GROUPES

"FLUX D'EAU DANS LES ORGANES EN CROISSANCE"

&

"ARCHITECTURE HYDRAULIQUE"

Compte rendu de la réunion tenue à Nancy

les 29, 30 et 31 mai 2001

Liste des participants :

Thierry Ameglio Têtè Barigah Luc Bidel Marie-Béatrice Bogeat-Triboulot Bernard Chanson Hervé Cochard Sabrina Coste Pierre Cruiziat François-Alain Daudet Erwin Dreyer Jean-Louis Durand Elisabeth de Faÿ Fabienne Froux Steve Hallgren Roland Huc Tharwat Ibrahim **Didier Le Thiec Pierre Martre** Bruno Moulia Isabelle Poggi-Limongi Stéphane Ponton **Thierry Simmoneau Gilles Vercambre**

INRA, Clermont-Ferrand INRA, Nancy **INRA**, Angers INRA, Nancy CNRS, Montpellier INRA, Clermont-Ferrand CNRS, Montpellier INRA, Clermont-Ferrand INRA, Clermont-Ferrand INRA, Nancy INRA, Lusignan Université HP, Nancy INRA, Nancy University of Oklahoma, USA INRA, Avignon INRA, Nancy INRA, Nancy University of California, Los Angeles, USA INRA, Lusignan INRA, Corse INRA, Nancy INRA, Montpellier INRA, Avignon

Communications :

Luc Bidel

Mesure de l'activité respiratoire des méristèmes racinaires primaires, son impact sur la croissan	ce des
axes racinaires	р. З
Thierry Améglio	
Pression dans le xylème : un indicateur de croissance racinaire chez le Noyer ?	_p. 4
Bruno Moulia	
Pulling for growth : a bio-rheological analysis of an <i>in situ</i> creep test on linearly-growing	organs
(gramineous leaves)	_p. 11
Jean-Louis Durand	
La circulation de l'eau dans une feuille en croissance: des variations instantanées au bilan sur la	ı durée
de sa vie	_ p. 16
Pierre Martre	
Modélisation de l'architecture hydraulique des thalles de fétuque élevée : implications pour les re	lations
entre les flux hydriques de transpiration et de croissance	_ p. 19
Elisabeth de Faÿ	
Eau, xylème et débourrement de l'arbre. Mobilité et état de l'eau dans les bourgeons d'Epicea au	ı début
du printemps en relation avec leur structure et leur fonctionnement hydraulique : Etude en réso	onance
magnétique nucléaire et microscopie	_p. 28
Hervé Cochard	
Croissance primaire, croissance secondaire et architecture hydraulique du hêtre	_p. 38
François-Alain Daudet	
Un modèle mécaniste de variation de diamètre de tige intègrant l'état hydrique et la croissance can	ıbiale
	_p. 46
Roland Huc	
Propriétés hydrauliques, vulnérabilité du xylème et efficience d'utilisation de l'eau chez les	cèdres
méditerranéens	_p. 57
Fabienne Froux	
Vision intégrée du fonctionnement hydraulique de 3 espèces de conifères méditerranéens: eff	icience
	_ p. 60
Steve Hallgren	
Hydraulic limitations of <i>Pinus halpensis</i> and <i>Quercus ilex</i> growing in mixed stand	_ p. 67
Isabelle Poggi-Limongi	
Connaissance de l'élaboration des composantes agronomiques de la qualité des agrumes par l'uti	lisation
de la diversité génétique : fonctionnement hydrique et sélection variétale	_p. 69
Stéphane Ponton	
Efficience d'utilisation de l'eau (δ^{13} C) et anatomie du bois à l'échelle de l'arbre dans un peuplem	ient de
chênes sessile et pédonculé	_ p. 70
Pierre Martre	
Conductance hydraulique et transport d'eau sensible au mercure dans les racines d'O)puntia
acanthocarpa en fonction de la disponibilité en eau dans le sol	_p. 75
Thierry Améglio	
Embolie hivernale et mécanismes de réparation chez le Pêcher et le Noyer	_p. 79
Hervé Cochard	
Contrôle stomatique de l'embolie chez le Noyer	_ p. 83
Didier Le Thiec	
Présentation des potentialités du nouveau MEB à pression variable, application à l'anatomie du xyl	ème
	nuu

Mesure de l'activité respiratoire des méristèmes racinaires. Son impact sur la croissance des axes racinaires.

BIDEL Luc P.R.¹ et RENAULT Pierre²

¹: INRA, UMR SAGAH, 42 rue Georges Morel, BP 57, 49071 Beaucouzé, France; (luc.bidel@angers.inra.fr);
 ²: INRA, Unité "Climat, Sol et Environnement", Domaine St-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France. (pierre.renault@avignon.inra.fr)

Les méristèmes primaires édifient l'ensemble des axes du système racinaire. Quantifier leur fonctionnement d'une façon non destructive permettrait d'en comprendre mieux le développement. Avec cet objectif, une méthode de mesure de la respiration *in vivo* a été adaptée. Elle consiste à enregistrer le profil d'oxygénation autour d'une racine poussant dans un gel d'agar, à l'aide d'une microélectrode à oxygène micromanipulée dans le champ d'une binoculaire, depuis la surface de l'agar jusqu'au contact de la racine. La respiration moyenne est alors déduite de l'ajustement d'un modèle de diffusion radial d'O₂ au profil mesuré. Une analyse de sensibilité du modèle de diffusion utilisé pour les segments racinaires a permis de montrer qu'en utilisant le profil d'oxygénation dans les 500 µm autour de la racine, il était également possible d'estimer la respiration du méristème, même si cette zone n'a plus une forme cylindrique.

Une cartographie de la respiration des meristèmes primaires des différents types d'axe d'un semis de Prunus persica (L) Batsch, âgé de 15 jours et cultivé dans un lit d'agar, montre que l'intensité respiratoire (IR) diminue de 36 à 3 x 10^{-3} mol O₂ m⁻³ de tissus s⁻¹ avec les diamètres croissants. Les plus petits méristèmes d'ordre trois présentent une IR dix fois plus élevée que les plus gros d'ordre un et deux. Malgré cela, le volume méristématique proéminent du pivot en fait le puits principal d'O2 et de glucides. Ce qui est à mettre en relation avec le développement encore pivotant du système racinaire à ce stade. Pour expliquer la réduction de l'IR en fonction du diamètre, un modèle de diffusion et de consommation intra-racinaire a été proposé. Il fait l'hypothèse que les tissus externes consommeraient O₂ à une intensité maximale et en priveraient les tissus centraux où la respiration serait nulle. L'ajustement du modèle aux données expérimentales a permis de déduire un unique couple de paramètres (intensité respiratoire potentielle ; coefficient de diffusion tissulaire) pour les méristèmes (9.2 x $10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$; 5.7 x $10^{-2} \text{ mol } O_2 \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$) et pour les segments en structure primaire (8.0 x $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$; 2.5 x $10^{-3} \text{ mol } O_2 \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$). Les résultats confirment l'hypothèse que O₂ serait le principal facteur limitant de la respiration des méristèmes racinaires primaires. Le coefficient de diffusion tissulaire de O₂ est très faible dans les méristèmes comparé à celui dans l'eau stagnante (2.10 x 10⁻⁹ m² s⁻¹), alors que le potentiel respiratoire tissulaire y est vingt fois plus élevé que dans les segments en structure primaire. Selon ces travaux, à l'exception des plus petits méristèmes (de moins de 50 µm de diamètre), même les méristèmes placés dans une atmosphère de 21 % d'O₂ auraient une zone centrale anoxique et auraient une activité limitée par leur faible capacité d'approvisionnement en l'oxygène. Ces résultats sont cohérents avec ceux démontrant l'existence un métabolisme fermentaire pour les méristèmes de racines primaires de maïs.

Un suivi de la croissance des différents types d'axe en parallèle de la respiration de leur méristème apical a permis d'établir une relation linéaire entre les deux paramètres, et de calculer un coût énergétique de croissance cohérent avec ceux calculés à l'échelle d'un système racinaire entier (c = 1/Yg = 1.045 g équivalent glucose g-1 de matière fraîche). Cette technique permet donc de définir un potentiel respiratoire à partir de leur diamètre et la teneur en oxygène à leur surface.

Mots clés : respiration ; méristèmes racinaires ; microélectrode à oxygène ; oxygène ; *Prunus persica* (L.) Batsch.

Bidel LPR., Renault P., Pagès L., Rivière L-M., 2000. Mapping meristem respiration of *Prunus persica* (L.) Batsch seedlings: potential respiration of the meristems, O2 diffusional constraints and combined effect on root growth. Journal of Experimental Botany, 51, 755-768.

Bidel LPR., Renault P., Pagès L., Rivière L-M. 2001. An improved method to measure spatial variation in root respiration: application to the taproot of a young peach tree *Prunus persica* (L.) Batsch. Agronomie, 21, 179-192.

Pression dans le xylème : un indicateur de croissance racinaire chez le Noyer ?

Réunion «flux d'eau dans les organes en croissance » Nancy, le 29/05/2001

Thierry Améglio

Frank Ewers Hervé Cochard François Beaujard Pierre Cruiziat

- : UMR PIAF (Clermont-Fd)
- : Univ. Michigan (USA)
- : UMR PIAF (Clermont-Fd)
- : UMR SAGAH (Angers)
- : UMR PIAF (Clermont-Fd)

Plan de l'exposé

Pression du xylème : Origines de la pression du xylème.

Evolution saisonnière de la pression chez le Noyer

Root pressure ou Stem pressure ?

Conclusions et discussions

La racine peut fonctionner comme un osmomètre

- principalement
 symplastique (bande de caspary) avec le
 franchissement d 'une membrane semi-perméable.
- En absence de transpiration
 - « Chargement » des ions
 - phénomène osmotique
 => Absorption d 'eau



(Taiz & Zeiger, 1991)

©TA-PIAF





TA-PIAF



La poussé racinaire : l'autre mécanisme pour l'ascension de la sève



Sève sous pression

Mesures sur Bambou au Pananma

Cochard, Ewers and Tyree (1994)



Pression du xylème : « Poussée de branche : Stem pressure » chez le Noyer « à sucres »



(Photo P. Fleurat-Lessard)

Amidon hydrolysé en saccharose
 => Efflux de sucres => Mise sous
 pression du xylème





Pression du xylème: noyer adulte en verger



 Mise en place de capteur de pression à différentes hauteurs + enregistement des températures

Évolution saisonnière de la pression

En Janvier :

- pression hivernale (gel-dégel et températures faiblement positives => pression
- − T°C $\overrightarrow{}$ ou T°C<0°C => pression \checkmark
- Pression forte à 3.5m du sol > 1.20m, non lié à la proximité des racines = Stem Pressure ?

En Mars :

- pression 1.20 m > 2.5 m > 3.5 m
 Pression printanière plus forte au pied de l'arbre => Root pressure
- $T^{\circ}C = pression$.



Root Pressure or Stem pressure ?

- W en chambre climatique (-25°C à +25°C)
- Mesures de pression au collet et sur branches ± feuilles.





Évolution saisonnière de la pression

- Automne et Printemps, Pression corrélée positivement avec la température.
- Pression Printanière >> Pression Automnale.



Évolution saisonnière de la pression

- Fin d'automne, la corrélation positive entre pression et température
- ◆ 0°C> Températures < +5°C
 => pression
- ♦ En 1 semaine T°C
 > pression
 ♦ T°C
 > pression



Évolution saisonnière de la pression



Arbre entier ou Rameau isolé conditionnés 48H à ≠ T°C => même résultats => Stem Pressure



- Relation entre pression et température ≠ avec le temps.
 - 1) root pressure
 - 2) stem pressure
 - 3) root pressure

Évolution saisonnière de la pression

- Pour une même osmolarité Root pressure >> Stem pressure.
- Stem pressure = f (GFS) : rôle des CAV (efflux de sucres)
 Root Pressure => 0 GFS => osmolarité = Ions ?





Absorption Minérale du Noyer



Novan NC 30 / Como Inna Angang Contambra 2000

Absorption minérale et pression racinaire



Mixing (1), Watering (2), Recovering Pumps (3)

Root Pressure

Root pressure = f(T°C)

- [NO3] =>varie fortement.
- Autres ions varient peu.





Root Pressure

Root pressure = f (T°C, NO3)





Root Pressure

 En conditions de privations de froid => root pressure permanente
 Pas d 'évolution saisonnière

Stem pressure possible (amidon, hydrolysé en GFS dans les parenchymes).



Conclusions et discussions

En conditions naturelles : évolution de l'origine de la pression

- 1) root =>stem=>root (rôle de cette pression ?)

 En conditions de privation de froid : root pressure permanente (puits racinaire fort => débourrement).

Température $< +5^{\circ}C =>$ disparition de la poussée racinaire (mortalité des fines racines ? Activité des transporteurs > ? Energisation des co-transports > ?)

Pression du xylème et température => système intégré du fonctionnement racinaire (mortalité, croissance, activité...).

Pulling for growth: a bio-rheological analysis of an *in situ* creep test on linearly-growing organs (gramineous leaves)

B. Moulia ¹, C. Coutand ² and J.L. Durand ¹

¹ UEPF, INRA, F-86 600 Lusignan, France ² PIAF, INRA Crouël, F-63039 Clermont-Ferrand Cedex 02, France

This text is a (slightly) modified version of **MOULIA B, COUTAND C, DURAND JL, 2000**. Pulling for growth : a bio-rheological analysis of an in situ creep test on linearly growing organs (grass leaves). In Spatz HC ansd Speck Th eds Plant Biomechanics 2000. Proceedings of the 3rd Plant Biomechanics Conference. Freiburg September 2000 :, Thieme Verlag, Stuttgart New York : pp19-21 . The figures from the oral presentation have been added, and their legend correspond to the oral comments

Since the pioneering works by Heyn [1] and Lokchard [2], expansive growth is analysed as the irreversible stretching of the primary cell wall under the mechanical effect of the wall stresses balancing the internal turgor pressure. The rheological behaviour of growing cell wall has mainly been modelled as a Bingham flow (linear irreversible viscous behaviour with an initial "plastic"stress threshold [2]). Consequently, it has been shown that these bio-rheological parameters were under metabolic control through the processes of wall loosening-stiffening, but the analysis of growth as an irreversible, time dependant, mechanical stretching, and the linear viscous analogy remained (see [3] for a recent review).

The primary assumptions of the linear viscous growth model are that i) a significant part of the strain due to load should be irreversible, ii) the relation between the steady strain rate and stress should be linear (load linearity). These hypotheses have been challenged by several reports of non-linear relationships between cell internal pressure and relative elemental growth rates (e.g.[4]). Moreover using killed but native specimens of growing tissues, Nolte and Schopfer [5] observed a complete retarded elasticity instead of real irreversible strain. Last but not least, many reports of indirect effects of mechanical perturbation inducing growth inhibitions (thigmomorphognesis) can be found in the literature (e.g. [8], [9], [10]). There is thus a need for a direct biomechanical re-assessment of the growth model.

To assess the Bingham-Flow analogy without any wounding or killing artefact and with no water stress on the plant, we used an *in situ* creep test (Fig1), in actively growing leaves of tall fescue (*Festuca arundinacea* Screb *cv* Clarine) grown from seeds in a glasshouse as described in ([6], [7]). Although this analysis at the organ level involves a more complicated physics due to significant coupling with water fluxes to the growth zones, the two primary assumptions 1) and 2) remain similar, and can be tested directly. To do so, two types of *in situ* tests were conducted: i) loading-deloading tensile creep test to assess irreversibility and ii) step-varying tensile creep tests to analyse the load linearity (Fig1). Moreover, two load durations were assessed: "short term" experiments with a load duration of 90 mn and long term experiments with load duration of 90 h.

Results demonstrated that the *in situ* load response in short terme experiment was consistent with a the growth being sensitive to wall stresses in a linear viscous way (Fig 2), although a more complicated rheological model (a modified Burgess model) was necessary to fit the data (Fig 3). However, the loading-deloading experiments revealed that the unloading behaviour could not be predicted from the model fitted to the load phase, and that it was likely that most of the load induced strain was visco-elastically reversible in short term experiments (Fig 4). However, long term creep tests (days) demonstrated an irreversible component (Fig 5), demonstrating the importance of time scales (see also [11]).

It is concluded that in situ creep tests are a usefull tool for the biorheological analysis of growth. However care should be taken to analyse also the unloading phase (which is almost never done in the bibliography). In this experiment, the growing leaf behaved as a reversible linear visco-elastic body in the short term experiments. An irreversible component was only found in long term experiments. Various experiments at different time scales are presently conducted. If the results presented here were to be confirmed, this would lead to a complete re-assessment of the theory of (irreversible) growth.

References

- [1] Heyn A.N.J. (1940). The physiology of cell elongation. *The Botanical Review* **6**(10). 515-574.
- [2] Lockhart J.A. (1965). Cell extension. *Plant Biochemistry* Bonner J & Varner J.E. eds. Academic Press. New York. pp 826-849.
- [3] Cosgrove D.J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Ann. Rev. Plant Physiol plant Mol. Biol.* **50**. 391-417

- [4] Cosgrove D.J. (1993). Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth *New Phytol.* **124**. 1-23.
- [5] Nolte T and Shopfer P. (1997). Viscoelastic versus plastic cell wall extensibility in growing seedling organs: a contribution to avoid some misconceptions *J. Exp. Bot.* 49(8). 2103-2107
- [6] Coutand C., 1995. Mise au point de la caractérisation des paramètres de la croissance par des essais mécaniques en fluage in situ: variations observées sur des limbes en croissance de fétuque élevée (Festuca aundinacea Schreb. cv Clarine) sous différents régimes hydriques. DEA Sciences Agronomiques. INPL Nancy
- [7] Coutand, C., Moulia B. & Durand JL. (1997). "Plant Biomechanics, 1997, II" eds
 G. Jeronimidis & JFV Vincent. The University of Reading Pub., Reading pp. 29-30

[8] Coutand C., Julien JL, Moulia B, Mauget JC. 2000. A biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation : I global mechanical analysis *J. Exp. Bot.* **51**(352) : 1813-1824.

[9] Coutand C., Moulia B, 2000. A biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation : II Local mechanical analysis and spatial integration of the mechanosensing *J. Exp. Bot.* **51**(352) : 1825-1842

- [10] Grace J., Pitcairns C., Russel G. & Dixon M. (1982). The effect of shaking on the growth and water relations of *Festuca arundinacea* Schreb. *Ann. Bot.* **49**. 207-215.
- [11] Coutand, C., Moulia B. & Durand JL., 1999. Bio-rheological analysis of an in-situ creep test on linearly-growing organs (garmineous leaves); *Plant proteins and the mechanical properties of cell walls (Alicante 10-12 April 1999)*. Plant Protein Club ed, University of York, p 9



Fig 1. In situ creep test on growing grass leaves. The zone of expansion growth in grass leaves is located at the basis of the leaves, inside the enclosing sheaths of older leaves. A steel thread is glued to the tip of the growing leaf (the tip consisting of fully mature tissues). The displacement of the tip due to growth is measured by an LVDT (preliminary experiments demonstrated that the displacements at the basis of the tiller can be neglected). Axial load is given by a mass. The step increase in longitudinal stress was 5.10⁻² Mpa, i.e. approx 10% of the Turgor pressure in the growing cells. Short term experiments were conducted in the lab, at steady temperature and very low light. For long term experiments, the test was conducted in the growth chamber.



Fig 2: A typical *in situ* **Displacement-time creep curve during the load phase** (short term experiments). The arrow represents the time of loading. It can be seen that after a transient phase, the elongation reaches an apparent new steady-state with increased rate of elongation.



Fig 3: Rheological analysis of the load phase of the creep curve. The simplest rheological model that fits the experimental data is a modified Burgess model (including an additional plastic element) a, d. The Burgess model includes a Kelvin-Voigt visco-elastic element accounting for the transient phase (b), an an irreversible Maxwell element accounting for the linear (and thus presumably irreversible) steady state (c). The fit was excellent (e) and the residual very well destributed (f).



Fig 4: Step increasing load: assessment of the Boltzmann's superposition. The effects of successive loads were fairly additive (a). In particular a good linear relatioship was found between the steady rate of elongation (corresponding to the irreversible Maxwell viscous element) and the load ((b). The linear viscous assumption thus seems to hold fairly well



Fig 5: Unloading phasis: assessing strain irreversibility. After deloading, in 80 % of the cases there was a complete recovery of the strains (assuming linear superposition with the turgor induced strains, according to Fig 4) (a). Such behaviour cannot be predicted by the modified Burgess model filted to the loading phasis (b)



Fig 6: Long term experiments: irreversible production of mature tissues under several loading conditions (9 g corresponds to a load similar to the short term experiments). The rate of production of mature tissues at the end of the growth zone (VAF) was measured by marking experiments (see [5] for more details). The distance between marks was measured after unloading and severing the leaf. As mature tissues behaved in a mostly elastic (or visco elastic reversible) way, the measurements were taken only a few minutes after deloading. Care was taken to minimize turgor losses.

La circulation de l'eau dans une feuille en croissance: des variations instantanées au bilan sur la durée de sa vie.

JL Durand

1. A état hydrique du sol optimal.



Au cours de sa vie, les besoins en eau d'une feuille sont très variables. Chez

les graminées, la quantification de ces besoins est maintenant établie (Fig 1.) On distingue une demande liée à la croissance, une demande liée à la transpiration, et une demande liée au comblement des déficits des tissus matures. Le premier flux est lié à la croissance. Il est essentiellement proportionnel à la vitesse d'allongement dans la mesure où c'est la principale déformation. Ce que Schnyder et Nelson (1988) ont bien montré chez la Fétuque est valable tout au long de la vie de la feuille. De sorte qu'aux variations près de largeur et de la part de volume vide au cours du temps, la demande en eau de croissance suit à peu près la_ courbe de la. vitesse d'allongement. Durant approximativement la moitié du

Figure 1 Les deux flux nets constitutifs du bilan d'une feuille en croissance (d'après les données de Martre et al. 2001)

développement de la feuille, ce flux d'eau est le seul. Il dépend cependant des autres flux de la plante du fait que le xylème de la feuille en croissance se connecte rapidement au réseau des feuilles plus âgées (Martre et al 2001). Le moment où cela se produit n'est pas connu avec précision. Il se pourrait que cela soit le moment où l'on observe une très forte accélération de la déformation de la feuille (typiquement quand elle fait entre 1 et 3 millimètres de long, Durand et al 1999.)

Au moment où la pointe de la feuille apparaît à la lumière, deux nouveaux flux apparaissent, transpiratoire et compensateur. En conditions contrôlées, le flux de transpiration est proportionnel à la surface de limbe exposée au rayonnement, les gaines transpirant très peu. Cette surface étant également quasi-proportionnelle à la longueur de la feuille, la transpiration instantanée est proportionnelle à l'intégrale de la vitesse d'allongement de la feuille. Si l'on applique enfin le même raisonnement à la phase de sénescence, on se représente assez bien ce que peut être l'évolution du bilan hydrique d'une feuille en flux transpiratoire conservatif (Fig. 1.) Le rôle des réservoirs de la feuille dans la variation de l'état hydrique est important mais n'affecte pas considérablement le schéma précédent sauf pour ce qui concerne les variations de flux de croissance, justement sensibles aux états hydriques à l'entrée de la feuille.

Par ailleurs, cette évolution est perturbée par un déficit hydrique édaphique. Ce dernier affecte la disponibilité en eau à l'entrée des racines.

2. Au cours d'un dessèchement du sol.

Au cours d'un dessèchement progressif, la quantité de sucres non structuraux disponibles pour la croissance augmente; on pense donc qu'il y a un effet direct de l'alimentation hydrique sur les processus morphogenétiques (Onillon et al 1994.) L'enregistrement de la vitesse de déplacement d'une feuille épuisant la réserve du sol en condition contrôlée livre un certain nombre d'observations importantes (Fig. 2.)



Figure 2 Evolution de la vitesse d'allongement d'une feuille de fétuque après arrêt puis reprise de l'irrigation (d'après Durand et al 1995)

variations Les nvcthémérales à VPD élevé (Cf exposé de P Martre), présentent des amplitudes d'abord croissantes jusqu'à ce que la vitesse s'annule après trois jours sans irrigation. Après deux iours à croissance nulle, le retour à l'alimentation optimale sol provoque du une reprise immédiate de l'allongement, d'abord à des vitesses inférieures aux valeurs initiales avant de les récupérer entièrement en un peu plus d'une journée. Durant cette expérience, on a mesuré l'évolution du profil de REGR (relative elemental growth

rate.) Initialement, le taux de croissance moyen, défini comme le rapport entre la vitesse et la longueur de la zone de croissance, est d'environ 5% par heure. On constate que durant le dessèchement, la longueur de la zone de croissance se réduit tandis que le REGR_{max} diminue aussi mais que près de la base de la feuille les REGR sont conservés (Durand et al 1995.) Notons que cela paraît compatible avec un effet strictement hydraulique puisque du fait de la forte résistance hydraulique dans la zone de croissance, une réduction de la disponibilité en eau à la base de la zone de croissance entraînerait en effet une diminution plus forte à l'aval (Cf Martre supra). Il y a une relation linéaire entre la vitesse d'allongement et la longueur de la zone de croissance pendant la phase de dessèchement.

R = 0.071 * (z - 14.8)

Où R est la vitesse d'allongement de la feuille et z la longueur de la zone de croissance.

Quand la vitesse tend vers zéro, la longueur de la zone de croissance tend vers environ 40 % de sa valeur maximale (environ 40 mm dans le cas étudié.) La reprise immédiate après réhydratation, avec une vitesse de 0.6 mm h^{-1} , conduit à penser que la longueur de la zone de croissance est restée proche de 14 mm durant les 48 heures où la feuille n'a pu s'allonger car cette vitesse correspond alors à un taux de 4.3 % h^{-1} , proche des 5% h^{-1} optimum. Durand et al (1999) ont présenté une modélisation de l'allongement d'une feuille qui prévoit l'évolution de la longueur de la zone de croissance. Il semble donc pertinent de combiner l'analyse de l'évolution ontogénique de la croissance de la feuille en conditions optimales et cet effet persistant du déficit hydrique sur la longueur de la zone de croissance. Parmi d'autres, deux types de questions pourraient être creusées:

- Comment la plante maintient-elle durant une période sèche son potentiel de croissance tel que le montre la stabilité de la zone de croissance potentielle ?
- Comment modéliser l'effet de la sécheresse édaphique sur l'allongement de la feuille au cours de son développement.

En ce qui concerne le premier point, deux pistes se dégagent en particulier

- Explorer la variabilité génétique de la longueur résiduelle de la zone de croissance. On sait en particulier que certaines graminées poursuivent leur activité de croissance à des potentiels de sol plus faible que d'autres (ex le Ray-grass anglais (Durand et al 1997.)
- Etudier les conditions hydriques de la zone de croissance durant la phase de croissance nulle. En particulier, on sait que la feuille réduit son allongement en conservant la pression hydraulique des tissus (au voisinage de 0.5 MPa), tandis que la pression des tissus matures diminue sensiblement. Est-ce que justement, cette valeur n'est pas celle qui est nécessaire pour entretenir le potentiel de croissance ?

En ce qui concerne le second point, il s'agit de transformer le modèle instantané de croissance utilisé par Martre et al. 2001 (Cf exposé précédent) afin de le rendre dynamique. Dans le modèle actuel, l'architecture hydraulique est fixe: la croissance ne modifie pas la dimension des compartiments. Le domaine temporel de validité de ce modèle est évidemment limité. Une façon de progresser serait de faire varier la dimension de la zone de croissance et les résistances hydrauliques des différents éléments selon une progression qui pourrait s'appuyer soit sur le résultat même de la croissance prédite par le modèle, soit en incluant un module de croissance des compartiments indépendant du type de celui utilisé par Durand *et al.* (1999).

Bibliographie

Durand, Onillon, Schnyder, Rademacher, 1995. J. Exp. Bot. 290, 1147-1155

Durand, Gastal, Etchebest, Bonnet, Ghesquière, 1997. E.J.A., 7, 99-107.

Durand, Gastal, Schaüfele, 1999. Ann. Bot. 83, 577-588.

Matre, Cochard, Durand, 2001. Plant Cell Env. 24, 65-76.

Onillon, Durand, Gastal, Tournebize, 1995. E.J.A. 4, 91-99.

Schnyder, Nelson, 1988. Plant Physiol. 90, 101-1206.

MODELISATION DE L'ARCHITECTURE HYDRAULIQUE DES TALLES DE FETUQUE ELEVEE : IMPLICATIONS

POUR LES RELATIONS ENTRE LES FLUX HYDRIQUES DE TRANSPIRATION ET DE CROISSANCE¹

Pierre Martre¹, Hervé Cochard² & Jean-Louis Durand¹

¹Unité d'Ecophysiologie des plantes Fourragères, INRA Lusignan, ²UMR Physiologie intégrative de l'arbre Fruitier, INRA Clermont-Ferrand

INTRODUCTION

De par leurs modes d'exploitation (pâturage ou fauche), les prairies sont régulièrement défoliées. La pérennité d'une prairie dépend donc de la vitesse de mise en place de la surface foliaire et de sa modulation par les facteurs du milieu. Il est donc important de caractériser les mécanismes qui contrôlent la croissance foliaire. Parmi les contraintes environnementales, les déficits hydriques, édaphiques et atmosphériques, sont des contraintes répandues dans les écosystèmes prairiaux, qui limitent souvent la croissance foliaire.

L'expansion foliaire chez la fétuque élevée est particulièrement sensible à la transpiration, ce qui résulte à température égale, en une vitesse d'allongement foliaire significativement plus faible le jour que la nuit. Par ailleurs, l'expansion foliaire est très sensible aux variations instantanées de transpiration au cours de la journée, dont l'intégration dans le temps a des répercussions importantes sur la productivité des prairies.

Les interactions entre la transpiration et l'expansion foliaire sont liées, d'une part, à des régulations biologiques (telles que celles qui modulent l'extensibilité pariétale des cellules en croissance ou la disponibilité en soluté dans la zone de croissance), d'autre part, à des effets strictement hydrauliques. La part respective des régulations biologiques et des effets hydrauliques est un sujet de débat actuel (J. Exp. Bot. (2000), Vol. 51, Special Issue 350). Or il apparaît qu'une part de cette incertitude provient du fait que la complexité de l'architecture hydraulique n'a jamais été prise en compte dans l'analyse des relations non linéaires entre la transpiration et l'expansion foliaire. Le réseau hydraulique de la plante peut en effet aboutir à des relations non linéaires entre la transpiration et l'expansion foliaire. La prise en compte de l'architecture hydraulique apparaît donc comme essentielle pour analyser les interactions entre la transpiration et l'expansion foliaire d'un point de vue hydraulique, mais également pour mettre en évidence et analyser les régulations biologiques sous-jacentes. *In fine*, l'objectif de ce programme de recherche est d'intégrer le fonctionnement hydrique de la plante à un modèle morphogénétique, afin d'identifier les variables écophysiologiques pertinentes qui permettraient de modifier génétiquement la réponse de la plante à la disponibilité en eau, en relation avec les variables biologiques et physiques de son environnement.

Notre démarche a été de modéliser les flux d'eau de transpiration et de croissance foliaire afin d'analyser le fonctionnement du réseau hydraulique de la plante. Cette démarche a consisté, dans un premier temps, à analyser le réseau hydraulique de la plante et à élaborer un modèle dynamique de flux basé sur un nombre minimum d'hypothèses. Dans un deuxième temps, à mesurer les paramètres de conductivité et les variables de potentiel et de flux, puis à adapter un outil de calcul, enfin, à comparer les résultats expérimentaux aux simulations du modèle.

DEFINITION DU SYSTEME D'ETUDE ET MODELISATION

Le système d'étude dans lequel les flux d'eau sont modélisés a été défini à partir d'une analyse de la topologie et des propriétés des différents organes de la plante. L'unité structurale et fonctionnelle des graminées est la talle.

¹ Martre P., Bogeat-Triboulot M.B. & Durand J.L. (1999) Measurement of a growth-induced water potential gradient in tall fescue leaves. *New Phytologist*, **142**, 435-439

Martre P., Durand J.L. & Cochard H. (2000) Changes in axial hydraulic conductivity along elongating leaf blades in relation to xylem maturation in tall fescue. *New Phytologist*, **146**, 235-247

Martre P., Cochard H. & Durand J.L. (2001) Hydraulic architecture and water flow in growing grass tillers (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Cell and Environment*, **24**, 65-76

Martre P. & Durand J.L. (2001) Quantitative analysis of vasculature in the leaf of *Festuca arundinacea* (Poaceae): Implications for axial water transfert. *International Journal of Plant Sciences*, **162**, 755-766

Ainsi nous avons considéré une talle isolée comme système d'étude. Une talle est constituée d'un empilement de feuilles générées par un méristème situé quelques millimètres au-dessus de la zone d'insertion des racines sur la tige feuillée. La fétuque élevée ne possède généralement pas plus de deux feuilles en croissance simultanément. Nous avons donc choisi de traiter dans notre étude des talles constituées de trois feuilles visibles (Fig. 1). Chaque feuille est reliée au système racinaire qui est représenté par un seul élément. En se basant sur une analyse approfondie de l'anatomie des nœuds et entre-nœuds de graminées, nous avons fait l'hypothèse que les différentes feuilles d'une talle sont hydrauliquement connectées les unes aux autres et sont au même potentiel hydrique à leur base.

les variables d'entrée du modèle sont définies aux bornes du système et sont :

- à l'interface sol/racine le potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol}).
- à l'interface feuille/atmosphère le flux de transpiration (*T*).

Nous avons considéré la transpiration comme une variable de forçage, plutôt que de modéliser la conductance stomatique, car nous ne nous intéressions pas ici à la régulation de la transpiration.

Les variables de sortie du modèle sont :

- le flux d'absorption (A), qui est déterminé par le flux de transpiration et les flux d'hydratation et de déshydratation des tissus matures et dans une moindre mesure par les flux de croissance.
- le flux de croissance (G), responsable de la croissance en volume de la feuille L₃.
- les champs de potentiels hydriques générés dans le réseau hydraulique de la talle par la circulation de l'eau.

Les feuilles de graminées sont alimentées en eau par une vascularisation parallèle. Pour atteindre la surface d'évaporation dans le limbe, l'eau perdue par transpiration doit suivre un trajet radial extravasculaire, qui oppose une forte résistance. Par ailleurs, les zones de croissance sont enveloppées dans les gaines des feuilles précédentes, leur transpiration est donc négligeable. Enfin, l'eau qui alimente la partie distale de la feuille en croissance, qui est exposée au rayonnement et qui transpire, doit traverser la zone de croissance. Nous avons donc explicitement considéré un **flux axial vasculaire** qui assure la circulation de l'eau à longue distance et un **flux radial extravasculaire** (Fig. 2). La nature très différente dans les éléments matures et en croissance du flux radial détermine deux types d'éléments : (1) les **éléments matures** (Fig. 2a), où l'eau du mésophylle peut également participer au flux de transpiration ; et (2) les **éléments en croissance** (Fig. 2b), où le flux radial correspond au flux de croissance.

Les feuilles ont été discrétisées en éléments de 5 mm de long et de largeur égale à celle de la feuille. Les éléments matures et en croissance de feuilles sont assemblés axialement par le xylème (Fig. 3). Les feuilles sont assemblées en parallèle les unes par rapport aux autres sur le système racinaire qui est représenté par un seul élément, caractérisé par sa conductance (L_{Proot}) et sa capacitance (C_{root}). Les flux d'eau dans chaque élément de feuille sont calculés par une méthode de résolution numérique en différence finie.

DETERMINATION DES VALEURS DES PARAMETRES DU MODELE

La modélisation du système hydraulique d'une talle définit un certain nombre de paramètres, sur lesquels on connaît généralement peut de choses chez les graminées. Ces paramètres peuvent être séparés en deux catégories : les conductances et les capacitances. Nous nous sommes d'abord intéressé aux variations de croissance en régime de transpiration stationnaire. Dans ces conditions la contribution des tissus matures au flux radial est faible et les échanges d'eau entre les compartiments sont déterminés par les conductances des différents éléments du réseau. Pour cette raison nous nous sommes tout d'abord focalisé sur la mesure des paramètres de conductivité. Les différents paramètres de conductivité ont été mesurés sur des organes excisés. Afin de réaliser les premières simulations de flux à partir de ce modèle, nous avons utilisé des valeurs de capacitance issue de la littérature. Les paramètres de conductivité et les variables de potentiel et de flux ont été mesurés sur des talles isolées, cultivées en hydroponie.

CONDUCTANCE AXIALE DES ELEMENTS DE FEUILLES

La conductivité hydraulique axiale (K) a été mesurée dans les limbes des feuilles matures et en croissance à partir d'une technique initialement mise au point sur des rameau de ligneux et que nous avons adaptée aux feuilles de graminées. Mais, cette technique ne permet pas de mesurer K dans les gaines des feuilles matures. De plus, dans

les feuilles en croissance, la résolution spatiale de cette technique (30 mm) ne permet pas de décrire à une échelle satisfaisante les variations de K le long des feuilles en croissance. Nous avons donc calculé K dans ces zones à partir d'un modèle basé sur des mesures anatomiques du diamètre et du nombre de vaisseaux de xylème fonctionnels. Les valeurs de K ainsi calculées ont été corrigées par le rapport Kcalculé / Kmesuré établie sur les limbes. La fonctionnalité des vaisseaux de protoxylème et de métaxylème le long des feuilles en croissance a été étudiée à l'aide de colorations et de micromoulages des vaisseaux.

Grâce à cette méthode nous avons établi une cartographie de K à l'échelle nécessaire pour notre modèle (Fig. 4). Il ressort de ces résultats que K est très hétérogène le long des feuilles matures et en croissance, ce qui justifie, au moins dans un premier temps, la discrétisation de la talle en éléments de faibles dimensions. Du fait de la présence de vaisseaux immatures de métaxylème, la conductivité à la base des feuilles en croissance est très faible.

CONDUCTANCE TOTALE ET RADIALE DES ELEMENTS MATURES DE FEUILLES

La conductance radiale (L_{Pr}) des limbes est délicate à mesurer directement, mais elle peut être calculée à partir des mesures précédentes de *K* et de la conductance totale du limbe (L_{Pblade}) . L_{Pr} a ensuite été ajustée à partir des mesures de *K* et de L_{Pblade} en inversant le sous modèle précédemment décrit pour les éléments matures (Fig. 2a) en supposant L_{Pr} constante le long du limbe.

Les valeurs de L_{Pr} ainsi ajustées ne sont pas significativement différentes des valeurs de L_{Pblade} (tableau 1), ainsi 90% de la résistance au flux d'eau dans les limbes est localisée dans le mésophylle, K ne limite donc pas le flux d'eau dans les tissus matures. C'est un résultat important, jusqu'ici implicite, dont l'implication principale est que la chute de potentiel hydrique dans une feuille a lieu essentiellement au cours du trajet extravasculaire.

CONDUCTANCE RADIALE DES ELEMENTS EN CROISSANCE DE FEUILLES

La conductance radiale de la zone en croissance (L_{Ppx}) a été calculée à partir d'une analyse cinématique de croissance et de la différence de potentiel hydrique entre le xylème et les cellules en expansion. Les paramètres nécessaires pour calculer L_{Ppx} sont : (1) le dépôt d'eau local (d_{water}) , (2) la différence de potentiel hydrique induite par la croissance $(\Delta \Psi_{ez})$ et (3) la surface d'échange entre le xylème et les cellules en expansion (A_{px}) .

 d_{water} est égal au flux radial entre le xylème et les cellules en expansion, l'intégrale de d_{water} le long de la zone de croissance est donc égale au flux d'eau de croissance (G). d_{water} a été mesuré le long de la zone de croissance par une analyse cinématique des champs d'allongement et de teneur en eau le long de la zone de croissance (équation de continuité). A_{px} est égale à la somme des périmètres du protoxylème, qui ont été calculés à partir de coupes anatomiques. $\Delta \Psi_{ez}$ a été calculé à partir de mesures *in planta* de la pression de turgescence (mesurée avec une sonde à pression cellulaire) et de la pression osmotique (mesurée avec un picolitre osmomètre).

Les résultats montrent que le long de la zone de croissance A_{px} évolue de manière parallèle à d_{water} (Fig. 5). Les mesures de $\Delta \Psi_{ez}$ nous ont permis de confirmer *in planta*, que le flux d'eau lié a la croissance génère une différence de potentiel hydrique considérable entre le xylème et les cellules en expansion. Cette différence de potentiel hydrique est homogène le long de la zone de croissance et est égale à 0.3 MPa. d_{water} étant corrélé de manière linéaire à A_{px} et $\Delta \Psi_{ez}$ étant homogène, L_{Ppx} est donc également homogène le long de la zone de croissance (tableau 1).

CONDUCTANCE TOTALE DU SYSTEME RACINAIRE

La conductance totale du système racinaire (L_{Proot}) a été mesurée à partir de la méthode utilisée pour mesurer L_{Pblade} (tableau 1).

DETERMINATION DES VALEURS DES VARIABLES DU MODELE

VARIABLES D'ENTREES

La pression osmotique dans la zone de croissance (Π_{ez}) a été mesurée aux échelles cellulaires et tissulaires. Les résultats montrent que Π_{ez} est homogène le long de la zone de croissance. De plus nous n'avons pas mesuré de différence significative entre la fin des phases obscures et éclairées, Π_{ez} est donc considéré comme stationnaire et a

été traité comme un paramètre. Le flux de transpiration (T) a été mesuré en continue grâce à un système gravimétrique. Ce dispositif expérimental permet grâce à un système de vases communiquants placés sur deux balances de mesurer simultanément T et le flux d'absorption (A).

VARIABLES DE SORTIES

A a été mesurée simultanément et au même pas de temps que T. L'expansion foliaire chez les graminées est essentiellement mono-dimensionnelle, il existe donc une relation quasi-linéaire entre la vitesse d'allongement foliaire (VAF) et le flux d'eau de croissance (G). Nous avons mesuré la VAF de L_3 en continue, simultanément aux flux d'A et de T, à l'aide d'un capteur de déplacement linéaire. Les potentiels hydriques des limbes des différentes feuilles ont été mesurés dans une chambre à pression ; ceux des racines et de la zone de croissance dans des chambres psychrométriques.

COMPARAISON DES SIMULATIONS ET DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

CARTOGRAPHIE DES POTENTIELS HYDRIQUES EN CONDITION DE FLUX DE TRANSPIRATION STATIONNAIRE

Une première évaluation du modèle consiste à comparer, en régime de transpiration stationnaire, la distribution dans la talle des potentiels hydriques simulés et mesurés. Cette première évaluation a été effectuée en entrant G comme une variable de forçage.

La chute de potentiel hydrique entre la solution nutritive et la base de la talle est de 0.2 MPa (Fig. 6). Dans le limbe de la feuille L_1 , la chute radiale de potentiel hydrique entre le xylème et les cellules du mésophylle est de 0.3 MPa. Cette chute de potentiel se produit sur une distance inférieure à 0.5 mm, elle correspond donc à un gradient de potentiel hydrique supérieure à 600 MPa m⁻¹! Par contre, le gradient de potentiel hydrique axial dans le mésophylle est beaucoup plus faible (0.3 MPa m⁻¹) et est comparable à celui calculé le long du xylème. Il apparaît donc que l'anisotropie des resistances radiales et axiales limitent le gradient de potentiel hydrique dans le xylème et homogénéise le potentiel hydrique du mésophylle le long du limbe ; ce qui optimise l'alimentation hydrique des feuilles matures en limitant les risques de cavitation du xylème et en plaçant les stomates le long du limbe au même potentiel hydrique.

Dans la partie mature des feuilles L_2 et L_3 (*i.e.*, au-delà de 100 mm de la base) la distribution des potentiels hydriques est comparable à celle calculée dans la feuille L_1 . Par contre, dans la partie basale de L_2 et L_3 , la présence de vaisseaux de métaxylème immatures entraîne un gradient de potentiel hydrique de 2.0 MPa m⁻¹. Dans la zone de croissance de L_3 , la chute de potentiel hydrique entre le xylème et le mésophylle est comparable à celle calculée dans la partie émergée du limbe, malgré un flux de croissance qui ne représente que 0.5 à 2% du flux de transpiration.

De manière générale, les valeurs simulées de potentiel hydrique sont en cohérence avec les valeurs mesurées ; que ce soit dans les racines, dans la zone de croissance ou dans la partie exposée des limbes (Fig. 6). On peut noter que les valeurs des potentiels hydriques des limbes, mesurés à la chambre à pression, sont très proches des celles calculées dans le mésophylle.

SIMULATION DES FLUX D'ABSORPTION ET DE CROISSANCE EN CONDITION DE FLUX DE TRANSPIRATION NON STATIONNAIRE

Après avoir vérifié que les paramètres de conductivité donnent une distribution de potentiel hydrique cohérente en condition de flux de transpiration stationnaire ; nous avons comparé en régime de transpiration non stationnaire les mesures de flux d'absorption (A) et de vitesse d'allongement foliaire (VAF) aux sorties du modèle. Nous présentons ici deux situations, tout d'abord au cours d'un nycthémère, puis lors d'un ombrage partiel de la surface foliaire au cours de la photophase.

Dans la situation présentée figure 7, G suit de près la VAF au cours du nycthémère. Le modèle permet dans ces conditions de simuler des relations non linéaires entre la transpiration et la VAF, comme par exemple au cours de la photophase ou lors de la transition jour/nuit. Dans environ 50% des cas, l'augmentation de la T lors des transitions nuit/jour est accompagnée d'une augmentation lente de la VAF (Fig. 8). Dans de telles situations, le modèle ne permet pas de rendre compte de la cinétique de la VAF. D'après les simulations que nous avons effectuées, il semble que ce deuxième type de cinétique ne soit pas directement lié à une interaction hydraulique entre T et G. Une analyse détaillée des relations entre le flux de croissance et les flux capacitifs est nécessaire avant de pouvoir conclure à l'existence de régulations biologiques locales ou intégrées.
Le masquage de la feuille L_1 entraîne une diminution rapide de la *T*, qui est accompagnée d'une augmentation transitoire de la VAF (Fig. 8). Après stabilisation de la *T*, la VAF diminue de manière exponentielle et se stabilise à une valeur comparable à celle mesurée pendant la nuit. Le modèle permet de rendre compte de telles variations transitoires de la VAF. Un effet similaire sur la VAF a été observé suite au masquage des feuilles L_2 ou L_3 , dans ces situations les variations de VAF de la feuille L_3 sont également prédites de manière satisfaisante.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La démarche d'analyse et de modélisation de l'architecture hydraulique et de la croissance entreprise dans cette étude montre la nécessité de prendre en compte la structure de la plante pour analyser les relations entre la transpiration et l'expansion foliaire. En effet, par cette démarche **nous avons pu montrer qu'un modèle hydraulique est suffisant pour rendre compte des interactions entre la transpiration et l'expansion foliaire.** Dans ces conditions, l'effet hydraulique de la transpiration sur la vitesse d'allongement foliaire est en grande partie expliqué par la chute du potentiel hydrique dans le xylème de la zone de croissance, qui est générée par le flux de transpiration. Cette chute de potentiel hydrique dans le xylème de la zone de croissance diminue la disponibilité de l'eau pour la croissance (i.e., la différence de potentiel hydrique induite par la croissance).

Dans sa version actuelle, le modèle présente un certain nombre de limites, qui ne remettent pas en cause le travail de modélisation réalisé, mais apparaissent importantes à considérer et constituent des perspectives directes de ce travail :

- les simulations réalisées indiquent que les flux d'eau capacitifs ont des répercussions importantes sur le flux d'eau de croissance.
- Les propriétés bio-rhéologiques de la zone de croissance et leurs régulations n'ont pas été modélisées de manière explicite au cours de ce travail. Les régulations de la rhéologie de la zone de croissance pourront être analysées en couplant le modèle hydraulique développé dans cette étude à un modèle bio-rhéologique de croissance (voir exposé de Bruno Moulia). Une telle étude a été initiée, nous avons essayé de découpler les régulations hydrauliques et mécaniques de la croissance. Ces jeux de données devraient permettre de faire une première analyse des régulations des paramètres bio-rhéologiques en relation avec la transpiration.
- Au cours de cette étude, nous n'avons pas modélisé le fonctionnement de la zone de croissance (i.e., les variations de longueurs de la zone de croissance) ce qui limite l'utilisation du modèle actuel à des pas de temps courts. La modélisation de ces phénomènes nous permettrait d'une part, d'analyser l'effet de l'augmentation de la transpiration avec l'âge de la feuille sur la croissance foliaire, d'autre part d'analyser l'effet hydraulique d'une contrainte hydrique édaphique sur la croissance foliaire.

Dans un cadre plus général, certaines limitations du modèle nécessitent de modifier sa structure. Par exemple, les flux de carbone dans la zone de croissance n'ont pas été envisagés au cours de cette étude. Le modèle de croissance des cernes d'arbre présenté par François Alain Daudet pourrait être une moyen d'intégrer les flux de carbone dans notre analyse de l'architecture hydraulique d'une talle de graminées. En effet, dans ce modèle les flux d'eau de croissance ont été modélisés de manière tout à fait équivalente à ce qui a été réalisé chez la fétuque, mais dans le cas du modèle de François Alain Daudet les flux de carbone ont également été modélisés et le couplage entre les flux de carbone et les flux d'eau a été traité.



Figure 1. Schéma conceptuel d'une talle de graminée. La talle est constituée de trois feuilles visibles : (i) une feuille mature (L₁), (ii) une feuille en croissance lente, dont le flux d'eau pour la croissance peut être négligé (L₂) et (iii) une feuille en croissance rapide, dont la partie apicale est exposée au rayonnement (L₃). L'expansion de L₃ est localisée dans la zone de croissance, située à la base de la feuille. La zone de croissance est donc protégée du rayonnement par les gaines des feuilles L₁ et L₂. Les trois feuilles de la talle sont directement reliées au système racinaire. A, flux d'absorption ; G, flux de croissance ; T, flux de transpiration ; Ψ_{sol} , potentiel hydrique du système racinaire.



Figure 2a. Modélisation des flux d'eau dans un élément mature de feuille. Le flux axial (*F*) est déterminé par la conductance axiale du xylème (*K*) et par la différence de pression hydrostatique (P_x) aux bornes de l'élément. Le flux axial qui entre dans l'élément suivant (F_2) est égal à la différence entre le flux axial (F_1) et le flux radial (T_1) de l'élément précédent. De même que pour le flux axial, le flux radial est déterminé par la conductance radiale du mésophylle (L_{P_r}) et par la différence de potentiel entre le xylème (P_{x1}) et le mésophylle (Ψ_{l1}). Le mésophylle contribue au flux radial en fonction de sa capacitance (C_l).



Figure 2b. Modélisation des flux d'eau dans un élément en croissance de feuille. Le flux axial (F) est modélisé de la même manière que dans les éléments matures (Fig. 2.2a). Le flux d'eau (G) qui entre dans le compartiment en croissance (C_{ez}), est déterminé par la conductance radiale des tissus en croissance (L_{Ppx}) et par la différence de potentiel aux bornes de cette capacitance, qui est égale à la différence de potentiel hydrique généré (Ψ_{ez}) par le flux d'eau et la pression osmotique (Π_{ez}) généré par le flux de soluté. La différence de potentiel aux bornes de C_{ez} est donc égale à la pression de turgescence (P_{ez}).



Figure 3. Représentation simplifiée du modèle de flux d'eau dans une talle de graminée en croissance. Les capacitances ne sont pas représentées, sauf pour le système racinaire. Les éléments matures et en croissance de feuilles, présentés figure 2.2, sont assemblés axialement par le xylème. Les feuilles sont assemblées en parallèle les unes par rapport aux autres sur le système racinaire, qui est représenté par un seul élément, caractérisé par sa conductance (L_{Proot}) et sa capacitance (C_{root}). L₁, feuille mature ; L₂, feuille en croissance lente ; L₃, feuille en croissance rapide. Ψ_{root} , potentiel hydrique du système racinaire.



Figure 4. Conductivité hydraulique axiale (*K*) des trois feuilles visibles d'une talle de fétuque élevée en fonction de la position à la base de la feuille. *K* a été calculée à partir des mesures de diamètre de vaisseaux en appliquant la loi de Poiseuille, corrigée par la proportion de vaisseaux fonctionnels et par le rapport entre la conductivité axiale mesurée sur des segments excisés de limbes et la conductivité axiale calculée par la loi de Poiseuille. Les moyennes sont représentées (1 SE \leq 13% de la moyenne, n = 5 à 8).

Tableau 1. Conductance hydraulique totale (L_{Pblade}) et radiale (L_{Pr}) des limbes foliaires matures (L_1), en croissance lente (L_2), en croissance rapide (L_3) et de la zone de croissance de la feuille L_3 (L_{Ppx}), et conductance totale du système racinaire (L_{Proot}) de fétuque élevée. Les moyennes ± 1 SE sont présentées (n = 8 à 11).

	L_{Pblade} ou L_{Proot} (mmol s ⁻¹ m ⁻² MPa ⁻¹)	$\frac{L_{\rm Pr} \text{ ou } L_{\rm Ppx}}{(\text{mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ MPa}^{-1})}$	$L_{ m Pblade}$ / $L_{ m Pr}$
Feuille L ₁	6.6 ± 0.7	7.2 ± 0.8	0.92
Feuille L ₂	8.9 ± 0.8	10.35 ± 1.0	0.86
Feuille L ₃	19.6 ± 0.7	21.2 ± 7.9	0.92
Zone de croissance	-	6.5	-
Système racinaire	12.3 ± 0.7	-	-



Figure 5. Taux de dépôt d'eau local (d_{water}) et surface d'échange entre le xylème et les cellules en expansion (A_{px}) en fonction de la distance à la base de la feuille en croissance rapide (L₃) de fétuque élevée. A_{px} est égale à la somme des périmètres des vaisseaux de protoxylème. Les moyennes (± 1SE pour A_{px}) sont présentées (n = 8 à 9). Insert, relation entre d_{water} et A_{px} .



Figure 6. Distribution des potentiels hydriques dans le xylème (P_x , lignes continues) et les tissus extravasculaires (Ψ , lignes discontinues) en conditions de flux stationnaires, prédit par le modèle d'architecture hydraulique de la fétuque élevée. Les potentiels hydriques ont été calculés en fixant le flux de croissance ($G = 0.30 \mu$ mol s⁻¹) et de transpiration. Les densités de flux de transpiration des feuilles L₁, L₂ et L₃ étaient respectivement égales 2.67, 2.31 et 2.21 mmol m⁻² s⁻¹. Les potentiels hydrauliques mesurés dans les racines (o), la zone de croissance de la feuille L₃ (c) et des limbes des feuilles L₁ (A), L₂ (u) et L₃ (i) sont reportées pour comparaison. Les moyennes ± 1SE (n = 5) sont présentées.



Figure 7. Évolution au cours d'un nycthémère des flux de transpiration (T), d'absorption (A) (a), de la vitesse d'allongement de la feuille L₃ (VAF) et du flux de croissance simulée de la feuille L₃ (G) (b) d'une talle isolée de fétuque élevée cultivée en hydroponie. Les flux de transpiration et d'absorption ainsi que la vitesse d'allongement foliaire ont été mesurés simultanément sur la même talle. Les barres noires sur les axes des abscisses représentent la scotophase.



Figure 8. Effet d'un ombrage partiel de la surface foliaire au cours de la photophase sur la transpiration (*T*) et l'absorption (*A*) (*a*), la vitesse d'allongement de la feuille L_3 (VAF) et le flux de croissance simulée de la feuille L_3 (*b*) d'une talle isolée de fétuque élevée cultivée en hydroponie. Les flux de transpiration et d'absorption ainsi que la vitesse d'allongement foliaire ont été mesurés simultanément sur la même talle. Les flèches pleines indiquent le début de l'ombrage de la feuille mature L_1 , les flèches ouvertes indiquent le démasquage de L_1 . Les barres noires sur les axes des abscisses représentent la scotophase.

Eau, xylème et débourrement de l'arbre. Mobilité et état de l'eau dans les bourgeons d'Épicéa au début du printemps, en relation avec leur structure et leur fonctionnement hydraulique : étude en résonance magnétique nucléaire et en microscopie.

E de Faÿ¹ et F Humbert^{2,3}

¹Laboratoire de Biologie Forestière, UMR UHP-INRA 1136, BP 234 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
² Laboratoire de Méthodologie RMN, UPRESA 7042, BP 234 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex
³Adresse actuelle : Laboratoire de Chimie Physique pour l'Environnement, UMR UHP-CNRS 7564, 405 rue de Vandoeuvre 54600 Villers-lès-Nancy

INTRODUCTION

L'eau est un facteur indispensable à la croissance, notamment pour l'élongation cellulaire et les synthèses. Mais, sa présence et ses caractéristiques dans les bourgeons avant le débourrement ont été peu étudiées. Les rares études portent sur la teneur en eau, le potentiel hydrique ou la relation avec les stades phénologiques chez le frêne (Cottignies 1983, 1990), divers feuillus (Essiamah et Eschrich 1986) ou le noyer (Améglio 1994) ainsi que sur l'état de l'eau déterminé par résonance magnétique nucléaire (RMN) dans les bourgeons floraux du pommier et du myrtillier (Faust *et al* 1991, 1995 ; Rowland *et al* 1992).

La RMN du proton est un puissant outil pour caractériser l'état de l'eau dans les systèmes biologiques. Deux types de paramètres sont notamment intéressants : les temps de relaxation et les coefficients d'auto-diffusion moléculaire translationnelle. Les temps de relaxation longitudinale (T1) et transversale (T2) correspondent à des constantes de temps associées aux lois qui décrivent le retour à l'équilibre thermodynamique des noyaux excités au cours d'une expérience RMN, par exemple les noyaux hydrogène ¹H ou carbone ¹³C. Comme ces temps de relaxation sont fortement influencés par les mouvements moléculaires, leur étude permet d'accéder à des informations très précieuses sur l'état de l'eau. Ainsi, le T2 relatif aux protons de l'eau est d'autant plus court que cette dernière est plus liée à des macromolécules. En ce qui concerne la diffusion moléculaire, il faut remarquer qu'il en existe deux sortes : la diffusion gouvernée par un gradient de concentration et l'auto-diffusion, dont nous parlons ici, et qui correspond à la diffusion aléatoire, dans des conditions d'équilibre, des molécules les unes par rapport aux autres sans changement net de concentration de l'espèce diffusante. En d'autres termes, ce mouvement correspond au mouvement moléculaire brownien. Tandis que les temps de relaxation RMN reflètent des mouvements rotationnels complexes des molécules, l'auto-diffusion mesurée par RMN est uniquement due à des mouvements translationnels aléatoires des molécules. Toutefois, cette diffusion peut être restreinte par la présence de barrières moléculaires et macromoléculaires, telles que celles constituées par les parois cellulaires. Dans ce cas, les coefficients d'auto-diffusion mesurés reflètent également les dimensions et la perméabilité des cellules. En raison de la complexité des processus de diffusion dans les systèmes biologiques, on parle généralement d'auto-diffusion apparente.

L'objectif de cet exposé est de préciser grâce à de méthodes de RMN et à la microscopie les caractéristiques de l'eau dans les bourgeons d'Épicéa (*Picea abies*) plus particulièrement dans leur pousse embryonnaire –car c'est elle qui apparaît au moment du débourrement– et les particularités structurales et fonctionnelles de ces bourgeons.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

L'étude a été réalisée chez des épicéas âgés de 20-30 ans poussant en champ dans la forêt d'Amance près de Champenoux. Trois clones différant par la précocité de leur débourrement (un clone très précoce, un clone précoce et un clone tardif) ont été examinés. Les bourgeons étudiés ont été prélevés dans la partie basse et moyenne de la couronne au cours du printemps et jusqu'au débourrement. Ce sont tous des bourgeons terminaux de branches et de ramifications vigoureuses. Ils sont au stade écodormant, c'est-à-dire qu'ils débourrent dès qu'ils sont placés dans des conditions environnementales favorables (leur dormance hivernale est levée).

Techniques RMN du proton

La RMN est une spectroscopie basée sur les interactions entre le moment magnétique que possède tout noyau de spin non nul (¹H, ¹³C, ³¹P) et deux champs magnétiques appliqués : (i) un champ magnétique statique B₀ généré en permanence par un électroaimant ou un aimant supraconducteur et (ii) un champ magnétique de radiofréquence B₁ appliqué perpendiculairement à B₀ sous forme de courtes impulsions par passage d'un courant radiofréquence à travers une bobine qui entoure l'échantillon. Le premier champ polarise les spins nucléaires, créant ainsi des niveaux d'énergie distincts, et le second induit des transitions entre ces niveaux. La fréquence de transition v₀ est reliée à l'amplitude du champ magnétique B₀ selon la relation de Larmor :

 $v_0 = \gamma B_0 / 2\pi \tag{1}$

où γ est le rapport gyromagnétique du noyau considéré. Pour un type de noyau donné, cette fréquence est toutefois légèrement modifiée en fonction de la densité et de la distribution du nuage électronique autour du noyau, reflétant ainsi l'environnement chimique de ce dernier : cet effet est connu sous le nom de déplacement chimique. Par ailleurs, la vitesse de retour à l'équilibre thermodynamique des noyaux excités n'est pas la même pour tous les noyaux. Ces

phénomènes dits de relaxation peuvent être caractérisés, entre autres, par deux constantes de temps désignées par T1 et T2 qui sont associées respectivement à la reconstruction de l'aimantation parallèlement à B_0 et la destruction de l'aimantation transversale à B_0 . Comme les phénomènes de relaxation des spins sont intimement liés aux mouvements moléculaires, leur étude permet en particulier de discriminer dans un échantillon hétérogène les différentes composantes en fonction de leur mobilité. Par exemple, il est tout à fait possible de distinguer l'eau libre de l'eau liée à des macromolécules. Pour plus de détails voir les références de Callaghan (1993) et Lens et Hemminga (1998).

Au vu de la relation (1) si le champ magnétique varie en intensité suivant une ou plusieurs directions de l'espace, la fréquence de résonance d'un noyau sera fonction de sa localisation spatiale au sein de l'échantillon. Ceci est au coeur de la technique de codage spatial utilisée en microscopie RMN et qui permet non seulement d'obtenir des images de l'échantillon mais aussi d'accéder aux coefficients d'auto-diffusion translationnelle moléculaire. Au lieu de faire varier dans l'espace B₀ une autre technique, pouvant présenter dans certains cas des avantages et qui est utilisée ici, consiste à faire varier spatialement le second champ magnétique excitateur B₁. Il s'agit de la technique de gradient de champ de radiofréquence. Pour plus de détails voir Humbert (2001).

La pousse embryonnaire prélevée est introduite dans un tube RMN de 5 mm de diamètre. Les mesures en protons sont réalisées à 26°C dans un spectromètre équipé d'un électroaimant et opérant à 90 MHz. L'intensité du gradient de champ de radiofréquence est de 80 Gauss/cm. Les temps de relaxation T2 sont mesurés en utilisant la méthode Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Les coefficients d'autodiffusion parallèle et perpendiculaire à l'axe longitudinal des bourgeons sont mesurés en orientant les échantillons respectivement parallèlement et perpendiculairement à la direction du champ de gradient.

Etude histologique du bourgeon

Les bourgeons, prélevés à différentes dates au cours du printemps, sont fixés dans le Craf I (Sass 1958) et ultérieurement coupés longitudinalement à l'aide d'un microtome à congélation. Les coupes sont traitées avec le phloroglucinol-HCl, qui colore spécifiquement (en rose ou rouge) les lignines (Sass 1958; Vallet *et al* 1996), et observées en microscopie optique.

Suivi de l'entrée d'un colorant apoplastique dans un bourgeon

Des rameaux d'épicéa de 30 cm de long sont placés dans un bécher contenant une solution d'azosulfamide à 1%, le tout est mis dans une chambre de culture à la lumière. L'azosulfamide est un colorant apoplastique (Ashworth 1982) qui colore en rouge les parois du xylème et les espaces intercellulaires voisins. Au bout de 20 heures environ, la partie terminale des rameaux est sectionnée longitudinalement et observée sous la loupe binoculaire.

RESULTATS

Temps de relaxation transversale pour l'eau liée et proportion d'eau libre

Les temps de relaxation longitudinale T1 et transversale T2 ont été mesurés, mais seuls les T2 donnent des résultats intéressants et sont présentés. Deux T2 ont été mis en évidence dans la pousse embryonnaire des bourgeons, indiquant deux populations d'eau. Ils évoluent de la même manière au cours du printemps. Ainsi, le T2 de l'eau liée augmente à partir d'avril (Fig 1). Le pourcentage d'eau libre donnant lieu au signal (Fig 1) est élevé dans les bourgeons en mars-avril (autour de 80%), mais il diminue en mai (à 50%), juste avant le débourrement. On en déduit que l'eau devient de plus en plus libre dans la pousse embryonnaire au cours du printemps et qu'une nouvelle population d'eau peu mobile apparaît juste avant le débourrement.

Coefficients d'auto-diffusion apparente, parallèle et perpendiculaire à l'axe longitudinal du bourgeon

En mars, les coefficients d'auto-diffusion parallèle et perpendiculaire sont identiques dans la pousse embryonnaire, mais à partir d'avril la direction longitudinale est privilégiée (Fig 2). L'auto-diffusion apparente des protons de l'eau dans la pousse embryonnaire devient donc anisotrope au cours du printemps, ce qui veut dire que les cellules de la pousse embryonnaire sont globalement plus perméables et/ou s'allongent davantage selon la direction longitudinale.

Structure du bourgeon et présence de xylème

La pousse embryonnaire à l'intérieur du bourgeon est petite et peu différenciée au début du printemps : entre le parenchyme médullaire et le parenchyme des aiguilles embryonnaires, on ne voit que du procambium -assise qui est à l'origine des tissus conducteurs primaires ; toutefois, à la base du bourgeon, du xylème est présent (Fig 3 A et Aa). Environ un mois avant le débourrement, la pousse embryonnaire commence à grandir et le xylème apparaît ; il se différencie dans tout l'axe embryonnaire, en commençant par la base et en montant jusqu'à quelques dizaines de µm du méristème terminal (Fig 3 Ba et Bb). La présence de cellules xylémiennes très allongées (trachéides) coïncide avec l'apparition de l'anisotropie de l'autodiffusion, ce qui confirme l'interprétation précédente. Il s'agit en fait de protoxylème (xylème primaire apparaissant dans les organes très jeunes) reconnaissable aux épaississements annelés, spiralés ou rayés de la paroi (même chez les Gymnospermes).

Entrée du colorant apoplastique dans la pousse embryonnaire à l'intérieur du bourgeon

Au début du printemps, le xylème et le tissu parenchymateux adjacent de la tige, des aiguilles et de la base du bourgeon se colorent fortement (Fig 4A) ; dans la pousse embryonnaire le colorant rouge est pratiquement absent, sauf à la base où il teinte légèrement le parenchyme. Juste avant et au moment du débourrement, le colorant est visible dans le xylème nouvellement formé de la pousse embryonnaire jusqu'aux aiguilles (Fig 4 B & C) et presque jusqu'au sommet de l'axe, ce qui montre que le xylème de la pousse embryonnaire est fonctionnel juste avant le débourrement. Il y a donc un afflux d'eau libre dans la pousse embryonnaire, dont une partie doit se lier aux macromolécules des parois cellulaires (eau d'hydratation). C'est vraisemblablement cette eau d'hydratation qui provoque la diminution de la proportion d'eau libre mise en évidence au moment du débourrement.

Comparaison entre clones

Tous les événements décrits ont été observés chez les 3 clones, mais avec un décalage : ils sont tous plus précoces chez le clone au débourrement très précoce que chez le clone au débourrement tardif et le 3ème clone est intermédiaire. C'est par exemple le cas de l'apparition du xylème dans la pousse embryonnaire (Table 1). Ce décalage des événements entre les clones laisse supposer que toute une séquence de phénomènes liés à l'eau doit se produire, au sein de la pousse embryonnaire, pendant l'écodormance, avant que le débourrement ait lieu.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La RMN combinée à l'étude microscopique a permis de montrer qu'il y avait pendant l'écodormance une association étroite d'une part entre les changements de mobilité et d'état de l'eau et d'autre part la différenciation du xylème au sein de la pousse embryonnaire, ainsi qu'avec le débourrement. Les changements de propriétés de l'eau et l'évolution de la pousse embryonnaire sont-ils semblables chez d'autres espèces arborescentes, notamment chez les Feuillus ? Peuvent-ils suffire à déterminer le degré de précocité d'un cultivar ? Il serait intéressant de le savoir. Préciser le début de la différenciation du protoxylème d'une part par rapport au protophloème dans la tige embryonnaire et d'autre part par rapport au début de la différenciation du bois dans la tige sous-jacente permettrait aussi de mieux comprendre le fonctionnement des bourgeons. De tels renseignements pourraient aider à comprendre le fonctionnement d'espèces comme les chênes, dont la différenciation du bois dans le rameau sous-jacent au bourgeon et son fonctionnement sont soupçonnés se produire avant le débourrement.

La mise en fonction du xylème dans la pousse embryonnaire de l'Épicéa, qui permet l'entrée en masse d'eau dans l'ensemble des tissus, est la cause immédiate du débourrement. Mais, l'eau est aussi vraisemblablement impliquée plus précocement dans l'évolution de la pousse embryonnaire, puisque de l'eau libre est présente bien avant le débourrement dans cette pousse et que son entrée à partir de la tige a été visualisée. Quels en sont les voies et les mécanismes d'entrée ? L'eau libre présente précocement peut avoir trois origines : (i) l'entrée d'eau à partir du xylème de la tige dans le parenchyme de la pousse embryonnaire, s'il existe un gradient de potentiel hydrique entre les deux ; (ii) la conversion d'eau liée en eau libre comme cela a été proposé pour les bourgeons végétatifs de frêne (Cottignies 1986) et pour les bourgeons floraux de pommier et de myrtillier (Faust et al 1991, 1995 ; Rowland et al 1992) ; (iii) le transport de l'eau à partir du protophloème, à condition que la différenciation du protophloème soit plus précoce que celle du protoxylème. Une étude biochimique combinée avec d'autres méthodes de RMN adaptées à l'étude des organismes vivants et mises au point sur d'autres parties de la plante (Ishida et al 2000) devrait permettre d'éclaircir ce point.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le responsable de la station agronomique de l'INRA-Nancy d'avoir autorisé les prélèvements d'Épicéas dans le parc à clones de la forêt d'Amance.

REFERENCES

- Ameglio T. 1994. Fonctionnement hydrique du noyer durant la période non feuillée: conséquences sur le développement de l'arbre. In: *l'eau dans la vie de l'arbre*, Séminaire du Groupe d'Etude de l'Arbre, Clermont-Ferrand, 14-15 Avril 1994: 99-129.
- Ashworth E N. 1982. Properties of peach flower buds which facilitate supercooling. *Plant Physiology* **70**: 1475-1479.
- **Callaghan P T. 1991.** k-Space microscopy in biology and materials science. In: *Principles of nuclear magnetic resonance microscopy.* Oxford: Clarendon Press, 227-327.
- **Cottignies A. 1983.** Teneur en eau et dormance dans le bourgeon de Frêne. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **111**: 133-139.
- **Cottignies A. 1986.** The hydrolysis of starch as related to the interruption of dormancy in the ash bud. *Journal of Plant Physiology* **123**: 381-388.
- **Cottignies A. 1990.** Potentiel osmotique et potentiel hydrique du bourgeon terminal de Frêne, au cours du cycle annuel. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris, série III* **310**: 211-216.
- **Essiamah S, Eschrich W. 1986.** Water uptake in deciduous trees during winter and the role of conducting tissues in spring reactivation. *IAWA Bulletin n.s.* **7**: 31-38.
- Faust M, Liu D, Line M J, Stutte GW. 1995. Conversion of bound to free water in endodormant buds of apple is an incremental process. *Acta Horticulturae* 395: 113-118.

- Faust M, Liu D, Millard M M, Stutte GW. 1991. Bound versus free water in dormant apple buds –a theory for endodormancy. *Hortscience* 26: 887-890.
- Faÿ E (de), Vacher V, Humbert F. 2000. Water-related phenomena in winter buds and twigs of *Picea abies* L. (Karst.) until bud-burst: a biological, histological and NMR study. *Annals of Botany* 86: 1097-1107.
- Humbert F. 2001. Potentials of radio-frequency field gradient NMR microscopy environmental science. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26: 53-61.
- **Ishida N, Koizumi M, Kano H, 2000.** The NMR microscope: a unique and promising tool for plant science. *Annals of botany* **86**: 259-278.
- Lens P N L, Hemmings MA, 1998. Nuclear magnetic resonance in environmental engineering: Principles and applications. *Biodegradation* 9: 393-409.
- Meiboom S, Gill D, 1959. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Science Instruments* 29: 688-691.
- Rowland L J, Liu D, Millard M M, Line M J. 1992. Magnetic resonance imaging of water in flower buds of blueberry. *Hortscience* 27: 339-341.
- Sass J E. 1958. *Botanical microtechnique*. Third edition. Ames, Iowa: The Iowa State University Press.
- Vallet C, Chabbert B, Czaninski Y, Monties B. 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals of Botany* 78: 625-632.



Dates d'échantillonnage

Fig 1. Temps de relaxation transversal T2 pour l'eau liée (**D**) et proportion d'eau libre (•) dans les pousses embryonnaires des bourgeons du clone précoce au cours du printemps (d'après de Faÿ *et al* 2000).



Fig 2. Coefficients d'autodiffusion apparente perpendiculaire (A) et parallèle (A) dans les pousses embryonnaires des bourgeons du clone précoce au cours du printemps (d'après de Faÿ *et al* 2000).



Fig 3. Coupes longitudinales colorées au phloroglucinol-HCl de bourgeons débarrassés de leurs écailles (clone tardif) prélevés le 6 et le 24 avril. Aa, Ba et Bb : Détails encadrés des photos A et B respectivement (Ba en haut, Bb en bas). Ae : aiguille embryonnaire, Base bg : Base du bourgeon, M : méristème, Mo : moelle, Pousse embr : pousse embryonnaire, Protox lign : protoxylème lignifié, Protox non lign : protoxylème non lignifié, T : cellule tanifère, X : xylème. (d'après de Faÿ *et al* 2000).



Fig 4. Coupes longitudinales de la partie terminale des rameaux mis à la lumière après avoir été plongés dans la solution colorée. d'azosulfamide. Ae : Aiguille embryonnaire, Base bg : base du bourgeon, Mo : moelle, Pousse embr : pousse embryonnaire, Tige : tige mise en place la dernière année, S : xylème (d'après de Faÿ *et al* 2000).

Table 1. Absence (0) et abondance des éléments de xylème ($\pm =$ un élément, + = plusieurs éléments le long de l'axe) dans la pousse embryonnaire des 3 clones. Comparer les prélèvements du 6 avril (d'après de Faÿ *et al* 2000).

	Clone			
Dates d'échantillonnage	Très précoce	Précoce	Tardif	
20 mars	0	0	0	
6 avril	+	±	0	
24 avril.	+	+	+	
10 mai	+	+	+	

















































Moyennes et SE par nombre de feuilles dans les bourgeons et points individuels



UN MODÈLE MÉCANISTE DES VARIATIONS DE DIAMÈTRE DE TIGE INTÉGRANT L'ÉTAT HYDRIQUE ET LA CROISSANCE CAMBIALE

F.A. Daudet, UMR PIAF Clermont-Ferrand

1 Introduction et hypothèses de base

Les capteurs de déplacement type LVDT qui permettent de suivre les variations de diamètre d'une branche d'une tige ou d'un tronc avec une résolution de l'ordre du micron, mettent en évidence la superposition d'au moins deux types de variation :

- i) des variations rapides de diamètre (réversibles ou élastiques) liées essentiellement aux fluctuations nycthémérales du bilan hydrique de la plante,
- ii) une variation lente qui reflète la croissance diamétrale liée à l'activité cambiale et diversement affectée par les conditions physiologiques et l'environnement.

Le modèle proposé explicite ces deux phénomènes à partir d'une conception du fonctionnement de la plante basée sur une généralisation du mécanisme de Münch. La plante y est envisagée comme un double réseau résistif (xylème, phloème) et ramifié (Fig. 1) dans lequel circulent l'eau apoplastique et l'eau symplastique, cette dernière véhiculant les sucres solubles (saccharose). Le potentiel hydrique Ψ , la pression de turgescence P et la concentration en sucre C, sont calculées en tout point du réseau en raison de ses propriétés hydrauliques ainsi que des activités source et puits des différents organes pour le carbone.

La modélisation utilise le logiciel de simulation des circuits électriques P-Spice, pour résoudre numériquement le système d'équations ordinaires et différentielles qui régissent les équilibres hydriques et osmotiques ainsi que le couplage entre flux d'eau et flux de sucres. La figure 2 indique les bases de l'analogie électrique utilisée pour exprimer l'équilibre hydrique entre apoplasme et symplasme ainsi que le couplage des flux :

- un double circuit d'eau représente l'eau apoplastique et symplastique et la communication possible entre les deux ; les flux d'eau (J_W) y sont associés à des gradients de potentiel hydrique Ψ (apoplasme) ou de turgescence P (symplasme)
- un circuit de sucres, parallèle aux précédents traite du bilan de carbone.

Le couplage eau/sucre est explicité par deux éléments dans cette figure :

- le générateur de tension Π qui représente la pression osmotique Π =CRT,
- l'expression du flux de sucre dans le symplasme : $J_S = C * J_W$

2 <u>Fonctionnement du modèle sur une structure linéaire sans croissance :</u>

Le modèle est d'abord appliqué à une structure linéaire sans croissance comprenant 4 éléments tige en série, un élément feuille, un élément racine et un élément sol (Fig. 3) ; les conditions aux limites imposées à la feuille sont : transpiration constante, photosynthèse en créneau (Fig. 4). On présente deux types de résultats :

- Flux d'eau échangés entre xylème et phloème (Fig. 5) : l'eau passe du xylème au phloème au niveau des feuilles (flux conventionnellement positif) et dans le sens inverse au niveau des racines. Dans les éléments tige intermédiaires, ce flux est beaucoup plus faible et peut changer de signe au cours de la journée.
- Concentration de sucre (Fig. 6) : la concentration de sucre décroît depuis le sommet de la plante vers la base ; l'onde de concentration est déphasée et amortie vers la base de la plante.

3 <u>Description du modèle avec prise en compte de l'élasticité des tissus et de la croissance</u>

La structure de la tige avec schématiquement des tissus périphériques vivants élastiques (écorce) et internes morts inélastiques (bois) est représentée dans Fig. 7. On suppose que le contenu structural de l'écorce ne varie pas au cours de la croissance (hypothèse de stationnarité); c'est à dire que la différentiation du néo xylème en méta xylème se fait au même rythme que la production cambiale de néo xylème (Fig. 8).

3.1 Elasticité des tissus de l'écorce

L'élasticité des tissus de l'écorce est traduite par la fonction qui relie pression de turgescence et volume (Fig. 9). Elle est prise en compte dans le circuit analogique par le générateur de tension PV_{PX} (Fig. 10) qui fait correspondre le volume de symplasme W_{NX} à la pression de turgescence P_{PX} , selon la fonction PV de la figure 9. Le condensateur W_{SYMP} sert à accumuler cette eau symplastique.

3.2 Croissance

La croissance concerne les tissus vivants de l'écorce ; elle correspond d'abord à une augmentation dV du volume symplastique de l'écorce dont on admet qu'elle est décrite par le modèle de Lockhart (Fig. 11). Un accroissement du volume d'eau apoplastique ainsi que du contenu en carbone dC=densité*dV sont associés à la croissance volumique. Notons que l'eau qui alimente cette croissance volumique peut provenir de l'apoplasme et du symplasme. La part des deux dépend de la concentration C en saccharose dans le symplasme ainsi que du rapport entre les besoins de l'écorce en carbone et en eau.

Compte tenu de la géométrie cylindrique de la tige, la croissance structurale se distribue au cours de la différenciation néo- méta xylème entre une augmentation du périmètre d'écorce (à épaisseur constante) et une augmentation du rayon de bois. La proportion des deux est imposée par la géométrie (Fig. 12). Le coût respiratoire de la croissance dépend par ailleurs de l'efficience de croissance (Y_G, Fig. 12).

La traduction en circuit Spice est représentée Fig. 13 pour l'eau : le générateur G-VolGr représente la croissance volumique ; il obéit à l'équation de Lockhart et fonctionne comme un puits d'eau symplastique. Cette croissance volumique se partage entre une part symplastique qui correspond à l'accroissement de périmètre de l'écorce (générateur G-Perim, Fig. 13) et une part apoplastique (générateur G-Rad) correspondant à la croissance radiale du méta-xylème.

Le schéma Fig. 14 reprend les mêmes phénomènes pour le bilan de carbone (saccharose). On reconnaît dans cette figure 3 éléments :

- les tubes criblés qui ont une fonction de transfert des sucres et de stockage sous forme soluble,
- les tissus de l'écorce qui assurent plusieurs fonctions :
 - stockage réversible de sucres à l'état soluble,
 - stockage réversible de sucres sous forme d'amidon,
 - respiration d'entretien
 - croissance structurale et respiration de croissance associée
- le méta-xylème dont le contenu en carbone structural augmente en fonction de la croissance diamétrale

4 <u>Fonctionnement du modèle sur une structure linéaire avec croissance diamétrale et</u> <u>écorce élastique :</u>

4.1 Croissance diamétrale en l'absence de stress hydrique

La variation de diamètre avec les mêmes conditions limites imposées (photosynthèse en créneau, transpiration constante, cf. Fig. 4), est représentée Fig. 15 pour les éléments « tige » #1 et #4. Cette variation correspond à la superposition d'une croissance diamétrale régulière et d'une variation cyclique de l'épaisseur d'écorce due à une variation d'état hydrique (Fig. 16). Le même calcul fait avec une transpiration en créneau, montre une croissance diamétrale inchangée mais une amplitude accrue des variations d'épaisseur d'écorce (Fig. 17).

4.2 Croissance diamétrale en condition de stress hydrique croissant

Les variations de diamètre calculées pour des conditions identiques aux précédentes (photosynthèse et transpiration en créneau) mais avec un volume de sol limité, sont représentées Fig. 18. La décomposition entre croissance diamétrale et variation d'épaisseur de l'écorce est présentée Fig. 19. On constate que la croissance diamétrale cesse rapidement alors que l'épaisseur de l'écorce diminue progressivement et que l'amplitude des contractions réversibles augmente.

4.3 Croissance diamétrale en l'absence de stress hydrique et avec décortication annulaire

On réalise une décortication annulaire virtuelle en interposant une résistance de valeur élevée sur la communication phloémienne entre les éléments tige #2 et #3 (Fig. 3).

La variation simulée du diamètre des éléments tige #1 et #4 est représentée Fig. 20 ; on constate un accroissement continu du diamètre de l'élément #1 situé au dessus de la décortication alors que #4 voit son diamètre diminuer. La décomposition entre croissance diamétrale et variation réversible de l'épaisseur d'écorce est montrée Fig. 21. L'élément tige #1 montre une croissance diamétrale d'abord accélérée puis constante et une épaisseur d'écorce qui augmente puis se stabilise rapidement à une valeur maximale. L'élément tige #4 montre une croissance diamétrale très faible, vite arrêtée, alors que l'épaisseur de son écorce diminue puis se stabilise à une valeur minimale.

Ces phénomènes s'expliquent par la variation de pression de turgescence dans les éléments tige (Fig. 22), elle même fonction de leur bilan de carbone : les éléments #1 et #2 qui ne peuvent plus exporter vers la base de la plante s'enrichissent énormément en sucres, ce qui conduit à une augmentation très importante de leur turgescence ; inversement les éléments #3 et #4 s'appauvrissent et leur turgescence finit par devenir nulle.

5 <u>Conclusion</u>

Le modèle proposé conduit à des simulations assez satisfaisantes (au moins sur le plan qualitatif) des variations de diamètre de tiges dans différentes circonstances : absence ou présence de stress hydrique, décortication annulaire. Il présente l'intérêt de traiter de manière indépendante la croissance diamétrale proprement dite du bois et les variations réversibles de l'épaisseur des tissus périphériques élastiques (écorce). Par ailleurs, le mécanisme de Münch, largement admis, est à l'œuvre dans les transferts axiaux de sucre dans les tubes criblés ainsi que dans les transferts radiaux qui assurent l'alimentation des parenchymes de l'écorce.

Des expériences destinées à valider les points principaux de ce modèle sont programmées à Clermont-Ferrand dès l'été 2001.












































Propriétés hydrauliques, vulnérabilité du xylème et efficience d'utilisation de l'eau chez les cèdres méditerranéens

Ladjal M., Huc R., Ducrey M. Guehl J-M.

- Le présent travail se rapporte à la mesure de paramètres écophysiologiques chez les cèdres en relation avec la sécheresse. Il s'inscrit dans un Projet Fair : Adaptation and selection of Mediterranean Pinus and Cedrus for sustanable afforestation of marginal lands
- Matériel végétal utilisé : Cedrus atlantica, C. brevifolia, C.libani entre 1 et 3 ans élevé en conteneurs en conditions semi-contrôlées.
- Questions :
 - Les paramètres hydrauliques permettent-ils de distinguer les espèces et provenances ?
 - Quelles sont les relations entre croissance et efficience d'utilisation de l'eau sur les jeunes plants en conditions semicontrôlées.
 - Une meilleure efficience d'utilisation de l'eau correspond -elle aussi à une meilleure conductivité hydraulique ?









-7.0

-7.5

-8.0

20

25

k_s (mol m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹)

30

35

Wem -8.515 L95–08, Ain Zhalta

٠ \$7

٠

T95-03, Armut Alan

F95-06, Ménerbes

T95-04, Arslankov L95-09, Jabal Ka * C95-12, CHYPRE

△ L95-10, Hadeth El Jebbe ○ L95-11, Maasser El Chouf







La circulation d'eau dans la plante se fait dans un continuum entre le sol et l'atmosphère. L'eau est "tirée" vers le haut par l'évapotranspiration créant des tensions en tout point du système, entre le sol et les feuilles. L'eau ne circule pas librement mais elle est enfermée dans le système conducteur qui crée des résistances au flux.



La conductance stomatique est un paramètre influençant la valeur de discrimination isotopique d'une part et indispensable pour le maintien de l'intégrité hydraulique d'autre part, Ces relations nous poussent à poser cette question.

Méthodes

Résultats issus d'expérimentations indépendantes pendant l'été 2000:

1- Suivi des **échanges gazeux** pendant un dessèchement total des plants en chambre climatique

2- **Caractéristiques hydrauliques** de la partie de la tige principale développée en 2000:

> Conductivités mesurées par conductimétrie

7

8

9

Vulnérabilité à la cavitation obtenue en induisant la perte de conductivité dans le xylème par pressurisation

$3 - \delta^{13}C$ des feuilles

plants issus deux traitements développés en 2000 prélevées au cours de l'été.

Méthodes

Potentiels hydriques mesurés sur des rameaux :

Potentiel de base (avant le lever du soleil, à l'équilibre sol-plante)

> Potentiel hydrique minimum (à midi)

 Potentiel du xylème : à midi, sur des rameaux qui n'ont pas transpirés (protégés par un isolant)

Le potentiel du xylème est utilisé pour comparer les mesures d'hydrauliques et d'échanges gazeux

$\delta^{13}C \text{ comme indicateur de WUE}$

Les mesures d'échanges gazeux et d'hydrauliques ont pu être reliée par la mesure du potentiel hydrique du xylème (en laboratoire, elle représente la pression de pressurisation des rameaux et en chambre climatisée, elle est obtenue en empêchant un rameau de transpirer en le couvrant d'un isolant.

La figure représente la moyenne de δ^{13} C sur 12 plants en fonction de A/g ponctuel en août sur les même plants. Les espèces discriminent contre le 13C de manière différente, le classement (CV>PN>PA) est conservé entre les traitements, bien que l'efficience des plants soumis à une sécheresse modérée aient une meilleur efficience d'utilisation de l'eau.

Le cyprès semble discriminer différemment des pins!







Les courbes de vulnérabilité ont été établies pour la tige de l'axe principal et une grosse racine en dessous du collet. il faut noter:

les racines sont plus vulnérables à la cavitation que les tiges (décalage de 1 à 2 MPa)

- le pin noir est plus vulnérable à la cavitation que le pin d'Alep et le cyprès,

- La conductivité spécifique foliaire du pin d'Alep est 3 fois plus faible que pin noir et cyprès.

- L'acclimatation à la sécheresse a un effet seulement sur la LSC (diminution).

Lorsque des plants des 3 espèces sont soumis à un dessèchement, l'assimilation et gs (la conductance stomatique) diminuent avec le potentiel de base. gs diminue plus rapidement que l'assimilation. les pente des courbes sont différentes en fonction des espèces.

Lorsqu'on représente le pourcentage restant de gs (calculé par rapport à la valeur maximale avant dessèchement) en fonction du potentiel de xylème, on voit que le pin noir ferme ces stomates plus tôt que le pin d'Alep et le cyprès (voir tableau).



Lorsqu'on place en vis à vis la courbe de perte de conductivité et la diminution de gs en fonction du potentiel du xylème, on voit que les stomates sont presque entièrement fermés avant que le potentiel dans le xylème provoque 20% de perte de conductivité.



Conclusions

 \succ Les racines sont significativement plus vulnérables que les tiges à la cavitation.

> La fermeture stomatique intervient avant que le xylème dans la tige n'aie perdu 10% de sa conductivité et 50% pour les grosses racines.

 \succ WUE, $\delta^{13}C$ et le risque d'embolie semblent directement corrélés, même si toutes les différences ne sont pas expliquée.

> La conductivité spécifique foliaire est diminuée dans les plants en conditions de sécheresse, aucun effet sur la vulnérabilité à la cavitation.

17

Perspectives

> Rôle de l'embolie racinaire dans la résistance à la sécheresse?

> Confirmer la relation $\delta^{13}C$ et conductivité hydraulique.

18

Hydraulic limitations of *Pinus halpensis* and *Quercus ilex* growing in mixed stands

Claude Doussan, Steve Hallgren, Roland Huc and Gilles Vercambre

<u>Overall goal</u>: The overall goal is to provide ecophysiology information on environmental requirements of *Pinus halpensis* and *Quercus ilex* to guide development of appropriate silviculture for mixed stands.

<u>Objectives</u>: The specific objective of the project is to compare the hydraulic limitations of *Pinus halpensis* and *Quercus ilex* growing on similar sites in the Mediterranean zone of southern France.

<u>Background</u>: Pinus halpensis and Quercus ilex grow together in the Mediterraneanzone of southern France. *P. halpensis* is a pioneer species that invades disturbed sites and *Q. ilex* is a seral species that benefits from the presence of other species such as *P. halpensis* to improve site conditions before it can become established. In fact, *Q. ilex* begins to compete with *P. halpensis* in the later stages of stand development. It is sometimes necessary to suppress *Q. ilex* to favor regeneration of *P. halpensis*. We wish to learn how the hydraulic limitations differ between these two species which occupy the same sites but have different places in the sequence of forest succession.

It is important to learn how to manage stands with both *P. halpensis* and *Q. ilex* for several reasons. There is a high economic cost to control *Q. ilex* to favor *P. halpensis*. Control of *Q. ilex* requires chemicals or mechanical methods that are controversial. In addition, there is strong pressure to manage forests as mixed stands instead of pure single species stands. The management of mixed stands requires detailed knowledge of the environmental requirements of both species. It appears *P. halpensis* and *Q. ilex* have different requirements and will need to be managed differently, as they occupy different stages of forest succession. In the Mediterranean forests water is a limiting factor due to the long dry summer. Therefore, it is important to know how to manage forest stands to protect them against water stress.

Recent developments have provided the theoretical framework to model the hydraulic limitations of trees (Sperry et al. 1998). The model is based on the relation of hydraulic conductance (K) to water potential () of the components of the soil-plant-atmosphere-continuum (SPAC). There are limits to conductivity in the plant and soil. The limits increase as decreases and can reach a catastrophic level (crit) where the system fails due to runaway cavitation in the xylem or soil. Plants are protected against cavitation failure by stomatal closure which reduces transpiration and prevents it from achieving the water flux (Ecrit) which would cause to decrease to crit somewhere in the SPAC. Two other plant controls over xylem failure are: 1.)the relation of capacity of roots to absorb water from soil to the capacity to transpire water (Ar:AI), and 2.) capacity to change xylem conductivity through ion concentration in the xylem (Zwieniecki et al. 2001).

<u>Approach</u>: We propose to use the recently developed model of Sperry et al. (1998) to compare the hydraulic limitations of *P. halpensis* and *Q. ilex* in their natural setting in closed forests. The tree and soil properties will be measured to determine the relation between K and including crit for each component of the SPAC. The model will be used to calculate values of Ecrit. Trees will be measured for transpiration and to learn how close they follow the model predictions.

Methods:

Mixed Stand

A closed mixed stand of *P. halpensis* and *Q. ilex* will be chosen for intensive study. In addition to measurements at the stand level eight trees of each species will be examined closely for hydraulic properties.

Transpiration. Transpiration will be measured by the heat dissipation method of Granier.

Potential Evapotranspiration. PET will be determined from measurements of solar radiation, temperature, humidity and wind speed at 2 m above the forest canopy.

PLC versus xylem. Stems and roots will be measured for the relation of loss of conductivity (PLC) to xylem with the mille pattes and centrifuge methods. Both fine (dia. less than 2 mm) and coarse (dia. greater than 2 mm) roots will be measured.

Soil hydraulic conductivity versus soil. Soil hydraulic conductivity inrelation to soil will be determined by measurement and calculation according to the particle size distribution for the A and B horizons.

xylem. xylem will be measured with the pressure chamber method.

Ar:Al. The Ar:Al will be measured by using the relation of basal area to leaf area for the leaves and excavating roots for the root area.

Model Application

The model of Sperry et al. (1998) will be used to verify that the measured hydraulic properties of the SPAC for *P. halpensis* and *Q. ilex* fall within expected values. The Ecrit calculated from the model will be calculated over the summer to determine the potential of the two species to extract water from the soil. It is expected each species will have a different relationship between Ecrit and soil determined by Ar:Al and the relation of PLC to xylem.

Expected Results:

These results will show the differences in hydraulic limitations of *P. halpensis* and *Q. ilex* growing on the same site in mixed stands. Drought is a severe limitation to productivity of these stands in the Mediterranean zone. Knowledge of the comparison of response to drought of these two species can be used to determine how they can be managed in mixed stands.

Programme de recherche 2001-2004 : « Connaissance de l'élaboration des composantes agronomiques de la qualité des agrumes par l'utilisation de la diversité génétique : fonctionnement hydrique et sélection variétale ».

Isabelle Poggi-Limongi - Sra INRA-CIRAD San Giuliano

Thierry Ameglio – P.I.A.F. U.M.R. INRA-Univ. Blaise-Pascal Clermont-Ferrand Hervé Cochard P.I.A.F. U.M.R. INRA-Univ. Blaise-Pascal Clermont-Ferrand

La ressource en eau se tarit en méditerranée mais également dans d'autres pays producteurs d'agrumes.

Par ailleurs, l'irrigation est nécessaire pour pallier le déficit hydrique estival et assurer une production économiquement rentable.

Les travaux conduits sur diverses variétés d'agrumes révèlent que cette espèce est très sensible à une restriction hydrique intervenant à différents stades physiologiques critiques.

Les effets induits sur la récolte se traduisent par une réduction de la production et une modification de la qualité externe et interne du fruit.

Une vulnérabilité à un excès d'eau a également été constatée avec une incidence sur la production comparable à celle notée en situation de déficit en eau, et surtout, des effets néfastes sur la pérennité du verger liés au développement de certains champignons.

Dans ce contexte, notre objectif est de caractériser le fonctionnement hydrique des agrumes en conditions de sécheresse édaphique et de définir les indicateurs physiologiques pertinents pour une meilleure gestion des irrigations.

Les hypothèses que nous formulons sont les suivantes :

- le fonctionnement hydrique d'une association porte-greffe /greffon dépend du porte-greffe et de la variété.

- le fonctionnement hydrique d'une association porte-greffe /greffon dépend des conditions de disponibilité en eau (support, climat, irrigations).

En 2001, deux études seront conduites sur 2 combinaisons de clémentiniers (clémentine commune**poncirus trifoliata*, clémentine commune*Citrange carrizzo).

Une première expérimentation en laboratoire permettra d'analyser d'une part, la relation entre les variations de diamètres d'un rameau et le potentiel hydrique du xylème, et d'autre part, la vulnérabilité à l'embolie.

Une deuxième expérimentation conduite sur plantes en pots sous serre, permettra d'analyser le fonctionnement hydrique de ces combinaisons sous contrainte édaphique (2 cycles de sécheresse de 10 jours en juillet et août): il s'agira de réaliser les mesures de transpiration, de micro-variations de diamètres des troncs, de potentiels hydriques, de conductance stomatique et de photosynthèse foliaire, et enfin d'embolie.

Ces études seront ensuite conduites sur douze autres combinaisons (3 porte-greffes et 4 variétés) d'intérêt commercial et 2 génotypes à comportement extrême vis à vis de l'eau. Enfin ces mêmes analyses seront menées en plein champ afin de valider les résultats obtenus en conditions contrôlées. Efficience d'utilisation de l'eau et anatomie du bois à l'échelle de l'arbre dans un peuplement mélangé de chênes sessile et pédonculé

S. Ponton, JL. Dupouey, N. Bréda et E. Dreyer

Diapositive 1				
1				
	Efficience d'utilisation de l'eau et anatomie du bois			
	à l'échelle de l'arbre dans un peuplement mélangé de chênes sessile et pédonculé			
	S. Ponton, J-L. Dupouey, N. Bréda & E. Dreyer			
Diapositive 2				
	Contexte			
	2 espèces sympatriques présentant:			
	 fonctionnements écophysiologiques similaires 			
	(sensibilité à l'embolie estivale, profondeur d'enracinement, sensibilité au dépérissement induit par la sécheresse, taux de croissance)			
	- proximité génétique			
	- préférences écologiques distinctes			
	(disponibilité en eau et éléments minéraux, héliophilie, hydromorphie)			
	- marqueurs spécifiques: morphologie foliaire et anatomie du bois (vaisseaux)			



Diapositive 6



Diapositive 7

Quelle que soit la période considérée, le chêne sessile présente une discrimination (Δ) inférieure à celle du chêne pédonculé, soit une meilleure efficience d'utilisation de l'eau.



Diapositive 8

Cette différence interspécifique est relativement stable au cours du temps. Elle est en moyenne de 1‰, soit une différence d'efficience d'utilisation de l'eau de 14% entre les deux espèces. Complément d'échantillonnage par des mesures de Δ réalisées en 1999 sur des échantillons foliaires et confirmation de la différence interspécifique obtenue à partir de la cellulose du bois.



radiale, DBH, hauteur des arbres, hauteur relative de houppier...) ⇒ pas d'influence du statut social sur ∆ + conservation du « rang » des individus au cours du temps \Rightarrow contrôle génétique de \triangle ? - différence inter-spécifique de WUE; confirmée par une étude sur semis croissant en conditions contrôlées - forte variabilité intra-spécifique (70% la variabilité totale, contre 25% pour la variabilité inter-spécifique) Diapositive 10 Relation entre discrimination isotopique durant l'année 1976 et la surface totale de vaisseaux dans le bois initial Mise en évidence d'une forte corrélation entre la discrimination isotopique 19 (pour l'année 1976 sur le Pearson Corr. Coef. =0.79 p=0.0001 graphique ci-contre) des individus et le paramètre Discrimination isotopique (‰) 18 anatomique "surface totale de vaisseaux dans le bois initial". 17 (1976) La surface de vaisseaux correspond à une valeur 16 moyenne par individu, indépendante de la date. 15 Q. petraea Q. robur 14 0.9 1.1 1.2 0.5 0.6 0.7 0.8 Surface totale de vaisseaux dans le bois initial (mm²) Diapositive 11 Relation entre efficience d'utilisation de l'eau et surface totale de vaisseaux dans le bois initial - corrélation la plus forte avec le A de l'année 1976 (fortes contraintes hvdrigues) - relations Δ / surface totale de vaisseaux identiques pour les 2 espèces ⇒ les différences inter-individus de surface de vaisseaux sont suffisantes pour expliquer les différences interspécifiques de A, et donc de WUE - hypothèse: les propriétés hydrauliques du xylème exerceraient des contraintes sur les échanges gazeux foliaires, induisant une meilleure WUE pour les individus présentant une plus faible surface de vaisseaux conducteurs - couplage direct (entre conductance hydraulique totale et conductance stomatique) ou indirect (résultant d'un compromis évolutif entre maximisation des transferts hydriques dans le xylème et minimisation des risques d'embolie estivale)

Les variations intra- et interspécifiques sont-elles sous le contrôle de facteurs génétiques ou environnementaux ?

+ absence de relation entre Δ et les paramètres dendrométriques (croissance

Diapositive 12	Conclusions			
	- différence stable de discrimination isotopique, et d'efficience intrinsèque d'utilisation de l'eau, entre <i>Q. robur</i> et <i>Q. petraea</i> ⇒ contrôle génétique de ∧ ?			
	- forte relation entre Δ et la surface totale de vaisseaux dans le bois initial			
	 la différence inter-spécifique de surface totale de vaisseaux dans le bois initial semble expliquer la majeure partie de l'effet "espèce" sur ∆ contrôle sur ∆ ? 			
	 - sélection de stratégies différentes (maximisation des capacités de tranfert hydrique dans le xylème chez <i>Q. robur</i>, minimisation des risques d'embolie estivale chez <i>Q. petraea</i>) en accord avec les observations écologiques 			
Diapositive 13	Perspectives			
	- vérification de la généralité de la liaison Δ / surface totale de vaisseaux dans le bois initial			
	- "La différence inter-spécifique de WUE _i explique-t-elle la plus grande sensibilité de <i>Quercus robur</i> à la sécheresse et aux dépérissements ?"			
	Ponton S., Dupouey J-L., Bréda N., Feuillat F., Bodénès C. and Dreyer E. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed <i>Quercus robur / Q. petraea</i> stands. <i>Plant, Cell and Environment</i> (sous presse).			

CONDUCTANCE HYDRAULIQUE ET TRANSPORT D'EAU SENSIBLE AU MERCURE DANS LES RACINES

D'OPUNTIA ACANTHOCARPA EN FONCTION DE LA DISPONIBILITE EN EAU DANS LE SOL¹

Pierre Martre², Gretchen B. North³ & Park S. Nobel²

²Department of Organismic Biology, Ecology, and Evolution, University of California, Los Angeles, California, USA, ³Department of Biology, Occidental College, Los Angeles, California, USA

INTRODUCTION

De nombreuses espèces natives des écosystèmes désertiques sont des espèces d'intérêt agronomique qui représentent une source de revenu important pour l'agriculture dans les pays en voie de développement ; par exemple le figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*), dont les tiges sont utilisées comme fourrage, est cultivé sur un million d'hectares dans le monde, dont 400 000 ha au Brésil. L'étude écophysiologique de ces espèces a donc un intérêt agronomique et économique en tant que tel. Par ailleurs, dans l'optique d'augmenter la résistance à la sécheresse d'espèces mesophytes, il est important de comprendre par quels mécanismes les espèces xérophytes peuvent maintenir une croissance significative dans des conditions létales pour la plupart des espèces mesophytes. Enfin, dans un contexte mondial de désertification et de changements climatiques globaux, l'étude du fonctionnement des espèces natives des écosystèmes désertiques revêt une importance nouvelle.

Dans les conditions environnementales extrêmes des écosystèmes désertiques, la réponse de l'architecture et du fonctionnement racinaire à la disponibilité en eau dans le sol joue un rôle critique dans l'établissement et le développement des espèces végétales. Malgré cette importance, nos connaissances de la biologie des systèmes racinaires des plantes xérophytes sont limitées à une représentation superficielle de leur architecture et de leur dynamique de mise en place et de fonctionnement.

L'objectif de ce programme de recherche est de comprendre comment la plasticité phénotypique et les régulations du fonctionnement des racines permettent aux plantes xérophytes de répondre à des précipitations sporadiques et très faibles. Le travail de recherche présenté ici est une étude de l'activité des canaux à eau (aquaporines) dans les racines d'*Opuntia acanthocarpa* en fonction de la disponibilité en eau dans le sol. Les racines des nombreuses espèces ont une conductance hydraulique variable, leur permettant d'absorber de l'eau dans un sol humide et de limiter les pertes d'eau dans un sol sec. Ces changements de conductance hydraulique racinaire (L_P) ont été mis en regard de changements anatomiques, principalement des parois de l'exoderme et de l'endoderme, conduisant à des modifications de la conductance hydraulique de la voie apoplastique. Mais, des modifications de la conductance de la voie transcellulaire pourraient également jouer un rôle important. Les aquaporines sont des candidats potentiels pour une telle régulation, mais leur activité de transport en fonction de la disponibilité en eau du sol n'a jusqu'à présent pas été étudiée. La régulation de l'expression des aquaporines a essentiellement été étudiée à l'échelle moléculaire, et leur activité essentiellement par expression dans des systèmes hétérologues, ou sur des vésicules membranaires. Mais quel est leur effet sur L_P ? Participent-elles à la régulation de L_P en fonction de la disponibilité en eau dans le sol ? Sont-elles réparties de manière homogène dans les différents tissus racinaires.

MATERIEL ET METHODES

Des plantes d'*Opuntia acanthocarpa* ont été collectées dans le site d'études écologiques d'Agave Hill, situé dans le désert du Sonoran ($33^{\circ} 38'$ N, $116^{\circ} 24'$ W, altitude 820 m). Les plantes ont été transférées en pots et cultivées en serre pendant un mois avant le début des expériences. Le potentiel hydrique du sol a été maintenu à une valeur > -0.2 MPa par un apport bihebdomadaire de solution nutritive. Trente jours après le transfert des plantes en serre l'irrigation a été arrêtée pendant 45 j. Après 45 j de dessèchement, le sol a été réhydraté à la capacité au champs et maintenu à un potentiel hydrique > -0.1 MPa pendant 8 j.

¹ Martre P., North G.B. & Nobel P.S. (2001) Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. *Plant Physiology*, **126**, 352-362.

 L_P a été mesurée sur des racines principales initiées en serre après le transfert des plantes, et mesurant environ 300 mm de long. Deux régions racinaires ont été étudiées, une région proximale mature prélevée à 120-200 mm de l'apex et une région distale immature prélevée à 0-80 mm de l'apex. La mesure de L_P consiste à fixer un segment excisé de racine, d'une longueur de 80 mm, à un capillaire de verre remplis à moitié d'eau. Le flux d'eau à travers la racine est contrôlé par une dépression appliquée à l'autre extrémité du capillaire. Le flux d'eau est calculé à partir de la vitesse de déplacement du ménisque air-eau dans le capillaire. Le flux est ainsi mesuré à différentes pressions. L_P est définie comme la pente de la droite entre la densité de flux d'eau traversant le segment racinaire et la différence de pression entre la surface de la racine et le ménisque air-eau. L_P est normalisée par la surface externe du segment mesuré.

A la fin de la mesure de L_P , l'extrémité distale du segment est coupé sous l'eau et le flux d'eau axial est mesuré à une seule pression. La conductivité axiale du xylème (K_h) est définie comme la densité de flux d'eau divisée par la différence de pression, puis multipliée par la longueur du segment.

La conductivité hydraulique radiale (L_R) est calculée à partir des mesures de L_P et de K_h en utilisant le modèle hydraulique de Landsberg et Flowkes [, 1978 #719], basé sur la théorie des *leaky pipes* :

$$L_{\rm R} = \frac{L_{\rm P} \alpha l}{\tanh(\alpha l)} \tag{1}$$

Où, l (m) est la longueur du segment racinaire, α (m⁻¹) représente la longueur efficace du segment et est égales à $(2\pi r_{root} L_R / K_h)^{1/2}$, et r_{root} (m) est le rayon du segment. La valeur de L_R est initialement fixée comme étant égale à L_P , puis est diminuée pour résoudre l'équation 1 par itération.

 $L_{\rm R}$ de la stèle ($L_{\rm R, S}$) et des tissus externes à la stèle (i.e., : exoderme/cortex/périderme) ($L_{\rm R, E/C/P}$) a été calculée. Après avoir mesuré $L_{\rm P}$ d'un segment de racine, les tissus externes à la stèle sont retirés sous un microscope à l'aide de fines pinces, puis $L_{\rm P}$ de la stèle est mesurée comme décrit précédemment. Les conductances radiales des différents tissus sont en série et sont basées dans tous les cas sur la surface externe du segment racinaire intact. Donc, l'inverse de $L_{\rm R}$ est égal à la somme des inverses de $L_{\rm R, S}$ et $L_{\rm R, E/C/P}$, donc :

$$L_{\rm R, E/C/P} = \frac{1}{\frac{1}{L_R} - \frac{1}{L_{R,S}}}$$
(2)

Parce que L_{R} , $L_{R, S}$ et $L_{R, E/C/P}$ sont basées sur la surface externe du segment racinaire intact, on peut directement comparer des segments de différentes longueur et diamètre.

L'utilisation d'un inhibiteur, tel que le chlorure de mercure, permet d'étudier l'implication des aquaporines dans le transport d'eau à l'échelle tissulaire. L'activité de transport d'eau des aquaporines a été mise en évidence en mesurant L_P successivement dans de l'eau distillée, puis dans une solution d'HgCl₂ (50 µM) et enfin dans une solution de 2-mercaptoethanol (10 mM). L'HgCl₂ est un inhibiteur non spécifique des aquaporines, qui interagi avec des résidus SH des cystéines constituant le port des aquaporines. L'absence d'effet non spécifique sur le métabolisme est contrôlée par la réversibilité de l'inhibition par une solution de 2-mercaptoethanol.

PRINCIPAUX RESULTATS

La densité de flux d'eau à travers les segments distaux de racines d'*Opuntia acanthocarpa* immergés dans de l'eau ou dans une solution d'HgCl₂ (50 μ M) ou de 2-mercapthoethanol (10 mM) est proportionnelle à la différence de pression hydrostatique appliquée (Fig. 1). La pente de cette relation est égale L_P . Des résultats similaires ont été obtenus pour la région racinaire proximale. Dans les conditions hydriques édaphiques non limitantes, L_P de la région proximale est 32% plus élevée que celle de la région distale (Fig. 2). Dans ces conditions, la région proximale mature des racines constitue la zone principale d'absorption racinaire. L_P de la région distale est réduite de 32% après immersion dans une solution de mercure (Fig. 1 et 2). Cet effet est entièrement réversible après immersion dans une solution de 2-mercaptoethanol. Dans la région proximale, le mercure n'a aucun effet sur L_P . Par contre, la conductivité radiale de la stèle des deux régions racinaires est réduite de 41% après immersion dans le mercure (Fig. 3). Ceci confirme les résultats obtenus, par localisation *in situ* d'ARNm d'aquaporines tonoplastiques chez plusieurs espèces. L'absence d'effet de l'HgCl₂ dans la région proximale est probablement liée à la subérisation du périderme qui empêche la pénétration du mercure jusqu'aux cellules de la stèle, comme cela a précédemment été montré dans les racines d'anion. Dans la région proximale, 70% de la résistance radiale est localisée dans la stèle, la régulation de $L_{R, S}$ est donc sûrement efficiente pour contrôler les flux d'eau à travers la racine. Dans la partie distale, où le cortex est encore en place, la résistance radiale est uniformément répartie entre les tissus externes à la stèle et la stèle.

Après 45 jours sans irrigation, L_P de la région distale et proximale diminuent de 73% et 60%, respectivement. Dans ces conditions l'HgCl₂ n'a pas d'effet sur L_P de la région distale et proximale, ni sur $L_{R, S}$. D'après ces résultats, la fermeture des aquaporines pourrait intervenir pour plus de 50% dans la diminution de L_P dans un sol sec.

Huit jours après réhydratation du sol, L_P de la région distale et proximale n'atteint que 60% de sa valeur initiale. L'augmentation de $L_{R,S}$ de la stèle de la région distale suite à la réhydratation est due à 95% à un transport d'eau sensible au mercure. D'après ces résultats, l'ouverture des aquaporines pourrait expliquer 83% de l'augmentation de L_P de la région distale suite à la réhydratation du sol. Dans la région proximale, l'absence de recouvrement de $L_{R,S}$ est associée à une absence d'effet du mercure, ceci confirme que la régulation de $L_{R,S}$ est liée à la régulation de l'activité des d'aquaporines.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, que les aquaporines participent de manière significative à la régulation de L_P en fonction de la disponibilité en eau dans le sol. Par ailleurs, cette étude confirme et complète, par des aspects fonctionnels à l'échelle tissulaire, les études moléculaires ayant montré que les aquaporines sont limitées aux parenchymes xylèmien et phloémien de la stèle chez de nombreuses espèces. Contrairement à l'hypothèse formulée par plusieurs auteurs, dans des conditions de contraintes hydriques les aquaporines ne facilitent pas l'absorption d'eau dans un sol sec, puisqu'elles sont régulées négativement. Elles pourraient au contraire participer à la diminution de L_P et ainsi limiter les mouvements d'eau des racines vers le sol dans un sol sec. Cette hypothèse reste cependant à vérifier pour des contraintes hydriques moins fortes. Il serait en particulier intéressant de vérifier s'il existe une corrélation dans le temps entre la régulation de l'ouverture stomatique et de l'activité des aquaporines racinaires. En effet, il a été montré que l'ABA a un effet antagoniste sur l'ouverture stomatique et l'activité des aquaporines racinaires. On peut donc faire l'hypothèse que la synthèse d'ABA dans les racines lors de contraintes hydriques édaphiques induise dans une certaine mesure la fermeture stomatique et parallèlement augmente la conductivité hydraulique racinaire.

L'utilisation du mercure comme inhibiteur de l'activité de transport des aquaporines n'est toutefois pas sans poser des questions (toxicité métabolique, dépolarisation des membranes,...). Nous avons donc commencé une étude pour comparer l'effet du mercure sur L_P à l'expression des aquaporines, par westernblot, et à leur localisation, par hybridation *in situ* des ARNm d'aquaporines du tonoplaste et de la membrane plasmique. Cette étude, réalisée sur *Agave deserti*, vise à intégrer les avancées récentes en biologie moléculaire sur les régulations de l'expression et de l'activité des aquaporines à une analyse écophysiologique de leurs rôles dans la régulation de l'absorption racinaire en relation avec la disponibilité en eau dans le sol.



Figure 1. Densité de flux d'eau (J_V) en fonction de la différence de pression appliquée pour des segments excisées de racine d'*Opuntia acanthocarpa*. Les segments racinaires ont été prélevés entre 0 et 80 mm de l'apex dans une sol humide. J_V a été mesuré successivement dans l'eau, une solution d'HgCl₂ (50µM) et une solution de 2-mercapthoethanol (10 mM). Les moyennes ± 1SE sont présentées pour n = 5 à 7 racines, chacune provenant d'une plante différente.



Figure 2. Conductivité hydraulique (L_P) de racines d'*Opuntia* acanthocarpa, mesurée dans la région distale (a, 0 à 80 mm de l'apex) et la région proximale (b, 120 à 200 mm de l'apex). Les racines étaient âgées de 30 jours et mesuraient environ 300 mm de long. Le sol a été maintenu à un potentiel hydrique (Ψ_{sol}) supérieur à -0.25 MPa par un apport de solution nutritive deux fois par semaine jusqu'aux jours -45. A partir du jour -45 l'arrosage a été arrêté, au jours 0 Ψ_{sol} était inférieur -10 MPa. A la fin du jour 0, les pots ont été arrosés jusqu'à la capacité au champs et Ψ_{sol} a été maintenu au-dessus de -0.1 MPa jusqu'au jour 8. Une première mesure de L_P a été effectuée en immergeant les segments racinaires dans un récipient d'eau distillée. Les segments ont ensuite été transférés dans une solution d'HgCl₂ (50 μ M). Les moyennes ± 1SE sont présentées pour n = 5 à 7 racines, chacune provenant d'une plante différente. Les étoiles indiquent une différence significative entre les mesures dans l'eau distillée et l'HgCl₂ (*t*-test, $\alpha = 0.05$).

Figure 3. Conductivité hydraulique radiale (L_R) de racines d'*Opuntia* acanthocarpa, mesurée dans la région distale (a, 0 à 80 mm de l'apex) et la région proximale (b, 120 à 200 mm de l'apex). $L_{\rm R}$ a été mesuré aux jours -45 (Irrigué), 0 (Sec) et 8 (Réhydraté) (cf. Fig. 3.1). Les valeurs de potentiels hydriques du sol étaient identiques à celles de la figure 3.1. Les racines étaient âgées de 30 jours et mesuraient environ 300 mm de long. Après avoir mesuré $L_{\rm P}$ d'un segment intact, les tissus externes à la stèle (E/C/P, épiderme/cortex/périderme) ont été disséqués et L_P de la stèle a été mesurée dans l'eau distillée, puis successivement dans des solutions d'HgCl₂ (50 µM), et de 2-mercaptoethanol (10 mM) pour la région distale. L_R a été calculée à partir des valeurs mesurées de LP et K. Les moyennes \pm 1SE sont présentées pour n = 6 à 9 racines, chacune provenant d'une plante différente.

Embolie Hivernale et Mécanismes de Réparation chez le Noyer et le Pêcher

Thierry Améglio, Christian Bodet, André Lacointe, Hervé Cochard

U.M.R. PIAF (INRA, Université Blaise-Pascal), centre INRA de Clermont-Fd - Theix, site de crouelle, 234, av. du Brezet, 63039 Clermont-Fd cedex 02 (France).

Abstract : The xylem vessels of Prunus persica Batsch and Juglans regia L. are vulnerable to frost-induced embolism. In peach, the degree of xylem embolism increased progressively over the winter, with a maximum of 85 % of loss of hydraulic conductivity (PLC) in early March. Walnut appeared very sensitive to winter embolism. PLC reached near 100 %, but for this species the degree of xylem embolism varies during winter and this can be related to the ability of walnut to generate xylem pressure in winter and spring in contrast to peach where xylem pressure was never observed. Controlled freeze-thaw experiments showed that frost per se is not sufficient to increase the embolism rate; evaporative conditions during thawing are required but, when both species were preserved from frost conditions, zero PLC was exhibited. At bud break time, embolism recovery was total in walnut, whereas in peach PLC was still high. Three mechanisms responsible for the restoration of branch hydraulic conductivity in walnut (stem and root pressure, new functional ring) against a single one in peach (new functional ring) and, the climatic conditions for these mechanisms were identified. Because xylem recovery is essential to support transpiration and growth of new leaves, bud break pattern and subsequent growth (both primary and secondary) in spring was observed in natural and cold deprived conditions (heated greenhouse above 15°C). Winter biology of trees and especially water relations during this period when no leaves are present appeared in the light of this study an important point to fully understand early growth after bud break.





Matériels et Méthodes

- Evolution durant 4 hivers pour le Noyer : 1994-95 à 1997-1998 (2 pour le Pêcher)
 - Température air et sol (-10°C)
 - Embolie rameau 1 an
 - Dates de débourrement et élongation des nouvelles pousses
 - Osmolarité de la sève du rameau 1 an
 - Volume de sève extrait du rameau 1 an
 - Pression du xylème
 - Croissance cambiale (Tronc, Rameau)
 - Humidité pondérale des rameaux 1 an

Quelques stratégies vis à vis de l'embolie hivernale

- Arbres à pores diffus : moins sensibles au gel, moins sensibles à l'embolie hivernale
- « Pleurs à la taille » : hêtre, bouleau, ...=> réparation possible => Fonctionnement cambiale avant débourrement non obligatoire.



◆ Étude de 2 espèces à pores diffus le Noyer (2 ≠ pressions du xylème : cf. hier) et le Pêcher (sans pression racinaire).

©TA-PIAF



1er gel => embolie

Réparation durant l'hiver chez le Noyer (Pression : osmolarité forte)

and the second

Réparation au printemps chez le Noyer (Pression : osmolarité faible, water ontent augmente)

Croissance cambiale postérieure au débourrement.

Elongation et croissance cambiale en même temps

Embolie hivernale Noyer

- ♦ En conditions de privations de froid :
 - pas d'embolie.
 - Water content fort.
 - Osmolarité faible.
 - Croissance cambiale nulle.
 - Débourrement erratique.



Embolie hivernale Pêcher

- Arbres privés de gel $\Rightarrow 0$ embolie
- Cycle gel-dégel => embolie 7 (en particulier lorsque 7 les conditions d'évaporation
- Diminution de l'embolie avec la croissance cambiale
- (annexe : Gel = contraction du diamètre => résistance au gel (Test GELISTA™)



Conclusions et Discussions

- Gel => embolie chez le Pêcher et Noyer
- Réparation de l'embolie chez le Noyer durant l'hiver et au printemps => protection contre la thyllose ?
- Augmentation de l'embolie chez le Pêcher à chaque épisode gel => mais nécessité de conditions évaporantes ?
- Débourrement = 0 % embolie chez le Noyer (root pressure & stem pressure) suivi d'une croissance radiale et élongation rapide => Résistance hydraulique faible au débourrement ?
- Débourrement = 80 % embolie chez le Pêcher suivi d'une croissance radiale puis d 'une élongation différée dans le temps => Résistance hydraulique forte ?
- Conditions thermiques hivernales => croissances printanières ?
- Croissance cambiale de la base vers l'apex chez le noyer; de l'apex vers la base chez le pêcher => Implication de la pression racinaire ? Localisation de l'appel d 'eau ?

Unraveling the Effects of Plant Hydraulics on Stomatal Closure during Water Stress in Walnut

Hervé Cochard*, Lluis Coll¹, Xavier Le Roux², and Thierry Améglio

Unité Mixte de Recherche 547 Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier, Institut National de la Recherche Agronomique-Université Blaise Pascal, Site de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand cedex 02, France

The objectives of the study were to identify the relevant hydraulic parameters associated with stomatal regulation during water stress and to test the hypothesis of a stomatal control of xylem embolism in walnut (*Juglans regia* × *nigra*) trees. The hydraulic characteristics of the sap pathway were experimentally altered with different methods to alter plant transpiration (E_{plant}) and stomatal conductance (g_s). Potted trees were exposed to a soil water depletion to alter soil water potential (Ψ_{soil}), soil resistance (R_{soil}), and root hydraulic resistances (R_{root}). Soil temperature was changed to alter R_{root} alone. Embolism was created in the trunk to increase shoot resistance (R_{shoot}). Stomata closed in response to these stresses with the effect of maintaining the water pressure in the leaf rachis xylem (P_{rachis}) above -1.4 MPa and the leaf water potential (Ψ_{leaf}) above -1.6 MPa. The same dependence of E_{plant} and g_s on P_{rachis} or Ψ_{leaf} was always observed. This suggested that stomata were not responding to changes in Ψ_{soil} , R_{root} or R_{shoot} per se but rather to their impact on P_{rachis} and/or Ψ_{leaf} values corresponded to leaf turgor loss point. This suggested that stomata are responding to leaf water status as determined by transpiration rate and plant hydraulics and that P_{rachis} might be the physiological parameter regulated by stomatal closure during water stress, which would have the effect of preventing extensive developments of cavitation during water stress.

Drought is one of the most limiting environmental stresses for plant production (Kramer and Boyer, 1995). Plants respond to drought by closing their stomata, which reduces leaf transpiration and prevents the development of excessive water deficits in their tissues. The drawback of the stomatal closure for plants is that their carbon gain is lowered and their growth is impaired. Therefore, information about plant responses to drought and their underlying mechanisms will have relevance for plant adaptation to new climatic conditions and breeding programs (Schulze et al., 1987).

Many physiological variables are known to be implicated in the stomatal regulation; some of these variables are involved in the mechanics of stomatal movements, others in the signals triggering these movements (Zeiger et al., 1987). A new set of variables has been proposed in the recent literature, all of which are related to the hydraulics of plants. Indeed, it has been suggested that stomata may respond to drought-induced changes in the hydraulic characteristics of the sap pathway, such as whole-plant hydraulic resistance (R_{plant} ; Meinzer and Grantz, 1990; Cochard et al., 1996a; Lu et al., 1996), soil resistance (R_{soil}), root resistance (R_{root} ; Meinzer and Grantz, 1990; Cochard et al., 2000b), or shoot resistance (R_{shoot} ; Salleo et al., 1992; Sperry et al., 1993). However, during water stress, changes in the above parameters are not independent and, further, correlated to variations in soil water potential (Ψ_{soil}), whose impact on stomatal function has long been recognized (e.g. Hinckley and Bruckerhoff, 1975).

It has also been suggested that stomatal closure during water stress might be associated with the maintenance of xylem integrity (Tyree and Sperry, 1988; Jones and Sutherland, 1991). Sap is transported under negative pressures in plants, and, therefore, is susceptible to cavitation events (Pickard, 1981) that render xylem conduits non-conductive. Cavitation occurs when the negative sap pressure exceeds a threshold value defined by anatomical characteristics (Sperry and Tyree, 1988). Many species have been found to operate very close to the point of embolism. Therefore, stomata control both plant water losses and sap pressure and, thus, may actively control the risk of xylem embolism (Jones and Sutherland, 1991).

The first objective of our study was to experimentally uncouple R_{soil} , R_{root} , R_{shoot} , and Ψ_{soil} to identify the specific hydraulic parameters associated with stomatal regulation during water stress. The experi-

¹ Present address: Centre d'Etude du Machinisme Agricole du Génie Rural des Eaux et Forêts, Unité de Recherche Dynamiques et Fonctions des Espaces Ruraux, 24, Av. des Landais Boite Postale 50085, 63172 Aubiere cedex, France.

² Present address: Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Unité Mixte de Recherche 5557 (Centre National de la Recherche Scientifique-Université Lyon 1), 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France.

^{*} Corresponding author; e-mail cochard@clermont.inra.fr; fax 33-4-73-62-44-54.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010400.



Figure 1. VCs for walnut leaf midribs and rachis, and current year shoots and roots. Close symbols refer to measures on air-pressurized segments. White symbols refer to leaf midribs and rachis collected on trees during the different experiments. Error bars are \pm sE. Lines are logistic fits through the data. For shoots, the lines are logistic fits through the data published by Tyree et al. (1993) for current year (plain line) and previous year (dashed line) segments.

ments were conducted on potted walnut (*Juglans regia* × *nigra*) trees in a growth cabinet to minimize the effects of temperature, light intensity, air vapor deficit, and air CO₂ concentration on stomatal behavior. The second objective of our study was to test the hypothesis that stomata control embolism during water stress in walnut.

RESULTS

Vulnerability to Cavitation

Vulnerability curves (VCs) were constructed by plotting the changes in the percentage loss of xylem conductance (PLC) versus xylem pressure. The VCs for the different walnut organs are shown in Figure 1 and the parameters of the logistic fitting (Eq. 4) are given in Table I. Significant differences were found between organs. Leaf rachises were significantly the most vulnerable, roots the least vulnerable, and leaf veins and shoots intermediate. The few measurements obtained on shoot segments were in agreement with our previous study.

Pressure-Volume Analysis

Turgor pressure $(P_{\text{leaf} 0})$ at full turgor averaged 0.93 ± 0.06 MPa ($n = 5, \pm \text{se}$) and turgor loss point averaged -1.53 ± 0.04 MPa. The relative change in $P_{\text{leaf}}(P_{\text{leaf} 0})$ with decreasing leaf water potential (Ψ_{leaf}) is shown on Figure 7.

Soil Dehydration

When plants were exposed to different light levels while soil watering was stopped (procedure 1), only a moderate water stress was induced. Figure 2 shows the concurrent changes in E_{plant} and P_{rachis} for one tree. The other trees behaved the same. After 4 d, $P_{\rm rachis}$ measured on the plants placed in the dark (predawn P_{rachis}) was reduced only by 0.1 MPa (see y intercepts on Fig. 2). However, E_{plant} , stomatal conductance (g_s) , and the P_{rachis} at maximum light intensity were considerably reduced at the end of the treatment. This was consistent with a sharp increase in R_{plant} . This increase could not be attributed to xylem cavitation because the xylem pressure never drops below the threshold for cavitation for all organs measured. The change in R_{plant} was more probably due to increase in R_{soil} and/or R_{root} .

When plants were continuously exposed to a constant and high light intensity for 1 week (procedure 2), higher levels of water stress were obtained. Figure 3 shows the results for one tree, the other trees behaving the same. E_{plant} and g_{s} dropped close to zero whereas P_{rachis} leveled at approximately -1.4Mpa. At this point, the degree of xylem embolism in the leaf rachis was still less than 10 PLC (not shown).

Root Chilling

Decreasing soil temperature from ambient to near zero temperature provoked a significant reduction in g_{sr} , $E_{\text{plant}r}$ and P_{rachis} (Fig. 4). These changes were reversed when soil temperature was returned to ambient.

Stem Pressurization

Application of a positive pneumatic pressure around the trunk of a plant induced a sharp decrease of E_{plant} , $g_{s'}$ and P_{rachis} only for pressures greater than 2.5 MPa (Fig. 5). At this pressure, about 70 PLC was

Table I. Xylem vulnerability to embolism

Parameters of the logistic function (see equation in the text) fitted to the experimental PLC versus Ψ_{rachis} curves. Values are given ± st. Data having a letter in common are not significantly different at P = 0.01.

	Leaf		Shoot		Poot
	Midrib	Rachis	Year n	Year n-1	KOOL
P _{rachis50}	$-2.12 \pm 0.06a$	$-1.72 \pm 0.05b$	$-2.10 \pm 0.04a$	$-2.36 \pm 0.02c$	$-3.53 \pm 0.39d$
5	$-9.77 \pm 2.00ac$	-5.72 ± 0.88 abd	$-9.82 \pm 1.97 bc$	$-12.8 \pm 1.95c$	$-3.50 \pm 1.31d$


Figure 2. Typical changes of plant transpiration and xylem water pressure during the first stage of a soil water stress for one of the studied tree. The four different symbols correspond to 4 consecutive d. Four different light intensities were used on each day to vary E_{plant} . Lines are linear regressions through the data for each day. The slope of the lines represents the R_{plant} .

induced in the stem (see the VC for stems plotted on top of Fig. 5). For air pressure applications higher than 3 MPa, more than 95 PLC was induced in the stem, leaf wilting was noticed, and nearly 100 PLC was measured in the leaf rachis.

DISCUSSION

The first objective of our study was to combine different experimental approaches to unravel the effect of plant hydraulics on stomatal closure. The second objective was to analyze the effect of stomatal closure on plant hydraulics and to test the hypothesis of a stomatal control of embolism.

Unraveling the Effects of Ψ_{soil} , R_{soil} , R_{root} , and R_{shoot} in the Response of g_s to Water Stress

In this study, we focused our analysis on some of the endogenous physiological parameters likely to be altered during a water stress and that have been reported in the literature to be associated with stomatal responses. These parameters are the Ψ_{soil} , the R_{soil} , the R_{root} , and the R_{shoot} ; all of these parameters are strongly correlated under natural drought condi-



Figure 3. Typical time course of plant transpiration and xylem water pressure for a non irrigated tree exposed to a constant light intensity.



Figure 4. Typical time course of xylem water pressure and soil temperature (top panel), and plant transpiration and g_s (bottom panel) during a soil chilling experiment. Error bars are \pm sE (n = 5).

tions. The experiments were designed to alter R_{plant} in very different ways, which probably had a primary influence on different parts of the pathway.

The effects of the different experiments conducted on the same plant material can be analyzed according to their main impact on Ψ_{soil} , R_{soil} , R_{root} , and R_{shoot} . Soil dehydration provoked mainly a drop in Ψ_{soil} and an increase of R_{soil} . The resistance of the interface



Figure 5. Changes in g_s (top panel) and xylem water pressure (bottom panel) of trees exposed to increasing pneumatic pressures around their trunk (*x* axis). The curve represents the change in embolism in the trunk versus the applied pressure.



Figure 6. Dependence of g_s (top panels) and transpiration (E_{plant}) on xylem water pressure (left panels) and Ψ_{leaf} . The different symbols represent the different experiments conducted in this study. Transpiration was normalized by the transpiration of each tree before treatment (E_{plant}/E_{max}).

between the soil and the root probably also increased (Nobel and Cui, 1992). R_{root} was modified to the extent that the radial flow into the root xylem was altered. $R_{\rm shoot}$ was probably not altered, because the level of xylem embolism remained low during these experiments. However, if the ionic composition of the sap changed dramatically as a result of the drought, then R_{shoot} may have varied (Zwieniecki et al., 2001). Root chilling altered mainly R_{root} and R_{soil} . The soil being watered to maximum capacity in this experiment, R_{soil} was very low compared with R_{root} , and its variations were not quantitatively significant. Ψ_{soil} remained constant because the temperature dependence of Ψ_{soil} is very low (Muromtsev, 1981). Stem pressurization provoked only an increase in $R_{\rm shoot}$ when the pressure exceeded the point of embolism induction (about 2.0 MPa; Tyree et al., 1993; Fig. 5). If the air was propagated along the xylem flow path significantly beyond the injection point, $R_{\rm root}$ and $R_{\rm leaf}$ may also have being altered. Therefore, combining the results of all these experiments, it is possible to determine whether g_s and E_{plant} were specifically responding to main changes in Ψ_{soil} , R_{soil} , \bar{R}_{root} , and/or \bar{R}_{shoot} or not. Because air humidity, air temperature, and light intensity were maintained constant in our experiments, leaf to air vapor deficits and leaf boundary layer conductances were also constant. Therefore, the g_s and E_{plant} patterns corresponded in our study. The relationship between g_s and hydraulic parameters are likely to depend on these environmental conditions, contrary to the relationships with E_{plant} (Monteith, 1995).

Our results showed that the different experiments all significantly reduced E_{plant} and g_{s} . Therefore, the response of g_{s} to Ψ_{soil} , R_{root} , R_{soil} , and R_{shoot} was neither specific nor exclusive. An alternative analysis of the problem is not to consider Ψ_{soil} , R_{root} , R_{soil} , and R_{shoot} individually but rather to examine their combined effect on P_{rachis} or Ψ_{leaf} . The relationship between P_{rachis} , Ψ_{soil} , R_{root} , R_{soil} , E_{plant} , and g_{s} under steady-state conditions is well described by the Ohm's law analogy (Tyree and Ewers, 1991):

$$P_{\text{rachis}} = \Psi_{\text{soil}} - (R_{\text{soil}} + R_{\text{root}} + R_{\text{shoot}}) \cdot \text{SF}_{\text{plant}} \cdot g_{\text{s}} \cdot D \quad (1)$$

where SF_{plant} is the plant leaf area and D the air vapor pressure deficit, two parameters that remained constant during our experiments. The gravity term and the xylem sap osmotic potential are assumed negligible in equation 1. A similar relationship is obtained with Ψ_{leaf} if we further include the leaf blade hydraulic resistance. The dependency of g_s or E_{plant} on P_{rachis} and Ψ_{leaf} is shown on Figure 6 for all of the experiments. The responses were similar whatever the experiments. This would suggest that in these experiments, g_s was not correlated to changes in Ψ_{soil} , R_{soil} , R_{root} , or R_{shoot} per se but rather to P_{rachis} and/or Ψ_{leaf} . Another illustration on the combining effects of $R_{\text{soil}} R_{\text{root}}$, and R_{shoot} on E_{plant} is shown on Figure 8. An identical relationship was obtained between E_{plant} and C_{plant} (defined as $[R_{\text{soil}} + R_{\text{root}} + R_{\text{shoot}}]^{-1}$). Data for plants exposed to a high soil water depletion (procedure 2) are not included on Figure 8. These results are in agreement with the finding of Saliendra et al. (1995), Sperry (2000), and Hubbard et al. (2001). Our data do not enable us to test whether g_s was more specifically responding to changes in Ψ_{leaf} or P_{rachis} because both values were highly correlated and differed only by a few 0.1 MPa. Experiments where P_{rachis} and Ψ_{leaf} are uncoupled are awaited.

Evidence for a Stomatal Control of Xylem Embolism in Walnut

From the above discussion, it could be concluded that the effect of the stomatal closure in our study was to maintain P_{rachis} above a threshold value around -1.4 MPa and Ψ_{leaf} above approximately -1.6 MPa. To further understand this behavior, we have to identify a major physiological trait that would threaten plant integrity at lower P_{rachis} and/or Ψ_{leaf} values. The answer to this question is obviously very complex, because many traits are probably involved and correlations between them probably exist. We will argue that, in our study, xylem cavitation was a trait correlated with the stomatal closure.

A physiological trait associated with a stomatal closure during water stress should meet at least the following three main conditions. First, its impairment should represent a serious threat to plant functioning. This results from the consideration that the cost associated with stomatal closure is high (reduced carbon gain, reduced growth, reduced reproductive success, etc.) so the gain associated with the regulation should overcome the loss. Cavitation is a serious threat for plants because it impairs the xylem conductive capacity and may eventually lead to leaf desiccation and branch mortality (Rood et al., 2000). Indeed, leaf desiccation was not observed in our study as long as the xylem integrity was maintained. Leaf desiccation was noticed only when high levels of embolism were measured in the leaf petioles. The gain associated with stomatal closure was thus the maintenance of leaf vitality, which largely overcomes the drawbacks cited above.

The second condition is that the impairment of the trait should be water deficit dependent because the effect of stomatal closure is precisely to prevent excessive leaf dehydration. The mechanism of water stress-induced cavitation has been well documented (Sperry and Tyree, 1988; Cochard et al., 1992; Jarbeau et al., 1995). Air is sucked into the xylem lumens through pores in the pit wall when pressures in the sap exceed the maximum capillary pressures that can sustain the pores. Therefore, the likelihood of cavitation occurrence is directly determined by the degree of water deficit in the xylem, more precisely by P_{rachis} . The maintenance of leaf turgor above cell plasmolysis is another physiological trait that might also satisfy these first two conditions.

The third condition is that the impairment of the trait should have the same water deficit dependence as stomata. Stomata were completely closed in walnut trees when P_{rachis} reached about approximately -1.4 MPa and Ψ_{leaf} about approximately -1.6 MPa. The impairment of the trait associated with stomatal closure should therefore occur at comparable P_{rachis} or Ψ_{leaf} values. On Figure 7 (top panel) is represented the dependencies of E_{plant} and rachis embolism on $P_{\rm rachis}$. The leaf rachis was the most vulnerable organ along the sap pathway in the xylem and was also exposed to the lowest xylem pressure values. Leaf rachis is therefore the Achilles' heel of the walnut tree sap pathway. Segmentation in xylem vulnerability to cavitation has been demonstrated for several other species (Cochard, 1992; Sperry and Saliendra, 1994). A lot of variation exists between species, and occasionally the roots appear to be the most cavitation sensitive organs in the plant (Sperry and Ikeda, 1997). From Figure 7, it is clear that the dependencies of leaf rachis xylem embolism and transpiration on water deficit were very similar. Stomata were completely closed at the incipience of xylem embolism in the leaf rachis. Figure 7 (bottom panel) shows the concurrent variations of E_{plant} and leaf turgor pressure (P_{leaf}) with bulk Ψ_{leaf} . It is also clear from this graph that stomata were completely closed at the incipience of leaf cell plasmolysis (turgor loss point). The maintenance of xylem integrity and leaf turgor



Figure 7. Dependence of plant transpiration and xylem rachis embolism on rachis xylem pressure (top panel) and dependence of plant transpiration and leaf turgor pressure on Ψ_{leaf} (bottom panel). Error bars are \pm sE. The VC was replotted from Figure 1, and data for transpiration rate were averaged from Figure 7.

were closely associated with stomatal closure during water stress in walnut.

The data from Figure 7 suggest that stomatal closure was rather preemptive in avoiding cavitation. This behavior might be explained by the potential for "catastrophic xylem failure" (Tyree and Sperry, 1988). There is a feedback between xylem conductance and xylem pressure during cavitation. Cavitation decreases xylem conductance, which in turn decreases xylem pressure and thus provokes more cavitation. Tyree and Sperry (1988) and Jones and Sutherland (1991) have computed that catastrophic xylem failure occurs at the expense of some xylem conductance and at a critical transpiration rate (E_{crit}) only slightly greater than the actual maximum E. The hypothesis of a stomatal control of catastrophic xylem failure was evaluated with an hydraulic model of a walnut tree explicitly taking into account the feedback between xylem pressure and xylem conductance. Our simulations confirmed the results of Sperry et al. (1998) and Comstock and Sperry (2000). Transpiration was maximized (E_{crit}) at the expense of all conductance in the distal leaf rachis segment. $E_{\rm crit}$ was therefore much higher than the actual E_{plant} (Fig. 8, plain line). Using the same model, we have computed E_{plant} provoking 1% (E_{1PLC}) and 10% (E_{10PLC}) loss of rachis conductance (Fig. 8, dotted and dashed



Figure 8. Plant transpiration versus whole plant hydraulic conductance. Different symbols represent different experiments. The plain, dashed, and dotted lines represent the critical transpiration rate provoking 100%, 10%, and 1% loss conductance in the leaf rachis, respectively.

lines, respectively). The onset of tree water loss regulation occurred when E_{plant} reached $E_{1\text{PLC}}$ and E_{plant} tracked $E_{10\text{PLC}}$ when plant conductance was further reduced. This model suggests that the risk of catastrophic xylem failure was not associated with the stomatal regulation in walnut. g_s was not maximized at the expense of all xylem conductance. Rather, xylem conductance was maximized at the expense of all g_s . To experimentally validate these computations, we have tried, without success, to feed stressed plants with fusiccocine, a drug supposed to promote stomatal opening. The use of mutants lacking efficient stomatal regulation is probably a better way to test such hypotheses (Cochard et al., 1996b).

Mechanisms Triggering Stomatal Closure

The mechanisms by which stomata could sense changes in P_{rachis} to adjust g_{s} and avoid cavitation remain hypothetical. It seems improbable that P_{rachis} itself was the triggering parameter, so we must identify a parameter correlated to $P_{\rm rachis}$ during water stress. Our stem pressurization experiments dismiss the implication of parameters associated with soil or root water stress (such as $\Psi_{
m soil}$ or abscisic acid production by roots [Tardieu et al., 1992]). Because the onset of cavitation events in leaf blades was correlated with the onset of stomatal closure in laurel, it has been suggested that stomata were responding to hydraulic signals generated by cavitation (Salleo et al., 2000; Nardini et al., 2001). However, in our study, stomatal closure occurred before the onset of cavitation in leaf blades and midribs (Fig. 6) and only after 70% loss of conductance in the trunk (Fig. 5). The possibility that stomata were responding to Ψ_{leaf} cannot be rejected because of the high correlation between P_{rachis} and Ψ_{leaf} in our study. Ψ_{leaf} could have a direct impact on guard cells turgor (Meidner and Edwards, 1996) or an indirect impact on their sensitivity to abscisic acid (Tardieu and Davis, 1993). A

stomatal response to changes in leaf water status has long been suggested (Cowan, 1977) and has recently been supported by root pressure chamber experiments on woody plants (Fuchs and Livingston, 1996; Comstock and Mencuccini, 1998). These experiments demonstrate that stomatal closure caused by soil drought or decreased air humidity can be partially or wholly reversed by root pressurization.

CONCLUSIONS

In conclusion, combining different experimental procedures, we have established that stomata were not responding to changes in Ψ_{soil} , R_{soil} , R_{root} , or $R_{\rm shoot}$ per se but rather to their impact on $P_{\rm rachis}$ or Ψ_{leaf} . Cavitation avoidance was a likely physiological function associated with stomatal regulation during water stress in these experiments. However, the mechanism triggering the stomatal closure probably resides in the leaf mesophyll itself as stomatal closure was also correlated to bulk leaf turgor. The significance of cavitation avoidance seems crucial to understand plant water relations during water stress, probably more than the occurrence of cavitation itself. The possibility still exists that the striking relations that were observed between cavitation and stomatal function were only correlations and that the main physiological trait involved in the regulation was elsewhere. However, it seems to us that cavitation avoidance fits the three conditions we have identified for such a trait better that any other trait so far.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Experiments were conducted on 3-year-old walnut (*Juglans nigra* × *regia* cv NG38 grafted on *Juglans regia* rootstocks) trees grown in 35-L pots containing one-third peat and two-thirds natural clay soil from the Limagne region (France). The plants, grown in a nursery, were transferred to growth cabinets where air temperature (25°C) and air humidity (60% relative humidity) were constant. The light intensity at foliage level was adjusted between 0 and 480 μ mol m⁻² s⁻¹. A total of 17 trees were used in the different experiments. Because the experiments were time consuming, we chose to combine multiple experiments with a rather limited number of repetitions.

Ψ_{leaf} and Plant Transpiration

 Ψ_{leaf} s were measured with a Scholander-type pressure chamber on leaflets randomly sampled on the trees. The xylem water pressure at the base of the leaflet blades (P_{rachis}) was measured on leaflets enclosed for at least 2 h in an air proof aluminum bag (Turner and Long, 1980). To minimize the reduction in tree leaf area due to sampling, only one replicate of P_{rachis} and Ψ_{leaf} were performed each time.

Cochard et al.

Plant water loss (E_{plant}) was estimated with two independent techniques. Sap flow through the trunk was monitored by the heat balance technique of Valancogne and Nasr (1989). E_{plant} was also measured gravimetrically with an electronic balance (model ID1, resolution 1g, Mettler, Viroflay, Switzerland). In addition, leaf transpiration and leaf g_s were measured with a steady-state porometer (model 1600, LI-COR, Linclon, NE). The measurements were performed on five leaflets randomly chosen in each trees.

Xylem Embolism

The degree of xylem embolism due to the presence of air in the vessels was assessed following the procedure introduced by Sperry et al. (1988) and recently substantiated (Cochard et al., 2000a). We used the new XYL'EM apparatus (Xylem Embolism Meter, Instrutec, Montigny les Cormeilles, France), based on a high-resolution liquid mass flowmeter, to determine the PLC in the leaf rachis. For each PLC determination, one leaf was cut from the trees under tap water. Six segments 15 to 20 mm long were excised, still under water, from the leaf rachis, and four segments were detached from the midribs of four leaflets. The segments were attached to the tubing of the XYL'EM apparatus and their initial hydraulic conductance (K_{init}) determined with a hydrostatic pressure gradient of approximately 3 kPa. The samples were then flushed with water pressurized to 0.1 MPa and the maximum conductance (K_{max}) determined as above. The PLC was calculated as follows:

$$PLC = 100 \times (1 - K_{init}/K_{max})$$
(2)

R_{plant}

The R_{plant} was computed as the ratio between the water potential drop along the sap pathway and the whole-plant transpiration:

$$R_{\rm plant} = (\Psi_{\rm soil} - P_{\rm rachis})/E_{\rm plant}$$
(3)

It should be noted that, as we have defined it, R_{plant} does not include the leaf blade hydraulic resistance. Ψ_{soil} was estimated by the P_{rachis} value measured on the plants placed in the dark (Améglio et al., 1999).

VCs

The vulnerability of the xylem conduits to air embolism was determined following the pressure chamber dehydration technique of Cochard et al. (1992). The technique consisted in inserting a plant segment in a pressure chamber with only the cut end protruding. The pressure in the chamber was then adjusted to a target value and maintained constant until sap exudation ceased (usually after 15–30 min). The pressure was then released and xylem segments were excised under water and their PLC value determined as above. The plot of the PLC value versus the applied air pressure represents the VCs of the plant segment. VCs were first obtained for leaflet midribs, leaf rachises, and fine roots. A few measurements were also made on current year stem segments to confirm our previous results (Tyree et al., 1993). For midrib and rachis VCs, entire leaves were pressurized. Four to six rachis segments were measured on each leaf. The basal 20 cm of the leaf rachis was discarded to avoid artifacts caused by air entry into cut vessels. On the same leaves, midribs were excised from the four apical leaflets. Root VCs were obtained on lateral roots excised from entire root systems gently washed with tap water. A total of 13 leaves and 13 roots from three different trees were used to construct the VCs. The following logistic function was fitted to the different curves (Cochard et al., 1999).

$$PLC(P_{\text{rachis}}) = 100/(1 + (P_{\text{rachis}}/P_{\text{rachis50}})^{\text{s}})$$
(4)

where P_{rachis50} is the water pressure inducing 50 PLC and *s* is a slope parameter.

Pressure-Volume Analysis

Pressure-volume curves were obtained for five individual leaves using the bench top dehydration method (Ritchie and Hinckley, 1975). Leaves were harvested, enclosed in a plastic bag, and let to rehydrate overnight with their petiole immerged in distilled water. Bulk tissue estimates of turgor pressure (P_{leaf}) and turgor loss point were made using the method of Schulte and Hinckley (1985).

Soil Dehydration

The stomatal response to a soil water deficit was studied on six different trees following two complementary procedures. The water deficit was induced by withholding irrigation. For the first procedure, the light intensity in the chamber was increased by steps during the day. Four light intensities (0, 170, 250, and 450 μ mol m⁻² s⁻¹) were applied for 2 h each, to obtain different transpiration rates so the slope of E versus P_{rachis} could be determined for getting R_{plant}. After 2 h, plant transpiration was stable, enabling determination of Ψ_{leaf} , P_{rachis} , and g_{s} . During the night, the light level was maintained at 170 μ mol m⁻² s⁻¹ to progressively lower the soil water content. The procedure was repeated for 4 consecutive d for each of the three trees used in this experiment. In a second procedure, plants were continuously exposed to 450 μ mol m⁻² s⁻¹ during 7 consecutive d. Ψ_{leaf} , P_{rachis} , and g_{s} were determined twice a day. Leaves were periodically sampled for embolism assessment. The second procedure was repeated on three different trees.

Stem Pressurization

The aim of this experiment was to analyze the stomatal response to an increase in trunk hydraulic resistance. We used the air injection technique (Cochard et al., 1992; Salleo et al., 1992) to induce air embolism in the trunk and thus increase the trunk resistance. A 20-cm-long pressure chamber was fastened to the trunk of three different trees exposed to a constant light intensity (450 μ mol m⁻² s⁻¹). The pressure chamber was similar to the chamber described by Salleo et al. (1992), except that it was divided in two parts and could be clamped on intact trees (Améglio et al., 1994). To facilitate air entry into the xylem conduits, six 1.3-mm-diameter holes were drilled radially through the trunk in-

side the chamber. The holes were aligned vertically to minimize the damage to the xylem conduits. In a preliminary experiment, we verified that fastening the pressure chamber to the tree had no effect on tree transpiration and Ψ_{leaf} . The trunk segment in the chamber was exposed to increasingly higher air pressures (up to 3.5 MPa). Each target pressure was maintained constant for 15 min. Two hours after each pressurization, two leaflets were sampled, one to measured P_{rachis} , and one to measure Ψ_{leaf} with a pressure chamber, and g_{s} was measured on five leaflets. Leaves were also periodically sampled for embolism assessment.

Root Chilling

This experiment aimed at altering root and soil hydraulic resistance by changing soil temperature (Brodribb and Hill, 2000; Cochard et al., 2000b). A well-watered tree was placed in the growth chamber with 450 μ mol m $^{-2}$ s $^{-1}$ light intensity. $\Psi_{\rm leaf}, P_{\rm rachis'}$ and $g_{\rm s}$ were measured when $E_{\rm plant}$ became stable. Solutions with different temperature were obtained by mixing tap water with ice. The solutions were successively poured on the soil to lower its temperature ($T_{\rm soil}$) in a step-wise manner from ambient to approximately 0.5°C. $T_{\rm soil}$ was measured with a thermocouple inserted near the center of the pot. After approximately 75 min, $\Psi_{\rm leaf}, P_{\rm rachis'}$ and $g_{\rm s}$ were measured, and a cooler solution was poured on the soil. $T_{\rm soil}$ was then returned to 20°C by pouring water at ambient temperature on the soil. The whole procedure was repeated three times on two different trees.

Modeling

The relationship between plant hydraulic parameters and water loss regulation was analyzed with a model similar to the ones developed by Tyree and Sperry (1988) and Sperry et al. (1998). The soil-plant continuum is represented by hydraulic resistances in series: R_{soil}, R_{root}, R_{stem}, R_{trunk}, R_{branch}, R_{rachis}, and R_{leaf}. The partitioning of resistances within a tree was measured with an high pressure flowmeter (H. Cochard, unpublished data; Tyree et al., 1994). The relationships between the different xylem resistances and the xylem pressure were derived from the logistic fits of their VCs. R_{soil} was supposed negligible and not Ψ_{soil} dependent. Therefore, our model pertains only for the understanding of stomatal behavior during our root chilling and stem pressurization experiments. Sperry et al. (1998) and Comstock and Sperry (2000) have pointed out that the accuracy of such models depends on how finely the continuum is discretized. In our model, each xylem resistance was divided into 10 tiers. A test with 1,000 tiers yielded only 1.7% higher $E_{\rm crit}$ values. $E_{\rm crit}$ was determined to the nearest 0.001 mmol s⁻¹ by progressively increasing E_{plant} until 100 PLC was obtained in one tier. The model was run with increasing R_{root} and R_{trunk} values to simulate the experimental observations. The model, called "RER," was developed on an Excel (Microsoft, Redmond, WA) spreadsheet.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Boris Adam, Christian Bodet, Patrice Chaleil, Maurice Crocombette, Robert Falcimagne, and Stéphane Ploquin for their help during this work. The comments of John Sperry and two anonymous reviewers are greatly appreciated.

Received April 30, 2001; returned for revision July 4, 2001; accepted October 17, 2001.

LITERATURE CITED

- Améglio T, Cruiziat P, Bodet C (1994) A pressure chamber to induce and control embolism in situ: consequence on the sap flow. *In* Y Kouchkovsky, F Larcher, eds, Plant Sciences. Société Franchouillarde de Physiologie Végétale, Paris, p 281
- Améglio T, Archer P, Cohen M, Valancogne C, Daudet FA, Dayau S, Cruiziat P (1999) Significance and limits in the use of predawn leaf water potential for tree irrigation. Plant Soil 207: 155–167
- **Brodribb TJ, Hill RS** (2000) Increases in water potential gradient reduce xylem conductivity in whole plants: evidence from a low-pressure conductivity method. Plant Physiol **123**: 1021–1028
- **Cochard H** (1992) Vulnerability of several conifers to air embolism. Tree Physiol **11**: 73–83
- **Cochard H, Bodet C, Améglio T, Cruiziat P** (2000a) Cryoscanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles: facts or artifacts? Plant Physiol **124**: 1191–1202
- **Cochard H, Bréda N, Granier A** (1996a) Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: evidence for stomatal control of embolism? Ann Sci Forest **53**: 197–206
- **Cochard H, Cruiziat P, Tyree MT** (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves: further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. Plant Physiol **100**: 205–209
- **Cochard H, Lemoine D, Dreyer E** (1999) The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. Plant Cell Environ **22**: 101–108
- Cochard H, Martin R, Gross P, Bogeat-Triboulot MB (2000b) Temperature effects on hydraulic conductance and water relations of *Quercus robur* L. J Exp Bot 51: 1255–1259
- Cochard H, Ridolfi M, Dreyer E (1996b) Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana* × *trichocarpa* cv. Peace): II. Hydraulic properties and xylem embolism. New Phytol 134: 455–461
- **Comstock JP, Sperry JS** (2000) Theoretical considerations of optimal conduit length for water transport in vascular plants. New Phytol **148**: 195–218
- **Comstock J, Mencuccini M** (1998) Control of stomatal conductance by leaf water potential in *Hymenoclea salsola* (T and G), a desert subshrub. Plant Cell Environ **21**: 1029–1038
- Cowan IR (1977) Stomatal behavior and environment. Adv Bot Res 4: 117–228
- Fuchs EE, Livingston NJ (1996) Hydraulic control of stomatal conductance in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*

(Mirb) Franco) and alder (*Alnus rubra* (Bong)) seedlings. Plant Cell Environ **19:** 1091–1098

- Hinckley TM, Bruckerhoff DM (1975) The effects of drought on water relations and stem shrinkage of *Quercus alba*. Can J Bot 53: 62–72
- Hubbard RM, Ryan MG, Stiller v, Sperry JS (2001) Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. Plant Cell Environ 24: 113–121
- Jarbeau JA, Ewers FW, Davis SD (1995) The mechanism of water-stress-induced embolism in two species of chaparral shrubs. Plant Cell Environ **18**: 189–196
- Jones HG, Sutherland RA (1991) Stomatal control of xylem embolism. Plant Cell Environ 14: 607–612
- Kramer PJ, Boyer JS (1995) Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego
- Lu P, Biron P, Granier A, Cochard H (1996) Water relations of adult Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) under soil drought in the Vosges mountains: whole-tree hydraulic conductance, xylem embolism and water loss regulation Ann Sci Forest 53: 113–121
- Meidner H, Edwards M (1996) Osmotic and turgor pressures of guard cells. Plant Cell Environ 19: 503
- Meinzer FC, Grantz DA (1990) Stomatal and hydraulic conductance in growing sugarcane: stomatal adjustment to water transport capacity. Plant Cell Environ 13: 383–388
- Monteith JL (1995) A reinterpretation of stomatal responses to humidity. Plant Cell Environ 18: 357–364
- **Muromtsev NA** (1981) Effects of temperature on the potential of soil water and the availability to plants. Soviet Meteorol Hydrol **5**: 68–72
- Nardini A, Tyree Mt, Salleo S (2001) Xylem cavitation in the leaf of *Prunus laurocerasus* and its impact on leaf hydraulics. Plant Physiol **125**: 1700–1709
- **Nobel PS, Cui MY** (1992) Hydraulic conductances of the soil, the root soil air gap, and the root: changes for desert succulents in drying soil. J Exp Bot **43**: 319–326
- Pickard WF (1981) The ascent of sap in plants. Prog Biophys Mol Biol 37: 181–229
- **Ritchie GA, Hinckley TM** (1975) The pressure chamber as an instrument for ecological research. Adv Ecol Res **9**: 165–254
- **Rood SB, Patino S, Coombs K, Tyree MT** (2000) Branch sacrifice: cavitation-associated drought adaptation of riparian cottonwoods. Trees **14:** 248–257
- Saliendra NZ, Sperry JS, Comstock JP (1995) Influence of leaf water status on stomatal response to humidity, hydraulic conductance, and soil drought in *Betula occidentalis*. Planta **196**: 357–366
- Salleo S, Hinckley TM, Kikuta SB, Lo Gullo MA, Weilgony P, Yoon TM, Richter H (1992) A method for inducing xylem emboli in situ: experiments with a field-grown tree. Plant Cell Environ **15**: 491–497
- Salleo S, Nardini A, Pitt F, Lo Gullo MA (2000) Xylem cavitation and hydraulic control of stomatal conductance in laurel (*Laurus nobilis* L.). Plant Cell Environ 23: 71–79
- Schulte PJ, Hinckley TM (1985) A comparison of pressurevolume curve data analysis techniques. J Exp Bot 36: 1590–1602

- Schulze ED, Turner NC, Gollan T, Shackel KA (1987) Stomatal responses to air humidity and to soil drought. *In* Z Zeiger, GD Farquhar, IR Cowan, eds, Stomatal Function. Stanford University Press, CA, pp 311–321
- Sperry JS (2000) Hydraulic constraints on plant gas exchange. Agric Forest Meteorol 104: 13–23
- Sperry JS, Adler FR, Campbell GS, Comstock JP (1998) Limitation of plant water use by rhizosphere and xylem conductance. Results from a model. Plant Cell Environ 21: 347–359
- Sperry JS, Alder NN, Eastlack SE (1993) The effect of reduced hydraulic conductance on stomatal conductance and xylem cavitation. J Exp Bot 44: 1075–1082
- **Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT** (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. Plant Cell Environ **11**: 35–40
- Sperry JS, Ikeda T (1997) Xylem cavitation in roots and stems of Douglas-fir and white fir. Tree Physiol 17: 275–280
- **Sperry JS, Saliendra NZ** (1994) Intra and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. Plant Cell Environ **17**: 1233–1241
- Sperry JS, Tyree MT (1988) Mechanism of water stressinduced xylem embolism. Plant Physiol 88: 581–587
- **Tardieu F, Davies WJ** (1993) Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. Plant Cell Environ **16:** 341–349
- Tardieu F, Zhang J, Davies WJ (1992) What information is conveyed by an ABA signal from maize roots in drying field soil. Plant Cell Environ **15**: 185–191
- **Turner NC, Long MJ** (1980) Errors arising from rapid water loss in the measurement of leaf water potential by the pressure chamber technique. Aust J Plant Physiol **7**: 527–537
- Tyree MT, Cochard H, Cruiziat P, Sinclair B, Améglio T (1993) Drought-induced leaf shedding in walnut: evidence for vulnerability segmentation. Plant Cell Environ 16: 879–882
- **Tyree MT, Ewers FW** (1991) The hydraulic architecture of trees and other woody plants. New Phytol **119**: 345–360
- **Tyree MT, Sperry JS** (1988) Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused bydynamic water stress? Answers from a model. Plant Physiol **88:** 574–580
- **Tyree MT, Yang S, Cruiziat P, Sinclair B** (1994) Novel methods of measuring hydraulic conductivity of tree root systems and interpretation using AMAIZED. Plant Physiol **104:** 189–199
- Valancogne C, Nasr Z (1989) A heat balance method for measuring sap flow in small trees. *In* M Borghetti, J Grace, A Raschi, eds, Water Transport in Plants under Climatic Stress. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 166–173
- Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR (1987) Stomatal Function. Stanford University Press, CA
- Zwieniecki MA, Melcher PJ, Holbrook NM (2001) Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. Science **291:** 1059–1062















4.5 L' observation Imagerie	

Conclusion MICROSCOPE ELECTRONIQUE à BALAYAGE TYPE LOW VACUUM -colonne haute résolution -grande chambre -platine motorisée -détecteur électrons rétro diffusés -détecteur électrons rétro diffusés -détecteur électrons secondaires mode HV -détecteur électrons secondaires mode LV -platine effet Peltier -platine et système de cryotransfert -logiciels d'imagerie et environnements informatiques -système intégré de micro analyse des rayons X (EDS) -configuration pour l'accueil futur d'un système WDS













