and rhythmic shoot growth in oak tree seedlings (*Quercus pubescens*). *Annals of botany*, 107(4) : 653-662.
- Woods DB, Turner NC (1971) Stomatal response to changing light by four tree species of varying shade tolerance. *New Phytol.* 70: 77–84
- Xiong D, Douthe C, Flexas J (2018) Differential coordination of stomatal conductance, mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance in response to changing light across species. *Plant, Cell & Environment* 41: 436–450.

## Chapitre IV : Cause physiologique et/ou anatomique de la variabilité intra-spécifique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le chêne sessile (*Q. petraea*)

Ce dernier chapitre visait à caractériser les causes physiologiques et/ou anatomiques de la variabilité intra-spécifique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le chêne sessile, *Q. petraea*. Faisant ainsi écho aux travaux de Magali Roussel sur le chêne pédonculé.

Ces recherches ont permis de mettre en évidence le fait que la diversité détectée pour la discrimination isotopique du carbone ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) est étroitement liée à l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ) chez de jeunes plants de chêne pédonculés (Roussel et al., 2008) conformément au modèle proposé par Farquhar et Richards (1984) ainsi que de précédents travaux réalisés sur les chênes sessiles et pédonculés (Ponton et al., 2002). Par ailleurs, les fortes corrélations identifiées entre  $\Delta^{13}\text{C}$  et la conductance stomatique par Roussel et al. (2008) laissaient suggérer qu'au sein de la famille des chênes pédonculés les différences d'efficacité d'utilisation de l'eau intégrée dans le temps sont dues aux différences de conductances. Ce faisant les traits stomatiques tels que la densité (SD) ou la taille des stomates (SS) constituent potentiellement des paramètres influençant  $g_s$  (Pearce et al., 2006) et par extension WUE chez *Q. robur*. Comparant ces données avec celles obtenues au sein de la même famille par Brendel et al., (2008), il apparut clairement que les différences génotypiques de discrimination isotopiques étaient indépendantes des conditions environnementales et conservées au cours des années, suggérant un fort déterminisme génétique impliqué dans la diversité de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez cette espèce.

WUE peut également être mesurée à l'échelle de la plante entière en estimant l'efficacité de transpiration (TE,  $\text{g Bm g}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ). Celle-ci étant le rapport entre la biomasse produite par la plante et sa consommation en eau sur une durée donnée. En raison des contraintes qu'imposent ce type de mesures, TE n'a été que peu étudiée parmi les espèces ligneuses (Sun et al., 1996 ; Li, 2000 ; Cernuzak et al., 2007...). Il n'existe par conséquent que peu d'études réalisées sur *Q. robur* et/ou *Q. petraea* faisant mention de cet estimateur de l'efficacité (Guehl et al., 1995 ; Picon et al., 1996; Roussel et al., 2009 ; Gérardin et al., 2019 article 2 chapitre III). Nous ne disposons de fait que de peu d'éléments pour caractériser les relations existantes entre les différents estimateurs de WUE et TE chez le chêne. Bien que ces estimateurs soient liés théoriquement (Farquhar et al., 1982), des résultats contradictoires sont disponibles au sein de la littérature. Certaines études établissent une relation entre efficacité de transpiration et



discrimination isotopiques (Picon et al., 1996) tandis que d'autres ne la détectent pas (Guehl et al., 1995). Les apports de Roussel et al., 2009 sur *Q. petraea* furent plus catégoriques, confirmant les relations théoriques établies par Farquhar et al. (1984) : L'estimation de  $W_i$  par la discrimination isotopique du carbone ( $\Delta^{13}C$ ) était valide, de même que l'estimation de TE. Ce faisant, leurs résultats démontraient que le déterminisme génétique décrit pour  $\Delta^{13}C$  reflétait celui de l'ensemble des estimateurs de WUE, quel que soit leur échelle d'intégration. Ces travaux concluaient également sur le fait que la variabilité génétique intra-famille de WUE était conditionnée par une variabilité de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau ( $g_s$ ). Une forte efficacité d'utilisation de l'eau serait donc caractérisée par une faible conductance stomatique mais aussi une faible assimilation induite par limitation stomatique se traduisant par une faible transpiration à l'échelle plante entière sans pour autant que la biomasse produite soit affectée.

Ainsi dans ce dernier chapitre nous nous sommes appliqués à explorer ces mêmes thématiques de recherche chez *Q. petraea* à des fins comparatives.

## Dynamique de réponse stomatique à différents facteurs

### *Sensibilité stomatique au déficit de pression de vapeur d'eau (VPD)*

Les végétaux sont sensibles aux variations de déficit de pression de vapeur d'eau dans l'atmosphère et la feuille (Mott & Peak, 2012), celles-ci étant par nature dépendantes des températures foliaire et atmosphérique à l'origine du déficit. Cependant les voies de signalisation et les mécanismes impliqués dans la réponse au VPD ne sont pas encore clairement identifiés. La réponse stomatique diffère en fonction des espèces et des écotypes suggérant l'existence au moins partielle de mécanismes différentiels impliqués dans la régulation stomatique. Parmi les mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse au VPD, l'hypothèse d'une régulation stomatique relative au taux de transpiration de la plante semble privilégiée. En outre, la fermeture stomatique serait initiée par une forte transpiration des cellules de garde en comparaison des cellules épidermiques qui les jouxtent, réduisant ainsi le potentiel hydrique des cellules de garde proportionnellement aux variations de VPD. Il s'agirait alors d'un mécanisme hydro-passif. Cependant une autre hypothèse a également été proposée, suggérant l'existence d'une voie de signalisation associée au mésophylle ou à l'épiderme répondant aux changements de potentiel hydrique ou de pression de turgescence. D'après cette hypothèse, la fermeture stomatique serait donc également induite par de forts taux de transpiration à l'origine d'une diminution du potentiel hydrique (Buckley et al., 2003 ; Buckley,

2003 ; Zwieniecki et al., 2007). Des mouvements stomatiques hydro-passifs impliquent que la réponse stomatique à une augmentation du VPD soit la plus rapide chez des plantes affichant les valeurs de conductance stomatique les plus élevées en raison de leurs taux de transpiration supérieurs et des potentiels hydriques subséquents (Horak et al., 2017). Le manque de sensibilité à l'ABA mise en relief dans une large gamme de fougères et lycophytes a mené à l'hypothèse d'une régulation hydro-passive des mouvements stomatiques (Brodribb & McAdams, 2011). Chez diverses espèces de fougères et de conifères, celles-ci ont affiché des réponses rapides et symétriques aux changements de VPD, confortant cette assertion (Martins et al., 2016). Néanmoins, il a également été observé chez d'autres espèces, que la réponse passive seule ne pouvait expliquer l'ensemble des mouvements stomatiques liés au VPD (Horak et al., 2017). Par ailleurs, la réponse au VPD chez les angiospermes a souvent été caractérisée par une hystérèse, invalidant l'idée d'une réponse hydro-passive exclusive et systématique (McAdam & Brodribb, 2015). Cependant, nos connaissances concernant la réponse au VPD chez le chêne sont lacunaires ; en outre Roussel (Annexe I, Thèse) évoquait un lien entre variabilité de  $g_s$  et variabilité de réponse stomatique au VPD au sein d'une famille de chênes pédonculés. Dans cette famille, un génotype présentant de fortes valeurs de conductance stomatique sous lumière saturante présentait également une plus forte sensibilité de réponse à la lumière et au VPD qu'un génotype à faible  $g_s$ . Des mécanismes de contrôle des mouvements stomatiques communs à ces deux stimuli ont été mis en évidence (Grantz & Zeiger, 1986). Ainsi, l'étude comparative de la réponse à la lumière et au VPD constitue un angle d'approche à l'étude de la variabilité intra-spécifique de  $W_i$ , celle-ci ayant été associée à la variabilité de  $g_s$ . Il n'existe par ailleurs aucune publication à notre connaissance ayant adressé la dynamique de réponse stomatique en réponse au VPD chez *Q. robur* ou *Q. petraea*.

### *Sensibilité de la conductance stomatique au CO<sub>2</sub>*

Dans un environnement naturel, la concentration de CO<sub>2</sub> atmosphérique est peu susceptible de varier significativement. Au cours de la journée, les variations de CO<sub>2</sub> à l'intérieur de la feuille résultent donc essentiellement de la réponse photosynthétique ( $A_n$ ) aux signaux lumineux, également dépendante de son couplage avec la conductance stomatique (Hetherington & Woodward, 2003). Basiquement, une augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique ainsi qu'une augmentation du  $C_i$  sont susceptibles de provoquer la fermeture des stomates. A l'inverse une augmentation de l'assimilation de CO<sub>2</sub> associée à une diminution de  $C_i$  au sein des cellules mésophylliennes ou une diminution du CO<sub>2</sub> atmosphérique induiront un signal initiant l'ouverture stomatique.

## Objectif

Ce 3ème chapitre s'inscrit dans la continuité du chapitre précédent, en visant également à déterminer les causes physiologiques et/ou anatomiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) à travers plusieurs échelles d'intégration de l'efficacité, allant de mesures instantanées d'échanges gazeux foliaires en conditions naturelles ou contrôlées ( $W_i$ ) à des mesures intégrées dans le temps de la composition isotopique foliaire ( $\delta^{13}C$ ) et l'efficacité de transpiration (TE). Néanmoins, dans l'optique de compléter les travaux de Magali Roussel (thèse) sur *Q. robur* et en raison de contraintes logistiques (indisponibilité de provenances pour *Q. robur*) nous n'avons cette fois pu seulement explorer que la plasticité de réponse à la sécheresse de WUE et de ses traits sous-jacents chez *Q. petraea*.

Au cours de la deuxième année de thèse (2016) nous avons donc réalisé une seconde étude focalisée sur *Q. petraea*. A cette fin, nous avons planté en serre des glands provenant de six provenances sélectionnées suivant un gradient de stress hydrique. Ayant maximisé la variabilité intraspécifique par le biais des diverses provenances, il fut décidé de délaissier l'approche par screening pour l'efficacité ( $W_i$ ) en phase initiale. A l'instar de l'étude comparative menée en 2015, la moitié des plants furent soumis à une sécheresse relativement forte. Un ensemble de campagnes de mesures explorant les échanges gazeux foliaires ainsi que la dynamique de réponse stomatique à la lumière fut également réalisée et les plants finalement récoltés. Pendant l'ensemble de cette expérimentation la consommation hydrique individuelle des plantes fut également comptabilisée grâce au dispositif automatique d'arrosage et de pesée précédemment décrit permettant à l'issue de la récolte finale d'estimer l'efficacité de transpiration des chênes (TE).

S'inscrivant dans la continuité de l'ensemble de nos travaux, l'approche par modélisation de la dynamique des échanges gazeux foliaires a également occupé une part prépondérante de cette expérimentation. A l'instar des travaux précédemment présentés (publications 2 et 3) nous permettant d'explorer chez les deux espèces la vitesse de réponse stomatique à un changement de lumière ainsi que sa plasticité de réponse à la sécheresse, nous avons cette fois décidé de réitérer des campagnes de mesures de dynamique de réponse à la lumière. Cependant, nous avons élargi la gamme de réponses au déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et la plante ainsi qu'au  $CO_2$ , dans l'objectif de dresser un portrait plus précis de la réponse dynamique chez *Q. petraea*.

## Article 4 : (H2Oak 2016)

**Title: *What drives water use efficiency in sessile oak seedlings (Quercus petraea)?***

*Authors: Théo Pierre Henri Gerardin<sup>1</sup>, Didier Le Thiec<sup>1</sup> and Oliver Brendel<sup>1,2</sup>*

Adresses:

<sup>1</sup> Université de Lorraine, AgroParisTech, INRA, Silva, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup> Corresponding author postal address: Oliver BRENDEL, INRA, UMR Silva, F-542802 CHAMPENOUX, France

Tel : 0033.383394100

ORCID :

Théo P.H. Gerardin: <https://orcid.org/0000-0002-5427-6470>

Didier Le Thiec: <https://orcid.org/0000-0002-4204-551X>

Oliver Brendel: <https://orcid.org/0000-0003-3252-0273>

Emails:

[theo.gerardin@inra.fr](mailto:theo.gerardin@inra.fr), [oliver.brendel@inra.fr](mailto:oliver.brendel@inra.fr), [Didier.lethiec@inra.fr](mailto:Didier.lethiec@inra.fr)

**Keywords: drought, dynamic response, irradiance, stomatal conductance, growth, oak**

## **Abstract**

In the context of climate change characterized by more intense and frequent drought episodes, tree tolerance to water stress is a major topic of research. We assessed in *Q.petraea* seedlings grown under control and drought conditions water use efficiency (WUE) at different temporal scales from leaf instantaneous gas exchange measurements to whole plant transpiration efficiency. Our objectives were to address the impact of an experimental drought on WUE and underlying traits, including traits related to biomass accumulation as well as traits related to transpiration, such as stomatal dynamics.

We found that a moderate drought induced higher water use efficiency at every scale. At the whole plant level, variation in transpiration efficiency among plants was mainly driven by differences in biomass accumulation rather than water use, especially due to variation in the root biomass. Whereas at the leaf level, the intrinsic WUE ( $W_i$ ) was mainly driven by variations in stomatal conductance, even when taking into account the drought effect. Both, plant water use, plant transpiration per leaf surface as well as biomass accumulation, displayed strong correlations with bulk leaf  $\delta^{13}C$ . Additionally, we explored stomatal kinetics induced by three environmental factors (irradiance,  $[CO_2]$  and VPD), as well their plasticity under water stressed conditions. We demonstrated that reduced water availability induced faster kinetics regardless of the environmental factor. Importantly, we observed that these kinetics were of different temporal magnitudes among factors, despite relatively similar stomatal amplitudes of responses.  $[CO_2]$ -induced responses were the fastest, followed by irradiance kinetics, and the slowest were VPD-induced responses. These differences between factors as well as treatments were unrelated to stomatal morphology, suggesting environmental factor specific mechanisms involved in their respective kinetics signalisation pathways. Nevertheless, the similar faster responses to water stress displayed by all three environmental factors hinted toward common processes involved in response to drought, probably linked to plants water status. Although we observed a covariation of faster stomatal dynamics and higher WUE driven by drought no direct correlations between dynamic parameters and TE were established.

**Table 1:** List of variables

Unit	variable	explanation
gr	SBm	stem biomass
gr	TRBm	taproots biomass
gr	RBm	root biomass
gr	AGBm	above ground biomass
gr	UGBm	under ground biomass
-	RS	root-shoot biomass ratio
-	nTR	Taproots number
cm	TRL	Taproots mean length
gr	LBm	Leaf biomass
cm <sup>2</sup>	LS	Leaf surface estimation
cm	H	plant final height
mm	D	plant final diameter
gr	TBm	plant total dry biomass
-	nF	number of flushes
-	nB	number of branches
cells/mm <sup>2</sup>	SD	Stomatal density
µm	OL	stomatal pore length
µm	GCL	guard cell length
µm	GCW	guard cell width
	SC	Stomatal coefficient (OL/GCL)
ym <sup>2</sup>	SS	stomatal size
%	N	leaf azote content
%	C	leaf carbon content
	TWCS	Water consumption by Leaf surface during the whole experiment
	ABmS	Biomass production by Leaf surface during the whole experiment
L	TWC	Water consumption during the whole experiment
g.L-1	TE	Transpiration efficiency during the whole experiment
gr	ABm	Biomass production during the whole experiment
mm	Bmi	initial biomass
-	δ13C	Leaf Isotopic discrimination for 13C (Leaf used for gaz exchange)
µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Vmax	Maximal carbocylation rate
µmol e <sup>-</sup> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Jmax	Maximal electron transport rate
µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	A-m	Net CO <sub>2</sub> assimilation (Licor 6200 monitoring)
mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	g <sub>s</sub> -m	Stomatal conductance (Licor 6200 monitoring)
µmolCO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	Wi-m	Intrinsic water use efficiency (Licor 6200 monitoring)
µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	A- co2	Net CO <sub>2</sub> assimilation (saturation Steady state : CO <sub>2</sub> response curves)
µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	A -irc	Net CO <sub>2</sub> assimilation (saturation Steady state : irradiance response curves )
µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	A -vpd	Net CO <sub>2</sub> assimilation (saturation Steady state : VPD response curves)
mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	g <sub>s</sub> -co <sub>2</sub>	Stomatal conductance (saturation Steady state : CO <sub>2</sub> response curves)
mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	g <sub>s</sub> -PPFD	Stomatal conductance (saturation Steady state : irradiance response curves )
mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	g <sub>s</sub> -vpd	Stomatal conductance (saturation Steady state : VPD response curves)
µmolCO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	Wi-co <sub>2</sub>	Intrinsic water use efficiency (saturation Steady state : CO <sub>2</sub> response curves)
µmolCO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	Wi-PPFD	Intrinsic water use efficiency (saturation Steady state : irradiance response curves )
µmolCO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	Wi-vpd	Intrinsic water use efficiency (saturation Steady state : VPD response curves )
sec	τ-CO <sub>2</sub> /VPD/PPFD	Response time of dynamic response
sec	λ-CO <sub>2</sub> /VPD/PPFD	Lag time of dynamics response
mol m <sup>-2</sup> s <sup>-2</sup>	SL-CO <sub>2</sub> /VPD/PPFD	Maximal slope of stomatal response
	τr	Ratio between τ parameters extracted from stomatal closing and opening
	λr	Ratio between λ parameters extracted from stomatal closing and opening
	SLr	Ratio between SL parameters extracted from stomatal closing and opening
mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	δg	Stomatal amplitude of response (absolute value)
%	Δg	Relative Stomatal amplitude of response
µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	δA	Assimilation amplitude of response (absolute value)
%	ΔA	Relative Assimilation amplitude of response

## **Introduction**

As the global population arises, increasing the needs for food production, domestic and industrial water use, thus increasing the pressure on the agricultural sector to produce more food and biomass with less water, water use efficiency (WUE) became a major concern. WUE is a complex trait associated to drought tolerance which usually increases when plants are submitted to water stressed conditions (Valladares & Gomez, 2006). Water use efficiency can be defined at different levels (Condon et al, 2002). At the whole plant level, WUE integrates over long term periods the ratio between the overall dry biomass accumulated on the water transpired by the plant and is referred to as “transpiration efficiency” (TE, g DM L H<sub>2</sub>O). TE is a complex trait related to leaf gas exchange and non-photosynthetic carbon as well as water loss which has been found to be dependent on environmental factors like vapour pressure deficit (Sinclair, 2012) but also displaying large genotypic variations in crops (Belko et al., 2012; Gholipour *et al.*, 2010) and trees (Wullschleger et al., 1998). At the leaf level, intrinsic WUE (Wi) is defined as the ratio between net CO<sub>2</sub> assimilation rate (A<sub>n</sub>) to stomatal conductance for water vapour (g<sub>s</sub>). Wi is related to numerous physiological and morphological traits which influence A<sub>n</sub> or g<sub>s</sub> and therefore the biomass production as well as the plant water consumption. The leaf carbon isotopic composition (δ<sup>13</sup>C) is commonly used as an estimator of intrinsic water use efficiency (Wi) since Farquhar and Richard (1984) established a negative relationship between these two parameters. However, due to the complexity of the trait, the up/downscaling from one WUE estimator to another depends on many parameters. Moreover, the morphological and physiological traits underlying WUE variations among individuals remains mostly unknown in *Q. petraea*.

A large intra-specific variability of δ<sup>13</sup>C has been detected within natural stands of pedunculate oaks (Ponton et al., 2001; Roussel et al., 2008a, b) and sessile oaks (Ponton et al., 2002). In addition, the predicted relationship between δ<sup>13</sup>C and Wi has been verified within both species (Ponton et al., 2002). Yet, little is known about intraspecific variability of water use efficiency estimators (TE, Wi, δ<sup>13</sup>C) within the sessile oak species as well as their plasticity to an edaphic drought. In *Q. petraea* grown under non limiting conditions, WUE diversity directly measured or estimated through isotopic discrimination has been linked to stomatal conductance (Ponton et al., 2002). Moreover, a higher influence of environmental than genetic control has been proposed as the main cause of the stomatal conductance variation (Roussel et al., 2009). Together these results stress the importance of studying the diversity of dynamic response of stomata to environmental factors such as irradiance, temperature or vapour pressure deficit between the leaf and the atmosphere (VPD).

Stomata regulate gas exchange between the leaf and the atmosphere by adjusting the pore's aperture in response to environmental factors through sensing pathways and internal signals. This results in a

dynamic control on CO<sub>2</sub> diffusion into the leaf and water loss by transpiration. Such a regulation of gas exchange is essential to maintain plant water status and to fulfill mesophyll demand for CO<sub>2</sub> supply (Lawson et al., 2010). Wong et al. (1979) first demonstrated a close nonlinear relationship between net CO<sub>2</sub> assimilation ( $A_n$ ) and stomatal conductance ( $g_s$ ) which was then observed in many occasions. Stomatal behaviour was later theorized as optimizing CO<sub>2</sub> uptake versus water loss through  $g_s$  regulation (Cowan & Farquhar, 1984). However, dynamic stomatal responses to environmental factors are generally uncoupled (McAusland et al., 2016) due to the by orders of magnitude slower stomatal response times, compared to photosynthetic response times (Lawson & Blatt, 2014). Which in turn leads to transient variation of intrinsic water use efficiency ( $A_n/g_s : W_i$ ) and a potential unnecessary loss of water (Violet-Chabrand et al., 2016).

Plants are submitted to a highly fluctuant environment through the daily course, with major variations of irradiance, temperature and VPD, all affecting stomatal regulation of  $g_s$  (Percy et al., 2000). Stomata have been found to respond to low CO<sub>2</sub>, low VPD and high irradiance by opening and therefore increasing  $g_s$  and reversely (Outlaw, 2003). In addition, environmental changes are prone to occur simultaneously resulting in a complex hierarchical regulation induced by several signalling pathways (Lawson et al., 2010; Aasamaa and Sober, 2011; Haworth et al., 2018). The temporal responses to irradiance of  $A_n$  and  $g_s$  are known to be uncoupled (Violet-Chabrand et al., 2011; McAusland et al., 2016; Gerardin et al., 2018) as,  $A_n$ , if not limited varies much faster than  $g_s$ . Such differential temporal responses are susceptible to deeply impact the CO<sub>2</sub> assimilation as well as the water loss and ultimately WUE (McAusland et al., 2016; Lawson et al 2010). While plant's drought responses have been extensively studied, only a few studies explored its impact on stomatal dynamics. In these studies, faster stomatal responses to irradiance have been found in plants submitted to drier climates (Vico et al., 2011; Lawson and Blatt, 2014; Gerardin et al., 2018, Gerardin and Brendel, 2019) and even associated with higher transient WUE (Qu et al., 2016).

In addition to the plant's environment, morphological traits such as stomatal size and density are known to set steady-state values of  $g_s$  (Franks and Farquhar 2001) but also to impact the temporal response to environmental changes. Several studies based on multiple species comparisons reported a faster stomatal response associated with smaller, more numerous stomata (Hetherington and Woodward, 2003; Drake et al., 2013; Raven, 2014; Kardiman and Raebild, 2017; Gerardin et al., 2018b). However, only few studies have focused on intra-specific variation. Gerardin et al. (2018) could not establish any relationship between stomatal size and the observed variation in the rapidity of response in tobacco. While stomatal morphology and patterning has been shown to be influenced by growth conditions (Woodward, 1987; Hetherington and Woodward, 2003; Kardiman and Raebild, 2017) contradictory results were also observed under water stress (Jones, 1977; Clifford et al., 1995) limiting



any straightforward conclusions. Along with environmental conditions or stomatal morphology other parameters such as gene expression, variations in ionic channels and water transporters have been proposed as major factors susceptible to influence the speed of stomatal responses (Lawson and Blatt,2014).

Despite the fact that physiological processes leading to stomatal movements are well known, the cause for the diversity of WUE within the *Q.petraea* species, its plasticity to drought and underlying physiological and morphological traits are far from being clearly assessed. In addition, only a handful of studies provided experimental data on stomatal dynamic responses to multiple environmental factors, their plasticity to drought as well as their possible link with WUE. Therefore, our main objectives were to:

- I) *Assess WUE from leaf to the whole plant in sessile oak and its response to drought*
- II) *Explore the drought response of underlying traits, especially of stomatal dynamics to different atmospheric variables (irradiance, CO<sub>2</sub>, VPD)*
- III) *Identify which underlying traits drive the variations in WUE observed in sessile oak.*

## ***Material and methods***

### ***Plant material and Experimental design***

The experiment was carried out on 60 *Q. petraea* seedlings originated from 6 different provenances (10 seedlings per provenance) at the National Institut of Agronomical Research (INRA), Champenoux, France (48°45'8"N, 6°20'28"E, 259m). The plants were selected from stands in central to Northern France ranging from dry to medium humid conditions to capture a maximum of within species variation. The acorns used for this experiment were collected in autumn 2015 from mature trees in six different natural pure stands in France and sown during spring 2016 (late March: 85<sup>th</sup> day of the year: DoY) in 6L pots filled with a 5/3/2 (V/V/V) mixture of sand, peat and silty-argillaceous forest soil. This soil mixture had been tested to a field capacity (FC) of 33% soil volumetric humidity (SVH) The plants then grew inside a greenhouse equipped with a robotic system allowing automatized plants weighing and watering in which they stayed during the whole experiment (for seven months from March to the final harvest in September on the 266<sup>th</sup> DoY). Conveyors moved the plants from their individual spot to a weighing and watering station 1-3 times per day during the whole experiment maintaining the soil humidity close to the target volumetric humidity. See Gerardin et al., (2019) and Bogeat-Triboulot et al., (2019) for a more detailed description of the irrigation system. All the plants were first submitted to the same non-limiting growing conditions: natural growth light, fertilized twice on 98<sup>th</sup> and 220<sup>th</sup> DoY (Nitrocote 15g/plant each time) and irrigated at 26% SVH, equivalent to 76% of relative extractible water ( $REW = (SVH - WP) / (FC - WP)$ ), assuming a wilting point (WP) at 4% soil humidity.

### ***Measurement of soil water status and drought establishment***

After a 3-months growing period on the 193<sup>th</sup> Julian day, the plants from each provenance were divided equally in two groups: control and water stressed. The volumetric soil water content remained at 26% for the control group while it was lowered to 13% SVH (corresponding to 31% REW) for the drought group until the end of the experiment. The volumetric soil water content was measured by time domain reflectometry (TRIME-TDR; IMKO GmbH, Ettlingen, DE) on a regular basis of 1-2 measurements per week throughout the experiment to adjust the watering adequately to the target SVH. Three measurements were done for each pot to sampled the complete soil volume and then averaged During the experiment an individual correlation was established between HV and the weight of each pot/plant system and used to program the robotic system with a target weight. Additionally, allometric correlations were used to compensate for an increase in weight of the pot/plant system by dry mass increase. The air temperature inside the greenhouse followed the environmental variations while never exceeding 25°C due to a cooling system in the facility.

### ***Gas exchange monitoring***

Regular *in situ* gas exchange monitoring was performed using a portable photosynthesis system (LI-COR 6200; LI-COR, Lincoln, NE, USA). Measurements of net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ), stomatal conductance for water vapour ( $g_s$ ) were made 1-3 times a week throughout the whole experiment (see fig 1). For each plant in both soil water treatments, the measurements were repeated on the same third-flush leaf. The monitoring started in mid-June (166<sup>th</sup> DoY) and finished in mid-September (256<sup>th</sup> DoY). The “-m” gas exchanges measurements mentioned through the manuscript and used in the correlations table are the means of 208 monitoring measurements acquired from the 197<sup>th</sup> to the 214<sup>th</sup> DoY after the desired soil water content level had been reached.

### ***Stomatal morphology***

The following parameters were measured for stomatal morphology: the stomatal density (SD), the ostiol length (OL), the length of the stomatal guard cell complex (GCL), the ratio between the ostiol and guard cell length (SC: OL/GCL, describing the actual size of the ostiole compared to the size of the guard cell complex), guard cells width (GCW) and the stomatal size (SS: defined as an elliptical area  $\pi \cdot (GCL/2) \cdot (GCW/2)$ ). Since oak trees only display stomata on the inferior surface of the leaves, 1cm<sup>2</sup> portions were collected and nail polish imprints were taken of the adaxial surface using adhesive film then applied on microscope slides for analysis. Stomata were counted in the obtained pictures using the ImageJ2 software. To estimate the stomatal size related parameters, for each collected leaf six pictures of the leaf epidermis imprints (500\*370 $\mu$ m) were taken and 10 stomata measured per pictures).

### ***Stomatal kinetics under environmental changes***

Three campaigns of measurement were performed on the plants, each one monitoring the stomatal response to a specific environmental parameter (irradiance, [CO<sub>2</sub>], VPD). All three campaigns were led in parallel over a 1-month period during July (From 178<sup>th</sup> DoY to 210) across all plants and treatments. For each plant, all the measurements were performed on the same third-flush, mature, fully expanded leaf grown under non-stressed conditions.

Gas exchanges were measured using three to four portable photosynthesis systems (LI-COR 6400XT; LI-COR, Lincoln, NE, USA) equipped with a 2cm<sup>2</sup> leaf chamber (Li-6400-40). Measured were : net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ), stomatal conductance for water vapor ( $g_s$ ). All measurements were carried out between 10:00 and 19:00 h (Central European summertime. For all three campaigns, the environmental parameters inside the chamber were kept constant during an acclimation phase before the measurement cycle with the [CO<sub>2</sub>] entering the chamber of 400  $\mu$ mol mol<sup>-1</sup>, the block temperature

set at 25°C, the humidity kept at ~70%, ~1.4 leaf VPD, an air flow of 300  $\mu\text{mol min}^{-1}$  and a PPFD of 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (red/blue irradiance 90/10%, respectively) until the leaf reached a steady-state of  $g_s$ . Then the measurement cycle was initiated as is:

The measurement cycle of the irradiance response campaign consisted of two step-changes in irradiance reaching another steady state: first A) a single step-change to low irradiance (from 1200 to 300  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD) inducing a stomatal closure, then B) a single step-change back to the original high irradiance (300 to 1200  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), inducing a stomatal reopening.

The measurement cycle of the CO<sub>2</sub> response campaign consisted of two step-changes in CO<sub>2</sub> reaching another state state: first A) a single step-change to high [CO<sub>2</sub>] (from 400 to 1000 ppm) inducing a stomatal closure, then B) a single step-change back to the original [CO<sub>2</sub>] (1000 to 400 ppm), inducing a stomatal reopening.

The measurement cycle of the VPD response campaign consisted of a single step-change in leaf VPD reaching another state-state: A) a single step-change to high VPD (from ~1.4 to ~3.1) inducing a stomatal closure. The opening step was not performed as in sessile oak, stomata that have been exposed to very high VPD values remained closed long after the VPD change.

The stomata were considered in steady-state when  $g_s$  did not vary more than  $\sim 0.005 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  during 10min. Data during the response curves were logged every 60sec. “Steady-state” data as mentioned through the manuscript were calculated from each steady state as the mean of 5 observations. The same leaves per plants was used for each campaign (VPD, CO<sub>2</sub>, irradiance).

### ***Dynamic Model description***

The obtained stomatal responses were adjusted using a sigmoidal model based on Vialet-Chabrand et al., (2013) as modified by Gerardin et al., (2018) allowing the estimation of dynamic parameters describing the temporal response of the stomata to an environmental change:

$$g_s = g_0 + (G - g_0) * \exp(-\exp(\lambda - t) / \tau)$$

Where  $g_s$  is the fitted stomatal conductance,  $g_0$  is the starting value of stomatal conductance),  $t$  is the time,  $G$  is the ending value of stomatal conductance (steady-state reached after the full stomatal response to the environmental change),  $\lambda$  is a time constant describing the lag time of the temporal response corresponding to the time needed to reach the inflection point (maximum slope) of the curve from the moment of the irradiance change, and  $\tau$  a time constant describing the response through the steepness of the curve. From these parameters, the maximum slope (SL) as an estimator of the speed of the stomatal response, has been be calculated as:

$$SL = (G-g_0)/(\tau \cdot e)$$

Where  $|(G-g_0)|$  represent the stomatal amplitude of the response ( $\delta G$ ). Increasing values of  $\tau$  will affect the curvature of the stomatal response, the smaller a  $\tau$  value is, the stronger the curvature and the higher SL will be, so the more rapidly  $g_s$  will increase/decrease (see Gerardin et al., (2018) for a visual representation of the dynamic parameters). The curves were fitted by the model using the function “nlminb” of R (TEAM RC, 2015). The adjustment of the sigmoidal model included five data points during the steady state before changing the irradiance thus delaying the time to reach the inflection of the curves and therefore increasing the values of the lag time  $\lambda$ . These values were then corrected by subtracting the added time period to accurately describe the time needed from the light change. As the model adjustment is sensitive to the starting point values, including five steady state points made the starting steady state  $g_s$  more robust and decreases the dependency of the adjustment on measurement noise. The nlminb function was called 100 times with different starting values for the estimated parameters, drawn randomly from uniform distributions over reasonable values of these parameters. The parameters values used in the statistics were means calculated from adjustments with an  $R^2 > 0.95$ . The assimilation, conductance and water use efficiency at saturated, starting steady-state values were extracted from each curve as means from 5 points and mentioned through the manuscript as (-PPFD, - $co_2$ , -vpd) for the irradiance,  $CO_2$  and VPD responses curves, respectively.

Additionally, the symmetry of response between the closing (A) and opening (B) sequences has been calculated for each dynamic parameter ( $\tau_r$ ,  $\lambda_r$  and  $SL_r$ ) as the ratio closing/opening.

### ***Estimation of photosynthetic capacity***

During the same time period as the estimations of the stomatal dynamics, Aci curves were performed from 178th DoY to 210). Gas exchanges were measured using three to four portable photosynthesis system (LI-COR 6400XT; LI-COR, Lincoln, NE, USA) equipped with a 2cm<sup>2</sup> leaf chamber. All A-Ci curves were carried out between 09:00 and 17:00 h (Central European summertime). The environmental parameters inside the chamber were kept constant during the acclimation phase at 400 ppm  $CO_2$ , with temperature regulated at 25°C, flow at 300 and a photonflux density at 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , the  $CO_2$  was then changed according to the following steps: 400-350-300-200-100-50-400-600-900-1200-1500-1800-2000 ppm. All the gas exchange measurements were performed on the same leaves as the ones used for dynamic measurements. “-Aci” suffix added to gaz exchange parameters as mentioned throughout the manuscript refers to the steady-state gaz exchange measurements extracted from A-ci curves after the initial acclimation to the conditions in the Licor chamber. Plant were acclimated until stomatal steady state was reached before the first measurement (~30-45min). Aci curves were fitted

using the R package “plantecophys” (R core team, 2015) based on the Farquhar-von Caemerer-Berry model of leaf photosynthesis: FvCB model (Farquhar et al., 1980).

### ***Final harvest***

At the end of the experiment on the 266<sup>th</sup> day of the year, heights (H) and diameters (D) were measured 4 cm above the roots collar, then all the plants harvested. The stems (SBm) and leaves (LBm) were dried and weighted separately, both constituting the above ground biomass (AGBm). The total leaf surface was also estimated (LS) according to the following allometry established in Gerardin & Brendel (2018):  $LS = 125.67 * LBm + 574.59$  ( $r^2 = 0.82$ ,  $n = 30$ )

Additionally, the root system was harvested, dried and the underground biomass (UGBm) has been measured for all the plants and divided between taproots and regular roots (TRBm and RBm, respectively). The tap roots were counted (nTR), weighted (TRBm) and their mean length measured (TRL). The root/shoot ratio has been estimated from the underground and above ground biomass (RS). The total dry biomass of the plants (TBm) was calculated as the sum of UGBm and AGBm.

The leaf of each plant used for gaz exchanges measurements was collected and split in half. One half was used for the determination of the nitrogen (N) and carbon (C) content as well as bulk leaf carbon isotope composition ( $\delta^{13}C$ ). The other half was used to characterize the stomatal morphology (described above).

### ***Transpiration efficiency estimation***

In order to estimate TE, the total water consumption (TWC) of the plants has been measured by adding the amount of water from all the watering cycles of each plant over a four months period from mid-May (135<sup>th</sup> DoY) to the final harvest in September (266<sup>th</sup> day). In addition, the water soil evaporation of 4 empty pots (2 for control and 2 for drought) has been measured and the daily water evaporation subtracted to the total water consumption of each plant. Since, the seedlings were almost 2 months old when the water consumption monitoring started, the initial biomass had to be estimated. To accurately estimate the biomass accumulation over the same period as the water consumption. Initial biomass at the start of the experiment was estimated on six additional seedlings. The height of these seedlings was measured, then they were harvested, dried and weighed. The data was combined with existing allometric data between seedlings biomass and seedlings height (Gerardin & Brendel, 2018) and used to estimate the initial biomass (iBm) of each plant.

$$iBm = 0.62e(0.0062 * H) \quad r^2 = 0.98 \quad (n = 72)$$

with iBm, the initial dry biomass and H the height of the plants at the moment of the estimation.

Accumulated biomass (ABm) was estimated as the difference between final (TBM) and initial (iBm) biomasses. Transpiration efficiency (TE) was calculated as the ratio between ABm and TWC

Additionally, ABm and TWC were standardized to the final leaf surface (BmS and TWCS: see table A) to have upscaled variables comparable to net CO<sub>2</sub> assimilation per leaf surface and stomatal conductance to water vapour per leaf surface.

### ***Statistical analysis***

All statistical analyses were performed with R 3.4.3 (R Core Team (2015)). Statistical differences between treatments were analyzed as a one factorial design by analysis of variance (t-test, n=60). Significant differences were considered at  $P < 0.05$ . Dynamic parameters (n=60) were analysed by a two-factorial Type III ANOVA (treatment, environmental factor and their interaction). To test the correlations between measured traits a two-factorial ANCOVA analysis was used to take the treatment effect into account ( $Y = \text{treatment} + X$ ). For each table of ANCOVA analyses, the significance level of the whole model was adjusted for multiple testing using FDR (False Discovery Rate) from the p.adjust function. All ANCOVA data-sets were tested for outliers using the generalized (extreme Studentized deviate) ESD test (Rosner et al., 1983), and the existence of an outlier that would render the ANCOVA without it non-significant is indicated by a “§” sign.

## Results

### WUE estimators

**Table 2** : Water use efficiency estimators and their components (mean  $\pm$  SE). t-test between groups are presented in right columns (P values ; “\*\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*\*” for  $P < 0.05$ ).

	Control n=30	Drought n=30	t test
TWCS	9,52 $\pm$ 0,36	9,23 $\pm$ 0,35	
ABmS	0,05 $\pm$ 0	0,05 $\pm$ 0	
TWC	25,3 $\pm$ 1,2	14,7 $\pm$ 0,8	***
TE	5,43 $\pm$ 0,12	5,89 $\pm$ 0,13	*
ABm	136,2 $\pm$ 6,2	86,8 $\pm$ 5,3	
$\delta^{13}C$	-30,13 $\pm$ 0,16	-29,63 $\pm$ 0,18	*
Vmax	60,89 $\pm$ 3,87	71,25 $\pm$ 3,93	.
Jmax	89,63 $\pm$ 6,33	100,05 $\pm$ 6,31	
A-m	15,69 $\pm$ 0,81	9,12 $\pm$ 0,47	***
$g_s$ -m	0,31 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	***
Wi-m	61 $\pm$ 4	134 $\pm$ 6	***
A -co2	13,68 $\pm$ 1,35	14,03 $\pm$ 1,23	
A -PAR	14,99 $\pm$ 0,81	10,99 $\pm$ 0,47	***
A -vpd	15,51 $\pm$ 0,64	10,03 $\pm$ 0,85	***
$g_s$ -co2	0,19 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	**
$g_s$ -irc	0,22 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01	***
$g_s$ -vpd	0,26 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01	***
Wi -co2	77 $\pm$ 7	106 $\pm$ 5	**
Wi -irc	77 $\pm$ 5	117 $\pm$ 5	***
Wi -vpd	72 $\pm$ 5	120 $\pm$ 6	***

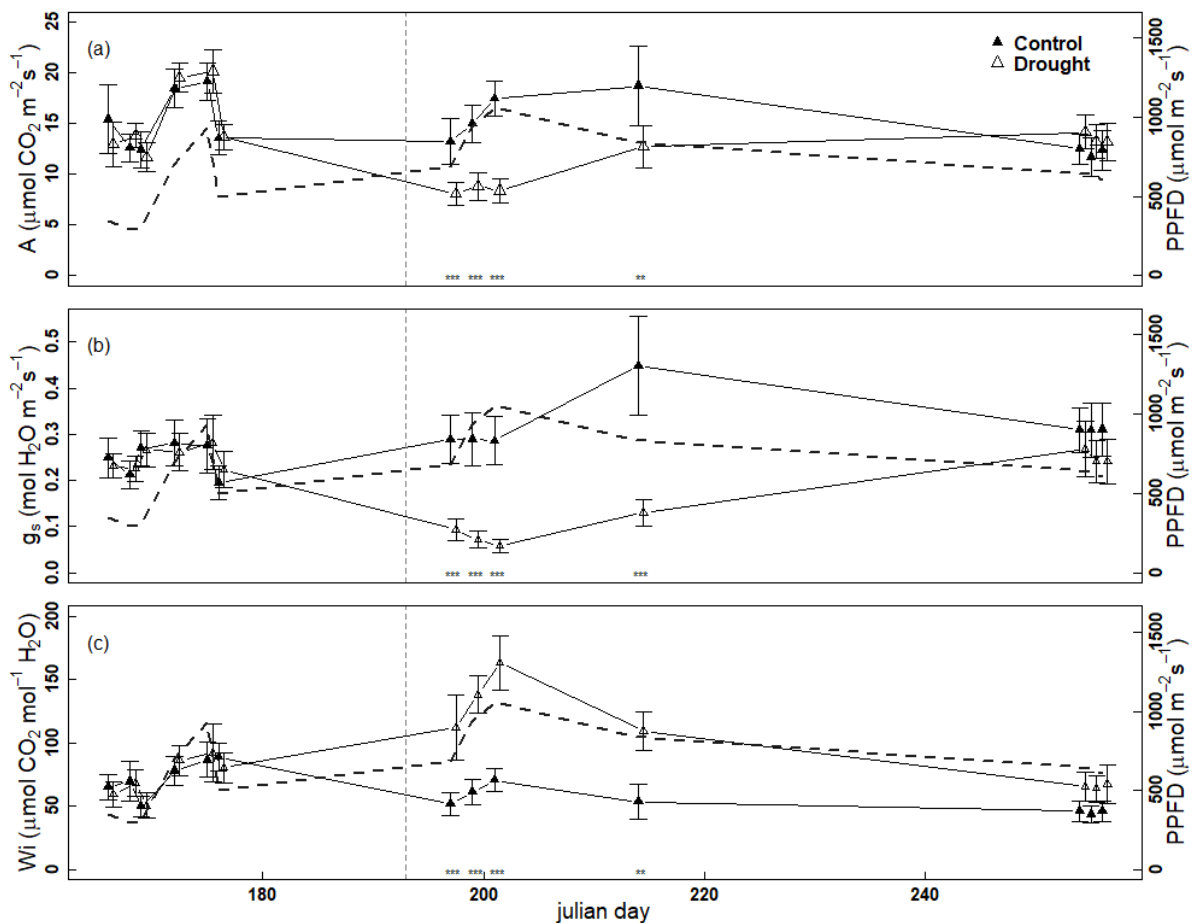
WUE was assessed by several estimators integrated at different scales. We extracted steady state measurements from the kinetics curves (table 2). At saturating light  $A_n$  ranged from 13.7 to 15.5  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  among steady states for the control group. Under drought,  $A_n$  values were globally significantly smaller (-30%) except from the  $\text{CO}_2$  curve's steady states. Stomatal conductance followed quite a similar pattern, control values ranging from 0.19 to 0.26  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  while  $g_s$  decreased significantly under drought ranging from 0.09 to 0.13  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  among steady states. Overall, these combinations of  $A_n$  and  $g_s$  values led to  $W_i \sim 77$  and  $\sim 115 \mu\text{mol mol}^{-1}$  under control and stress conditions, respectively.  $A_n$ -m values from greenhouse (“*in situ*”) measurements were similar to the top range of steady states in control plants ( $\sim 15.7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), while stressed seedlings displayed the lowest values ( $9.12 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).  $g_s$ -m followed the same trend, ranging from 0.31 in control to 0.08 under stress. These combinations resulted in slightly lower and higher  $W_i$ -m under water control and stressed conditions ( $\sim 60$  and  $\sim 135 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), respectively, compared to the  $W_i$ -Aci. Additionally, no significant differences in photosynthetic capacity were found between control and drought (t-test,  $n=60$ ), albeit a slight tendency to higher values under drought. Integrated measurements of WUE through leaf isotopic discrimination ( $\delta^{13}C$ ) were slightly but significantly higher in stressed plants (less negative



values). Upscaled to the whole plant level, stressed plants produced ~40% less biomass (ABm) and consumed significantly less water (~78% TWC) resulting in higher whole plant transpiration efficiency (TE).

Altogether, steady states  $W_i$  correlated with each other displaying positive correlations ranging from 0.08 to 0.19, the tightest relation being found between  $W_i$ -vpd and  $W_i$ -co<sub>2</sub>, whilst *in situ* water efficiency ( $W_i$ -m) correlated poorly with steady states  $W_i$  (Table 5). Furthermore,  $\delta^{13}C$  correlated significantly with CO<sub>2</sub> and PPFD steady state  $W_i$ , however, not with *in situ*  $W_i$ -m and correlated relatively poorly with TE ( $pR^2$  0.08) although,  $\delta^{13}C$  correlated with both of its components.

### Drought impact on gaz exchanges monitoring (Fig 1)



**Figure 1** : Monitoring of the net assimilation carbon rate : A (a), the stomatal conductance  $g_s$  : (b) and the water use efficiency  $W_i$  : (c) through the experiment (mean  $\pm$  SD). With, plain black triangles for the control plants and open triangles for droughted ones, the PPFD in black dotted line and the start of the drought marked by the vertical dotted line. The differences between treatments at given date from a t-test are presented as : P values : “\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*” for  $P < 0.05$ . To avoid overlapping values and slightly improve the visibility, droughted group monitoring has been shifted by a day

We monitored *in situ* gas exchange on plants in the greenhouse during the whole experiment. At the beginning, when plants were submitted to non-stressed conditions (26%SVH), both groups displayed similar  $A_n$  values ranging from  $\sim 13.0$  to  $\sim 20.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Then on the 197<sup>th</sup> DoY one week after drought start (13%SVH),  $A_n$  dropped to  $\sim 8.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in the drought treatment displaying significantly lower values than the control plants remaining at  $\sim 13.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Under drought,  $A_n$  stabilized to significantly lower values than non-stressed conditions until the 214<sup>th</sup> day and increased at the end of the monitoring reaching back the initial values similar to the control treatment (Fig 1a).

The stomatal conductance  $g_s$  followed the same starting pattern, where stomatal conductance was not significantly different between both plant-groups under non-stressed conditions with values around  $\sim 0.25 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . When the drought conditions were applied,  $g_s$  dropped significantly below the control plants to under  $0.1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig 1b). Then, the stomatal conductance in drought treatment increased back to similar values to the control treatment at the end of the experiment.

The similar  $A_n$  and  $g_s$  values resulted in similar  $W_i$   $\sim 60$ - $80 \mu\text{mol mol}^{-1}$  in both groups under non-stressed conditions (Fig 1c). Then  $W_i$  increased to above  $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$  under drought conditions reaching significantly higher values than control plants.  $W_i$  values slightly decreased to similar values than control plants  $\sim 50$ - $60 \mu\text{mol mol}^{-1}$  at the end of the monitoring.

### ***Drought impact on growth***

The experimental drought induced significant differences of biomass production and water use (t-test  $n=60$ ). All measured biomass traits were significantly reduced under drought. Overall, stressed plants produced  $\sim 40\%$  less biomass (TBm) than control seedlings, mainly due to reduction in above ground biomass ( $\sim 55\%$  AGBm) compared to the  $-36\%$  in underground compartment (UGBm). Thus, stressed seedlings produced proportionally more root biomass. Nevertheless, under both treatments, seedlings invested much more biomass in the underground compartment than aboveground, twice as much and three times more in Control and stressed plants, respectively (RS). Under drought, the plants also displayed slower flush development (by one flush) associated with reduced height (H) and diameter (D) increments ( $\sim 40\%$  and  $13\%$ , respectively, Table 3). In addition, leaf biomass (LBm) was tightly correlated to the total biomass (TBm) inside both drought and control treatments ( $r^2$  0.78 and,  $r^2$  0.62, respectively), which along with flush slower development led to significantly reduced LBm and leaf surface area (LS) under stress ( $-40\%$ ).

**Table 3** : Morphological traits (mean  $\pm$  SE by treatment). With t-test results : P values ; “\*\*\*” for  $P < 0.001$  ; “\*\*” for  $P < 0.01$  and “\*” for  $P < 0.05$ ).

	Control (n=30)	Drought (n=30)	t-test
SBm	30,65 $\pm$ 2,45	13,18 $\pm$ 1,12	***
CBm	5,2 $\pm$ 0,51	3,35 $\pm$ 0,21	**
TRBm	30,1 $\pm$ 1,77	23,65 $\pm$ 1,53	**
RBm	48,04 $\pm$ 2,99	33,8 $\pm$ 2,31	***
FRBm	22,39 $\pm$ 0,82	18,5 $\pm$ 0,63	***
AGBm	39,39 $\pm$ 2,7	18,78 $\pm$ 1,38	***
UGBm	78,14 $\pm$ 3,55	57,45 $\pm$ 3,49	***
RS	0,51 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,02	***
LBm	19,38 $\pm$ 1,12	11,85 $\pm$ 0,92	***
LS	2768 $\pm$ 160	1692 $\pm$ 132	***
H	114,2 $\pm$ 6,6	67,5 $\pm$ 3,7	***
D	13,08 $\pm$ 0,38	11,01 $\pm$ 0,26	***
TBm	139,49 $\pm$ 6,37	89,52 $\pm$ 5,48	***
nF	4 $\pm$ 0,11	3,2 $\pm$ 0,07	***
nB	4 $\pm$ 0,72	3,67 $\pm$ 0,55	
SD	618 $\pm$ 16	632 $\pm$ 21	
OL	13,26 $\pm$ 0,13	13,57 $\pm$ 0,19	
GCL	24,75 $\pm$ 0,23	24,94 $\pm$ 0,28	
GCW	18,15 $\pm$ 0,17	18,42 $\pm$ 0,2	
SC	53,8 $\pm$ 0,58	54,46 $\pm$ 0,48	
SS	353,8 $\pm$ 6,14	361,79 $\pm$ 7,8	
SPI	108406 $\pm$ 2977	115144 $\pm$ 2999	
N	1,59 $\pm$ 0,07	2,19 $\pm$ 0,11	***
C	45,20 $\pm$ 0,16	46,17 $\pm$ 0,21	***

### ***Stomatal morphology***

The leaves sampled for stomatal morphology were also used for gas-exchange and kinetics measurements. They developed under non-restricted conditions and were fully mature before the start of the experimental drought. No significant difference between control and drought was detected for any of the measured stomatal morphology traits, indicating an absence of sampling bias between the two plant groups (Table 3). Overall, a small negative correlation between stomatal size (SS) and stomatal density (SD) was detected ( $r^2$  0.09 : data unshown).

### ***Stomatal dynamics induced by step changes of irradiance***

Reducing the PPFD induced a stomatal closing sequence.  $g_s$  decreased by respectively 0.13 and 0.7 in control and drought ( $\delta g_s$ ), which corresponded to similar relative closures ( $\Delta g_s \sim 55-60\%$ ) between the two treatments while  $A_n$  decreased by  $7.4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and  $5.2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in control and drought groups, also corresponding to similar relative assimilation decreases by 45% ( $\Delta A$ ). For stomatal dynamics,  $\tau_{cl}$  (response time closing) was significantly lower for stressed plants than control (116 and 285 s,

respectively),  $\lambda_{cl}$  (closing lag time) followed the same pattern, indicating faster responses (Table 4). However, the maximum slope of stomatal closing ( $SL_{cl}$ ) was not significantly different between the two treatments, due to a compensation between faster times and a decreased amplitude. A similar result was obtained during opening,  $SL_{op}$  was also not significantly different between treatments and both  $\tau_{op}$  and  $\lambda_{op}$  were lower under drought. In addition, an asymmetrical response was detected by the paired t-test for all three parameters under stress treatment while only detected for  $SL_{op}$  under control. When detected asymmetry was characterized by slower responses during opening (higher values of  $\tau$ ,  $\lambda$  and lower SL value) due to the faster drought induced kinetics during closing (although both closing and opening are faster under drought). Moreover, increasing PPFD back to the initial steady state induced a smaller re-opening than the closing sequence, thus smaller values of  $\delta g_s$  and  $\Delta g_s$ .

#### ***Stomatal dynamics induced by step changes of ambient [CO<sub>2</sub>]***

Both  $\tau$  and  $\lambda$  displayed lower values (faster responses), while SL was higher under stress (Table 4). Once [CO<sub>2</sub>] reduced,  $g_s$  re-increased by ~52% ( $\Delta g_s$ ). All three dynamic parameters ( $\tau$ ,  $\lambda$  and SL) followed the same patterns by still displaying slower responses in control group and similarly to irradiance dynamics during closing, describing an asymmetrical response under stress. Elevating [CO<sub>2</sub>] induced stomatal closing. In response, A slightly increased by respectively 1.0 (13.9%  $\Delta A$ ) and 3.0 (28.9%  $\Delta A$ ) in control and drought groups, followed by a similar  $g_s$  decrease by ~63% ( $\Delta g_s$ ) compared to irradiance.

#### ***Stomatal dynamics induced by a step change of VPD***

Compared to the two other factors, the step change in VPD resulted in a similar absolute stomatal decrease as irradiance and CO<sub>2</sub> curves but in the smallest relative decreases (~51% and 34%  $\Delta g_s$ ) under control and stress conditions, respectively. Such decrease was associated with a ~33%  $\Delta A$  reduction regardless of the treatment. VPD dynamics were also faster under stress, however, to the contrary of irradiance and [CO<sub>2</sub>] dynamics, SL was higher for control plants due the higher  $\delta g_s$  involved in its calculation. Stomata were very slow to reopen, therefore due to practical reasons the opening sequence has not been estimated; although not recorded, the reopening happened roughly 45-60min after VPD changes suggesting a strong asymmetry marked by small  $\tau$ ,  $\lambda$  and SL ratios.

#### ***Comparisons between PPF, VPD and [CO<sub>2</sub>] induced stomatal dynamics.***

The three factors globally induced similar stomatal movements. During closing sequences inside each treatment, absolute stomatal amplitudes were similar between PPF and CO<sub>2</sub> but slightly lower under drought for VPD responses. During opening, PPF amplitudes were slightly lower in drought conditions however, no differences among environmental factors were detected by ANOVA in both closing and opening sequences. Overall, induced responses were faster under drought compared to control for  $\tau$

and  $\lambda$  for closing kinetics. Both CO<sub>2</sub> and irradiance opening sequences were of lower stomatal amplitudes than closing responses. Significant differences in stomatal dynamics parameters between factors were found. For relatively similar induced stomatal amplitudes, [CO<sub>2</sub>] responses were altogether, the fastest for both closing and opening sequences in both response times ( $\tau$ ) and maximal slope (SL), while displaying similar  $\lambda$  dynamics compared to irradiance. VPD responses were the slowest in all treatments, sequences and parameters ( $\tau$  and  $\lambda$ ) while inducing the smaller amplitudes for both A<sub>n</sub> and g<sub>s</sub> decreases. In addition, for CO<sub>2</sub> and PPFD, all significant asymmetrical responses were due to faster closing and were mostly found under water stress for  $\tau$  and a tendency for  $\lambda$ -PPFD due to a more accelerated closing compared to opening. Furthermore, SL always displayed lower values for opening thus, indicating slower openings. It is also worth noticing that, none of the dynamic parameters correlated (ANCOVA : unshown) with any of the stomatal morphology parameters, nor with TE and its components (data unshown due to the lack of correlations).

**Table 4** : Dynamic parameters as well as their ratios per factor and treatment (mean  $\pm$  SE ; n=45-60) for opening and closing sequences. The results from ANOVA (T : Treatment effect/ F : environmental factor effect / I : interaction F\*T) are given below each parameters while Paires t-test figure between the tested parameters columns: P values : “\*\*\*” for P<0.001 ; “\*\*” for P<0.01 and “\*” for P<0.05.

			Closing	Paired t-test	Opening	ratio cl/op
Control	CO2		180 $\pm$ 19	ns	179 $\pm$ 23	1,21 $\pm$ 0,27
Drought	CO2		79 $\pm$ 8	***	178 $\pm$ 20	0,53 $\pm$ 0,07
Control	PPFD	$\tau$	285 $\pm$ 29	ns	321 $\pm$ 46	0,83 $\pm$ 0,13
Drought	PPFD	(sec)	116 $\pm$ 8	***	196 $\pm$ 20	0,58 $\pm$ 0,03
Control	VPD		345 $\pm$ 32			
Drought	VPD		232 $\pm$ 40			
T			***		*	***
F			***		**	
F*I					*	
Control	CO2		308 $\pm$ 19	*	362 $\pm$ 21	0,84 $\pm$ 0,07
Drought	CO2		262 $\pm$ 18	**	359 $\pm$ 27	0,73 $\pm$ 0,09
Control	PPFD	$\lambda$	307 $\pm$ 25	ns	433 $\pm$ 74	0,75 $\pm$ 0,08
Drought	PPFD	(sec)	177 $\pm$ 9	***	280 $\pm$ 25	0,63 $\pm$ 0,04
Control	VPD		649 $\pm$ 48			
Drought	VPD		482 $\pm$ 35			
T			***		.	.
F			***		.	.
F*I					.	.
Control	CO2		3,3 $\pm$ 0,46	**	2,01 $\pm$ 0,28	2,35 $\pm$ 0,35
Drought	CO2		4,09 $\pm$ 0,53	***	1,59 $\pm$ 0,37	4,2 $\pm$ 1,02
Control	PPFD	SL	2,13 $\pm$ 0,26	**	1,18 $\pm$ 0,3	3,31 $\pm$ 0,65
Drought	PPFD	mol m <sup>-2</sup> s <sup>-2</sup> *10 <sup>-5</sup>	2,09 $\pm$ 0,14	***	0,73 $\pm$ 0,08	3,66 $\pm$ 0,29
Control	VPD		1,99 $\pm$ 0,31			
Drought	VPD		0,86 $\pm$ 0,13			
T					.	*
F			***		***	
F*I			**			
Control	CO2		0,13 $\pm$ 0,01	***	0,11 $\pm$ 0,02	

Drought	CO2		0,08 ± 0,01	*	0,06 ± 0,01
Control	PPFD	ΔG	0,13 ± 0,02	ns	0,10 ± 0,03
Drought	PPFD	mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	0,07 ± 0,01	***	0,03 ± 0,00
Control	VPD		0,14 ± 0,02		
Drought	VPD		0,04 ± 0,01		
T			***		***
F					
F*					
Control	CO2		-67,02 ± 2,47	***	-54,8 ± 4,2
Drought	CO2		-61,63 ± 3,31	**	-49,6 ± 4,0
Control	PPFD	ΔG	-59,49 ± 2,94	**	-41,9 ± 5,2
Drought	PPFD	%	-55,42 ± 1,69	***	-40,0 ± 2,0
Control	VPD		-50,82 ± 3,27		
Drought	VPD		-34,36 ± 2,97		
T			***		***
F			***		***
F*			*		*
Control	CO2		-1,0 ± 1,9		
Drought	CO2		-3,2 ± 0,8		
Control	PAR	ΔA	7,4 ± 0,6		
Drought	PAR	μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	5,2 ± 0,3		
Control	VPD		5,5 ± 0,6		
Drought	VPD		2,9 ± 0,3		
T			***		
F			***		
F*					
Control	CO2		13,9 ± 8,9		
Drought	CO2		28,9 ± 8,5		
Control	PAR	ΔA	-48,7 ± 2,6		
Drought	PAR	%	-46,9 ± 1,4		
Control	VPD		-35,9 ± 3,6		
Drought	VPD		-31,6 ± 3,0		
T			.		
F			***		
F*					

### **WUE with biomass**

Overall, each biomass trait displayed a relatively high positive correlation with ABm, the lowest being found for H (pR<sup>2</sup> 0.18\*\*\*) and the highest (TBm apart) observed with underground biomass (UGBm; pR<sup>2</sup> 0.53\*\*\*; see Table 7). TWC followed the same pattern to a lesser extent with smaller correlations. It appeared clearly that TWC and ABm were linked by a tight relationship (pR<sup>2</sup> 0.45\*\*\*).

Field gas exchange measurements (A<sub>n-m</sub> and g<sub>s-m</sub>) displayed a few small positive correlations with biomass traits, pR<sup>2</sup> value ranging from 0.05 to 0.09 for SBm, AGBm, RS and H. In addition, g<sub>s-m</sub> was found to correlate with both A<sub>n-m</sub> (+ 0.34) and Wi-m (- 0.12) whilst A<sub>n-m</sub> displayed a weaker negative correlation with Wi-m (0.06).

However, a high positive correlation between  $\delta^{13}\text{C}$  and N was found ( $pR^2$  0.44), where the latter also correlated positively with TWC and negatively with ABm (0.16 and 0.14, respectively). Once TWC and ABm reported to leaf surface, correlations with N were higher and changed direction ( $pR^2$  0.19 with TWCS and 0.29 with ABmS). Furthermore, among photosynthetic traits,  $V_{\text{max}}$  displayed small negative correlations with TWC and ABm (0.06 and 0.05, respectively) but higher positive correlations with ABmS and  $\delta^{13}\text{C}$  (0.1 and 0.12, respectively). Leaf nitrogen content also explained 23% of variation in  $V_{\text{max}}$  and 15% of variation in  $J_{\text{max}}$  (data not shown).

Whole plant transpiration (TE) is positively correlated with ABm (ABm,  $pR^2$  0.09), but not with TWC. Concerning the different biomass traits, variation in TE was most strongly driven by variation in underground biomass, rather than above ground. However, a negative correlation was found with TWCS, ( $pR^2$  0.1), probably driven by the variation in leaf surface while TWCS did not correlate significantly with mean stomatal conductance measured *in situ* during mostly sunny days. In summary TE correlated positively with most of other WUE estimators, except  $W_i\text{-CO}_2$ . These correlations were stronger for intrinsic water efficiency than bulk leaf  $\delta^{13}\text{C}$ . Furthermore, TE was negatively correlated to stomatal conductance field measurements.  $\delta^{13}\text{C}$  correlated positively with the steady state  $W_i$  estimates, however not with the *in situ* measurements.

### ***Correlations of Dynamic parameters to WUE***

Only relatively few highly significant correlations were detected between stomatal dynamic parameters and TE and underlying variables, and only concerning  $\text{CO}_2$  and irradiance-mediated responses, when using ANCOVA analysis and thus removing any drought effect (Table 5). TE was not found to be related to variations in stomatal dynamics, however a negative significant covariance driven by some extreme points was found between the TE components TWC / ABm and the lag time ( $\lambda$ ) and response time ( $\tau$ ) for the  $\text{CO}_2$  opening sequence. At the leaf level, where integrated intrinsic WUE, as reflected by  $\delta^{13}\text{C}$  was related positively to the  $\text{CO}_2$  lambda opening as well as negatively to SL for  $\text{CO}_2$  closing, both relating a higher WUE to slower stomata. The mean WUE of *in situ* measurements ( $W_i\text{-m}$ ) covaried also positively with  $\text{CO}_2$  lambda opening and negatively with the closing-to-opening ratios of tau irradiance and lambda  $\text{CO}_2$ , the latter covariances indicating that higher WUE was related to faster closing and slower opening. Overall, except  $SL_{\text{cl}}\text{-CO}_2$ , none of the closing related parameters covaried with any of the WUE estimates.

Out of 21 dynamic parameters, only 3 covaried significantly and positively with mean in-situ  $g_s$  ( $g_s\text{-m}$ ). Here, mainly a shorter (faster) closing response time ( $\tau$ ) for  $\text{CO}_2$  as well as light covaried with a lower  $g_s\text{-m}$ . Additionally, significant positive covariances were found with closing-to-opening ratios for  $\tau\text{-CO}_2$  and light as well as  $\lambda\text{-CO}_2$  and  $g_s\text{-m}$ , indicating that the increased WUE could be attributed to faster

closing stomata. Covariances between stomatal dynamics and  $A_n$  were also positive, suggesting a stomatal control over  $A_n$  and thus WUE. None of dynamic parameters correlated directly with  $\delta^{13}C$ , TE nor its components at the exception of the negative  $\lambda_{op}\text{-CO}_2/\text{TWC}$ ,  $\lambda_{op}\text{-CO}_2/\text{ABm}$  and  $\text{SL}_{op}\text{-PPFD}/\text{ABmS}$  relationships. One of the few significant correlations between stomatal dynamics and TE components, was with lag time, for which faster opening was associated with greater water loss and biomass gain. Furthermore, when found significant, asymmetrical responses were correlated negatively ( $\tau_r$ ) as well as positively ( $\text{SL}_r$ ) with  $\text{Wi-m}$  indicating that a slower opening compared to closing resulted in higher  $\text{Wi}$ . However,  $\tau_r\text{-PPFD}$  correlated more strongly and positively with  $g_{s-m}$  than with  $A_n\text{-m}$ , suggesting that slower opening than were found in plants with the more opened stomata.

**Table 5** : ANCOVA table of Biomass traits and WUE estimators/components, testing covariate are presented in left column, each case. when found significant figure in order: correlations signs, covariate partial  $R^2$  values and significance degree (P values; “\*\*\*” for  $P<0.001$ ; “\*\*” for  $P<0.01$  and “\*” for  $P<0.05$ ,  $n=60$ ).

	TWC	TWCS	ABmS	ABm	TE	$\delta^{13}C$	$g_{s-m}$	$A_n\text{-m}$	$\text{Wi-m}$
$\tau_{cl}\text{-co}_2$									
$\tau_{cl}\text{-PPFD}$							(+) 0.06 **	(+) 0.09 **	
$\tau_{cl}\text{-vpd}$									
$\lambda_{cl}\text{-co}_2$									
$\text{L}_{cl}\text{-PPFD}$								(+) 0.04 *	
$\lambda_{cl}\text{-vpd}$									
$\text{SL}_{cl}\text{-co}_2$									
$\text{SL}_{cl}\text{-PPFD}$									
$\text{SL}_{cl}\text{-vpd}$									
$\tau_{op}\text{-co}_2$									
$\tau_{op}\text{-PPFD}$									
$\lambda_{op}\text{-co}_2$	(-) 0.18 **				(-) 0.19 **				
$\lambda_{op}\text{-PPFD}$									
$\text{SL}_{op}\text{-co}_2$									
$\text{SL}_{op}\text{-irc}$			(+) 0.18 *						
$\tau_r\text{-co}_2$							(+) 0.17 **		
$\tau_r\text{-PPFD}$							(+) 0.14 **	(+) 0.07 *	(-) 0.05 *
$\text{L}_r\text{-co}_2$									
$\text{L}_r\text{-PPFD}$									
$\text{SL}_r\text{-co}_2$									(+) 0.14
$\text{SL}_r\text{-PPFD}$									***



**Table 6:** ANCOVA table of WUE estimator/components between themselves, columns represent the dependent variable, the covariate are presented in left column, in each case, when found significant figure in order: correlations signs, covariate partial R<sup>2</sup> values and significance degrees (P values; “\*\*\*” for P<0.001; “\*\*” for P<0.01 and “\*” for P<0.05, n=60).

	TWC	TWCS	ABmS	ABm	TE	δ13C	g <sub>s</sub> -m	A <sub>n</sub> -m	Wi-m
TWC	-			(+) 0.51 ***		(-) 0.33 ***	(+) 0.08 **		
TWCS		-	(+) 0.74 ***	(-) 0.05 *	(-) 0.10 *				(-) 0.03 *
ABmS		(+) 0.73 ***	-						
ABm	(+) 0.45 ***	(-) 0.07 *		-	(+) 0.09 *	(-) 0.18 ***			
TE		(-) 0.11 *		(+) 0.06 *	-	(+) 0.08 *	(-) 0.07 **		(+) 0.04 **
δ13C	(-) 0.20 ***			(-) 0.12 ***	(+) 0.08 *	-			
g <sub>s</sub> -m	(+) 0.09 **				(-) 0.13 **		-	(+) 0.34 ***	(-) 0.11 ***
A <sub>n</sub> -m							(+) 0.29 ***	-	(-) 0.06 ***
Wi-m		(-) 0.09 *			(+) 0.12 **		(-) 0.18 ***	(-) 0.10 ***	-
Wi-co2					(+) 0.13 *	(+) 0.17 **			
Wi-PPFD						(+) 0.1 *			
Wi-vpd									

**Table 7:** ANCOVA table of Biomass traits and WUE estimators/components, testing covariate are presented in left column, each case. when found significant figure in order: correlations signs, covariate partial R<sup>2</sup> values and significance degree (P values; “\*\*\*\*” for P<0.001; “\*\*\*” for P<0.01 and “\*\*” for P<0.05, n=60).

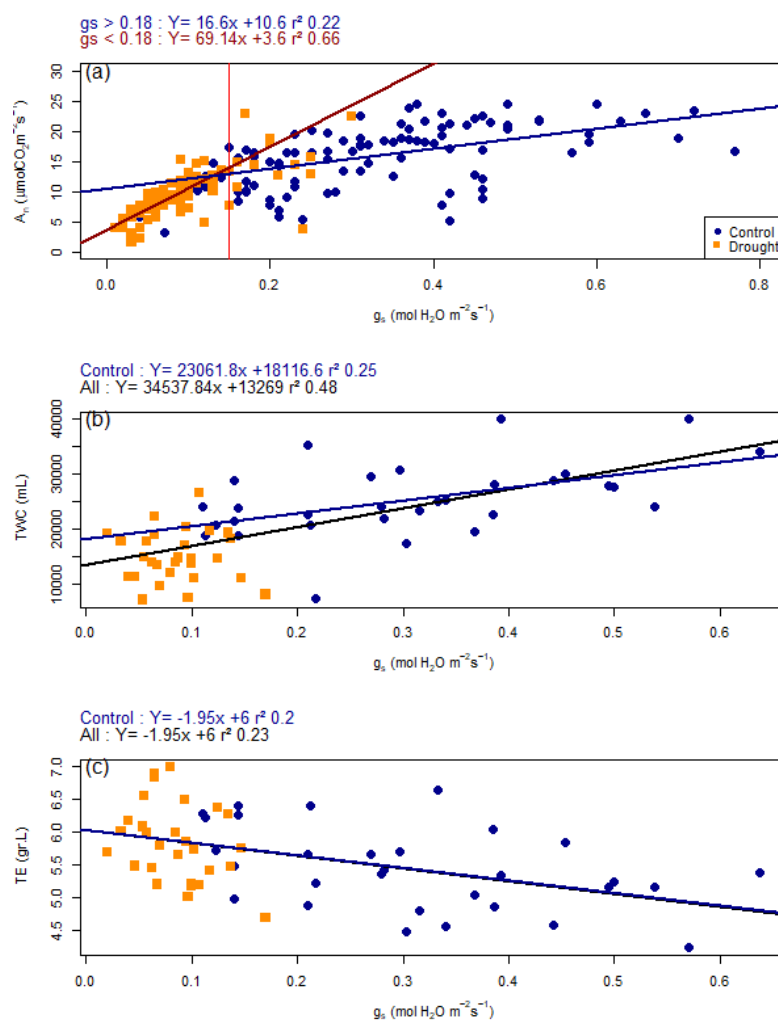
	TWC	TWCS	ABmS	ABm	TE	δ13C	g <sub>s</sub> -m	A <sub>n</sub> -m	Wi-m
SBm	(+) 0.3 ***	(-) 0.08 *		(+) 0.4 ***		(-) 0.09 *	(+) 0.06 **		
TRBm	(+) 0.28 ***			(+) 0.34 ***		(-) 0.15 **			
RBm	(+) 0.2 ***			(+) 0.35 ***	(+) 0.15 **	(-) 0.09 *			
AGBm	(+) 0.35 ***			(+) 0.43 ***		(-) 0.11 **	(+) 0.06 **		
UGBm	(+) 0.35 ***			(+) 0.53 ***	(+) 0.13 **	(-) 0.17 ***			
RS	(+) 0.04 *		(-) 0.11 *				(+) 0.05 *	(+) 0.07 **	
LBm	(+) 0.36 ***	(-) 0.42 ***	(-) 0.37 ***	(+) 0.44 ***		(-) 0.18 ***			
LS	(+) 0.36 ***	(-) 0.42 ***	(-) 0.37 ***	(+) 0.44 ***		(-) 0.18 ***			
H	(+) 0.2 ***	(-) 0.07 *		(+) 0.24 ***			(+) 0.09 ***	(+) 0.05 *	
TBm	(+) 0.45 ***	(-) 0.07 *		(+) 0.62 ***	(+) 0.08 *	(-) 0.19 ***			
D	(+) 0.31 ***	(-) 0.07 *		(+) 0.39 ***		(-) 0.15 **			
N	(-) 0.16 ***	(+) 0.19 ***	(+) 0.29 ***	(-) 0.14 ***		(+) 0.44 ***			
C									
Vmax	(-) 0.06 *		(+) 0.1 *	(-) 0.05 *		(+) 0.12 **			(+) 0.04 **
Jmax		(+) 0.14 **	(+) 0.2 ***						

## Discussion

### *Q.petraea* acclimation to drought

#### WUE upscaled from field measurements to whole plant transpiration efficiency

In this study, we explored the diversity of water use efficiency (WUE) in sessile oak through several estimates integrated at different scales. Seeds used in this experiment were selected from six sessile oak populations along a soil water balance gradient, to increase the within species diversity. Differences among populations were not tested as the number of seedlings from each population was too small to be representative.



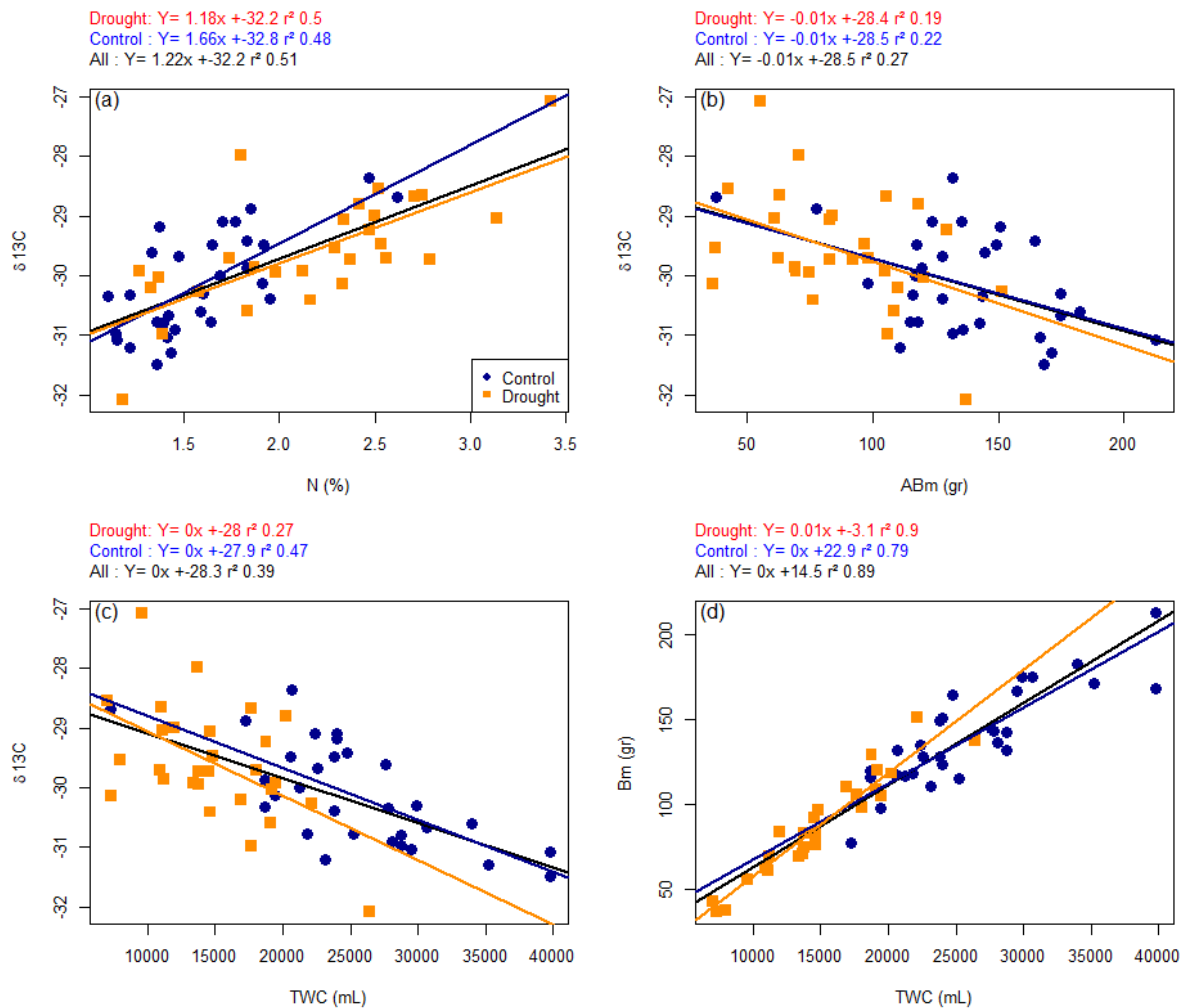
**Figure 2** : Relationships between the stomatal conductance and the net assimilation (a), the total of water consumption (b) and the transpiration efficiency (c). When found significant ( $p < 0.05$ ) correlations were added in orange (Drought treatment), blue (Control treatment) and black (all data).

In plants submitted to drought, all WUE estimates displayed significantly higher values than the control plants, thus drought impacted both instantaneous, integrated and whole plant gas exchange. Most of Wi-m variability was explained by  $g_s$  rather than  $A_n$ , in addition  $A_n$  was under tight stomatal control

(33%). Based on *in situ* measurement during drought (figure 2 : n=208), we observed that under  $0.18 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} g_s$  (principally drought plants),  $A_n$  and  $g_s$  followed a near linear relationship where  $A_n$  is strongly controlled by  $g_s$  and most likely decoupled from photosynthetic capacity. Such results were also demonstrated by Roussel et al., (2009) in a *Q. robur* seedlings for which the gas exchange variability was driven by the population genetic diversity. Most of the droughted plant showed a strong stomatal control while the wide stomatal opening of most of the control plants did not lead to an increased  $A_n$  (Fig 2a). Thus, the observed acclimation to drought induced a tight stomatal control, thereby increasing  $W_i$ . Most of  $W_i$  estimates poorly correlated with each other (Except  $W_i\text{-CO}_2/W_i\text{-PPFD}$ ) and no relationship between field measurements ( $W_i\text{-m}$ ) and steady-state  $W_i$  estimated under ambient  $\text{CO}_2$  and saturating light was established, highlighting a discrepancy between gas exchanges encountered in mid-morning *in-situ* (maximum stomatal opening ; Roussel et al 2009) and steady state values. Such poor correlations are often described between field measurements and steady state conditions (Poorter et al., 2016) as stable environmental conditions are unlikely to occur leading to uncoupled relations between  $A_n$  and  $g_s$ , both components varying at different temporal magnitudes.

Furthermore, our data displayed a covariation between integrated leaf isotopic discrimination ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and steady state  $W_i$ . Such correlations were previously found in another close oak species *Q. robur* (Brendel et al., 2008; Roussel et al., 2009a). However, ANCOVA analysis revealed that this relation explained at best 17% of the observed variability, also hinting toward the non-representative aspect of steady state measurements involved in  $\delta^{13}\text{C}$  variability. Nevertheless, field measurements were not correlated to bulk leaves  $\delta^{13}\text{C}$ , suggesting that the assimilation rate weighted integration of  $W_i$  in  $\delta^{13}\text{C}$  is dominated by high light situations, as represented by the steady-state measurements. Furthermore, one must keep in mind that isotopic measurements integrate  $W_i$  by being pondered by  $A_n$ .

Whole plant transpiration efficiency ultimately translates every single gas exchange between trees and their environment, however TE estimations in trees are not extensively reported due to the constraining measurements over growing seasons (Guehl et al., 1994; Cernusak et al., 2007; Roussel et al., 2009; Durand et al., 2019; Gerardin et al., 2019a). *In-situ*  $W_i$  measurements as well as  $\delta^{13}\text{C}$  estimates reflected between 8% and 12% of whole plant TE, driven mainly by variation in stomatal conductance, highlighting the fundamental role of stomatal regulation in *Q. petraea*. Stronger correlation between TE and  $\delta^{13}\text{C}$  (ANCOVA >40%) were found recently for *Q. robur* as well as for *Q. petraea* seedlings (Gerardin et al., 2019, Article 2 Chapitre III). Furthermore, the significant positive correlation between  $\delta^{13}\text{C}$  and leaf nitrogen content (Fig 3a) suggests that nitrogen uptake had an impact on photosynthetic capacity and therefore increased WUE. However, leaf nitrogen or  $V_{\text{max}}$  explained only very low levels of steady state or mean  $W_i$  (<5%).



**Figure 3** : Relationships between the leaf isotopic composition and the leaf nitrogen concentration (a) and biomass production (b). As well as relationships between the isotopic composition (c), the total biomass (d) and the total water consumed. When found significant correlations were added in orange (Drought treatment), blue (Control treatment) and black (all data).

No TE/TWC correlation was shown whereas biomass accumulation positively correlated with TE in accordance with a recent study assessing underlying traits of transpiration efficiency in *Quercus robur* and *petraea* (Gerardin et al., 2019a). Both studies converging toward a transpiration efficiency driven by biomass rather than water use, biomass accumulation itself driven by underground traits. Although only accumulated biomass correlated to TE, both TE components were negatively correlated to  $\delta^{13}C$ , suggesting that a higher leaf level WUE could result in less overall plant transpiration. The result that biomass accumulation also correlated negatively with  $\delta^{13}C$  and that no correlation with TE was detected suggests that for *Q. petraea* leaf level water use efficiency affects whole plant transpiration via stomatal regulation. This seems contrary to the lack of correlation between whole plant transpiration (TWC) and TE and the slight, but significant correlation between biomass accumulation (ABm) and TE. However, variation of leaf level WUE explained only a small percentage of variation in TE, which were more strongly related to variation in root biomass, and might also be affected by traits

that are involved in the upscaling from leaf to plant : carbon losses by respiration of the whole plant, except leaves during the day and water losses other than diurnal leaf transpiration, such as nocturnal water losses and water losses related to variation in leaf to air vapour pressure deficit variations (Cernusak et al., 2008).

### ***Experimental drought impact on stomatal dynamics***

#### ***First stomatal dynamics generally***

Overall, for  $\tau$  and SL, the order of responses was relatively consistent between opening/closing sequences as well as treatments: CO<sub>2</sub> changes induced faster responses than PPF while VPD responses were the slowest. Globally for CO<sub>2</sub> and PPF, opening and closing parameters were positively correlated (data unshown) suggesting similar mechanisms involved as previously observed within a relatively large range of species (McAusland et al., 2016). However, for  $\lambda$ , which is assumed to reflect stomatal sensing to environmental changes, no significant difference was detected between CO<sub>2</sub> and PPF, whereas the VPD response was also here the slowest. This could suggest that the CO<sub>2</sub> and PPF sensing result from similar mechanisms. It has been observed in literature that the stomata responses to irradiance during the day (thus, mainly red-light variations) and CO<sub>2</sub> responses might be both mediated by the changes in  $C_i$  caused by the photosynthetic response (Messinger et al., 2006; Engineer et al., 2016). However, drought, which overall resulted in faster responses, induced smaller  $\lambda$  values in PPF compared to CO<sub>2</sub>. This result could suggest a more rapid sensing of the PPF variation compared to CO<sub>2</sub> under drought stress and could be an indication that the CO<sub>2</sub> and PPF response depend partly on different sensing mechanisms, which are mediated by the drought stress. Nevertheless, the globally faster responses observed under drought for all three factors are suggesting common mechanisms or pathways involved in the acclimation to water stress.

Stomatal morphology such as stomatal size, density and patterning, which determine the maximal stomatal conductance achievable by the plants (Franks and Farquhar, 2001; Dow et al., 2014) could be involved in such a drought response. Recent studies established a link between stomatal speed of response and morphology. It has been proposed that smaller stomata associated with higher density could result in faster responses (Drake et al., 2013; Raven et al., 2014). The impact on stomatal morphology of leaves grown under drought seems to be dependent on species or genotypes (Theodorou et al., 2013, Laajimi et al., 2011, Gerardin et al., 2018). In the present study, no significant change in any stomatal morphology trait was detected in third flush leaves grown under control versus drought treatments. This corroborates the results found by Gerardin et al., (2019: Article 2,3) on *Q. petraea* and *Q. robur* and suggests that stomatal morphology could not play a role in the systematically observed decrease in response time ( $\tau_{cl}$ ) and lag time ( $\lambda_{cl}$ ) (faster responses) in plants submitted to

water stress. When taking into account the drought effect on stomatal dynamics, none of the observed within species variation in stomatal morphology traits correlated with any kinetic parameters nor TE estimates/components. Therefore, also within species variations of stomatal morphology were not driving observed variations in kinetic responses hinting towards other processes involved in water fluxes such as ion metabolism and transport (Blatt, 2000; Wang and Blatt 2011) or osmotic adjustment (Gao et al., 2005). Faster stomatal kinetics associated with reduced water availability were previously reported under experimental drought (Qu et al., 2016; Gerardin et al., 2018; Haworth et al., 2018), increased leaf water potential (Barradas et al., 1994) and drier climates (Vico et al., 2011). However, opposite observations were also shown among poplar trees subjected to drought stress (Durand et al., 2019). Nevertheless, our results corroborate the tendency to faster kinetics, which had been induced by irradiance steps in drought stressed *Q. robur* and *Q. petraea* seedlings recently reported by Gerardin et al. (2019a : Article 2 & 3). Temporal coupling between  $A_n$  and  $g_s$  enhanced by faster kinetics has been hypothesized (Lawson & Blatt, 2010) to impact to a large extent carbon gain and water loss integrated in both short- and long-term periods (i.e across the diurnal period or integrating seasonal fluctuations).

Although, stomatal kinetics recently received a great deal of attention, highlighting a large diversity of stomatal kinetics among species (Ooba et al., 2008; Vico et al., 2011; McAusland et al., 2016; Males & Griffiths, 2017; Kardiman & Ræbild, 2018 ;Durand et al., 2019) and growth conditions (Matthews et al., 2018; Arve et al., 2017; Gerardin et al.,2018; Gerardin et al., 2019a), not much is known about the integrated impact of kinetics on plant growth and water use over time. Lawson et al., (2010) established through modelling that faster kinetics resulted in improved transient WUE due to closer coupling between  $A_n$  and  $g_s$ , which was experimentally observed under water stressed conditions in rice plants (Qu et al., 2016). To our knowledge, only one study observed an impact of stomatal kinetics integrated in long term growth and water use (Durand et al.,2019), where a slower general response to variations in light resulted in higher water use of different poplar genotypes.

We were not able to establish a correlation between whole plant cumulative transpiration (per plant or per leaf surface) with dynamic parameters except for the  $CO_2$  opening time lag ( $\lambda$ ), which however was caused by outlier points. At the leaf level, faster stomatal closing, especially in response to  $CO_2$  resulted in higher  $W_i$  ( $\delta^{13}C$  or mid-morning  $W_i$ -m). Higher WUE was also related to the asymmetry of faster closing and slower opening, which was mainly driven by variation in the closing responses of stomata for  $CO_2$  and light. This is in accord with Ooba and Takahashi (2003), who had suggested that the asymmetry of stomatal closing to opening in response to fluctuating light affected transpiration more strongly than photosynthesis and that an asymmetry towards more rapid closing should then result in higher WUE.

## **Conclusions**

Drought acclimation resulted in different biomass allocation patterns between treatments. Although *Q.petraea* seedlings already heavily invested in the underground compartment under non-restrictive conditions, plants experiencing drought stress globally producing less biomass, invested proportionally more in root biomass while displaying a fine stomatal regulation on gas exchange preventing inefficient water loss.  $\delta^{13}\text{C}$  estimation poorly explained TE as well as intrinsic water use efficiency diversity, in contradiction with previous reports proposing  $\delta^{13}\text{C}$  as an efficient indicator of WUE. However, from leaf measurements to whole plant, diversity in water use efficiency was related to water use and stomatal regulation as well as biomass production. Thus confirming the importance of stomatal behaviors in *Q.petraea*. Additionally, we explored stomatal kinetics induced by three environmental factors (irradiance,  $[\text{CO}_2]$  and VPD), as well their plasticity under water stressed conditions. We demonstrated that reduced water availability induced faster kinetics regardless of the factor. Importantly, we observed that these kinetics were of different temporal magnitudes among factors, despite relatively similar stomatal amplitudes of responses.  $[\text{CO}_2]$ -induced responses were the faster, followed by irradiance kinetics then VPD-induced responses. These differences between factors as well as treatments were unrelated to stomatal morphology implying probable factors-specific mechanisms involved in their respective kinetics signalisation pathways. Nevertheless, the similar faster responses to water stress displayed by all three environmental factors hinted toward common process involved in response to drought, probably linked to plants hydric status whilst stomatal sensing remained constant. Therefore, further experiments are required in order to address the underlying processes and traits involved in the rapidity of stomatal responses as well as the potential impact of stomatal kinetics on gaz exchanges integrated other time.



### ***Declaration of interest***

All authors disclose any financial or personal conflict of interest.

### ***Author contributions***

OB designed the experiment, OB provided study material and environment, TG, and OB conducted the experiment, TG, OB did the data analysis, and TG, OB and DLT wrote the manuscript and were involved in the interpretation and critical discussion of the results, OB obtained funding.

### ***Acknowledgements***

TG acknowledges the PhD grant from the H2Oak ANR-14-CE02-0013 project. This study was part of the interdisciplinary « H2Oak » research project aiming to investigate the diversity for adaptative traits related to water use in two European white oaks (*Quercus robur* and *Quercus petraea*). the UMR Silva is supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12- LABXARBRE-01)

We thank Cyril Buré for the help with growing the seedlings and setting up the experiment on the robotic system and everyone who helped during the final harvest

## Bibliography

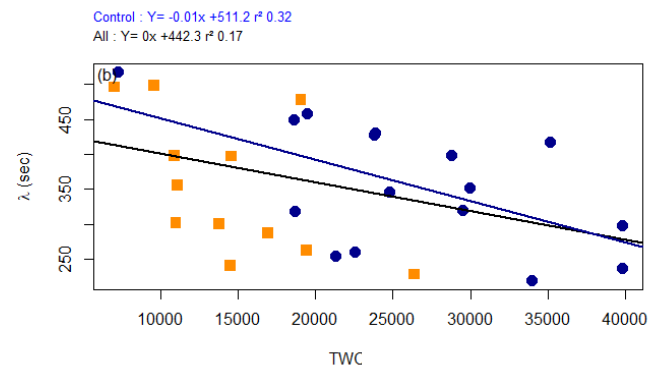
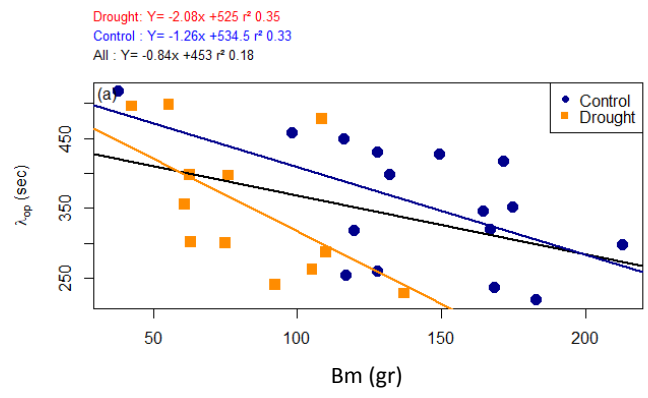
- Aasamaa K, Söber A (2011) Responses of stomatal conductance to simultaneous changes in two environmental factors. *Tree Physiol* 31: 855–864.
- Arve LE, Kruse OMO, Tanino KK, Olsen JE, Futsæther C, Torre S (2017) Daily changes in VPD during leaf development in high air humidity increase the stomatal responsiveness to darkness and dry air. *J Plant Physiol* 211: 63–69.
- Barradas VL, Jones HG, Clark JA (1994) Stomatal responses to changing irradiance in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 45(7) : 931-936.
- Belko N, Zaman-Allah M, Cisse, N, Diop NN, Zombre G, Ehlers JD, Vadez V (2012) Lower soil moisture threshold for transpiration decline under water deficit correlates with lower canopy conductance and higher transpiration efficiency in drought-tolerant cowpea. *Functional Plant Biology* 39(4) : 306-322.
- Blatt MR (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 221–241.
- Brendel O, Le Thiec D, Saintagne C, Kremer A, Guehl JM (2008) Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genet Genomes* 4:263–278.
- Cernusak L, Aranda J, Marshall J, Winter K (2007a) Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytologist* 173 : 294-305.
- Cernusak LA, Winter K, Aranda J, Turner BL (2008) Conifers, Angiosperm Trees, and Lianas: Growth, Whole-Plant Water and Nitrogen Use Efficiency, and Stable Isotope Composition ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ ) of Seedlings Grown in a Tropical Environment 1 [ W ][ OA ]. *Plant Physiol* 148:642–659.
- Clifford SC, Black CR, Robert JA, Stronach IM, Singleton-Jones PR, Mohamed AD, Azam-Ali SN (1995) The effect of elevated atmospheric  $\text{CO}_2$  and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis hypogaea* (L.)). *J Exp Bot.* 46, 847-852
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD (2002) Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop science* 42(1) : 122-131.
- Cowan IR, Farquhar GD (1977) Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment : Stomatal function in the regulation of gas exchange. In *Symposium of the Society of Experimental Botany*. Jennings DH (Ed). Cambridge University Press, Cambridge. 31 : 471-505.
- Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC (2014) The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 201: 1205–1217.
- Drake PL, Froend RH, Franks PJ (2013) Smaller, faster stomata : scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J Exp Bot* 64: 495–505.
- Durand M, Brendel O, Buré C, Le Thiec D (2019) Altered stomatal dynamics induced by changes in irradiance and vapour-pressure deficit under drought : impacts on the whole plant transpiration efficiency of poplar genotypes. *New Phytologist* 222 :1789-1802.

- Engineer CB, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Israelsson-Nordström M, Azoulay-Shemer T, Rappel WJ, ... & Schroeder JI (2016) CO<sub>2</sub> sensing and CO<sub>2</sub> regulation of stomatal conductance: advances and open questions. *Trends in plant science* 21(1) : 16-30.
- Farquhar G, Richards R (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11 : 539-552.
- Franks PJ, Farquhar GD (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol* 143: 78–87.
- Gao X, Zou C, Wang L, Zhang F (2005) Silicon improves water use efficiency in maize plants. *Journal of plant nutrition* 27(8) : 1457-1470.
- Gerardin T, Douthe C, Flexas J, Brendel O (2018) Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environ Exp Bot*.
- Gerardin TPH, Le Thiec D, Brendel O (2019a) Biomass accumulation drives whole plant transpiration efficiency differences between two related sympatric oaks species : importance of underground biomass production in response to drought in *Quercus robur* & *Quercus petraea* seedlings (unpublished yet)
- Gerardin TPH, Brendel O (2019b) *Impact of a progressive drought on growth rate and gas exchange between Quercus robur and Quercus petraea* (unpublished yet)
- Gholipour M, Prasad PV, Mutava RN, Sinclair TR (2010) Genetic variability of transpiration response to vapor pressure deficit among sorghum genotypes. *Field Crops Research* 119(1) : 85-90.
- Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P (1994) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiol* 14:707–724.
- Haworth M, Marino G, Cosentino SL, Brunetti C, De Carlo A, Avola G, Centritto M (2018) Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 147: 116-124.
- Hetherington AM, Woodward FI (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951): 901-908.
- Hörak H, Kollist H, Merilo E (2017) Fern Stomatal Responses to ABA and CO<sub>2</sub> Depend on Species and Growth Conditions. *Plant Physiol*. 174 : 672–679.
- Jones HG (1977) Transpiration in barley lines with differing stomatal frequencies. *J Exp Bot* 28: 162–168
- Kardiman R, Ræbild A (2017) Relationship between stomatal density, size and speed of opening in Sumatran rainforest species. *Tree physiology* 38(5) : 696-705.
- Laajimi NO, Boussadia O, Skhiri FH, Teixeira da Silva, JA, Rezgui S, Hellali R (2011) Anatomical adaptations in vegetative structures of Apricot tree (*Prunus armeniaca* L.) cv. ‘Amor El Euch’ grown under water stress. *Fruit, Vegetable and Cereal Sci. Biotech* 5: 46-51
- Lawson T, von Caemmerer S, Baroli I (2010) Photosynthesis and Stomatal Behaviour. in 265–304 doi:10.1007/978-3-642-13145-5\_11.

- Lawson T, Blatt MR (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* 164: 1556–70.
- Lawson T, Kramer DM, Raines CA (2012) Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 23: 215–220.
- Males J, Griffiths H (2017) Stomatal biology of CAM plants. *Plant Physiology* 174(2) : 550-560.
- Matthews JS, Vialet-Chabrand SR, Lawson T (2018) Acclimation to fluctuating light impacts the rapidity and diurnal rhythm of stomatal conductance. *Plant physiology*. 176: 1939-1951.
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, Baker NR, Brendel O, Lawson T (2016) Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol* 211: 1209–1220.
- Messinger SM, Buckley TN, Mott KA (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Plant physiology* 140(2) : 771-778.
- Ooba M, Takahashi H (2003) Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecol Modell* 164: 65–82.
- Outlaw WH (2003) Integration of cellular and physiological functions of guard cells. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 22: 503–529.
- Pearcy RW, Schulze ED, Zimmermann R (2000) Measurement of transpiration and leaf conductance. *Plant Physiological Ecology*, pp. 137-160.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Feuillat F, Bodénès C, Dreyer E (2001) Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell Environ* 24:861–868.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Dreyer E (2002) Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiol* 22:413–422.
- Poorter H, Fiorani F, Pieruschka R, Wojciechowski T, van der Putten WH, Kleyer M, Schurr U, Postma J (2016) Pampered inside, pestered outside? Differences and similarities between plants growing in controlled conditions and in the field. *New Phytol* 212: 838–855.
- Qu M, Hamdani S, Li W, Wang S, Tang J, Chen Z, Song Q, Li M, Zhao H, Chang T, Chu C, Zhu X (2016) Rapid stomatal response to fluctuating light: an under-explored mechanism to improve drought tolerance in rice. *Funct Plant Biol* 43: 727–738.
- Raven JA (2014) Speedy small stomata? *J Exp Bot* 65: 1415–1424.
- Rosner B (1983) Percentage Points for a Generalized ESD Many-Outlier Procedure, *Technometrics* 25(2): 165-172.
- Roussel M, Le Thiec D, Montpied P, Guehl JM, Brendel O (2009) Diversity of water use efficiency in a *Quercus robur* family: contribution of related leaf traits. *Ann For Sci* 66:408-417.
- Roussel M, Dreyer E, Montpied P, Le-Provost G, Guehl JM, Brendel O (2008) The diversity of <sup>13</sup>C isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family is associated with differences in intrinsic water use efficiency, transpiration efficiency, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* 60 : 2419–2431.

- Sinclair TR (2012) Is transpiration efficiency a viable plant trait in breeding for crop improvement? *Functional Plant Biology* 39(5) : 359-365.
- Sinclair TR, Rufty TW (2012) Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. *Global Food Security* 1(2) : 94-98.
- Team RC (2015) R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria: 2014. R: A language and environment for statistical computing.
- Theodorou N, Koundouras S, Zioziou E, Nikolaou N (2013) Responses of leaf stomatal density and anatomy to water deficit in four winegrape cultivars (*Vitis vinifera* L.). AMPELOS 2013 - 3<sup>rd</sup> international symposium on trends in world vitiviniculture development conference; 30-31 May 2013 Santorini island, Greece.
- 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(6) : 1103-1116.
- Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O (2013) Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment*. Doi : 10.1111/pce.12086.
- Vialet-Chabrand S, Matthews JSA, Brendel O, Blatt MR, Wang Y, Hills A, Griffiths H, Rogers S, Lawson T (2016) Modelling water use efficiency in a dynamic environment : An example using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 251: 65–74.
- Vialet- Chabrand SRM, Matthews JSA, McAusland L, Blatt MR, Griffiths H, Lawson T (2017) Temporal dynamics of stomatal behavior : modeling and implications for photosynthesis and water use. *Plant Physiology* 174: 603–613.
- Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G (2011) Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytol* 192: 640–652 181.
- Wang Y, Blatt MR (2011) Anion channel sensitivity to cytosolic organic acids implicates a central role for oxaloacetate in integrating ion flux with metabolism in stomatal guard cells. *Biochemical Journal* 439(1) : 161-170.
- Wang YF, Munemasa S, Nishimura N, Ren HM, Robert N, Han M, Schroeder JI (2013) Identification of cyclic GMP-activated nonselective Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channels and associated CNGC5 and CNGC6 genes in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology* 163(2) : 578-590.
- Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD (1979) Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282: 424–426.
- Woodward FI (1987) Stomatal numbers are sensitive to increases in CO<sub>2</sub> from preindustrial levels. *Nature* 327: 617–618.
- Wullschlegel SD, Ziska LH, Bunce JA (1994) Respiratory responses of higher plants to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment. *Physiologia Plantarum* 90(1) : 221-229.

Annexe I :



## Chapitre V : Synthèse sur l'Écologie des espèces

Au cours des dernières décennies des efforts considérables de recherche ont été alloués à l'étude de la différenciation écologiques de *Q. robur* et *Q. petraea* et ce particulièrement chez des peuplements adultes. Ce chapitre de synthèse met en perspective l'ensemble des résultats présentés dans les chapitres précédents au regard de la littérature disponible. Dans un premier temps, la dynamique de croissance des deux espèces est discutée pour ensuite faire mention de l'efficacité d'utilisation de l'eau à travers ces différents estimateurs et leurs possibles implications dans l'écologie des espèces. Enfin l'ensemble des travaux traitant la dynamique de réponse stomatique sont synthétisés avant une brève conclusion sur l'ensemble de ces travaux de thèse.

### Croissance

Chez des individus juvéniles une meilleure croissance et production de biomasse chez *Q. robur* est un phénomène récurrent aussi bien en pépinière (Génére & Bouler, 1996 ; Ponton et al., 2002) qu'en conditions semi-contrôlées (Parent et al., 2011 ; Kuster et al., 2013). Une meilleure croissance radiale est également observée parmi des stations variées pour des individus adultes de *Q. robur* (Dobrovoly et al. 2016). Il semblerait cependant que cela ne soit pas une constante. Il n'est pas rare en effet que les deux espèces affichent des taux de croissance similaires au stade juvénile (Gieger et al., 2005) ou au stade adulte (croissance radiale : Sanders et al., 2014). A titre d'exemple, Collet et al. (2017) mirent en évidence au sein de peuplements monospécifiques que la taille et la densité des populations de chênes sessiles et pédonculés étaient semblables après une dizaine d'années de régénération, traduisant des taux de croissance verticale et radiale ainsi qu'une intensité de compétition intraspécifique identiques chez les deux espèces. Cependant, des résultats opposés furent également mis en évidence chez l'adulte. En effet, au sein de nombreuses forêts mixtes composées, *Q. petraea* atteint des taux de croissance radiale (44% supérieurs : Lévy et al., 1992) ainsi que des hauteurs systématiquement supérieures à *Q. robur* (Becker et al., 1972).

Par ailleurs, les deux espèces affichent des tendances de croissance dépendantes de l'âge des individus. En effet, à mesure du vieillissement des peuplements, les taux de croissance radiale et verticale décroissent (Friedrichs et al., 2008). Ainsi, il semblerait que *Q. robur* ait une meilleure croissance aérienne que *Q. petraea* au cours des 100 premières années de vie. Cependant, cet écart tendrait à se réduire chez les chênes centenaires pour devenir semblable entre les deux espèces (Friedrichs et al., 2008). Au-delà de 140 ans, les chênes cesseraient

notamment de croître en hauteur (Becker et al. 1972). Le cas particulier de la forêt de Hart mis en évidence par Nathalie Bréda (1998) semble également corroborer l'observation qu'avec l'âge, *Q. petraea* deviendrait plus productif (en termes de croissance verticale et radiale) en comparaison de son homologue *Q. robur*. En effet, au sein de ce site mixte, le chêne pédonculé (*Q. robur*) initialement plus productif est rapidement dépassé par *Q. petraea* après une vingtaine d'années. Les éléments dont nous disposons au sein de la littérature tendent donc à suggérer qu'il ne s'agirait pas là d'un cas isolé mais bien d'un phénomène relativement fréquent. Ces divergences d'accroissement liées à l'âge sont susceptibles d'avoir des implications sylvicoles majeures. En effet la sélection de chênes pédonculés par les forestiers sur la base de bonnes performances juvéniles s'avérerait alors peu judicieuse au regard de la meilleure productivité du chêne sessile sur le long terme.

Un impact de la sécheresse sur la croissance des arbres est un phénomène largement décrit au sein de la littérature. Dans le cadre des études comparatives entre des jeunes plants de *Q. robur* et *Q. petraea*, il apparaît que ce dernier est généralement moins impacté par le stress hydrique, présentant des réductions de croissances radiale et verticale plus faibles et tardives que *Q. robur* (Drvoledic et al., 2013 ; Fonti et al., 2013). Cet état de fait est également observable au sein de peuplements naturels composés d'arbres adultes pour lesquels la croissance de *Q. robur* est également plus impactée par le stress hydrique que *Q. petraea*, et ce particulièrement au cours des périodes printanières et estivales (Becker et al., 1982 ; Friedrichs et al., 2008). *Q. petraea* serait par ailleurs plus résilient à la sécheresse en termes de rétablissement de la croissance que *Q. robur* au sein de peuplements mixtes d'arbres adultes, bien que cela ne soit pas nécessairement le cas au sein de peuplements monospécifiques (Levy 1992).

Au regard de la littérature disponible, il n'existe pas à ce jour de consensus clair vis-à-vis des différences de croissance aérienne entre *Q. robur* et *Q. petraea*. A l'instar des stades phénologiques, il est tout à fait possible que l'influence de la station et des traitements soit plus importante que celle de l'essence. Cela étant dit, une meilleure croissance de *Q. robur* à un stade juvénile semble néanmoins être le cas de figure prépondérant. D'autres éléments sont par ailleurs à prendre en compte vis à vis de la croissance de ces deux essences forestières. En effet à un stade juvénile, le développement des chênes (en croissance et accumulation de biomasse) est fortement associé à la taille et donc la quantité de réserves potentielles des glands dont ils sont issus (Brookes et al., 1980; Kleinschmit, 1993). Il faut par ailleurs noter que des glands plus lourds sont souvent recensés chez *Q. robur* plutôt que chez *Q. petraea* (Gérard et al., 2009).



Notre première étude (2015) visait quant à elle à caractériser les différences morphologiques et physiologiques entre *Q. robur* et *Q. petraea*. Après une courte saison de végétation les jeunes chênes ont été récoltés. A l'issue de l'expérimentation *Q. robur* avait produit significativement plus de biomasse totale que *Q. petraea*, indifféremment des traitements hydriques bien que les deux espèces aient atteint la même taille (mais un diamètre légèrement plus grand chez *Q. robur*) et produit la même quantité de biomasse aérienne. Du point de vue des traits aériens, les deux espèces ne diffèrent que de la LMA mais aussi de la quantité de bois produite (WBm) traduisant les plus gros diamètres observés chez *Q. robur*.

Au cours de la dernière expérimentation que nous avons menée en 2017, nous avons suivi l'évolution des dynamiques des croissances radiales et verticales au cours d'une saison de végétation chez les chênes sessiles et pédonculés (étude comparative : Article 3 chapitre III). Il est alors apparu que les deux espèces suivaient la même dynamique de croissance relative de manière synchrone au fur et à mesure de la mise en place de la sécheresse progressive. Bien que synchronisées, il est apparu que les croissances radiales/verticales de *Q. robur* était par moments relativement plus fortes que celle de *Q. petraea*. Cet état de fait serait notamment tributaire de la plus forte assimilation nette de CO<sub>2</sub> observable chez les chênes pédonculés (mis en évidence par mesures régulières des échanges gazeux foliaires en conditions non contrôlées et à steady-state non saturant en lumière), associés à une meilleure capacité photosynthétique (principalement V<sub>max</sub>). Nous ne pouvons cependant pas exclure le fait que les meilleures performances initiales de *Q. robur* soient au moins partiellement associées à des réserves supérieures issues des glands pendant la première saison de végétation des jeunes plants. Néanmoins il nous est impossible de tester cette hypothèse, ne connaissant pas le poids initial et individuel des glands plantés. La sécheresse progressive s'est par ailleurs traduite par réduction à néant du taux de croissance verticale, tandis que la croissance radiale a relativement peu décliné sous le stress.

### Architecture racinaire

Pour des raisons pratiques évidentes, la caractérisation du système racinaire des arbres et plus particulièrement des adultes est un exercice complexe. Une méthode destructive et/ou fortement invasive est souvent employée afin de décrire l'architecture racinaire. Le développement des racines constitue un élément essentiel à la stabilité du sol, l'ancrage de l'arbre ainsi que l'approvisionnement en eau et nutriments (Atkinson & Last, 1994). L'architecture racinaire d'arbres matures a été décrite comme étant semblable chez *Q. robur* et *Q. petraea* (Kostler et

al., 1968), celle-ci consistant en un réseau de nombreuses racines horizontales accompagnées de pivots à la base desquels les racines latérales et verticales se développent. Chez *Q. petraea*, à l'âge mature ce réseau est caractérisé par une biomasse racinaire préférentiellement répartie et distribuée uniformément dans les couches superficielles du sol augmentant ainsi la stabilité de l'arbre lorsque les conditions ne sont pas défavorables (Drexhage et al., 1999 ; Hruska et al., 1999 ; Bréda et al., 1995). Cette biomasse racinaire est par ailleurs positivement corrélée au diamètre de l'arbre en conditions non restrictives. Il existe néanmoins des cas pour lesquels les racines de chênes sont distribuées de façon erratique formant des clusters (Bédeneau & Auclair, 1989). Néanmoins les chênes sessiles et pédonculés sont capables de prospecter le sol en profondeur à l'aide de racines fines (Abrams, 1990 ; Bréda et al., 1995) y compris dans les sols relativement résistants à la pénétration des racines (Kreutzer 1961). Ce faisant, le système racinaire des chênes s'il est profondément ancré, contribue à l'approvisionnement hydrique et nutritif de l'arbre favorisant ainsi la tolérance à un éventuel épisode de sécheresse (Bréda et al., 1993). Le profil de la distribution des racines dans le sol est également parfois décrit comme semblable entre les jeunes individus de ces deux espèces (Thomas, 2000 ; Gerard et al., 2009) en étant marqué par un nombre et une taille comparable des racines latérales chez des jeunes plants grandissant en conditions non limitantes. Il semblerait néanmoins que quelques divergences entre les espèces apparaissent au sein de sections plus profondes du sol là où de manière générale la taille et le nombre de racines diminue chez les deux espèces mais de manière relativement plus importante chez *Q. robur* (Thomas, 2000), ce qui pourrait *in fine* se traduire par un avantage en termes de capacité de prospection profonde chez *Q. petraea*. Bréda et al. (1995) mirent également en évidence une divergence de densité racinaire entre les espèces chez des arbres adultes, *Q. robur* faisant état d'un nombre de racines significativement inférieur à *Q. petraea* (ce qui n'indique par ailleurs pas nécessairement une biomasse moindre), *Q. robur* allouant relativement moins de biomasse aux racines par rapport à leur surface que *Q. petraea* : Nardini & Tyree (1999). Autre fait notable, à l'instar de nombreux autres traits morphologiques et anatomiques, la distribution des racines dans le sol semble également sujette à une forte variabilité inhérente aux provenances d'origines et leurs propriétés hydromorphes (chez *Q. petraea* : Kuster et al., 2013). Globalement, la littérature traitant le développement racinaire chez *Q. robur* et *Q. petraea* prête à confusion. Si le profil architectural des racines semble identique chez les deux espèces rien n'est moins sûr vis-à-vis de la biomasse allouée à ce compartiment. En effet, en conditions non contraignantes il n'est pas systématique d'observer des différences de biomasse racinaire entre les deux espèces (Thomas & Gausling, 2000 ; Gerard et al., 2009) ni en surface racinaire (Rasheed-Depardieu et al., 2012). Il est en revanche

parfois fait état de différences interspécifiques, *Q. robur* produisant plus de racines que *Q. petraea* (Kuster et al., 2013).

Nous avons mesuré les traits racinaires au cours des deux expérimentations menées en 2015 et 2016. Lorsque nous avons comparé la production de biomasse de ces différents traits, *Q. robur* affichait des biomasses supérieures à *Q. petraea* pour quasiment l'ensemble des traits à l'exception de la masse des pivots et des racines fines ; la RMA (root mass area) était également semblable pour les deux espèces de chênes.

**Les systèmes racinaires de *Q. robur* et *Q. petraea* sont extrêmement différenciés dès un stade précoce de développement sous les différents traitements hydriques. (Article 2, chapitre III).**

Sous stress hydrique, une possible acclimatation à la sécheresse consiste en une modification de l'allocation du carbone en faveur du compartiment racinaire. Ainsi une augmentation de la biomasse racinaire est un phénomène souvent observé en réponse au stress chez *Q. robur* (Osonubi & Davies 1981, Van Hees, 1997 ; Gieger et al., 2002) mais également chez *Q. petraea* (Thomas, 2000; Gieger et al., 2002). Cette redistribution du carbone a pour effet de modifier le ratio entre biomasse aérienne et biomasse racinaire. Au sein des études comparatives disponibles traitant les différences interspécifiques entre *Q. robur* et *Q. petraea*, deux stratégies d'acclimatation propres à chacune des espèces semblent se démarquer. Ainsi chez *Q. petraea* de plus faibles ratios sont obtenus à travers une forte réduction de la biomasse aérienne et notamment des feuilles (Fort et al., 1997 ; Thomas & Gausling, 2000 ; Gieger et al., 2002). En revanche chez *Q. robur*, un relatif maintien de la biomasse aérienne associé à une légère augmentation des racines fines serait à l'origine des faibles ratios en réponse à la sécheresse (Van Hees, 1997 ; Gieger et al. 2002).

**Parmi l'ensemble des traits racinaires, *Q. robur* et *Q. petraea* ne sont impactés différenciellement par la sécheresse que pour la biomasse cumulée des racines fines et intermédiaires (CFRBm).**

*Q. robur* semble en effet plus durement touchée que *Q. petraea* sous stress hydrique affichant des productions de biomasse racinaire (fine et intermédiaire) relativement plus faibles que *Q. petraea* (vis-à-vis des plants contrôles). Chez les deux espèces la quasi-totalité des traits racinaires sont par ailleurs plus faibles sous stress hydrique, exception faite des racines fines (FRBm). Eu égard l'apparent effet de l'âge des peuplements sur les taux de croissance aérienne de *Q. robur* et *Q. petraea* et les corrélations qui peuvent exister entre production de biomasses

aérienne et souterraine, il n'est pas impossible que la croissance racinaire soit elle-même sujette à des modifications de profils et/ou productivité au cours du vieillissement des individus. Il n'existe cependant pas de travaux ayant étudié l'évolution de la dynamique de croissance chez ces deux espèces ligneuses (fait totalement compréhensible étant donné les aspects pratiques que cela impliquerait).

## Profils racinaires

En outre, les deux espèces se distinguent par deux profils racinaires clairement différenciés (Article 2) :

Sous conditions optimales le chêne pédonculé (*Q. robur*) investit préférentiellement dans le compartiment racinaire en produisant relativement plus de biomasse racinaire que de biomasse aérienne. Son profil se distingue par relativement peu de pivots (~1 pivot par plante en moyenne) qui correspondent à ~25-30% de la biomasse racinaire. La biomasse restante est ensuite majoritairement composée de racines de tailles intermédiaires puis de racines fines (~70 et 30% respectivement). Il en résulte une surface foliaire transpirante deux fois supérieure à la surface racinaire absorbante.

Contrairement au chêne pédonculé, le chêne sessile (*Q. petraea*) investit à part relativement égale dans les compartiments aériens et souterrains sous conditions non limitantes. Son profil se distingue alors par un investissement accru dans les pivots que l'on observe en proportion relativement plus importante (~40%) que chez *Q. robur*. Ces pivots sont par ailleurs plus nombreux et plus fins que ceux de *Q. robur* (à production de biomasse égale). Le reste de la biomasse est ensuite toujours majoritairement composé de racines intermédiaires puis enfin de racines fines mais dans des proportions accrues (~60 et 40% respectivement) en comparaison du chêne pédonculé. Il en résulte une biomasse de racines fines similaire entre les deux espèces bien que globalement la biomasse racinaire de *Q. petraea* soit plus faible, ce qui *in fine* induit des surfaces racinaires absorbantes ainsi que des ratios surface foliaire/surface racinaire identiques chez les deux espèces.

**En résumé, bien que produisant significativement moins de biomasse racinaire que *Q. robur*, *Q. petraea* atteint des surfaces racinaires absorbantes semblables en investissant relativement plus dans des racines fines supportées par des pivots plus nombreux. *Q. petraea* présente ainsi un réseau racinaire bien plus ramifié que son homologue qui a produit un réseau moins fin mais plus étendu. Ce faisant, *Q. petraea* développerait à un**

**stade juvénile un réseau racinaire aussi efficace que *Q. robur* en termes de surface absorbante pour un moindre investissement.**

Sous conditions de stress hydrique, *Q. robur* produit significativement moins de biomasse racinaire et aérienne sans que le rapport entre les deux en soit modifié. A l'exception des pivots, la biomasse des racines fines et intermédiaires est nettement plus faible sous stress. Ces diminutions de biomasse sont à l'origine d'une recomposition du profil racinaire. Si la proportion de pivots demeure semblable à celle des plants non stressés, les plants soumis aux stress produisent relativement plus de racines fines bien que les racines intermédiaires soient toujours majoritaires (~38 et 62% respectivement). En résulte une RMA (root masse area) supérieure sous condition de stress atténuant la diminution de la biomasse en racines fines. La surface racinaire absorbante bien que plus faible que les plants contrôles s'équilibre alors avec la surface foliaire transpirante bien que celle-ci reste supérieure.

A l'instar de *Q. robur*, le chêne sessile suit la même dynamique sous conditions de stress. En revanche la diminution de biomasse des racines fines et intermédiaires est bien moindre que pour *Q. robur* (seul effet différentiel de la sécheresse entre les espèces pour l'ensemble des traits racinaires). La proportion entre racines fines et intermédiaires est alors plus équilibrée (45 et 55% respectivement). Cette recomposition du profil racinaire induit là encore une augmentation de la surface racinaire absorbante qui s'équilibre avec la surface foliaire transpirante. Cette dynamique de croissance racinaire sous stress hydrique chez *Q. petraea* a également été corroborée au cours de l'expérimentation de 2016 (Article 4).

**Un tel rééquilibrage du rapport entre surface foliaire et racinaire à travers une recomposition du profil racinaire apparaît comme une remarquable acclimatation à la sécheresse chez les deux espèces. Cependant *Q. robur* semble plus sensible au stress en étant plus impacté sur la production de racines fines et intermédiaires que *Q. petraea*. Ce faisant, le chêne sessile semble plus tolérant à la sécheresse en investissant là encore dans un système racinaire plus ramifié et fin permettant une meilleure prospection du sol.**

**De telles différences de dynamiques de croissance aérienne et racinaire entre les deux espèces à un stade juvénile sont susceptibles d'avoir un impact majeur sur la différenciation écologique des espèces, notamment vis-à-vis de leurs capacités de prospection des sols et donc d'accès à l'eau. Cependant les réserves initiales au sein des glands, les conditions particulières en serre ainsi que la capacité limitée de prospection de sol (pots de 6L) sont des éléments potentiellement déterminants sur ces dynamiques de**

**croissance. Il semble nécessaire d'inscrire de futures études dans la continuité de nos travaux qui traiteraient ces aspects en conditions naturelles et/ou semi-naturelles ainsi que sur la durée.**

Il convient de rappeler que la notion de compétition pour la réserve hydrique du sol semble fondamentale vis-à-vis de la tolérance à la sécheresse ainsi que de l'efficacité d'utilisation de l'eau. Des observations en profondeur des systèmes racinaires à l'état naturel chez des individus juvéniles et/ou adultes permettraient de compléter la description des profils racinaires précédemment faite dans ce manuscrit. La comparaison de ces profils à des plants ayant poussé en serre nous semble par ailleurs nécessaire afin d'estimer les divergences de croissance induites par le développement en serre en comparaison d'une pépinière.

### Traits foliaires

Des valeurs de LMA systématiquement supérieures au chêne pédonculé quel que soit le traitement hydrique ont précédemment été détectées chez des jeunes plants (Steinbrecher 2013), il existe cependant des résultats contradictoires pour lesquels les deux espèces ne semblent pas diverger (LMA : Thomas, 2000 non testé ; SLA : Parent et al., 2011 ; LMA : Günthardt-Goerg et al., 2013). Par ailleurs, des productions de biomasse supérieures en termes de surface et masse foliaires ont également été répertoriées chez *Q. robur* par rapport à *Q. petraea*.

**Dans notre étude (2015), nous n'avons pas constaté ces différences en biomasse/surface foliaire malgré la divergence de LMA entre les deux espèces. En effet, suite aux récoltes finales que nous avons réalisées pendant les deux premières années de thèse (Article 2 chapitre III, Article 4 chapitre IV), nous avons pu estimer un ensemble de traits foliaires chez *Q. robur* et *Q. petraea*. En outre, pour des jeunes chênes issus de provenances au climat similaire (Article 2 chapitre III), il n'apparaît que très peu de différences liées aux traits foliaires (biomasse, surface, LMA). Le seul paramètre pour lequel une divergence interspécifique fut observée était le LMA, le chêne sessile affichant des valeurs de LMA systématiquement supérieures au chêne pédonculé, quel que soit le traitement hydrique. Sous conditions de stress, les chênes des deux espèces produisent moins de biomasse foliaire totale (Article 2,4), ce qui se traduit par une baisse de la surface foliaire et le maintien des valeurs LMA (ainsi que les différences entre espèces) chez *Q. robur* et *Q. petraea*. Un ralentissement de la production de biomasse foliaire et in fine de la surface sous sécheresse est un phénomène auparavant mis en évidence dans une étude comparative pour laquelle *Q. petraea* réagissait à la sécheresse contrairement à *Q. robur* (Gieger & Thomas, 2002),**

**traduisant une meilleure tolérance à la sécheresse chez le chêne sessile en limitant la surface transpirante.**

### Traits stomatiques

Bien qu'il existe quelques données intraspécifiques (Bruschi et al., 2003a, 2003b), nous ne disposons que de peu d'éléments au sein de la littérature traitant les différences interspécifiques entre *Q. robur* et *Q. petraea* concernant les traits stomatiques ainsi que l'impact potentiel d'un stress hydrique sur ceux-ci. Sous conditions non limitantes, *Q. robur* et *Q. petraea* ne semblent pas différer l'une de l'autre en termes de densité stomatique (données non publiées : Annexe III Thèse Vialet-Chabrand) ; la densité stomatique est par ailleurs négativement corrélée à la taille des stomates chez ces deux espèces de chênes (Thèse Vialet-Chabrand : deux espèces confondues ; Roussel et al., 2009 : *Q. robur*). Différents facteurs environnementaux sont susceptibles d'altérer les traits stomatiques. Il a en effet été mis en évidence que les températures au cours du développement des feuilles influençaient la répartition des stomates à la surface des feuilles chez *Q. robur*, espèce pour laquelle la densité ainsi que l'index stomatique des feuilles d'été et de printemps baissent avec l'augmentation des températures saisonnières (Beerling et al., 1993). De cette plus faible densité stomatique résulteraient de plus faibles valeurs de conductance stomatique et *in fine* une limitation de la transpiration au cours des périodes sujettes au plus haut risque de stress hydrique. Au cours de l'Histoire la quantité de CO<sub>2</sub> atmosphérique a également influencé ces traits. Chez *Q. robur* et *Q. petraea*, une augmentation de [CO<sub>2</sub>] est associée à une diminution de l'index stomatique, une réduction de la taille des stomates ainsi qu'une augmentation de leur densité (Van Hoof et al., 2006 ; Garcia-Amonera et al., 2006). Enfin, un meilleur accès à la lumière entraîne une augmentation de la densité stomatique chez certaines espèces du genre *Quercus* (Osborn & Taylor, 1990).

**Nous avons analysé les traits stomatiques au cours des deux expérimentations menées en 2015 et 2016 et n'avons pas observé de différences entre espèces ni d'effet induit par le stress hydrique sur l'ensemble des variables mesurées. Dans le cadre de notre étude des individus juvéniles issus de provenances proches au climat similaire ne semblent pas exprimer de divergences majeures concernant les traits foliaires. Chez le chêne la réduction de la biomasse foliaire constitue donc une probable acclimatation à la sécheresse, permettant une surface transpirante moindre associée à une conductance stomatique plus faible n'étant pas liée à une modification des traits stomatiques (SI, SD, SS).**

Ces résultats sont en accord avec les précédents travaux de Guehl et al. (1994) pour lesquels les traits stomatiques demeuraient inchangés sous stress hydrique chez *Q. petraea*. Nous en concluons que de prime abord et dans le cadre de nos études, le stress hydrique ne semble pas être un facteur à l'influence déterminante sur les traits stomatiques chez ces deux espèces de chênes. Les valeurs de densité ainsi que de taille stomatique que nous avons mesurées étaient par ailleurs semblables entre les deux expérimentations, ainsi qu'à celles obtenues par Roussel et al., 2008 sur des pousses de *Q. robur*. Les traits stomatiques apparaissent donc comme étant relativement conservés quelle que soit la provenance et le stress hydrique chez ces deux espèces de chênes lorsque celles-ci se sont développées en serre.

## Traits physiologiques

### *Capacité photosynthétique et échanges gazeux foliaires*

**La première étude que nous avons menée n'a pas laissé transparaître de différences interspécifiques pour la capacité photosynthétique chez des plants juvéniles issus d'une provenance proche (Article 2). En revanche, lors de la seconde étude comparative pour laquelle la variabilité intraspécifique était élargie à travers quatre provenances différentes sélectionnées le long d'un gradient d'aridité (deux provenances par espèce : Article 3), des différences de capacités photosynthétiques étaient cette fois observables entre *Q. petraea* et *Q. robur*, ce dernier affichant des valeurs significativement supérieures pour  $V_{max}$  ainsi qu'une légère tendance pour  $J_{max}$ .**

Sous stress hydrique une baisse de l'assimilation photosynthétique du carbone est un phénomène courant chez *Q. robur* et *Q. petraea* (Thomas, 2000 ; Arend et al., 2013 ; Fonti et al., 2013). Cette réduction de l'assimilation est notamment parfois significativement plus marquée chez *Q. robur* (Ponton et al., 2002 ; Arend et al., 2013) et potentiellement associée à une altération de l'appareil photosynthétique à travers l'efficacité photochimique du photosystème II (Arend et al. 2013) ou la capacité photosynthétique des plants.

**Par ailleurs, la mise en place du stress progressif eut également un impact sur la capacité photosynthétique chez les deux espèces.** Il est possible que cette différence apparaissant dans la seconde étude soit le fait de la variabilité intraspécifique induite par le plus large éventail de provenances choisi. Au cours de l'expérimentation de 2016 (Article 4 chapitre IV) menée exclusivement sur *Q. petraea*, la sécheresse n'a pas impacté la capacité photosynthétique bien que l'assimilation ait chuté de l'ordre de ~30% lorsque mesurée en conditions non contrôlées (Wi-m) et sous régime stationnaire (exception faite de l'état d'équilibre des courbes de réponses



au CO<sub>2</sub>). Il est fort probable que dans le cas présent la diminution de A soit dûe à une forte limitation par la conductance stomatique, celle-ci ayant également été réduite de l'ordre de 30 à 60% suivant les cas.

**Nous émettons ainsi l'hypothèse que la variabilité intraspécifique pour la capacité photosynthétique est supérieure à la variabilité interspécifique ainsi que celle induite par le traitement. Il n'est par ailleurs pas impossible qu'elle soit également liée aux propriétés nutritives des sites de provenance ou à des différences entre populations de l'assimilation en azote.**

Concernant la proportion d'azote au sein des feuilles, les deux espèces présentent soit des ratios C/N similaires (Hu et al., 2013) soit plus faible chez *Q. robur* que *Q. petraea* (Günthardt-Goerg et al., 2013). Néanmoins, indépendamment des ratios il semblerait que les valeurs les plus faibles d'azote foliaire soient le plus fréquemment trouvées chez *Q. petraea* (Ponton Thèse ; Günthardt-Goerg et al., 2013 ; Hu et al., 2013 ; Li et al., 2013). La quantité d'azote foliaire est par ailleurs également dépendante des provenances de chaque espèce ainsi que positivement associée à des meilleurs de taux de croissance aérienne et racinaire (Li et al., 2013)

**Dans le cadre de la première étude réalisée en 2015, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre *Q. robur* et *Q. petraea* vis-à-vis du pourcentage d'azote foliaire. Les deux essences étaient par ailleurs toutes deux impactées par la sécheresse, affichant des valeurs plus élevées d'azote chez les plants stressés sans que la quantité de carbone soit affectée, induisant des ratios C/N plus faibles. Nous assistâmes par ailleurs à la même accumulation d'azote foliaire en condition de stress chez *Q. petraea* au cours de l'expérimentation de 2016.**

Cette accumulation d'azote foliaire par masse sous stress hydrique est surprenante dans la mesure où celle-ci était accompagnée d'une réduction de la capacité photosynthétique ( $V_{max} / J_{max}$ ) et de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> habituellement positivement corrélées à la quantité d'azote disponible. Plusieurs hypothèses sont susceptibles d'expliquer cet état de fait. Il est en outre possible que l'intense sécheresse ait endommagé l'appareil photosynthétique ( $V_{max}$  et  $J_{max}$  étant en effet diminués par le stress). Néanmoins le maintien de l'osmolarité et de la quantité d'eau relative des feuilles semble indiquer une acclimatation relativement efficace au stress hydrique de la part des deux espèces à l'échelle foliaire et donc un maintien de la majeure partie des fonctions physiologiques vitales. Cette accumulation pourrait par ailleurs être due à la forte réduction de la surface aérienne qui induirait mécaniquement une augmentation de

l'azote disponible pour les feuilles. Une dernière hypothèse serait le transport et le maintien de composés azotés vers les feuilles induits par le stress.

#### Efficiences d'utilisation de l'eau chez *Q. robur* et *Q. petraea*

Il n'est pas rare d'observer des différences d'efficiences d'utilisation de l'eau entre des espèces sympatriques pouvant être importantes, notamment chez le chêne (Guehl et al., 1998 ; Ponton et al., 2002). Néanmoins les déterminismes environnementaux et génétiques de ces différences ne sont pas toujours clairement élucidés et il n'existe que peu d'études comparatives traitant l'efficiences d'utilisation de l'eau chez le chêne. Notons par ailleurs que bien que disposant des données d'échanges gazeux foliaires, l'efficiences n'est souvent pas relevée par les auteurs eux-mêmes et par conséquent les différences interspécifiques non testées. Il existe entre autres quelques études qui, après une estimation grossière, pourraient laisser envisager une efficiences d'utilisation de l'eau intrinsèque supérieure chez *Q. petraea* par rapport à *Q. robur* chez des jeunes plants (Wagner & Dreyer, 1997 ; Parent et al., 2011 ; Steinbrecher et al., 2013). Lorsque les différences interspécifiques sont effectivement testées et significatives, *Q. petraea* semble être l'espèce la plus efficiente aussi bien pour des mesures de  $W_i$  (Epron et al., 1993 : Arbre adultes ; Ponton et al., 2002 ; juvéniles) que pour des mesures de la discrimination isotopique (Ponton et al., 2001 ; Pflug et al., 2015 : juvéniles). Par ailleurs, quelques études ont également fait état d'une absence de différence entre les deux espèces (Thomas, 2000 ; Hu et al., 2013) voire d'une efficiences supérieure chez *Q. robur* pour des cas de stress hydriques et thermiques cumulés (Hu et al., 2013). Les travaux de Stéphane Ponton (Thèse) furent les premiers et les seuls à mettre en évidence des différences de discrimination isotopique entre *Q. robur* et *Q. petraea* à la fois chez des arbres forestiers adultes mais aussi chez des jeunes plants ayant poussé en conditions semi-contrôlées (serres). Ces différences furent par ailleurs confirmées par des mesures d'efficiences d'utilisation de l'eau intrinsèque chez ces mêmes plants juvéniles et maintenues sous stress hydrique. Sur la base de ces études, force est de constater que *Q. petraea* fait généralement montre d'une meilleure efficiences d'utilisation de l'eau que *Q. robur* à la fois à l'échelle foliaire et instantanée ( $W_i$ ) mais aussi pour des mesures intégrées dans le temps ( $\Delta$  ou  $\delta$ ). A notre connaissance il n'existait pas d'études comparatives adressant les différences interspécifiques pour l'efficiences de transpiration au sein de la littérature avant celle que nous avons réalisée en 2015.

**Contrairement à ce que pouvait laisser supposer la littérature, nous n'avons à aucun moment mis en évidence de différences interspécifiques pour l'efficiences d'utilisation de l'eau intrinsèque chez les jeunes chênes ayant grandi en serre quelle que soit l'étude**

comparative (Article 2 et 3), si ce n'est une mesure en conditions non contrôlées réalisée pendant le suivi des échanges gazeux foliaires de 2017, à un stade bien particulier de sécheresse. Cette différence disparaissait d'ailleurs par la suite. Ces résultats furent obtenus aussi bien pour des provenances au climat semblable que pour des provenances ayant été sélectionnées en fonction d'un gradient environnemental pour la disponibilité en eau. Nos valeurs, cohérentes d'une expérimentation à l'autre et à travers les deux traitements hydriques relancent donc le débat vis-à-vis de la présumée plus forte efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque de *Q. petraea* par rapport à *Q. robur* (Table 1).

Ces valeurs d'efficacité notamment chez *Q. petraea* ne sont a priori pas cohérentes vis-à-vis d'une stratégie stress-tolérante de cette essence liée à l'efficacité. *De facto*, d'après nos travaux *Wi* ne semble pas constituer un marqueur de tolérance au stress particulièrement pertinent ou en tout cas discriminant les niches écologiques respectives chez les jeunes chênes sessiles et pédonculés que nous avons étudiés. A une échelle intégrée dans le temps, nous avons cette fois-ci détecté une différence interspécifique pour la composition isotopique des feuilles (Article 2). En contradiction avec la plupart des études comparatives disponibles au sein de la littérature, *Q. robur* affichait des valeurs supérieures d'efficacité d'utilisation de l'eau par rapport à *Q. petraea*.

**Par ailleurs, nos travaux sont les seuls à notre connaissance à avoir comparé l'efficacité de transpiration (TE) de ces deux espèces ; nous avons ainsi pour la première fois mis en évidence une plus forte efficacité de transpiration chez *Q. robur* par rapport à *Q. petraea* et ce pour les deux traitements hydriques.**

**Table 1 :** Tableau récapitulatif par espèce et année de la pluparts des différents estimateurs de l'efficacité mesurés.

Experiment	Species		Control	Drought	t test Drought
H2Oak 2016	QP	TE	5,43 ± 0,12	5,89 ± 0,13	*
H2Oak 2015	QP	TE	4,07 ± 0,15	5,23 ± 0,16	***
H2Oak 2015	QR	TE	4,62 ± 0,14	5,4 ± 0,14	***
H2Oak 2016	QP	δ13C	-30,13 ± 0,16	-29,63 ± 0,18	*
H2Oak 2015	QP	δ13C	-27,88 ± 0,52	-26,87 ± 0,31	*
H2Oak 2015	QR	δ13C	-28,22 ± 0,36	-27,33 ± 0,14	*
H2Oak 2016	QP	Wi-m	61 ± 4	134 ± 6	***
H2Oak 2016	QP	Wi-CO <sub>2</sub>	77 ± 7	106 ± 5	**
H2Oak 2016	QP	Wi-PAR 1000	77 ± 5	117 ± 5	***
H2Oak 2016	QP	Wi-VPD	72 ± 5	120 ± 6	***
H2Oak 2015	QP	Wi-PAR 800	93 ± 9	125 ± 12	*
H2Oak 2015	QR	Wi-PAR 800	87 ± 7	130 ± 17	*
H2Oak 2017	QP	Wi-PAR 1200	112 ± 8	125 ± 6	*
H2Oak 2017	QR	Wi-PAR 1200	110 ± 8	128 ± 7	*

### *Effet d'une sécheresse édaphique sur l'efficacité d'utilisation de l'eau*

En cas de stress hydrique, une diminution des échanges gazeux foliaires accompagnée d'une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ) est une réponse courante chez les deux espèces de chênes (Bréda et al., 1993 ; Vivin et al., 1993). Cependant une diminution des échanges gazeux due à une sécheresse ne se traduit pas toujours par une modification de  $W_i$  (Ponton et al., 2002) dans le cas où une légère augmentation de la résistance mésophyllienne (Roupsard et al., 1996) ou une altération de l'appareil photosynthétique entraînerait une réduction de l'assimilation photosynthétique suffisante pour compenser la réduction de  $g_s$ . **Dans le cadre de nos études, une partie des jeunes plants fut soumise à des sécheresses relativement intenses (Article 2), modérées (Article 4) ainsi qu'à une sécheresse progressive (Article 3). Au cours de l'ensemble de ces expérimentations le stress hydrique a entraîné une réduction des échanges gazeux associée à une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i=A/g_s$  : Table 1). Cette augmentation de  $W_i$  était essentiellement liée à la réduction de la conductance stomatique chez les deux espèces.** A l'échelle supérieure et conformément à la théorie de Farquhar & Richards (1984), l'occurrence d'une sécheresse entraîne une diminution de la discrimination isotopique (et donc une augmentation de WUE). Cet état de fait est également maintes fois relaté au sein de la littérature chez *Q. petraea* (Guehl et al., 1994 ; Picon et al., 1996b), *Q. robur* (Picon et al., 1996a ; Vivin & Guehl 1997) ou dans le cadre d'études comparatives des deux espèces (Ponton Thèse). Cependant à l'instar de  $W_i$ , il est également possible que les deux espèces fassent montre d'une faible réponse à la sécheresse pour la discrimination isotopique (Thomas & Gausling, 2000 ; Thomas, 2000 ; Ponton et al., 2002). **Nos travaux se sont inscrits dans la continuité de la littérature disponible. Les campagnes de mesures de composition isotopiques foliaires que nous avons réalisées dans le cadre de l'étude comparative de 2015 (publication 2, chapitre III) ainsi qu'au cours de l'étude réalisée sur *Q. petraea* en 2016 (Publication 4, chapitre IV) se sont toutes deux soldées par la démonstration d'une augmentation significative de l'efficacité d'utilisation de l'eau à cette échelle d'intégration. Enfin, l'ensemble des estimations de l'efficacité de transpiration (TE) effectuées en 2015 et 2016 étaient également significativement supérieures sous l'effet d'un stress hydrique chez les deux espèces. Chez *Q. robur* et *Q. petraea*, quelle que soit l'année d'expérimentation, l'occurrence d'une sécheresse est systématiquement traduite par une**

**augmentation significative de l'efficience d'utilisation de l'eau pour l'ensemble de ses estimateurs, indifféremment de l'échelle d'intégration ( $W_i$ ,  $\delta^{13}C$  et TE).**

#### *Intégration de l'efficience à différentes échelles*

L'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque est assujettie aux variations environnementales que les plantes subissent au cours de la journée. Ces changements de température, humidité, ou encore couverture nuageuse auront un impact considérable sur l'assimilation nette de  $CO_2$  et la conductance stomatique. Il est de fait légitime de s'interroger sur la nature de la relation que peuvent entretenir une estimation de l'efficience à un instant donné ( $W_i$ ) et des estimateurs intégrés dans le temps ( $\delta^{13}C$  et TE). En outre, il est rare sous conditions naturelles que les plantes fonctionnent en régime stable vis-à-vis de leurs échanges gazeux (steady-state). Dans le cadre de cette thèse,  $W_i$  fut maintes fois mesurée sous conditions contrôlées après stabilisation de la conductance stomatique à une lumière saturante. De telles mesures sont de facto peu susceptibles d'être pleinement représentatives des échanges gazeux foliaires intégrés sur la durée. De larges variations des échanges gazeux foliaires et de l'efficience qui en résulte ont d'ailleurs été mis en évidence chez ces deux espèces au cours de cinétiques journalières (Ponton thèse ; Roussel et al., 2008). Il n'en demeure pas moins que de telles relations ont été signalées entre  $W_i$  et la discrimination isotopique, notamment chez des jeunes chênes pour lesquels la variabilité de l'efficience étendue par un stress hydrique (Picon et al., 1996a, 1996b ; Roussel et al., 2009) mais aussi chez des individus juvéniles de *Q. robur* et *Q. petraea* pour lesquels la variabilité de l'efficience était imputable aux différents régimes d'éclaircissements auxquels les arbres étaient soumis (Ponton et al., 2002). Il faut cependant noter que dans cette dernière publication (Ponton et al., 2002) subsistaient de légères divergences entre ces estimateurs de l'efficience.

Il existe donc des précédents pour lesquels des mesures instantanées d'échanges gazeux foliaires peuvent dans une certaine proportion être représentatives d'un fonctionnement intégré des plantes. Ce faisant d'après la littérature disponible, chez *Q. robur* et *Q. petraea* la discrimination isotopique du carbone semble constituer un bon estimateur de l'efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (et réciproquement).

Une seule étude est parvenue à mettre en évidence une relation positive entre efficience de transpiration et efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque lorsque  $W_i$  a été mesurée sous conditions contrôlées saturantes chez le chêne (*Q. robur* : Roussel Thèse, 2008). Dans cette étude cependant, 50% des variations de TE n'étaient pas expliquées par  $W_i$  à saturation

lumineuse. Il est cependant remarquable que quelques mesures foliaires probablement loin d'être représentatives des échanges gazeux globaux de la plante entière puissent être liées à une intégration sur le long terme de l'efficacité. Il serait par ailleurs étonnant que ces mesures sous conditions contrôlées traduisent fidèlement l'ensemble des échanges gazeux foliaires réalisés pendant la période d'estimation de l'efficacité de transpiration.

Dans le cadre de nos travaux, l'efficacité d'utilisation de l'eau fut mesurée à différentes échelles spatio-temporelles. A travers diverses campagnes de mesures d'échanges gazeux foliaires, l'efficacité d'utilisation de l'eau instantanée fut caractérisée aussi bien sous conditions environnementales naturelles (campagne de mesures LiCor 6200) que contrôlées (mesures extraites des steady-states LiCor 6400). A une échelle intégrée dans le temps, la composition isotopique des feuilles ayant été utilisée pour les mesures d'échanges gazeux fut également déterminée ( $\delta^{13}C$ ). Enfin, nous avons estimé l'efficacité de transpiration plante entière (TE) traduisant le compromis entre la biomasse produite et l'eau transpirée.

**Au cours de notre étude de 2015, nous n'avons mis en évidence qu'une très faible relation positive entre des mesures  $W_i$  à lumière sous-saturante et TE (7% de variation expliqués par  $W_i$  après analyse ANCOVA intégrant l'effet espèces et traitement hydrique) ; il n'y avait par ailleurs aucune relation entre nos mesures de  $W_i$ -sat et la discrimination isotopique. Suite à la première année d'expérimentation, l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque s'est révélée être un estimateur extrêmement peu fiable pour exprimer la variabilité des estimateurs de l'efficacité intégrés dans le temps ( $\delta^{13}C$  et TE). Les estimations de  $W_i$  réalisées chez *Q. petraea* en 2016 se sont également révélées être de médiocres estimateurs de  $\delta^{13}C$  et TE bien qu'il existât quelques faibles relations entre différentes mesures de  $W_i$  et TE/ $\delta^{13}C$ , n'expliquant pas plus de 10 à 17% de variabilité. Il y a cependant plusieurs hypothèses susceptibles d'expliquer cette absence de lien entre les estimateurs de WUE. Il est tout à fait possible que toutes nos mesures de  $W_i$  sur quelques feuilles (sous conditions saturantes, non saturantes, non contrôlées) ne reflètent pas les échanges gazeux des plantes entières et sur la durée. Il est également possible que TE soit fortement découplée des échanges gazeux foliaires, de par des pertes d'eau et de carbone par processus non photosynthétiques (transpirations nocturnes, cuticulaires, émission de composés volatiles...). Il est également possible que la relation entre ces variables ne soit pas linéaire et/ou propre à chaque génotype et/ou traitement. Dans cette même étude nous avons en revanche détecté une relation positive et fortement significative entre la composition isotopique foliaire et TE (de l'ordre de +29%). Cette relation reste cependant bien en deçà de celle observée**

par Roussel (Thèse), entre la discrimination isotopique de différents compartiments organiques et TE pour lesquels la variabilité était expliquée de 43 à 71%. Ces fortes relations ont cependant été établies au sein d'une seule et même espèce dont la variabilité avait été élargie en sélectionnant des géotypes extrêmes et intermédiaires. A l'instar de  $W_i$ , il est tout à fait possible que des relations propres à chaque traitement existent.

**Il existe une relation positive fortement significative entre les deux estimateurs de l'efficacité intégrés dans le temps obtenue pendant l'expérimentation de 2015 ( $\delta^{13}C$  et TE). La composition isotopique des feuilles pourrait alors être utilisée comme estimateur relativement fiable lors de large screening de l'efficacité de transpiration chez ces deux espèces (Fig 6 p214).**

#### *Traits anatomiques et/ou physiologiques associés à l'efficacité de transpiration (TE)*

A l'échelle foliaire, la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ) peut être par définition liée soit à l'une de ses composantes ( $A_n$  et  $g_s$ ) soit aux deux. Ces deux composantes sont elles-même fortement corrélées au sein d'une même espèce (Lauteri et al., 1997 ; Rouspard et al., 1998) comme par exemple le chêne pédonculé (Roussel et al., 2009). Ces précédents travaux mettaient en évidence une relation systématique et négative entre  $W_i$  et  $g_s$  sans toutefois établir de consensus vis-à-vis de la relation entre  $W_i$  et  $A_n$ , cette relation étant parfois trouvée positive ou négative.

Dans l'étude de 2016 sur le chêne sessile (Article 4) une corrélation (ANCOVA intégrant l'effet traitement) entre  $A_{n-m}$  et  $g_{s-m}$  ( $R^2=0.34$ ) a été mise en évidence pour des mesures réalisées en conditions non contrôlées. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes réalisées sur le chêne et traduisent le fait qu'un individu à forte conductance sera également caractérisé par une forte assimilation nette de  $CO_2$ . Cependant ces deux composantes ont toutes deux été négativement et faiblement corrélées à l'efficacité d'utilisation de l'eau qui en résultait ( $W_{i-m}$ ). **Ce résultat met en relief la régulation qu'exerce la conductance stomatique sur l'efficacité d'utilisation de l'eau. Un individu présente alors une forte efficacité pour de faibles valeurs de conductance et d'assimilation nette de  $CO_2$ .**

Par ailleurs dans cette étude (2016),  $W_i$  a faiblement reflété les variations de TE ( $R^2=0.12$ ). La conductance stomatique explique une plus grande variation de TE ( $R^2=0.13$ ), allant dans le sens des individus à la meilleure efficacité de transpiration ayant les plus faibles valeurs de conductance stomatique. Concernant l'efficacité de transpiration (TE), nous n'avons établi qu'une faible corrélation positive entre celle-ci et sa production de biomasse ( $R^2=0.09$ ). La

biomasse produite n'est elle-même ni corrélée à  $g_s$ -m ou  $A_n$ -m. Ce résultat est à l'opposé de celui obtenu par Roussel et al., (2009), étude pour laquelle l'efficacité de transpiration du chêne pédonculé était négativement corrélée à la quantité d'eau transpirée sur toute la période de végétation et aucune corrélation n'était détectée pour la biomasse produite. Il faut par ailleurs noter que dans le cadre de notre étude sur plusieurs provenances de chênes sessiles, la production de biomasse était fortement corrélée à l'eau consommée (elle-même dépendante de la conductance stomatique). **Il semblerait donc que pour *Q. petraea* ce soit la production de biomasse qui détermine l'efficacité de transpiration des individus ; cette même biomasse conditionne alors l'eau consommée, elle-même régulée par la conductance stomatique** (ce que suggère la corrélation négative entre TE et la consommation en eau rapportée à la surface foliaire (TWCS) également obtenue ; Fig 6 p214). Parmi l'ensemble des traits anatomiques mesurés, l'efficacité de transpiration ne corrélait positivement qu'avec les traits racinaires (la biomasse racinaire totale et la biomasse des racines fines). L'ensemble des traits corrélait évidemment avec la biomasse totale produite par les plantes et la forte relation entre biomasse produite et eau consommée (TWC) se reflétait par des corrélations plus faibles entre TWC et l'ensemble des traits anatomiques. **Ces résultats soulignent encore une fois l'importance de la biomasse notamment racinaire sur la variabilité de l'efficacité de transpiration chez *Q. petraea*.**

L'étude comparative réalisée en 2015 (Article 2) corrobore la plupart des résultats précédemment décrits, l'efficacité de transpiration étant encore une fois uniquement corrélée à la biomasse produite parmi ses composantes ( $R^2=16$  : ANCOVA intégrant l'effet espèce et traitement) ainsi que négativement corrélée à TWCS ( $R^2=0,07$ ). TE était également fortement corrélée aux traits racinaires (notamment les racines fines et intermédiaires  $R^2=0,34/0,42$  respectivement).

**Les relations globales établies par nos travaux montrent à plusieurs reprises qu'à un stade juvénile, la variabilité de l'efficacité de transpiration chez les deux espèces est vraisemblablement déterminée par la variabilité entre individus pour la production de biomasse et plus particulièrement la biomasse racinaire. Un individu à forte efficacité est caractérisé par une forte croissance (aérienne et racinaire) ainsi qu'une quantité d'eau transpirée par surface foliaire plus faible (Fig 6 p214).**

**Il est nécessaire de garder à l'esprit que la plupart des différences anatomiques rencontrées entre les deux espèces l'ont été pour les traits racinaires (Article 2). *Q. petraea***



et *Q. robur* se sont en effet distingués l'un de l'autre par des profils racinaires et de croissance très différente. Nous avons par ailleurs souligné l'impact de l'âge sur la croissance des individus observé au sein de la littérature, l'efficacité de transpiration étant ici fortement liée à la production de biomasse notamment racinaire. Il nous est permis d'émettre l'hypothèse que les rangs d'efficacité sont susceptibles de fortement changer au fur et à mesure du vieillissement des individus.

#### *Implications écologiques de l'efficacité*

Nous n'avons pas observé de différences d'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque entre les deux espèces à un stade juvénile chez des plants ayant grandi en serre (Article 2,3). Aussi bien en condition de sécheresse que non limitante, *Q. petraea* et *Q. robur* ont exprimé des valeurs similaires contredisant ainsi les précédentes études comparatives réalisées (Thèse Ponton). Cependant à l'instar de ces travaux, nous avons observé une croissance en hauteur et radiale ainsi qu'une accumulation de biomasse significativement supérieures chez *Q. robur* en comparaison de *Q. petraea*. Ces récurrences de dynamiques de croissance chez les deux espèces, bien qu'il existe des différences interspécifiques de l'efficacité contradictoires (entre les travaux de Stéphane Ponton et les nôtres), pourraient exclure  $W_i$  comme ayant des répercussions déterminantes sur l'écologie des espèces et la différenciation de leurs niches respectives à un stade juvénile et/ou *a minima* sur leurs dynamiques de croissance. Néanmoins, une telle assertion nécessite plus ample investigation. Par ailleurs, la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau (intrinsèque et dans une moindre mesure TE (2016)) semble être principalement liée à celle de la conductance stomatique, soulignant l'importance de la régulation des échanges gazeux par les mouvements stomatiques et ainsi potentiellement l'importance de la dynamique stomatique en réponse à un stimulus environnemental chez le chêne.

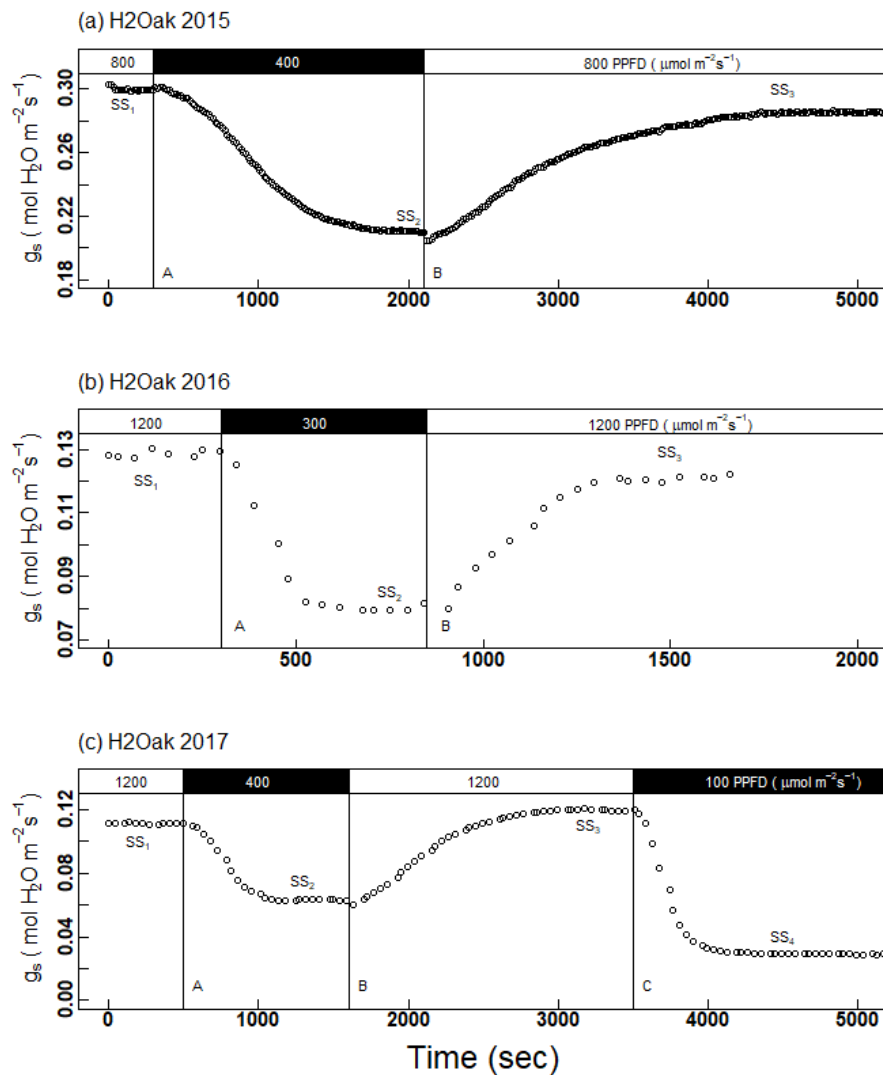
Nos résultats semblent par ailleurs confirmer l'observation préalablement proposée par Généré et Le Bouler (1996) établissant que seules les différences interspécifiques de dynamiques de croissance au cours de la première année de développement et donc d'accumulations de biomasse (elles-mêmes sous régulation stomatique) seraient suffisantes pour expliquer les différences écologiques entre les deux espèces, tout du moins à un stade juvénile. Cet état de fait s'est par ailleurs traduit par des valeurs d'efficacité de transpiration supérieures chez *Q. robur* par rapport à *Q. petraea* (Article 2). En outre, ces dynamiques de croissance ainsi que cette plus forte efficacité de transpiration chez *Q. robur* semblent illustrer le caractère pionnier de cette espèce, également susceptible d'être associé à une meilleure compétitivité au stade

juvénile face à *Q. petraea*. Nous avons associé une forte efficacité de transpiration chez le chêne à une forte productivité plutôt qu'à une meilleure gestion de l'eau. En outre, les individus présentant les meilleures efficacités de transpiration sont également ceux ayant développé les systèmes racinaires les plus étendus. Ce qui nous permet de conjecturer que le maintien d'une forte efficacité de transpiration accorderait un avantage au sein d'un environnement aride, dû à une meilleure capacité de prospection des sols et donc d'accès à l'eau. Cependant une forte efficacité liée à la productivité nous semble avant tout un marqueur de forte compétitivité. En effet dans le cadre de nos travaux, sur des plants juvéniles élevés en serre, une forte efficacité de transpiration nous semble être essentiellement une stratégie maximisant la croissance et la production de biomasse afin de se soustraire à la pression de sélection par compétition.

En outre, la comparaison des espèces entre elles ayant motivé ces travaux a permis d'observer des divergences écophysologiques majeures entre les deux espèces notamment vis-à-vis des dynamiques de croissance respectives des deux espèces ainsi que des différences interspécifiques, notamment liées au compartiment racinaire. Si la variation de la production de biomasse racinaire a en effet été associée ultimement à l'efficacité de transpiration des plants, nos travaux semblent suggérer que c'est aussi et surtout la nature des profils racinaires (compositions en racines plus ou moins fines) qui conditionnerait la capacité de prospection des sols des deux espèces et donc à terme la tolérance à la sécheresse différentielle (supposée) des deux espèces. Cette observation nous semble être un résultat majeur de ces travaux de thèse. Néanmoins, des efforts supplémentaires sont requis afin de définir, par des observations physiologiques et morphologiques, les divergences entre les deux espèces sous diverses conditions environnementales aussi bien favorables que défavorables, afin de déterminer si celles-ci sont déterminantes pour la croissance future des individus ainsi que persistantes au cours du vieillissement des peuplements.

#### Description de la dynamique de réponse stomatique

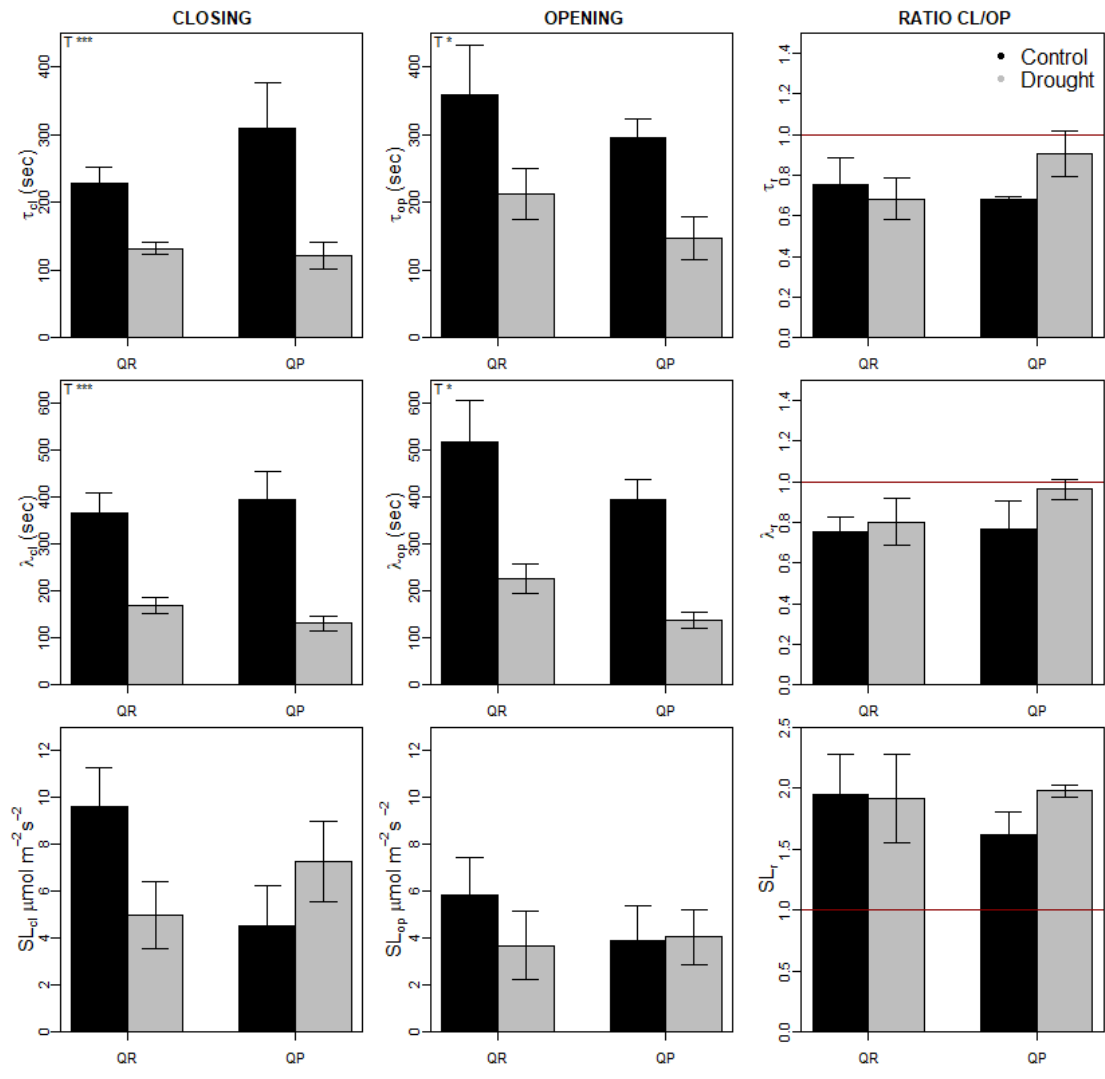
Nous avons pour objectif de décrire la diversité de réponse des stomates à la suite d'un changement brutal des conditions microclimatiques ainsi que sa plasticité sous un stress hydrique. Au cours des différentes expérimentations nos efforts ont visé à caractériser la réponse à la lumière à travers différentes combinaisons de stimuli lumineux (Figure 1)



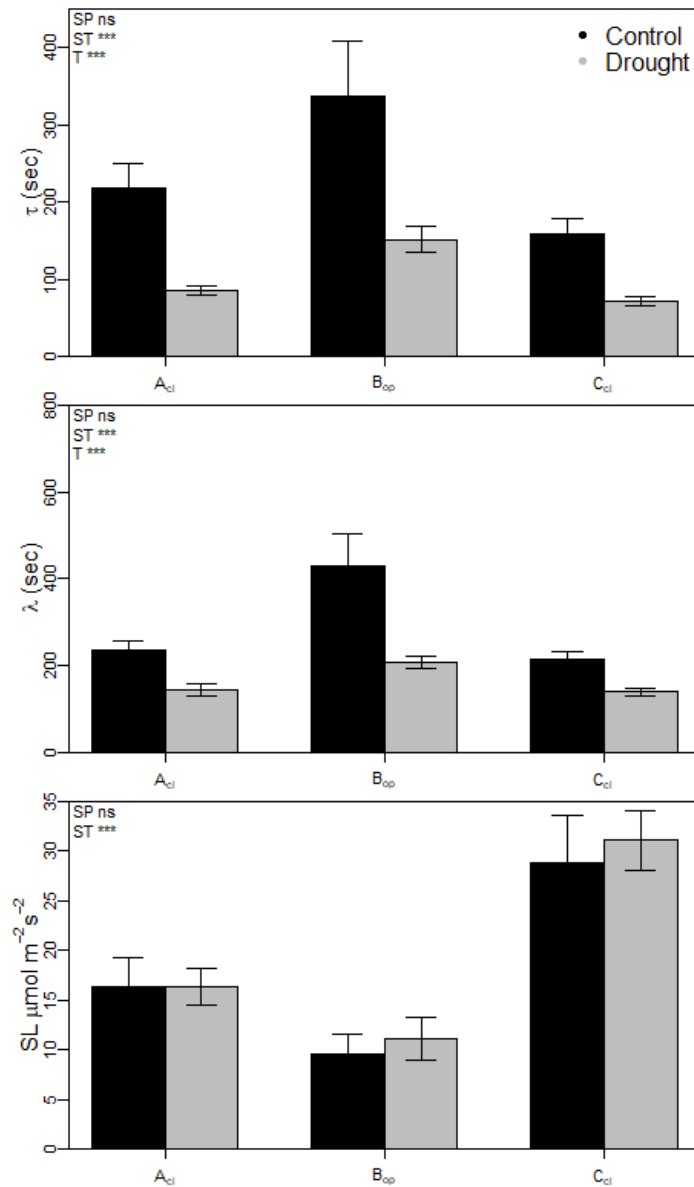
**Figure 1** : Visualisation des différents protocoles de caractérisation de la réponse temporelle à la lumière utilisés au cours de la thèse en 2015 (a) ,2016 (b) et 2017 (c). La figure (a) illustre la réponse type d'une plante bien irriguée dont le cycle de fermeture/réouverture dure environs 5000 secondes. Les figures (b,c) illustrent les cycles plus rapides obtenus chez des plantes soumises à un stress hydrique (environs 2000 secondes dans les cas présents). Avec «  $SS_x$  » identifiant les différents steady-states de conductance stomatique.

### *Différence interspécifique de la dynamique de réponse à la lumière*

L'ensemble des mesures de réponse stomatique à la lumière (articles 2 et 3) a permis de mettre en évidence l'absence de différences entre *Q. petraea* et *Q. robur* pour l'ensemble des paramètres dynamiques ( $\tau$ ,  $\lambda$  et  $SL_{\text{max}}$ ), aussi bien en séquence de fermeture que d'ouverture stomatique (i.e figure 2). De plus, les deux espèces ont affiché la même plasticité de réponse au stress hydrique caractérisée par des mouvements stomatiques plus rapides. Ces résultats répétés sous différentes modalités d'intensité lumineuse suggèrent que chez les jeunes plants de chênes il n'existe pas de différence interspécifique dans la réponse à des sauts de lumière (Article 2,3).



**Figure 2 :** Illustration des paramètres dynamiques extraits des courbes réalisées en 2015 (voir article 2 chapitre III)



**Figure 3 :** Illustration des paramètres dynamiques extraits des courbes réalisées en 2017. En raison de l'absence de différences entre espèces l'ensemble les mesures sur *Q. petraea* et *Q. robur* sont présentées ensemble afin de mettre en évidence les différences entre séquences (A,B,C : voir article 3 chapitre II)

**Par ailleurs, nous avons mesuré l'amplitude de réponse stomatique et photosynthétique faisant suite au stimulus environnemental (Article 2,3). A l'instar des paramètres dynamiques, les deux espèces ont affiché les mêmes amplitudes de réponses. Nous en concluons donc qu'à un stade juvénile *Q. robur* et *Q. petraea* semblent être similairement sensibles aux changements abrupts de lumière.**

### *Implications de la rapidité de réponse stomatique sur les échanges gazeux de *Q. robur* et *Q. petraea**

Au sein du cadre expérimental de cette thèse, l'ensemble des données physiologiques obtenues décrivant la dynamique de réponse stomatique indique une rapidité de réponse accrue sous conditions de stress hydrique (Article 1, 2, 3,4) en accord avec les considérations théoriques suggèrent un comportement stomatique optimisant la conservation de l'eau (Vico et al., 2011 ; Lawson & Chabrand 2018). A notre connaissance, seuls Durand et al., (2019) ont mis en évidence des corrélations entre dynamique de réponse stomatique et échanges gazeux foliaires intégrés sur le long terme chez plusieurs génotypes de peupliers, confirmant ainsi l'importance de l'étude de la dynamique des stomates, notamment à des fins de modélisation des échanges gazeux des arbres.

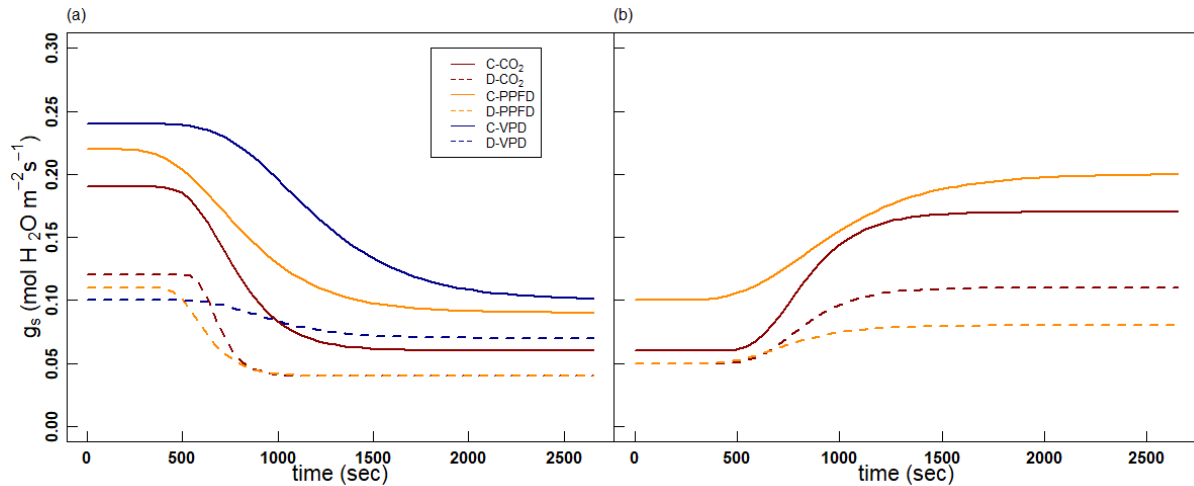
**Nos résultats suggèrent que la dynamique de réponse stomatique n'est pas à l'origine des différences d'efficacité de transpiration observées entre les deux espèces (Article 2 et 3), aucune corrélation directe entre les deux (ou les composantes de l'efficacité) n'ayant pu être établie.** Il semble nécessaire afin de valider ou d'infirmer les hypothèses liées à l'impact de la dynamique de réponse stomatique chez le chêne, de compléter les données existantes à l'aide de futures études. Ces travaux de thèse ayant été réalisés essentiellement en période estivale, au sein de serres assujetties aux conditions météorologiques locales, il est en effet possible que les conditions de croissance aient été globalement trop stables en termes d'exposition à la lumière pour que l'influence potentielle d'une variabilité de rapidité de réponse stomatique sur la consommation en eau et la production de biomasse soit détectable. Il semble donc a priori nécessaire de mettre en place dans l'avenir des expérimentations au sein d'environnements contrôlés sous régimes de lumières hautement fluctuants ainsi que d'étendre la gamme d'espèces de chêne, élargissant potentiellement la variabilité interspécifique de réponses stomatiques afin d'aller plus loin sur ce sujet.

**En outre, les résultats de nos études comparatives (Article 2 et 3) nous permettent pour le moment de conclure à la ténuité des différences de dynamique de réponse à un changement abrupt de lumière chez des jeunes chênes sessiles et pédonculés ayant grandi en serre. Celle-ci ne jouerait pas un rôle déterminant dans la différenciation des niches écologiques des deux espèces à un stade juvénile.**

Indépendamment de la réponse photosynthétique à l'intensité lumineuse largement traitée dans ces travaux de thèse, il existe une deuxième voie de régulation stomatique associée au spectre

lumineux (Kinoshita et al., 2001 ; Hu et al., 2010, Vialet-chabrand et al., 2013). Cette voie d'activation fait intervenir les phototropines dans la sensibilité des plantes à la lumière bleue (Kinoshita et al., 2001 ; Shimazaki et al., 2007) et impliquerait par ailleurs des pigments tels que la zéaxanthine. D'après Kirschbaum et al., (1988), les réponses temporelles de la conductance stomatique seraient dépendantes du spectre lumineux au cours des cycles journaliers. Plus récemment Vialet-Chabrand (2013c) a mis en évidence des résultats pouvant laisser suggérer des différences de perception à la lumière bleue impactant  $g_s$  chez *Q. petraea* et *Q. robur*. Cependant, étant donné le faible nombre de plants mesurés au cours de cette étude, ces résultats requièrent d'être approfondis. Nous n'avons pas réalisé de cinétiques journalières des échanges gazeux, ni exploré différentes qualités de lumière dans le cadre de ce projet de thèse. Des efforts supplémentaires sont donc à envisager afin d'étudier l'impact de la diversité de perception du spectre lumineux sur les variations de la conductance stomatique et donc de  $W_i$  au cours de la journée ainsi que leurs potentielles implications sur les divergences écologiques entre les deux espèces de chêne.

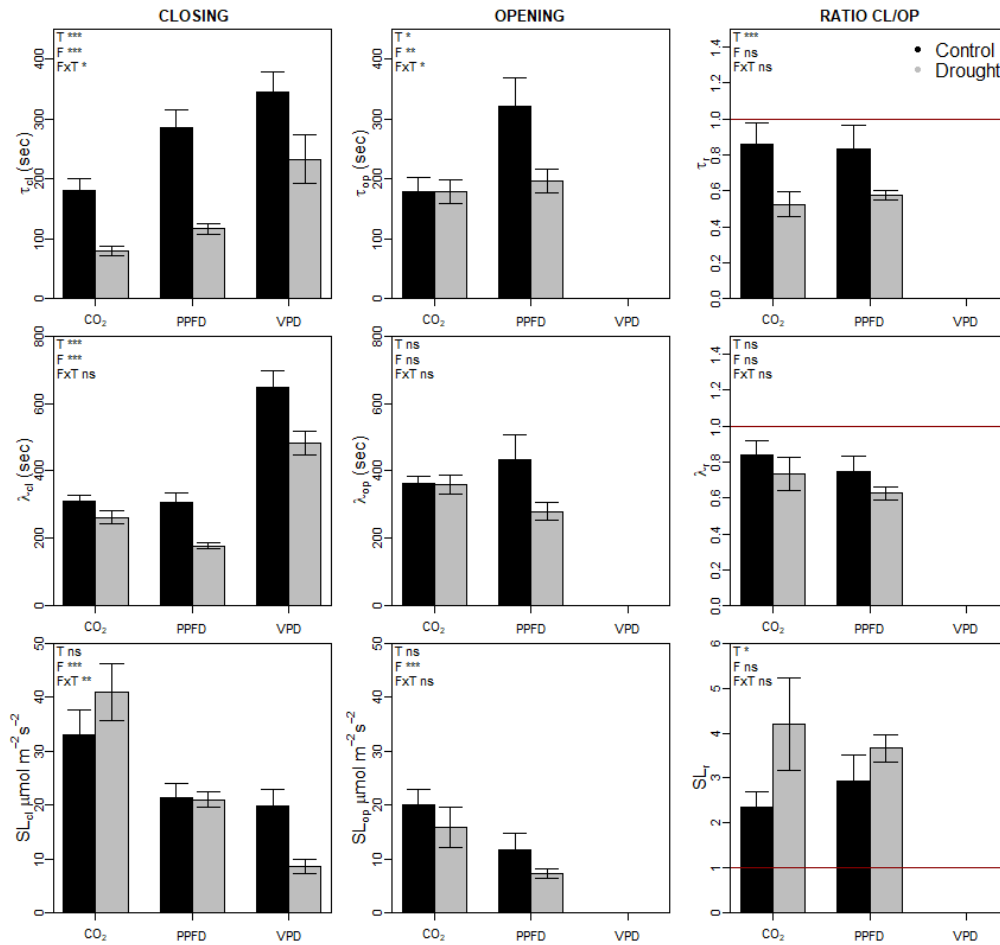
Il faut par ailleurs prendre en considération le fait que nous ayons étudié les dynamiques de réponses à des stimuli uniques ; or sous conditions naturelles, les fluctuations de lumière sont susceptibles d'être accompagnées de changements transitoires de température ainsi que de déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère. Les fluctuations environnementales subies par les plantes sous conditions naturelles sont ainsi probablement plus complexes que celles subies lors des mesures que nous avons réalisées sous conditions contrôlées. Par ailleurs, nous avons mis en évidence lors de nos travaux une large variabilité de rapidité des mouvements stomatiques en réponse à différents facteurs environnementaux (lumière,  $CO_2$ , VPD : Article 4). Il semble par conséquent nécessaire d'étudier la dynamique de réponse à travers la combinaison de l'ensemble des facteurs fluctuants lors d'un changement de lumière en conditions naturelles mais aussi chaque réponse isolément afin de plus finement en appréhender l'impact sur le fonctionnement des plantes en conditions naturelles.



**Figure 4 :** Visualisation des différentes réponses sigmoïdales induites chez *Q. petraea* par 3 facteurs environnementaux ( $\text{CO}_2$ , PAR, VPD). Les courbes ont été tracées en fonction des valeurs moyennes de chaque paramètre dynamique et des valeurs de conductances stomatiques en steady-states pour les fermetures (a) et les ouvertures (b). Les courbes hachurées illustrent les réponses en conditions de stress et les courbes pleines en conditions contrôles (voir article 4 chapitre IV pour les valeurs des paramètres).

Au cours de l'expérimentation menée en 2016 nous avons exploré la diversité de la rapidité de réponse stomatique à ces différentes variables environnementales chez *Q. petraea* (Article 4). Nous avons décrit la dynamique de réponse stomatique à trois facteurs environnementaux : la lumière, la concentration ambiante de  $\text{CO}_2$ , et le VPD (figure 4). L'absence de données concernant la réouverture stomatique en réponse au VPD est ici la résultante d'une apparente sensibilité de *Q. petraea* suite à l'exposition à un fort déficit de pression de vapeur d'eau. En effet les tests préliminaires que nous avons réalisés en amont de cette expérimentation nous ont permis d'observer l'absence de réouverture, ou une réouverture particulièrement faible et tardive suivant la séquence de fermeture initiale chez *Q. petraea*. Ce faisant nous ne disposons pas d'éléments descriptifs concernant la réouverture stomatique en réponse au VPD, cette contrainte impliquant des séries de mesures particulièrement chronophages.





**Figure 5** : Schéma récapitulatif des paramètres dynamiques extraits des courbes réalisées en 2016 sur *Q. petraea*. (voir article 4 chapitre IV). Les lignes horizontales rouge matérialisent la symétrie entre ouverture et fermeture.

Pendant la fermeture des stomates il apparait clairement des différences entre facteurs pour le paramètre  $\tau$ , les mouvements les plus rapides sont observés en réponse au  $\text{CO}_2$  puis à la lumière et enfin au VPD. Les trois facteurs sont impactés par le stress hydrique qui induit des réponses plus rapides systématiquement ; néanmoins la réponse au VPD semble moins impactée que les deux autres facteurs. Pendant l'ouverture cette même hiérarchie de réponse semble conservée, cependant la réponse au  $\text{CO}_2$  ne semble plus impactée par le traitement contrairement au PAR. Toutes ces différences entre facteurs et séquences de mouvement résultent cependant en des ratios identiques quel que soit le facteur (ratio fermeture/ouverture :  $\tau_r$ ). Sous condition non limitantes ces ratios sont sensiblement inférieurs à 1 indiquant une asymétrie de réponse marquée par des fermetures plus rapides que les ouvertures, cette asymétrie est accentuée sous conditions de stress essentiellement à cause de l'accélération des fermetures stomatiques.

Globalement les délais de réponse ( $\lambda$ ) sont semblables pour le  $\text{CO}_2$  et le PAR à la fois pour la fermeture et l'ouverture stomatiques, il en résulte les mêmes ratios d'asymétrie. A supposer que  $\lambda$  illustre avec justesse le délai de signalisation et d'activation du mouvement stomatique en

réponse au stimulus (McAusland et al., 2016), ce résultat pourrait indiquer l'existence de mécanismes communs impliqués dans les voies de signalisation des deux facteurs. Par ailleurs, la réponse au VPD se distingue par un délai stomatique deux fois plus lent que les deux autres facteurs.

La pente maximale (SL) étant dépendante de l'amplitude du changement de conductance stomatique il est difficile de comparer les facteurs entre eux pour ce paramètre, l'amplitude étant elle-même définie par l'intensité du stimulus. Globalement la sécheresse n'impacte pas significativement les pentes maximales des trois facteurs. Malgré cela, pendant la séquence de fermeture nos résultats tendent à suggérer un impact différentiel du traitement sur les réponses au CO<sub>2</sub> et le VPD. La réponse au VPD semble en effet sensiblement plus lente sous sécheresse à l'inverse de la réponse au CO<sub>2</sub> qui serait plus rapide. Là encore les paramètres respectent la hiérarchie de rapidité précédemment établie pour  $\tau$  à la fois pour la fermeture et l'ouverture. Conformément aux autres paramètres, le ratio des pentes entre fermeture et ouverture (SLr) affiche des fermetures plus rapides que l'ouverture, ce ratio est significativement impacté par le stress hydrique accentuant l'asymétrie.

**Pour résumer, quel que soit le facteur considéré, lorsqu'un effet significatif du stress est détecté celui-ci est marqué par une réponse stomatique plus rapide.** Ce résultat peut laisser supposer l'existence de mécanismes communs d'acclimatation à la sécheresse. Néanmoins la forme de hiérarchisation des vitesses de réponse ainsi que les quelques interactions Facteur\*Traitement suggèrent également des processus propres à chaque stimulus. Cependant nous ne disposons pas des éléments nécessaires pour établir si ces différences sont liées à l'intensité des facteurs ou à leur nature elle-même. Un tel comportement stomatique plus rapide sous sécheresse est encore une fois compatible avec les considérations théoriques faisant l'hypothèse d'un meilleur couplage entre conductance stomatique et assimilation optimisant l'efficacité d'utilisation de l'eau (Lawson & Blatt, 2014, McAusland et al., 2016, Lawson & Vialet-Chabrand, 2018). Par ailleurs, il existe une asymétrie systématique de réponse caractérisée par une fermeture plus rapide que l'ouverture, cette asymétrie est accentuée significativement en situation de stress ( $\tau$  et SL). Ces résultats corroborent également l'adoption d'un comportement stomatique limitant les pertes en eau grâce à des fermetures stomatiques accélérées (Ooba et al., 2009 ; Vico et al., 2011). Il est toutefois notable que de manière assez surprenante, l'asymétrie ne diffère jamais entre les facteurs, quel que soit le paramètre considéré et tend systématiquement vers des fermetures plus rapides que les ouvertures. Bien que cela nécessite quelques précautions, l'asymétrie semble donc être un paramètre relativement

conservé dans la dynamique de réponse de *Q. petraea* (eu égard aux différents traitements hydriques).

**Nos travaux sont donc a priori les premiers à mettre en évidence chez *Q. robur* et *Q. petraea* un effet systématique de la sécheresse sur la dynamique de réponse stomatique se traduisant par des vitesses de réponse accrues et ce pour différents facteurs environnementaux (y compris chez le tabac). Ces résultats corroborent l'hypothèse d'un comportement stomatique visant à optimiser les échanges gazeux bien que nous n'ayons pu établir de lien direct entre dynamique stomatique et efficacité de transpiration.**

Notons également que ces derniers travaux n'ont été réalisés que sur le chêne sessile. Il subsiste donc toujours des interrogations concernant les possibles différences interspécifiques entre *Q. robur* et *Q. petraea* dans leurs réponses au VPD et au CO<sub>2</sub> qu'il conviendra d'adresser dans la continuité de nos travaux.

Outre les interactions complexes entre les différentes voies de perception et de signalisation des variables environnementales, Aasamaa et Sober (2011) ont proposé une hiérarchisation de la réponse stomatique à ces différents stimuli. Selon ces règles de priorité, la conductance stomatique réagit en priorité aux changements de potentiel hydrique foliaire, ceux-ci étant tributaires du statut hydrique des plantes et donc sensibles au stress hydrique. Les changements de VPD interviendraient en seconde position. La lumière et le CO<sub>2</sub> seraient finalement les variables environnementales les moins prioritaires dans la réponse hiérarchique de la conductance stomatique. Sur la base de ces règles, Vialet-Chabrand (Thèse) notait ainsi la prédominance de la régulation stomatique sur les pertes en eau. Il faut par ailleurs considérer le fait qu'en absence de stress hydrique, la réponse stomatique au VPD serait donc prioritaire.

#### *Traits physiologiques et/ou anatomiques potentiellement liés à la rapidité de réponse stomatique*

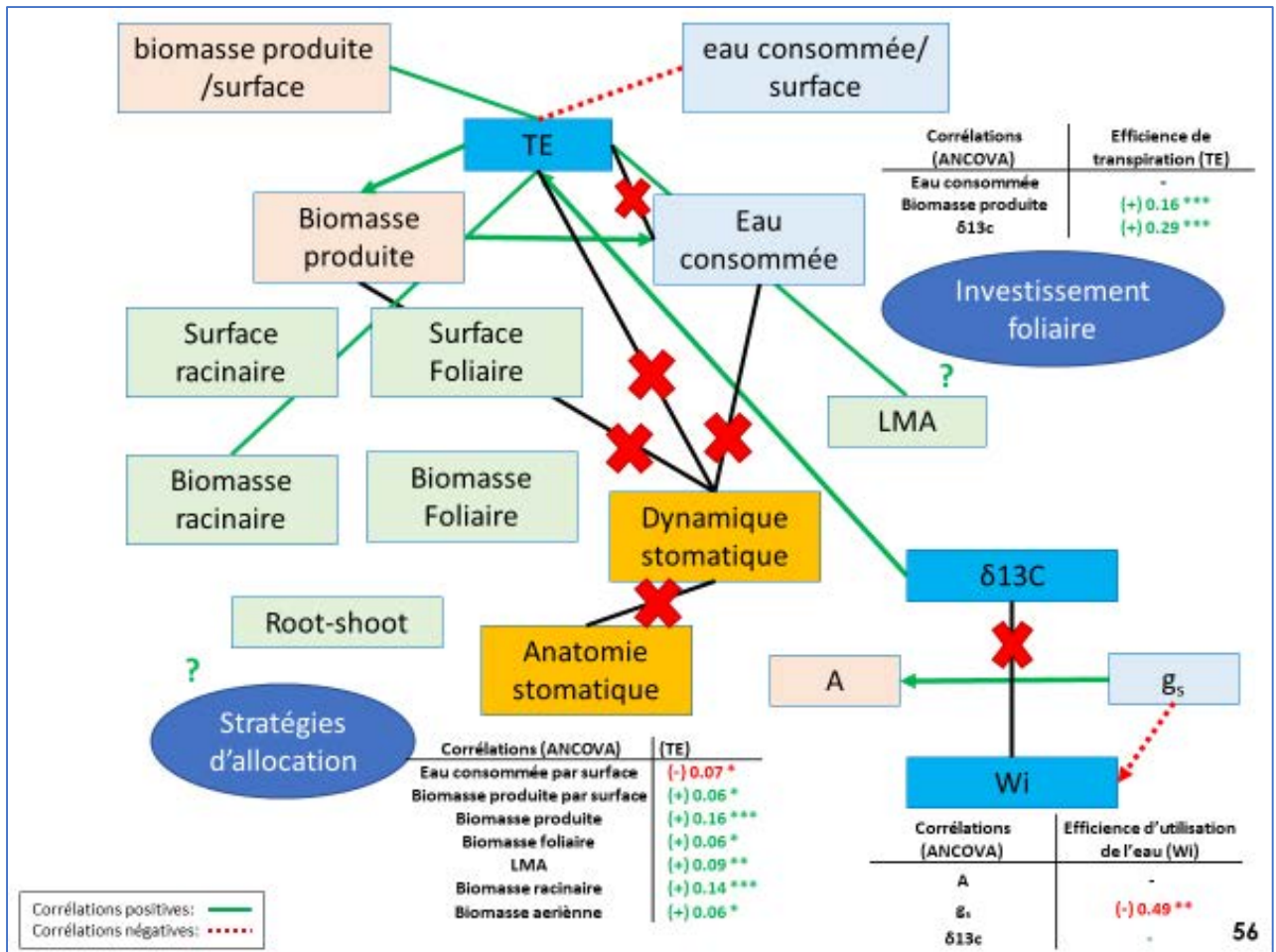
Bien qu'il ait initialement été proposé par Drake et al. (2013) que de plus petits stomates puissent induire des réponses stomatiques plus rapides dues à un ratio : surface membranaire /volume d'eau plus élevé que des stomates plus grands, les études disponibles sur le sujet ne sont pas encore aujourd'hui parvenues à un consensus clair (Drake et al., 2013 ; Raven et al., 2014 ; McAusland et al., 2016 ; Gerardin et al., 2018 (Article 1) ; Xiong et al., 2018 ; Durand et al., 2019).

**Dans le cadre de ce projet de thèse et ce pour l'ensemble des études pendant lesquelles nous avons mesuré les traits stomatiques (Article 2, 4), nous n'avons pas observé de**

**relation entre rapidité de réponse stomatique ( $\lambda$ ,  $\tau$ , SL) et traits stomatiques (SD, SS...). Nous n'avons par ailleurs pas non plus mis en évidence de relation entre la dynamique de réponse stomatique et quel qu'autres traits anatomiques et/ou physiologiques (Fig 6).**

Cependant, bien que les deux espèces aient affiché des dynamiques de réponse stomatique identiques, nous avons mis en évidence un fort effet de la sécheresse sur la rapidité de réponse ainsi qu'une large variabilité de réponses en fonction du facteur environnemental à l'origine de la réponse (Article 4) ne pouvant pas être attribués aux traits stomatiques. Ce faisant, la caractérisation des mécanismes impliqués dans la dynamique de réponse stomatique chez les chênes ainsi que l'identification des traits physiologiques et anatomiques liés à cette réponse nécessitent d'être explorés plus finement dans le futur.

La réponse stomatique au CO<sub>2</sub> est également couplée à l'ABA (Merilo et al., 2013 ; Chater et al., 2015), Récemment, Horak et al. (2017) mirent en évidence des réponses temporelles stomatiques analogues à l'ABA et au CO<sub>2</sub> suggérant l'existence de mécanismes communs. Cette phytohormone est également connue pour être régulée par le stress hydrique, l'augmentation des niveaux d'ABA dans les cellules stomatiques soumises au stress est un phénomène aujourd'hui souvent rapporté dans la littérature. En addition, l'acide abscissique est un médiateur de la réponse stomatique aux changements de VPD chez les angiospermes (Bauer et al., 2013 ; Merilo et al., 2013 ; McAdam & Brodribb, 2015). Nos résultats montrent que l'ensemble des paramètres dynamiques (à l'exception de SL) étaient plus rapides sous conditions de sécheresse quel que soit le facteur environnemental initiant le mouvement stomatique, suggérant des mécanismes communs d'acclimatation à la sécheresse dans ces réponses. L'ensemble de ces faisceaux de preuves tend à désigner l'acide abscissique comme étant une phytohormone probablement impliquée dans la rapidité de réponse stomatique. L'apparente implication de l'ABA dans les voies de signalisation de ces différents facteurs décrite au sein de la littérature constitue de fait une piste de réflexion concernant l'étude de la dynamique de réponse stomatique.



**Figure 6:** Schéma récapitulatif des liens entre les différents estimateurs de l'efficacité d'utilisation de l'eau et leurs composantes respectives ainsi que les traits liés à la dynamique de réponse des stomates et la répartition de la biomasse produite. Avec en vert, les corrélations positives (ANCOVA : Variable testée fonction de l'effet (Traitement + espèce + la variable X), en rouge pointillé les corrélations négatives et en noir assorti d'une croix rouge les absences de corrélations. Les différents tableaux présentent les résultats (signes de la corrélation,  $r^2$  partiels et significativité) des tests ANCOVA.

## Conclusions

L'ensemble de nos travaux avait vocation à répondre à trois questions principales :

*Existe-t-il des différences d'utilisation de l'eau conservées à différentes échelles d'intégrations entre *Q. robur* et *Q. petraea* susceptibles d'expliquer les divergences entre leurs niches écologiques respectives ?*

L'analyse de l'efficacité d'utilisation de l'eau de jeunes chênes sessiles et pédonculés à travers plusieurs estimateurs de l'efficacité intégrés à différentes échelles nous a permis de décrire finement les différences de comportement écologiques entre les deux espèces. Nous avons assisté de manière générale à une plasticité de réponse à la sécheresse de l'efficacité d'utilisation de l'eau pour l'ensemble des estimateurs, caractérisée par une plus forte efficacité sous stress hydrique. Cependant, les différents estimateurs ne constituent pas un bloc cohérent reflétant fidèlement leurs variations respectives. En effet bien qu'il existe théoriquement des relations entre les estimateurs de l'efficacité intégrés dans le temps et de la feuille à la plante entière ( $W_i$ ,  $\delta^{13}C$ , TE) ces relations se sont révélées relativement faibles et inconstantes d'une expérimentation à une autre.

En outre l'étude de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ne nous a pas permis d'expliquer des comportements écologiques différentiels exhibés par les deux espèces dans la mesure où nous n'avons pas établi de différences interspécifiques pour cet estimateur. En revanche et pour la première fois à notre connaissance nous avons démontré une différence d'efficacité de transpiration entre les deux espèces, *Q. robur* affichant des efficacités plus élevées que *Q. petraea*, prenant à contrepied la littérature décrivant en général *Q. petraea* comme plus efficace que *Q. robur* pour les autres estimateurs de l'efficacité ( $W_i$ ,  $\delta^{13}C$ ). En outre et ce pour les deux espèces, l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque apparaît comme étant principalement régulée par la conductance stomatique, mettant en relief la nécessité pour les plantes de réguler les échanges gazeux à l'échelle foliaire.

*Quelles sont les traits physiologiques et anatomiques à l'origine de la variabilité des différents estimateurs de l'efficacité d'utilisation de l'eau ?*

L'approche éco-physiologique de ces travaux de thèse visait à décrypter les mécanismes impliqués dans la variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les chênes sessiles et pédonculés. Nos travaux avaient ainsi vocation à déterminer les causes physiologiques et/ou anatomiques de la variabilité de différents estimateurs de l'efficacité intégrés à différentes

échelles. De nombreux traits foliaires, racinaires, stomatiques et physiologiques ont ainsi été analysés eu égard de l'efficacité d'utilisation de l'eau (ANCOVA intégrant l'effet espèce et/ou traitement). De tous ces traits et en accord avec la littérature disponible chez ces deux espèces de chênes, la conductance stomatique est le facteur contribuant le plus à la variabilité de l'efficacité intrinsèque ( $W_i$ ).

A l'échelle plante entière, la production de biomasse s'est avérée être le déterminant principal de la variabilité de l'efficacité de transpiration. Ainsi, les individus les plus efficaces étaient les individus produisant le plus de biomasse notamment racinaire. Or, au cours de nos travaux *Q. petraea* et *Q. robur* se sont essentiellement différenciés à travers leur croissance racinaire et les profils qui en découlent. *Q. robur* affichant des capacités photosynthétiques ainsi que des taux d'assimilation nette du  $CO_2$  supérieurs, s'est ainsi démarqué de *Q. petraea* en produisant plus de biomasse. Cette production moindre était néanmoins compensée chez le chêne sessile par un investissement racinaire vers un profil plus ramifié et plus fin potentiellement associé à une meilleure prospection des sols par rapport à la biomasse engagée. Si à un stade juvénile, *Q. robur* bénéficie de sa meilleure croissance il est néanmoins possible qu'au fil du vieillissement des individus, *Q. petraea* devienne nettement avantagé en raison de son profil racinaire et de sa meilleure croissance au fil de sa maturation. Ce faisant, ces différents profils racinaires associés à l'efficacité de transpiration sont susceptibles d'avoir des implications majeures pour l'écologie des espèces en termes à la fois de compétitivité à un stade juvénile mais aussi de tolérance à la sécheresse via la prospection des sols.

Indépendamment de nos travaux Ponton et al., (2001) ont mis en évidence une forte corrélation entre discrimination isotopique et la surface conductrice dans le xylème, la discrimination isotopique intégrant ainsi l'expression de caractères liés au fonctionnement physiologique des chênes sous stress hydrique. Nous avons travaillé sur des jeunes individus ayant vécu une seule saison de végétation, par conséquent la question des liens entre traits anatomiques du bois et efficacité d'utilisation de l'eau demeure en suspens suite à cette thèse. L'exploration de l'anatomie du bois et notamment de ses propriétés hydrauliques semble un axe de recherche à ne pas négliger afin de mieux comprendre les divergences écologiques entre les deux espèces ainsi que leurs relations respectives avec l'efficacité d'utilisation de l'eau.

Il semble judicieux d'adopter une approche génétique en parallèle de cette approche écophysiologique : nous avons en effet identifié des traits physiologiques (racinaires, production de la biomasse) qu'il serait intéressant d'analyser à travers par exemple, les

techniques de co-localisation QTL permettant potentiellement de progresser vers une interprétation fonctionnelle de la variabilité génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau

*La dynamique de réponse stomatique en réponse à des stimuli environnementaux joue-t-elle un rôle significatif dans les échanges gazeux intégrés sur le long terme chez ces deux espèces ?*

Une large partie de nos travaux a consisté à explorer la dynamique de réponse stomatique à des changements environnementaux dont principalement la lumière. Nous avons lors de chaque expérimentation, réalisé des campagnes de mesures monitorant la réponse sigmoïdale des stomates à ces stimuli environnementaux. Nous avons ainsi traité des centaines de courbes sur lesquels nous avons ajusté un modèle dynamique permettant de décrire la réponse temporelle des stomates à travers plusieurs paramètres. Nous avons mis en évidence l'absence de différences entre les deux espèces vis-à-vis de la réponse à la lumière. Ce faisant il est peu probable que cet élément soit à l'origine de la différenciation écologique des espèces et notamment des meilleures efficacités de transpiration observées chez *Q. robur*. Cependant ces résultats restent à être confirmés dans la mesure où nous sommes les premiers et les seuls à en avoir fait état. Nous n'avons par ailleurs pas détecté de lien direct entre la rapidité de réponse stomatique et la consommation hydrique (y compris par surface foliaire) ainsi que la production de biomasse des plantes intégrées sur le long terme (et donc l'efficacité de transpiration). Cependant les chênes ont adopté des comportements stomatiques en adéquation avec les considérations théoriques établissant qu'une réponse stomatique rapide optimiserait le couplage entre conductance stomatique et assimilation nette de CO<sub>2</sub>. Nous avons ainsi observé une dynamique significativement plus rapide sous conditions de stress compatible avec une économie de la consommation en eau sur le long terme (notamment pendant les fermetures stomatiques). Par ailleurs l'asymétrie de réponse entre fermeture et ouverture stomatique semble être caractérisée chez le chêne par une fermeture plus rapide que l'ouverture. Cette asymétrie était également conservée sous stress hydrique. Un tel rapport entre fermeture et ouverture est encore une fois une indication d'un comportement stomatique visant à optimiser la conservation de l'eau. En effet, un couplage plus fin entre l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et la conductance stomatique pendant la fermeture ainsi que la prévention de situations d'overshoot (conductance stomatique élevée pour un gain faible ou nul d'assimilation) par des réouvertures plus lentes favorisent théoriquement une faible consommation en eau.

Indépendamment de la réponse à la lumière nous avons étudié la dynamique de réponse stomatique au CO<sub>2</sub> et au VPD. Une réponse commune à la sécheresse caractérisée par une



rapidité stomatique accrue a été globalement mise en évidence, suggérant l'existence de mécanismes communs impliqués dans la plasticité de réponse à la sécheresse de la dynamique. Néanmoins nous avons également décrit des réponses spécifiques à chaque facteur environnemental, indications de voies signalisations et processus qui leurs sont propres. Parmi ces réponses spécifiques, l'apparente sensibilité de *Q. petraea* au VPD notamment après une forte augmentation de celui-ci ainsi que la lente réponse que nous avons observée (par rapport aux autres facteurs) laissent suggérer que la dynamique de réponse stomatique au déficit de pression de vapeur d'eau pourrait avoir des implications écologiques considérables dans la différenciation écologique des espèces. De plus amples travaux traitant cette réponse nous semblent donc nécessaires.

De plus, nous ne sommes pas parvenus à établir de lien entre les différents paramètres dynamiques et d'éventuels traits physiologiques et anatomiques. La détermination des traits à l'origine de la variabilité de la dynamique de réponse ainsi que des mécanismes physiologiques impliqués reste donc à élucider.

## Bibliographie

- Aasamaa K, Söber A (2011) Responses of stomatal conductance to simultaneous changes in two environmental factors. *Tree Physiol* 31:855–864.
- Aas G (1993) Taxonomical impact of morphological variation in *Quercus robur* and *Q. petraea* contribution to the hybrid controversy. *Annales des Sciences Forestières* 50:107-113.
- Aas G (2000) Enzyklopädie der Holzgewächse : Handbuch und Atlas der Dendrologie, A. Roloff, H. Weisgerber, U. M. Lang, B. Stimm, P. Schütt, eds. (Wiley-Vch Verlag, Weinheim), vol. 3.
- Abrams MD (1990) Adaptations and responses to drought in *Quercus* species of North America. *Tree Physiol.* 7 : 227-238.
- Adams HD, Kolb TE (2005) Tree growth response to drought and temperature along an elevation gradient on a mountain landscape. *Journal of Biogeography* 32:1629–1640.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks fo forests. *For Ecol Manag* 259 :660-684.
- Arend M, Brem A, Kuster TM, Günthardt-Goerg MS (2013) Seasonal photosynthetic responses of European oaks to drought and elevated daytime temperature. *Plant Biol* 15:169–176.
- Arend M, Kuster T, Günthardt-Goerg MS, Dobbertin M (2011) Provenance-specific growth responses to drought and air warming in three European oak species (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*). *Tree Physiol* 31(3):287–297.
- Arend M, Brem A, Kuster TM, Günthardt-Goerg MS (2012) Seasonal photosynthetic responses of three European oak species (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*) to severe drought and elevated daytime temperature. *Plant Biol.* doi: [10.1111/j.1438-8677.2012.00625.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00625.x)
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot.* 59(2):206–16.
- Atkinson D, Last F (1994) Growth, form and function of roots and root systems. *Scott. For.* 48: 154–159.
- Bacilieri R, Ducousso A, Kremer A (1995) Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. And *Quercus robur* L. in a mixed stand of Northwest of France *Silvae Genetica* 44 : 1-9.
- Bacon MA, ed. (2004) *Water use efficiency in plant biology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Badington CC (1862) *Manual of British botany, containing the flowering plants and ferns arranged according to the natural orders*. London.
- Ball JT, Berry JA (1982) Ci/Cs ratio : a basis for predicting stomatal control of photosynthesis. Year B. Carnegie Inst. Wash.
- Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al- Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald, U, Kneitz S, Lachmann N, Mendel RR, Bittner F, Hetherington AM, Hedrich R (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell- autonomous ABA synthesis. *Curr Biol* 23: 53– 57.

- Becker M (1972) Etude des relations sol-végétation, en conditions d'hydromorphie, dans une forêt de la plaine lorraine. *Ann. Sci. For.* 29: 143-182.
- Becker M, Lévy G (1982) Le dépérissement du chêne en forêt de Tronçais. Les causes écologiques. *Ann. Sci. For.*, 39: 439-444.
- Becker M, Lévy G (1983) Le dépérissement du chêne. Les causes écologiques. Exemple de la Forêt de Tronçais et premières conclusions. *Revue Forestière Française* 35, 341-356
- Becker M, Lévy G (1986) Croissance radiale comparée de chênes adultes (*Quercus robur* L. et *Q. petraea* [Matt.] Liebl.) sur sol hydromorphe acide. Effet du drainage. *Acta Oecol., Oecol. Plant.* 7 (21): 121-143.
- Bédeneau M, Auclair D (1989) The study of tree fine root distribution and dynamics using a combined trench and observation window method. *Ann. Sci. For.* 46 : 283-290.
- Beerling D, Chaloner WG (1993) The Impact of Atmospheric CO<sub>2</sub> and Temperature Changes on Stomatal Density : Observation from *Quercus robur* Lammas Leaves. *Ann. Bot.* 71 : 231-235.
- Berry SC, Varney GT, Flanagan LB (1997) Leaf  $\delta C$  in *Pinus resinosa* trees and understory plants : variation associated with light and CO<sub>2</sub> gradients. *Oecologia* 109 :499-506.
- Blatt MR (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 221–241.
- Blum A (2009) Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* 112 : 119–123.
- Bodénès C, Joandet S, Laigret F, Kremer A (1997) Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt) Liebl and *Quercus robur* L. *Heredity* 78 :433-444.
- Bohn U, et al (2000) Karte der natürlichen Vegetation Europas ; Map of the Natural Vegetation of Europe (Landwirtschaftsverlag).
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell.* 7(7):1099–111. 10.
- Boratynski A, Marcysiak K, Lewandowska A, Jasinska A, Iszkulo G, Burczyk J (2008) Differences in leaf morphology between *Quercus petraea* and *Q. robur* adult and young individuals. *Silva Fennica* 42(1): 115–124.
- Bossel H (1986) Dynamics of forest dieback : systems analysis and simulation. *Ecological Modeling* 34: 259–288.
- Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD (1997) CO<sub>2</sub> and water vapour exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology* 100 : 1051-1053.
- Bréda N, Cochard H, Dreyer E, Granier A (1993) Field comparison of transpiration, stomatal conductance and vulnerability to cavitation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* under water stress. *Ann For Sci* 50:571–582.
- Bréda N, Granier A, Barataud F, Moyne C (1995) Soil water dynamics in an oak stand. *Plant and Soil* 172:17-27.

- Bréda N (1998) Analyse rétrospective de la croissance radiale des chênes de la forêt Domaniale de la Harth. Dépérissement forestier en vallée du Rhin. Rapport final convention ONF-INRA, 50 p.
- Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought : a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science* 63: 625–544.
- Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl J (2002) Genetic parameters and QTL analysis of  $\delta^{13}C$  and ring width in maritime pine. *Plant, Cell and Environment* 25 : 945-953.
- Brendel O, Le Thiec D, Saintagne C, Kremer A, Guehl JM (2008) Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genet Genomes* 4:263–278.
- Brodribb TJ, McAdam SA (2011) Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science*, 331(6017) : 582-585.
- Brodribb TJ, McAdam SAM, Jordan GJ, Feild TS (2009) Evolution of stomatal responsiveness to CO<sub>2</sub> and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytologist* 183: 839–847.
- Brodribb TJ, McAdam SAM (2017) Evolution of the stomatal regulation of plant water content. *Plant Physiol* 174: 639-649.
- Brookes PC, Wigston DL, Bourne WF (1980) The dependence of *Quercus robur* and *Q. petraea* seeding on cotyledon potassium, magnesium, calcium and phosphorus during the first year of growth. *Forestry : An International Journal of Forest Research* 53(2) : 167-177.
- Bruschi P, Vendramin G, Bussotti F, Grossoni, P (2003a) Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91 : 707-716.
- Bruschi P, Grossoni P, Bussotti F (2003b) Within- and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations. *Trees* 17 : 164-172.
- Buckley TN (2005) The control of stomata by water balance. *New Phytologist* 168(2) : 275-292.
- Buckley TN, Mott KA, Farquhar GD (2003) A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant, Cell Environ* 26: 1767-1785.
- Buckley TN, Mott KA (2013) Modelling stomatal conductance in response to environmental factors. *Plant, Cell Environ* 36: 1691-1699.
- Buckley TN (2017) Modeling stomatal conductance. *Plant Physiol* 174: 572-582.
- Cannon WB (1932) *The wisdom of the body*. 864p. Norton, New York, USA.
- Cardon ZG, Berry JA, Woodrow IE (1994) Dependence of the extent and direction of average stomatal response in *Zea mays* L. and *Phaseolus vulgaris* L. on the frequency of fluctuations in environmental stimuli. *Plant Physiology* 105: 1007–1013.
- Cernusak L, Aranda J, Marshall J, Winter K (2007a) Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytologist* 173 : 294-305.

- Cernusak LA, Haverd V, Brendel O, Le Thiec D, Guehl J, Cuntz M (2019) Robust Response of Terrestrial Plants to Rising CO<sub>2</sub>. *Trends in Plant Science* : 1–9.
- Cernusak L, Winter K, Aranda J, Turner B, Marshall J (2007b) Transpiration efficiency of a tropical pioneer tree (*Ficus insipida*) in relation to soil fertility, *J Exp Bot* 58:3549–3566.
- Chater C, Peng K, Movahedi M, Dunn JA, Walker HJ, Liang YK, McLachlan DH, Casson S, Isner JC, Wilson I, Neill SJ, Hedrich R, Gray JE, Hetherington AM (2015) Elevated CO<sub>2</sub>-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Curr Biol* 25: 2709– 2716.
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany* 89(7) : 907-916.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress : regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot.* 103(4):551–60.
- Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits : prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot.* 55(407):2365–84.
- Chen ZH, Hills A, Bätz U, Amtmann A, Lew VL, Blatt MR (2012) Systems dynamic modeling of the stomatal guard cell predicts emergent behaviors in transport, signaling, and volume control. *Plant Physiol* 159: 1235–1251.
- Clark DA (2004) Sources or sinks? The responses of tropical forests to current and future climate and atmospheric composition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 359: 477–491.
- Collet C, Manso R, Barbeito I (2016) Coexistence, association and competitive ability of *Quercus petraea* and *Quercus robur* seedlings in naturally regenerated mixed stands. *For. Ecol. Manage.* 390 : 36–46.
- Comstock JP (2000) Variation in hydraulic architecture and gas- exchange in two desert shrubs, *Hymenoclea salsola* (T & G) and *Ambrosia dumosa* (Payne). *Oecologia* 125: 1–10.
- Cowan IR (1977) Stomatal behaviour and environment. In *Advances in botanical research*, Academic press 4: 117–228.
- Cowan IR, Farquhar GD (1977) Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment : Stomatal function in the regulation of gas exchange. In *Symposium of the Society of Experimental Botany*. Jennings DH (Ed). Cambridge University Press, Cambridge. 31 : 471-505.
- Dale VH, Joyce LA, McNulty S, Neilson RP (2000) The interplay between climate change, forest, and disturbances. *The Science of the Total Environment* 262: 201–204.
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, cell & Environ* 33: 1419–1438.
- Darwin CR (1859) *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London : John Murray.
- Delatour C (1983) Les dépérissements de chênes en Europe. *Rev. For. Fr.*, XXXV (3) :265-282.
- Demmig-Adams B, Adams WW, 3rd (2006) Photoprotection in an ecological context : the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* 172(1):11–21.

- Dickson RE, Tomlinson PT (1996) Oak growth, development and carbon metabolism in response to water stress, *Ann For Sci* 53:81–196.
- Dobrovolný P et al (2016) Recent growth coherence in long-term oak (*Quercus* spp.) ring width chronologies in the Czech Republic. *Clim Res* 70 :133–141.
- Doheny-Adams T, Hunt L, Franks PJ, Beerling DJ, Gray JE, Berry JA, Beerling DJ, Franks PJ, Farquhar GD, Sharkey TD, et al (2012) Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 547–555.
- Doi M, Kitagawa Y, Shimazaki K (2015) Stomatal Blue Light Response Is Present in Early Vascular Plants. *Plant Physiol* 169: 1205–1213.
- Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC (2014) The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 201: 1205–1217.
- Drake PL, Froend RH, Franks PJ (2013) Smaller, faster stomata : scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *J Exp Bot* 64: 495–505.
- Drexhage M, Chauvière M, Colin F, Nielsen CN (1999) Development of structural root architecture and allometry of *Quercus petraea*. *Can J For Res* 29 : 600–608.
- Drvodelić D, Oršanić M, Perić S, Tijardović M (2013) Influence of irrigation and micro-relief in nurseries on morphological characteristics of pedunculate (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* L.) forest seedlings. *Šumarski list* 137(9-10) : 447-458.
- Dupouey JL (1983) Analyse multivariable de quelques caractères morphologiques de populations de chênes (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) du Hurepoix. *Annales des Sciences Forestières* 40 : 265-282.
- Dupouey JL, Badeau V (1993) Morphological variability of oaks (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus pubescens* Willd) in North-East of France. Preliminary results. *Annales des Sciences Forestières* 50 : 35-40.
- Durand P, Gelpe J, Lemoine B, Riou J, Timbal J (1983) Le dépérissement du chêne pédonculé dans les pyrénées-atlantiques. *Revue Forestière Française* 35 : 357-368.
- Durand T (2009) Approche protéomique des stress abiotiques chez *Populus tremula* x *P. alba*. Thèse Université d'Orléans.
- Durand M, Brendel O, Buré C, Le Thiec D (2019) Altered stomatal dynamics induced by changes in irradiance and vapour-pressure deficit under drought : impacts on the whole plant transpiration efficiency of poplar genotypes. *New Phytologist* 222 :1789-1802.
- Easterling D, Meehl GA, Parmesan C, Changnon SA, Karl TR, Mearns LO (2000) Climate extrêmes : observations, modeling, and impacts. *Science* 289 :2068-2074.
- Eaton E, Caudullo G, Oliveira S, De Rigo D (2016) *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe : distribution, habitat, usage and threats. *European atlas of forest tree species* 160-163.
- Edwards G, Walker D (1983) C3, C4 : mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Univ of California Press.

- Ehleringer J (1993) Carbon and water relations in desert plants : an isotopic perspective. In : Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations. eds Ehleringer J, Hall A, Farquhar G. Academic Press, San Diego. pp. 155-172.
- Ehleringer J, Cerling T (1995) Atmospheric CO<sub>2</sub> and the ratio of intercellular to ambient CO<sub>2</sub> concentrations in plants. *Tree Physiology* 15 : 105-111.
- Eisinger WR, Kirik V, Lewis C, Ehrhardt DW, Briggs WR (2012) Quantitative changes in microtubule distribution correlate with guard cell function in Arabidopsis. *Molecular Plant* 5: 716–725.
- Ellenberg H.H (2009) *Vegetation Ecology of Central Europe* (Cambridge University Press, fourth ed).
- Elliot-Kingston C, Haworth M, Yearsley JM, Batke SP, Lawson T, McElwain JC (2016) Does Size Matter? Atmospheric CO<sub>2</sub> May Be A Stronger Driver of Stomatal Closing Rate Than Stomatal Size in Taxa That Diversified under Low CO<sub>2</sub>. *Front Plant Sci.* 7: 1253.
- Epron D, Dreyer E (1993) Long- term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [Quercus petraea (Matt.) Liebl. and Quercus robur L.] in a natural stand. *New Phytol* 125:381–389.
- EUFORGEN (2008) Distribution map of pedunculate oak (Quercus robur). [www.euforgen.org](http://www.euforgen.org)
- EUFORGEN (2008) Distribution map of sessile oak (Quercus petraea). [www.euforgen.org](http://www.euforgen.org)
- European Environment Agency (Ed.) (2017) *Renewable energy in Europe* : Recent growth and knock-on effects.
- Evans J (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. *Oecologia* 78 : 9-19.
- Farquhar GD, Caemmerer S Von, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthesis CO<sub>2</sub> fixation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149: 78–90.
- Farquhar G, Ehleringer J, Hubick K (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40 : 503-537.
- Farquhar GD, Rashke K (1978) On the resistance to transpiration of the sites of evaporation within the leaf. *Plant Physiology* 61: 1000–1005.
- Farquhar G, Richards R (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11 : 539-552.
- Farquhar GD, O’Leary MH, Berry JA (1982) On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular CO<sub>2</sub>-concentration in Leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9 : 121–137.
- Fettig CJ, Klepzig KD, Billings RF, Munson AS, Nebeker TE, Negron JF, Nowak JT (2007) The effectiveness of vegetation management practices for prevention and control of bark beetle infestations in coniferous forests of the western and southern United States. *Forest Ecology and Management* 238: 24–53.
- Fonti P, Heller O, Cherubini P, Rigling A, Arend M (2013) Wood anatomical responses of oak saplings exposed to air warming and soil drought. *Plant Biol* 15:210–219.

- Fort C, Fauveau M, Muller F, Label P, Granier A, Dreyer E (1997) Stomatal conductance, growth and root signalling in young oak seedlings subjected to partial soil drying. *Tree Physiology* 17 : 281-289.
- Franks PJ, Farquhar GD (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol* 143: 78–87.
- Friedrichs DA *et al* (2008) Complex climate controls on 20th century oak growth in Central-West Germany. *Tree Physiol.* 29 : 39–51.
- Friedrichs DA, Trouet V, Büntgen U, Frank DC, Esper J, Neuwirth B, Löffler J (2009) Species-specific climate sensitivity of tree growth in Central-West Germany. *Trees-Struct Funct* 23(4):729–739.
- García-Amorena I, Wagner F, van Hoof TB, Gómez Manzaneque F (2006) Stomatal responses in deciduous oaks from southern Europe to the anthropogenic atmospheric CO<sub>2</sub> increase ; refining the stomatal-based CO<sub>2</sub> proxy. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 141 : 303–312.
- Geisler M, Nadeau J, Sack FD (2000) Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the too many mouths mutation. *The Plant Cell* 12(11) : 2075-2086.
- Génére B, Le Bouler H (1996) Etudes des performances en pépinière de lots de glands constitués d'un mélange variable en chênes sessile et pédonculé. *Revue Forestière Française* 48 : 21-30.
- Gérard B, Alaoui-Sossé B, Badot PM (2009) Flooding effects on starch partitioning during early growth of two oak species. *Trees* 23(2) : 373.
- Gerardin T, Douthe C, Flexas J, Brendel O (2018) Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environ Exp Bot.*
- Gieger T, Thomas FM (2002) Effects of defoliation and drought stress on biomass partitioning and water relations of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Basic Appl Ecol* 3:171–182.
- Gieger T, Thomas FM (2005) Differential response of two Central-European oak species to single and combined stress factors. *Trees* 19:607–618.
- Grantz D, Zeiger E (1986) Stomatal responses to light and leaf-air water vapor pressure difference show similar kinetics in sugarcane and soybean. *Plant Physiology* 81, 865-868.
- Gratao PL, Polle A (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32 :481-494.
- Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P (1994) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiol* 14:707–724.
- Guehl J, NGuyen-Queyrens A, Loustau D, Ferhi A (1995) Genetic and environmental determinants of water-use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. In : *Eurosilva : Contribution to Forest Tree Physiology.* eds. Sandermann H, Bonnet-Masimbert M. INRA Editions Les Colloques 76. pp. 298-321.
- Guehl J, Domenach A, Bereau M, Barigah T, Casabianca H, Ferhi A, Garbaye J (1998) Functional diversity in an Amazonian rainforest of French Guyana : a dual isotope approach ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ). *Oecologia* 116, 316-330.



- Günthardt-Goerg MS, Kuster TM, Arend M, Vollenweider P (2013) Foliage response of young central European oaks to air warming, drought and soil type. *Plant Biology* 15:185-197.
- Hall E, Richards RA, Condon AG, Wright GC, Farquhar GD, (1994) Carbon isotope discrimination and plant breeding. *Plant Breeding Reviews* 12:81-113
- Hamrick JL (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management* 197: 323–335.
- Hanba YY, Mori S, Lei TT, Koike T, Wada E (1997) Variations in leaf  $\delta^{13}\text{C}$  along a vertical profile of irradiance in a temperate Japanese forest. *Oecologia* 110 :253-261.
- Hartmann G, Blank R (1992) Winter frost, insect defoliation and *Agrilus biguttatus* Fabr. as causal factors of oak decline in northern Germany. *Forst und Holz (Germany, FR)*.
- Haworth M, Killi D, Materassi A, Raschi A (2015) Coordination of stomatal physiological behaviour and morphology with carbon dioxide determines stomatal control. *American Journal of Botany*. 102: 677-688.
- Haworth M, Marino G, Cosentino SL, Brunetti C, De Carlo A, Avola G, Centritto M (2018) Increased free abscisic acid during drought enhances stomatal sensitivity and modifies stomatal behaviour in fast growing giant reed (*Arundo donax* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 147: 116-124.
- He C, Zhang J, Duan A, Zheng S, Sun H, Fu L (2008) Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Populus euramericana* cv. « 74/76 ». *Trees - Structure and Function* 22 :803-813.
- Hetherington AM (2001) Guard Cell Signaling. *Cell* 107 : 711-714.
- Hetherington AM, Woodward FI (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951): 901-908.
- Hepworth C, Caine RS, Harrison EL, Sloan J, Gray JE (2018) Stomatal development : focusing on the grasses. *Current Opinion in Plant Biology* 41: 1-7.
- Hochbichler E (1993) Methods of oak silviculture in Austria. In *Annales des sciences forestières* (Vol. 50, No. 6, pp. 583-591). EDP Sciences.
- Hörak H, Kollist H, Merilo E (2017) Fern Stomatal Responses to ABA and  $\text{CO}_2$  Depend on Species and Growth Conditions. *Plant Physiol.* 174 : 672–679.
- Hruska J, Cermak J, Svatopluk S (1999) Mapping tree root systems with ground-penetrating radar. *Tree Physiology* 19 :125-130.
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of  $\text{CO}_2$ -controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* 12, 87-93; sup pp 1–18.
- Hu B, Simon J, Rennenberg H (2013) Drought and air warming affect the species-specific levels of stress-related foliar metabolites of three oak species on acidic and calcareous soil, *Tree Physiology*, 33 : 489–504.
- Hughes RF, Archer SR, Asner GP, Wessman CA, McMurtry C, Nelson J, Ansley RJ (2006) Changes in aboveground primary production and carbon and nitrogen pools accompanying woody plant encroachment in a temperate savanna. *Global Change Biology* 12: 1733–1747.

IGN (2018) La forêt en chiffres et en cartes (memento 2018).

IPCC (2014) Summary for policy makers. In : Meyer L, Brinkman S, van Kesteren L, Leprince-Ringuet N, van Boxmeer F, eds. Climate change 2014 : synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Geneva, Switzerland : Cambridge University Press, 7.

IPCC (2018) Masson-Delmotte V, Zhai P, Pörtner HO, Roberts D, Skea J, Shukla PR, Pirani A, Moufouma-Okia W, Péan C, Pidcock R, Connors S, Matthews JBR, Chen Y, Zhou X, Gomis MI, Lonnoy E, Maycock T, Tignor M, Waterfield T (eds.) (2018) Summary for Policymakers. In : Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 32 pp.

Jarvis PG (1976) The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* 273 : 593–610.

Johnson PS, Shifley SR, Rogers R, eds (2002) The ecology and silviculture of oaks. CABI, Wallingford.

Jones EW (1959) Biological flora of the British Isles : *Quercus L.* *J. Ecol.* 47:169-222.

Jones HG (1992) Drought and drought tolerance. In : *Plants and Microclimate : A quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*, pp 212-237, Cambridge University Press, UK.

Jones HG (1994) *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Jones HG (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J Exp Bot* 49: 387–398

Kaiser E, Morales A, Harbinson J, Kromdijk J, Heuvelink E, Marcelis LFM (2015) Dynamic photosynthesis in different environmental conditions. *Journal of Experimental Botany* 66: 2415–2426.

Kavanagh KL, Bond BJ, Aiken 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.

Keeling CD, Mook WG, Tans PP (1979) Recent trends in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of atmospheric carbon dioxide. *Nature* 277 : 121-123.

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki KI (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414(6864) : 656.

Kirschbaum MUF, Gross LJ, Percy RW (1988) Observed and modelled stomatal responses to dynamic light environments in the shade plant *Alocasia macrorrhiza*. *Plant, Cell Environ* 11 : 111–121.

Kleinschmit J (1993) Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Annales des Sciences Forestières* 50 : 166-185.

Körner C (2003) Limitation and stress – always or never ? *Journal of Vegetation Science* 14 :141-143.

- Köstler, JN, Brückner E, Bibelriether E (1968) Die Wurzeln der Waldbäume. Verlag Paul Parey, Hamburg, Germany.
- Kremer A, Petit R (1993) Gene diversity in natural populations of oak species. *Annales des Sciences Forestières* 50 : 186-203.
- Kreutzer K (1961) Wurzelbildung junger Waldbäume auf Pseudo-gleyböden. *Forstwiss. Centralbl.* 80: 356–392.
- Kurz WA, Apps MJ (1999) A 70- year retrospective analysis of carbon fluxes in the Canadian forest sector. *Ecological Applications* 9: 526–547.
- Kuster M, Schleppi P, Hu B, Schulin R, Günthardt-Goerg MS (2013) Nitrogen dynamics in oak model ecosystems subjected to air warming and drought on two different soils. *Plant Biol* 15:220–229.
- Lauteri M, Scartazza A, Guido M, Brugnoli E (1997) Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology* 11 : 675-683.
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25(2):275–94. 10.
- Lawson T, Kramer DM, Raines CA (2012) Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 23: 215–220.
- Lawson T, Blatt MR (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* 164: 1556–70.
- Lawson T (2018) Tansley insight Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. doi:10.1111/nph.15330.
- Lawson, T. and Vialet- Chabrand, S (2019) Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytol* 221: 93-98. doi:[10.1111/nph.15330](https://doi.org/10.1111/nph.15330).
- Lehmann P, Or D (2015) Effects of stomata clustering on leaf gas exchange. *New Phytologist* 207 : 1015–1025.
- Lévy G, Becker M, Duhamel DA (1992) Comparison of the ecology of pedunculate and sessile oaks: radial growth in the Centre and Northwest of France. *For Ecol Manage* 55:51–63.
- Li Z, Ratliff EA, Sharkey TD (2011) Effect of temperature on postillumination isoprene emission in oak and poplar. *Plant Physiology* 155(2) : 1037-1046.
- Li MH, Cherubini P, Dobbertin M, Arend M, Xiao WF, Rigling A (2013) Responses of leaf nitrogen and mobile carbohydrates in different *Quercus* species/provenances to moderate climate changes. *Plant Biology* 15 : 177-184.
- Linnaeus C (1753) *Species Plantarum* 2. Stockholm, Sweden.
- Macaire A (1984) Le dépérissement du Chêne pédonculé en forêt communale d'Amance (Aube). *Revue Forestière Française*.
- Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC (1999) Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 12(3) : 333-349.

- Marguerit E, Bouffier L, Chancerel E, Costa P, Lagane F, Guehl JM, ... Brendel O (2014) The genetics of water-use efficiency and its relation to growth in maritime pine. *Journal of Experimental Botany* 65(17): 4757–4768.
- Martins SC, McAdam SA, Deans RM, DaMatta FM, Brodribb TJ (2016) Stomatal dynamics are limited by leaf hydraulics in ferns and conifers : results from simultaneous measurements of liquid and vapour fluxes in leaves. *Plant, cell & environment* 39(3) : 694-705.
- Matthews JS, Vialet-Chabrand SR, Lawson T (2018) Acclimation to fluctuating light impacts the rapidity and diurnal rhythm of stomatal conductance. *Plant physiology*. 176: 1939-1951.
- McAdam SAM, Brodribb TJ (2015) The Evolution of Mechanisms Driving the Stomatal Response to Vapor Pressure Deficit. *Plant Physiol* 167: 833–843.
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, Baker NR, Brendel O, Lawson T (2016) Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol* 211: 1209–1220.
- Mahan JR, McMichael BL, Wanjura DF (1995) Methods for reducing the adverse effects of temperature stress on plants : a review. *Environmental and Experimental Botany* 35 :251-258.
- Manion PD (1991) *Tree disease concepts*. Upper Saddle River, NJ, USA : Prentice Hall.
- Marçais B, Bréda N (2007) Role of an opportunistic pathogen in the decline of stressed oak trees. *Journal of Ecology* 94: 1214–1223.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New-York, 334 p.
- Markesteijn L, Poorter L (2009) Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *Journal of Ecology* 97 :311-325.
- McDowell NG (2011) Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiol*. 155:1051–1059.
- McDowell NG, Pockman WT, Allen CD, et al (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought : why do some plants sur-vive while others succumb to drought? *New Phytol*. 178:719–739.
- Medrano H, Parry MAJ, Socias X, et al (1997) Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Ann Appl Biol*. 131(3):491–501.
- Medrano H, Tomas M, Martorell S, Flexas J, Hernandez E, Rossello J, Pou A, Escalona JM, Bota J (2015) From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies : limitations of leaf WUE as a selection target. *The Crop J* 3(3): 220–228.
- Meinzer FC, Ingamells JL, Crisosto C (1991) Carbon Isotope Discrimination correlates with bean yield of diverse coffee seedling populations. *HortScience* 26(11) : 1413–1414.
- Merilo E, Jalakas P, Kollist H, Brosché M (2015) The role of ABA recycling and transporter proteins in rapid stomatal responses to reduced air humidity, elevated CO<sub>2</sub>, and exogenous ABA. *Mol Plant* 8 : 657-659.
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez- Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosché M, Kollist H (2013) PYR/RCAR receptors contribute to ozone- ,

- reduced air humidity-, darkness-, and CO<sub>2</sub>- induced stomatal regulation. *Plant Physiol* 162 : 1652-1668.
- Monteith JL (1995) A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant, Cell & Environment* 18(4) : 357-364.
- Mook WG, Koopmans M, Carter AF, Kelling CH (1983) Seasonal, latitudinal, and secular variations in the abundance and isotopic ratios of atmospheric carbon dioxide. 1. Results from land stations. *Journal of Geophysical Research* 88 :10915-10933.
- Moore JP, Vicré-Bibouin M, Farrant JM, Driouich A (2008) Adaptations of higher plant cell walls to water loss ; drought vs dessication. *Physiologia Plantarum* 134 : 237-245.
- Mott KA (1988) Do Stomata Respond to CO<sub>2</sub> Concentrations Other than Intercellular? *Plant Physiol* 86: 200–203.
- Mott KA, Peak D (2012) Testing a vapour-phase model of stomatal responses to humidity. *Plant, Cell & Environment*, 936–944.
- Nardini A, Tyree MT (1999) Root and shoot hydraulic conductance of seven *Quercus* species. *Ann For Sci* 56:371–377.
- Nebauer SG (1967) Bemerkungen über den Bau der Begoniaceen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 80 : 80–97.
- Ooba M, Takahashi H (2003) Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecol Modell* 164: 65–82.
- Osborn JM, Taylor TN (1990) Morphological and ultrastructural studies of plant cuticular membranes. I. Sun and shade leaves of *Quercus velutina* (Fagaceae). *Botanical Gazette* 151(4) : 465-476.
- Osonubi O, Davies WJ (1981) Root growth and water relations of oak and birch seedlings. *Oecologia* 51(3) : 343-350.
- Papanatsiou M, Amtmann A, Blatt MR (2016) Stomatal spacing safeguards stomatal dynamics by facilitating guard cell ion transport independent of the epidermal solute reservoir. *Plant Physiol* 172: 254–63.
- Papanatsiou M, Petersen J, Henderson L, Wang Y, Christie JM, Blatt, MR (2019) Optogenetic manipulation of stomatal kinetics improves carbon assimilation, water use, and growth. *Science* 363 :(6434), 1456-1459.
- Parent C, Crèvecoeur M, Capelli N, Dat JF (2011) Contrasting growth and adaptive responses of two oak species to flooding stress : role of non- symbiotic haemoglobin. *Plant, cell & environment* 34(7) : 1113-1126.
- Pearce D, Millard S, Bray D, Rood S (2006) Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree Physiology* 26 : 211-218.
- Peterson KM, Rychel AL, Torii KU (2010) Out of the mouths of plants : the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *The Plant Cell* 22 : 296–306.
- Petit R, Wagner D, Kremer A (1993) Ribosomal DNA and chloroplast DNA polymorphisms in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Annales des Sciences Forestières* 50 :41s-47s.

- Pflug EE, Siegwolf R, Buchmann N, Dobbertin M, Kuster TM, Günthardt-Goerg MS, Arend M (2015) Growth cessation uncouples isotopic signals in leaves and tree rings of drought-exposed oak trees. *Tree Physiol* 35:1095–1105.
- Picon C (1996) Effets combinés d'un doublement de la concentration en CO<sub>2</sub> de l'air et de sécheresses édaphiques sur la croissance et l'efficacité d'utilisation de l'eau de *Quercus petraea*, *Quercus robur* et *Pinus pinaster*. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I. 106 p.
- Picon C, Guehl J, Ferhi A (1996a) Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (*Pinus pinaster*) and a drought-tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant, Cell and Environment* 19 : 182-190.
- Picon C, Guehl J, Aussenac G (1996b) Growth dynamics, transpiration and water use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO<sub>2</sub> and drought. *Annales des Sciences Forestières* 53 : 431-446.
- Picon C, Ferhi A, Guehl J (1997) Concentration and  $\delta^{13}C$  of leaf carbohydrates in relation to gas exchange in *Quercus robur* under elevated CO<sub>2</sub> and drought. *Journal of Experimental Botany* 48 : 1547-1556.
- Pierce S, Vianelli A, Cerabolini B (2005) From ancient genes to modern communities : the cellular stress response and the evolution of plant strategies. *Ecology* 19 :763-776.
- Pillitteri LJ, Dong J (2013) Stomatal development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 11, e0162.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Feuillat F, Bodénès C, Dreyer E (2001) Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell Environ* 24: 861–868.
- Ponton S (2002) Analyse de l'efficacité d'utilisation de l'eau des chênes pédonculé (*Quercus robur* L.) et sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). Relation avec les dépérissements des chênaies. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Ponton S, Dupouey JL, Bréda N, Dreyer E (2002) Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiol* 22:413–422.
- Ponton S, Dupouey JL, Dreyer E (2004) Leaf morphology as species indicator in seedlings of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. : modulation by irradiance and growth flush. *Annals of Forest Science* 61(1) : 73-80.
- Poorter H, Fiorani F, Pieruschka R, Wojciechowski T, van der Putten WH, Kleyer M, Schurr U, Postma J (2016) Pampered inside, pestered outside? Differences and similarities between plants growing in controlled conditions and in the field. *New Phytol* 212: 838–855.
- Praciak A et al (2013) *The CABI encyclopedia of forest trees* (CABI, Oxfordshire, UK, 2013).
- Pradet A, Bomsel JL (1978) Energy metabolism in plants under hypoxia and anoxia. In : *Plant life in anaerobic environments*. Hook DD, Crawford RMM. Eds. *Ann. Ar bor Science, Ann Arbor, Michigan*. 89 -1 18.
- Price AJE (2015) Shake in oak: an evidence review. Forestry Commission, 231 Corstorphine Road, Edinburgh.

- Qu M, Hamdani S, Li W, Wang S, Tang J, Chen Z, Song Q, Li M, Zhao H, Chang T, Chu C, Zhu X (2016) Rapid stomatal response to fluctuating light: an under-explored mechanism to improve drought tolerance in rice. *Funct Plant Biol* 43: 727–738.
- Raissig MT, Matos JL, Gil MXA, Kornfeld A, Bettadapur A, Abrash E, Allison HR, Badgley G, Vogel JP, Berry JA et al (2017) Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science* 355: 1215–1218.
- Rasheed-Depardieu C, Parent C, Crèvecoeur M *et al* (2012) Identification and Expression of Nine Oak Aquaporin Genes in the Primary Root Axis of Two Oak Species, *Quercus petraea* and *Quercus robur*. *PLoS One* 7, e51838.
- Rasheed-Depardieu C, Parelle J, Tatin-Froux F, Parent C, Capelli N (2015) Short-term response to waterlogging in *Quercus petraea* and *Quercus robur*: A study of the root hydraulic responses and the transcriptional pattern of aquaporins. *Plant Physiol Biochem* 97:323–330.
- Raven JA (2014) Speedy small stomata? *J Exp Bot* 65: 1415–1424.
- Roloff A., H. Weisgerber, U. M. Lang, B. Stimm, *Bäume Mitteleuropas: Von Aspe bis Zirbelkiefer. Mit den Porträts aller Bäume des Jahres von 1989 bis 2010.* (Wiley-VCH, 2010)
- Roussel M (2008) *Variabilité intraspécifique de l'efficacité d'utilisation de l'eau dans une famille de chêne pédonculé (Quercus robur L.): causes physiologiques et/ou anatomiques.* Thèse, Université Henri Poincaré-Nancy 1.
- Roussel M, Le Thiec D, Montpied P, Guehl JM, Brendel O (2009) Diversity of water use efficiency in a *Quercus robur* family: contribution of related leaf traits. *Ann For Sci* 66:408-417.
- Roussel M, Dreyer E, Montpied P, Le-Provost G, Guehl JM, Brendel O (2008) The diversity of <sup>13</sup>C isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family is associated with differences in intrinsic water use efficiency, transpiration efficiency, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* 60 : 2419–2431.
- Roupsard O, Gross P, Dreyer E (1996) Limitation of photosynthetic activity by CO<sub>2</sub> availability in the chloroplasts of oak leaves from different species and during drought. *Annales des Sciences Forestières* 53 : 243-254.
- Roupsard O, Joly H, Dreyer E (1998) Variability of initial growth, water-use efficiency and carbon isotope discrimination in seedlings of *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev., a multipurpose tree of semi-arid Africa. Provenance and drought effect. *Annals of Forest Science* 55 : 329-348.
- Rushton BS (1974) The origin and possible significance of variation of leaf structure in the two native British oak species, *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. D.Phil. thesis, University of York.
- Rushton BS (1978) *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. : a multivariate approach to the hybrid problem, 1. Data acquisition, analysis and interpretation. *Watsonia* 12 :81-101.
- Ryan G (2011) Tree responses to drought. *Tree Physiol.* 31 :237-239.
- Sanchez-Rodriguez E, Rubio-Wilhelmi, M, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Rosales MA, Romero L, Ruiz JM (2010) Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science.* 178 :30-40.

- Sanders TGM, Pitman R, Broadmeadow MSJ (2014) Species-specific climate response of oaks (*Quercus* spp.) under identical environmental conditions. <http://www.sisef.it/iforest> 7, 61.
- Savill, PS. The silviculture of trees used in British forestry (CABI, 2013).
- Schleser GH and Jayasekera R (1985)  $\delta^{13}\text{C}$ -variations of leaves in forests as an indication of reassimilated  $\text{CO}_2$  from the soil. *Oecologia* 65 : 536-542.
- Schluter U, Muschak M, Berger D, Altmann T (2003) Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. *J Exp Bot* 54: 867–874.
- Scholze M, Knorr W, Arnell NW, Prentice IC (2006) A climate- change risk analysis for worlds ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 13116–13120.
- Schulze ED, Turner N, Gollan T, Shackel KA (1987) Stomatal response to air humidity and soil drought. In : *Stomatal function* (ed Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR). 311-321.
- Schwarz O (1993) *Quercus L.* In Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmonson JR, Heywood YH, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds.). *Flora europaea*, Vol.1.2nded., Cambridge University Press, Cambridge, 72-76.
- Selote, DS, Khanna-Chopra R (2006) Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* 127 :494-506.
- Selye H (1936) A syndrome produced by various nucuous agents. *Nature* 138 : 32-34.
- Serraj R, Sinclair TR (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25(2):333–41.
- Sharkey TD, Raschke K (1981) Separation and measurement of direct and indirect effects of light on stomata. *Plant Physiol* 68: 33–40.
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58: 219–247.
- Simova-Stoilova L, Demirevska K, Petrova T, Tsenov N, Feller U (2009) Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum L.*) varieties subjected to long-term field drought. *Plant Growth Regulation* 58 :107-117.
- Steinbrecher R, Contran N, Gugerli F, Schnitzler JP, Zimmer I, Menard T, Günthardt- Goerg, MS (2013) Inter- and intra- specific variability in isoprene production and photosynthesis of C entral E uropean oak species. *Plant Biology* 15 :148-156.
- Sun Z, Livingston N, Guy R, Ethier G (1996) Stable carbon istopes as indicators of increased water use efficiency and productivity in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings. *Plant, Cell and Environment* 19 : 887-894.
- Szaran L (1998) Seasonal variations of  $\delta^{13}\text{C}$  values and  $\text{CO}_2$  concentration in the air during vegetation growth. *Isotopes in Environmental Health Studies* 34 : 341-348.
- Svolba J, Kleinschmit J (2000) Provenance differences in oak decline. *Forst und Holz*, 55(1) : 15-17.
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.



- Tanaka Y, Sugano SS, Shimada T, Hara-Nishimura I (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in *Arabidopsis*. *New Phytol* 198: 757–764.
- Tardieu F (1993) Will increases in our understanding of soil- root relations and root signaling substantially alter water flux models? *The Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B* 341: 57–66.
- Tardieu F (2005) Plant tolerance to water deficit : physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geosciences* 337 :57-67.
- Tardieu F, Simonneau T (1998) Variability of species among stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* 49: 419–432.
- Terashima I, Miyazawa S, Hanba Y (2001) Why are sun leaves thicker than shade leaves? - Consideration based on analyses of CO<sub>2</sub> diffusion in the leaf. *Journal of Plant Research* 114 : 93-105.
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, et al. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*. 401:914–7.
- Thomas FM (2000) Growth and water relations of four deciduous tree species (*Fagus sylvatica* L., *Quercus petraea* Matt. Liebl., *Q. pubescens* Willd., *Sorbus aria* L. Cr.) occurring at Central-European tree-line sites on shallow calcareous soils: physiological reactions of seedlings to severe drought. *Flora* 195(2):104–115.
- Thomas FM (2000b) Vertical rooting patterns of mature *Quercus* trees growing on different soil types in northern Germany. *Plant Ecol* 147(1):95–103.
- Thomas FM (2008) Recent advances in cause-effect research on oak decline in Europe. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3(037) : 1-12.
- Thomas FM, Blank R, Hartmann G (2002) Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For Pathol* 32:277–307.
- Thomas FM, Gausling T (2000) Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Ann For Sci* 57:325–333.
- Torti X (2005) Variabilité génétique de la réponse du métabolisme carboné du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) à des teneurs croissantes en CO<sub>2</sub>. Thèse Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Tran JK, Ylloja T, Billings RF, Regniere J, Ayres MP (2007) Impact of minimum winter temperatures on the population dynamics of *Dendroctonus frontalis*. *Ecological Applications* 17: 882–899.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Maccaferri M, Giuliani S, Landi P. (2003) Searching for quantitative trait loci controlling root traits in maize: a critical appraisal. *Plant and Soil* 255: 35–54.
- Van Hees A (1997) Growth and morphology of pedunculate oak (*Quercus robur* L) and beech (*Fagus sylvatica* L) seedlings in relation to shading and drought. *Ann For Sci* 54:9-18.

- Van Hoof TB, Kürschner WM, Wagner F, Visscher H (2006) Stomatal index response of *Quercus robur* and *Quercus petraea* to the anthropogenic atmospheric CO<sub>2</sub> increase. *Plant Ecol.* 183 :237–243.
- Van Valen L (1976) Ecological species, multispecies and oaks. *Taxon* 18 : 13-19.
- Vartapetian BB, Andreeva IN, Nuritdinov N (1978) Plant cells under oxygen stress-In : Piani life in anaerobic environments. HOOK D.D. and CRAWFORD R.M.M. Eds. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan. 13 · 88.
- Vialet-chabrand S (2013) Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique : apports d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne. Thèse Université de Lorraine.
- Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O (2013a) Assessing and modelling the dynamic variations of whole plant transpiration during light-dark transitions in different oak species. ( unpublished in thesis) .
- Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O (2013b) Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment*. doi: 10.1111/pce.12086.
- Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Le Thiec D, Brendel O (2013c) Dynamics of stomatal responses to red light, blue light and CO<sub>2</sub> are not linked with stomatal size in oaks ( unpublished in thesis).
- Vialet-Chabrand S, Matthews JSA, Brendel O, Blatt MR, Wang Y, Hills A, Griffiths H, Rogers S, Lawson T (2016) Modelling water use efficiency in a dynamic environment: An example using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 251: 65–74.
- Vialet- Chabrand SRM, Matthews JSA, McAusland L, Blatt MR, Griffiths H, Lawson T. (2017) Temporal dynamics of stomatal behavior: modeling and implications for photosynthesis and water use. *Plant Physiology* 174: 603–613.
- Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G (2011) Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytol* 192: 640–652 181.
- Vivin P, Guehl JM (1997) Changes in carbon uptake and allocation patterns in *Quercus robur* seedlings in response to elevated CO<sub>2</sub> and water stress: an evaluation with <sup>13</sup>C labelling. *Annales des Sciences Forestières* 54:597-610.
- Vivin P, Aussenac G, Lévy G (1993) Differences in drought resistance among three deciduous oak species grown in large boxes. *Annales des Sciences Forestières* 50 : 221-233.
- Von Caemmerer S, Lawson T, Oxborough K, Baker NR, Andrews TJ, Raines CA (2004) Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. *J Exp Bot* 55: 1157–1166.
- Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ* 33(4):510–25.
- West AG, Hultine KR, Sperry JS, Bush SE, Ehleringer JR (2008) Transpiration and hydraulic strategies in a piñon–juniper woodland. *Ecological Applications* 18: 911–927.
- Wagner P, Dreyer E (1997) Interactive effects of waterlogging and irradiance on the photosynthetic performance of seedlings from three oak species displaying different sensitivities (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. rubra*). *Ann For Sci* 54:409–429.

- Welander N, Ottosson B (2000) The influence of low light, drought and fertilization on transpiration and growth in young seedlings of *Quercus robur* L. *For Ecol Manage* 127:139–151.
- Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD (1979) Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282: 424–426.
- Wong SL, Chen CW, Huang HW, Weng JH (2012) Using combined measurements for comparison of light induction of stomatal conductance, electron transport rate and CO<sub>2</sub> fixation in woody and fern species adapted to different light regimes. *Tree Physiol* 32: 535–544.
- Woolfenden HC, Bourdais G, Kopschke M, Miedes E, Molina A, Robatzek S, Morris RJ (2017) A computational approach for inferring the cell wall properties that govern guard cell dynamics. *Plant Journal* 92: 5–18.
- Xiong D, Douthe C, Flexas J (2018) Differential coordination of stomatal conductance, mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance in response to changing light across species. *Plant, Cell & Environment* 41: 436–450.
- Zhang J, Marshall JD, Jaquish BC (1995) Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. *Oecologia* 101: 80–87.
- Zwieniecki MA, Brodribb TJ, Holbrook NM (2007) Hydraulic design of leaves: insights from rehydration kinetics. *Plant, Cell & Environment*, 30(8), 910-921.

# Plasticité et diversité de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez deux espèces de chêne blanc d'Europe : les chênes pédonculés (*Quercus robur* L.) et sessiles (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)

Approche descriptive de la dynamique de réponse stomatique aux changements environnementaux

## Résumé

Mots clés : Chêne, efficacité d'utilisation de l'eau, sécheresse, dynamique de réponse stomatique

*Quercus robur* et *Quercus petraea* sont deux espèces de chêne sympatriques occupant des niches écologiques distinctes et présentant des différences de sensibilités à la sécheresse. La littérature disponible suggère qu'il existe des différences inter-spécifiques stables de l'efficacité d'utilisation entre ces deux espèces, *Q. petraea* présentant des valeurs supérieures à *Q. robur*. L'efficacité d'utilisation de l'eau peut être étudiée à différentes échelles d'intégration spatiales et temporelle. Sur la base de mesures instantanées d'échanges gazeux foliaires, l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque ( $W_i$ ) peut être déterminée. D'autre part, l'efficacité d'utilisation de l'eau peut être caractérisée par des mesures de composition isotopique du carbone ( $\delta^{13}C$ ) au sein des tissus végétaux ou par l'estimation de l'efficacité de transpiration plante entière (TE), permettant ainsi une estimation de l'efficacité intégrée dans le temps. La caractérisation de l'efficacité à travers ces différents estimateurs a permis de mettre en évidence chez des semis croissant en conditions contrôlées une efficacité de transpiration supérieure chez *Q. robur* bien qu'aucune différence ne soit détectable entre les deux espèces sur la base des mesures instantanées ( $W_i$ ). Ces variations de TE étaient essentiellement liées aux variations de la production de biomasse par les plants tandis que les variations de  $W_i$  qui ont été observées étaient principalement associées à la conductance stomatique.

Les variations intra et inter espèces de la dynamique de réponse stomatique au changement abrupte d'un facteur environnemental (lumière,  $CO_2$ , VPD) n'ont pu être clairement reliées aux variations des différents estimateurs de l'efficacité ou leur composantes respectives. Par ailleurs, les conditions de stress hydriques impactaient la dynamique de réponse stomatique chez les deux espèces de chênes. Cet impact se traduit par des réponses stomatiques plus rapides. Les principales différences observées entre les espèces étaient liées à la production de biomasse. Les deux espèces affichaient en effet des stratégies d'allocation du carbone divergentes notamment au niveau du compartiment racinaire. Ainsi *Q. petraea* produisait un système racinaire plus fin et ramifié que *Q. robur*. Par ailleurs, cet état de fait était plus marqué sous conditions de stress, conditions à laquelle *Q. robur* est plus sensible que *Q. petraea* en terme de production de biomasse. La complexité des relations entre efficacité d'utilisation de l'eau et l'ensemble des traits physiologiques et anatomiques étudiés ainsi que leurs possibles implications dans la tolérance à la sécheresse des deux espèces de chênes sont discutées dans cette synthèse.

## Summary

Key words : Oaks, water use efficiency, drought, dynamics of stomatal response

*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. are two sympatric oak species occupying distinctive ecological niches as well as presenting disparate drought tolerances. Available literature reports the existence of stable inter-specific differences of water use efficiency (WUE) between the two species, *Q. petraea* displaying higher values than *Q. robur*. Water use efficiency can be studied at several integration scales both spatially and temporally. Based on instantaneous foliar gas exchange, the intrinsic water use efficiency can be determined ( $W_i$ ). On the other hand, water use can be characterised by measurements of the carbon isotopic composition of plant tissues ( $\delta^{13}C$ ) or by estimation of the whole plant transpiration efficiency (TE), thus allowing a time-integrated estimate of water use. The characterisation of WUE through these different estimators allowed us to put in evidence in oak seedlings grown under controlled conditions a higher transpiration efficiency in *Q. robur* even though no differences were observed between the two species regarding instantaneous measurements ( $W_i$ ). TE variations were mainly linked to the variations of the biomass production by the plants while  $W_i$  variations were essentially associated to the stomatal conductance.

Both intra and inter specific variations of the dynamics of stomatal response to step changes of environmental factors (light,  $CO_2$ , VPD) could not be clearly linked to the variations of the different WUE estimates nor their respective components. Nevertheless, drought conditions impacted the stomatal dynamics in both species towards faster stomatal responses, especially for stomatal closing. Furthermore, the main observed differences between species were linked to biomass production. Both species displayed different carbon allocation strategies, especially regarding the root compartment. Thus, *Q. petraea* produced a significantly more ramified and thinner root system than *Q. robur*. Such behaviour was accentuated under drought stress, under which *Q. robur* was more sensitive than *Q. petraea* in term of biomass production. The complexity of the relationships between water use efficiency and all of these morphological and physiological traits as well as the possible drought tolerance implications in both oak species are discussed in this PhD thesis.