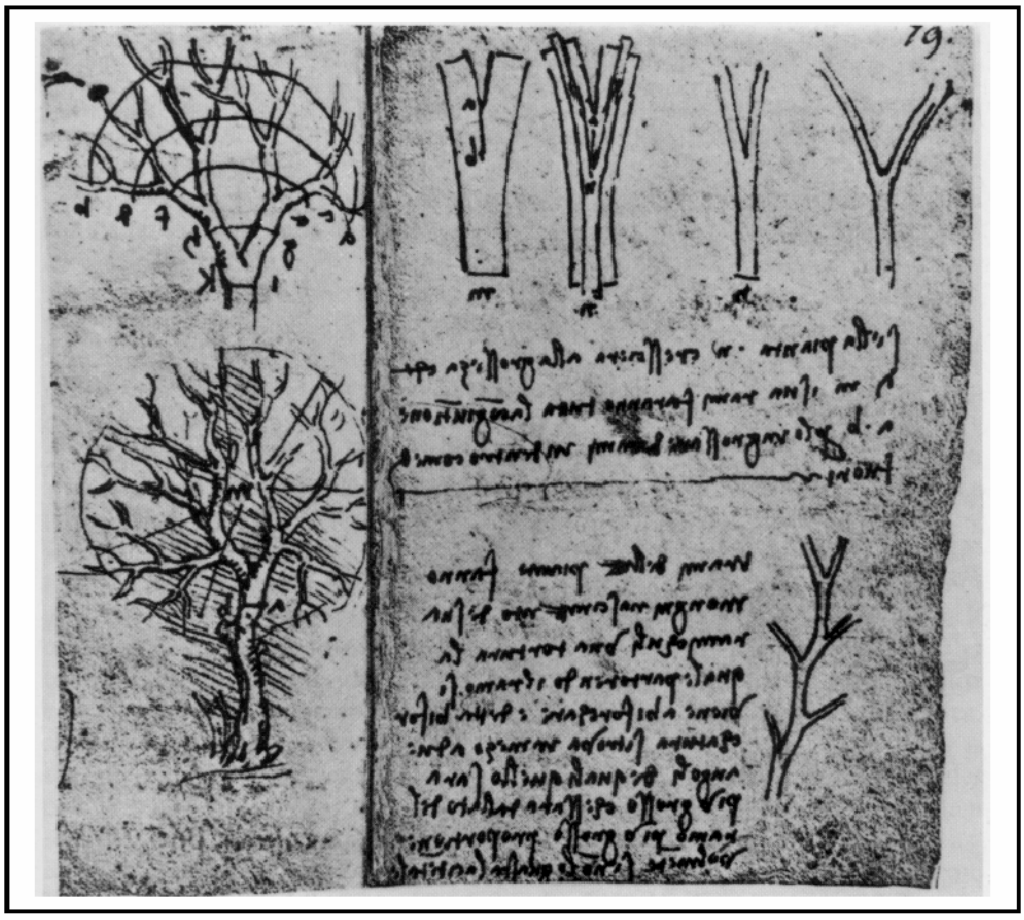
REA

Groupe Xylème-Eau-Croissance

Montpellier 27-28 Mars 2003



Leonardo da Vinci (*communication personnelle*)

Jeudi 27 mars

14h00-14h30	Accueil des participants, programme etc…	(HC, JLD, TS)
14h30- 15h00	Les orientations du LEPSE	**T Simonneau**
15h00-15h30	Imagerie du prélèvement d'eau par les racines	**C Doussan**
15h30-16h00	PAUSE	
16h-16h30	Visualisation par IRM de l'embolie hivernale des vaisseaux du xylème chez le Noyer	**T Améglio**
16h30-17h00	Ecophysiologie des chênes américains	**J Barres**
17h00-17h30	Fonctionnement hydrique d'une forêt mélangée	**R Huc**
20h00	Dîner	

Vendredi 28 mars

9h00-9h30	Cavitation et collapse des parois dans les aiguilles de Pins	**H Cochard**
9h30-10h00	Rôle des aquaporines dans le fonctionnement du système racinaire	**C Maurel**
10h00-10h30	Aquaporins and water uptake by the growing root cell	**D Hukin**
10h30-11h00	PAUSE	
11h00-11h30	Impact du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée	**V Gonzales**
11h30-12h00	Impact du conditionnement en lumière sur la croissance et l'architecture hydraulique	**T Barigah**

12h00-12h30 Perspectives, discussion générale

contact : Thierry Simonneau,
LEPSE, UMR INRA-ENSAM
2, place Viala, 34060 Montpellier cedex 1
04 99 61 27 52
simonnea@ensam.inra.fr

Imagerie et modélisation du prélèvement en eau par les systèmes racinaires

C. Doussan, E. Garrigues, A. Pierret

INRA – Unité Climat, Sol, Environnement – Avignon

CSIRO – Land & Water – Canberra - Australie

Voie de progrès actuels dans la compréhension du processus de prélèvement

- Progrès des modèles intégrateurs processus sol **et** plante
- Progrès des techniques d 'observation des systèmes racinaires

Milieu opaque ; comportement non linéaire vis-à-vis des transferts hydriques

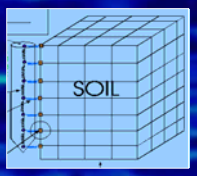
Disposition spatiale des racines et capacités d'absorption différenciées d'une racine

Prise en compte de l'*architecture géométrique* et *hydraulique* du système racinaire dans des sols aux propriétés hydrodynamiques contrastées.

Objectifs

1) Déterminer et analyser l'influence de l 'architecture racinaire sur les prélèvements d'eau en condition de faibles contraintes mécaniques du sol (pas d'effet de la structure)

2) Analyser les effets de propriétés hydrodynamiques contrastées sur les prélèvements d 'eau



3) Intégration des processus par modélisation du transfert d'eau dans le système sol / système racinaire

La démarche suivie (1/2)

- Travailler à la fois à un niveau global (le système racinaire) et local (le segment de racine et l 'interface sol/racine)
- Faire le lien entre ces 2 échelles d 'espaces

⇒ ***Vision globale et intégrée*** **des transferts d 'eau**

Aspect intégrateur de l 'architecture racinaire

Modulation des prélèvements racinaires selon le type de sol

La démarche suivie (2/2)

Lupin Bleu (*Lupinus angustifolius*)

En laboratoire
- système racinaire
- champ humidité
- prélèvements

Méthode d 'imagerie

3D
Tomographie

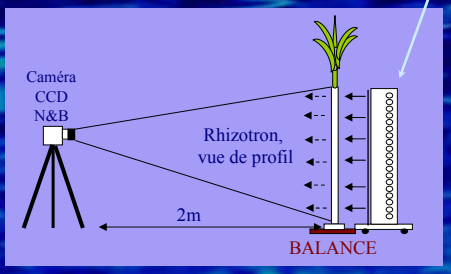
2D
Projection

Transmission Lumineuse
↖ effet architecture

Radiographie rayon X
↖ effet type de sol

Matériels & Méthodes

Imagerie par transmission lumineuse



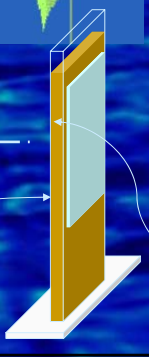
L'intensité de la lumière transmise à travers le sable s'accroît avec l'augmentation de la teneur en eau du milieu.

(variation indice refraction sable-air, sable eau)

Imagerie rayon X (coll:A.Pierret, CSIRO) 8

Atténuation des rayons X par le sol et l 'eau

Source de rayons X



Rhizotron de 1 cm d'épaisseur (50x25 cm)

Plaque de lecture des rayons X transmis

scanner

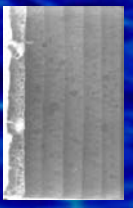


Image digitalisée

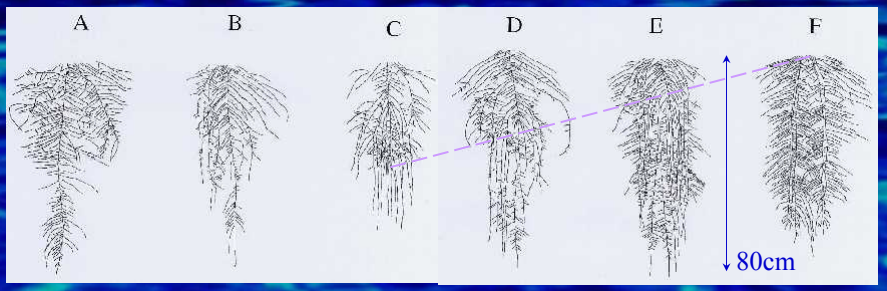
Installation et équipement Rayon X

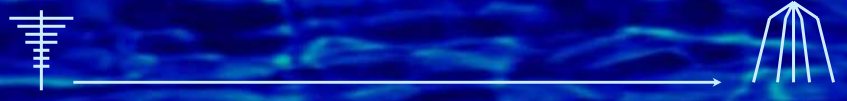
Rhizotron

Résultats expérimentaux

Transmission lumineuse

Architectures racinaires obtenues

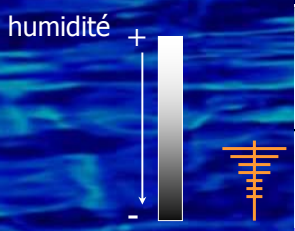


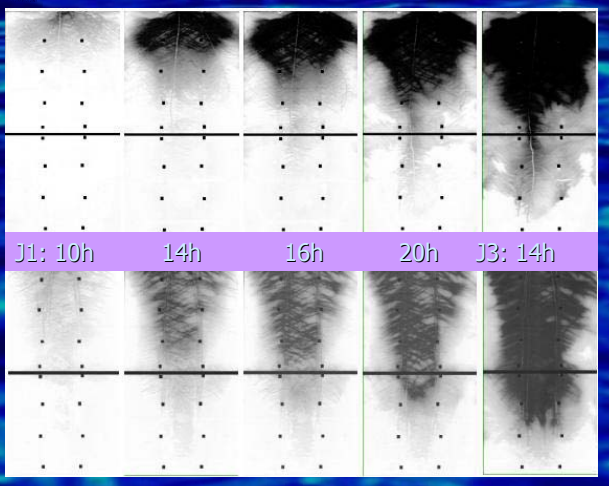


pivotant

fasciculé

Transmission lumineuse :
Evolution temporelle des humidités

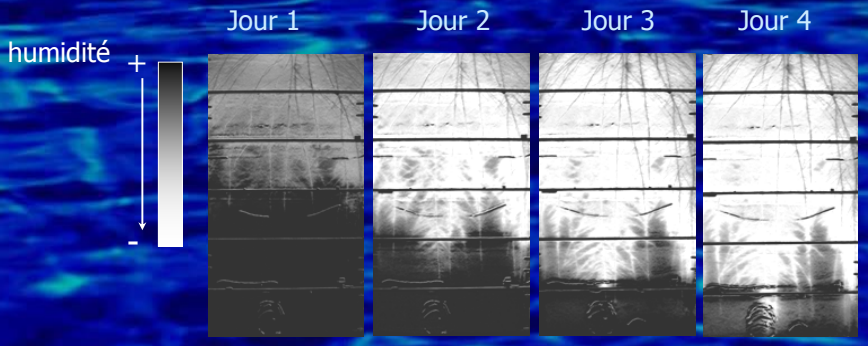




Dessèchement progressif en profondeur

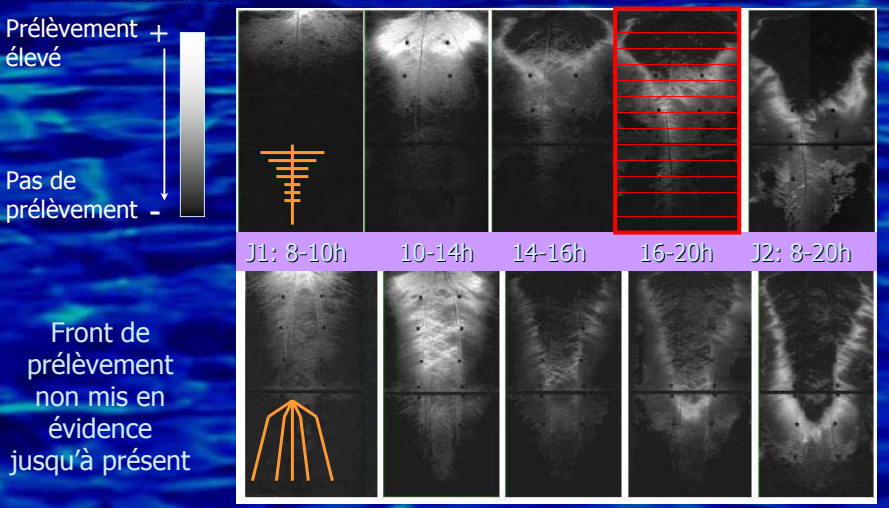
Evolution temporelle de la teneur en eau:

Cas du Maïs



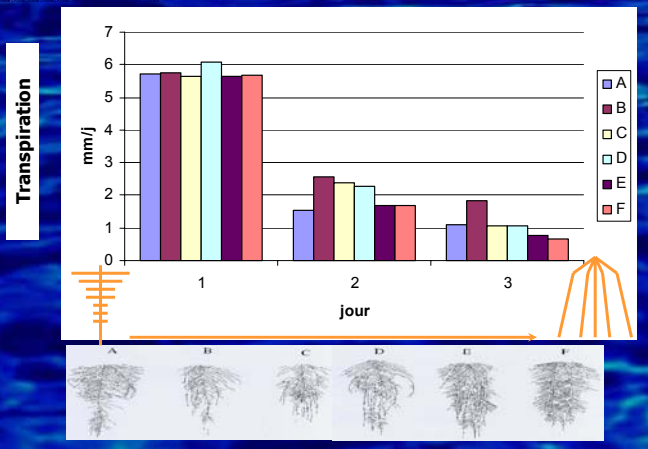
Transmission lumineuse :

Evolution temporelle du front de prélèvement



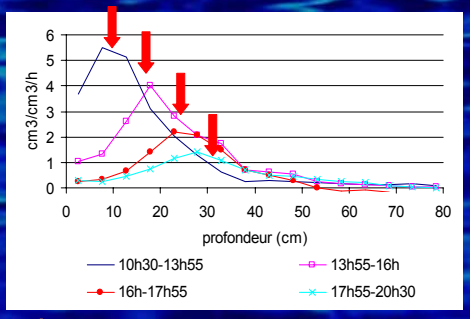
Front de prélèvement non mis en évidence jusqu'à présent

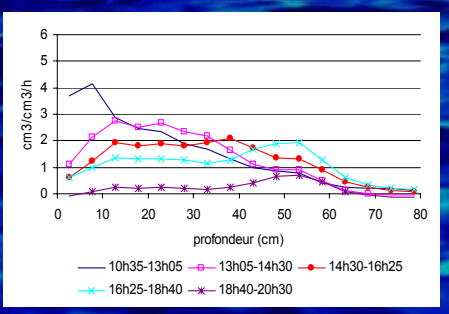
Echelle globale :
Satisfaction de la demande climatique



Différence de comportement entre plantes d 'une même espèce

Profils de prélèvements (1/2)





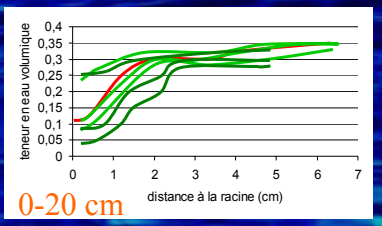
Intensité du front de prélèvements diminue avec la profondeur

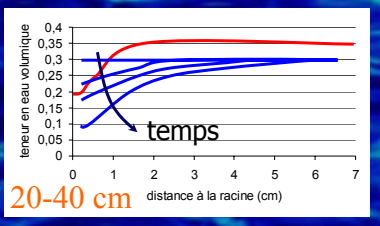
Echelle locale

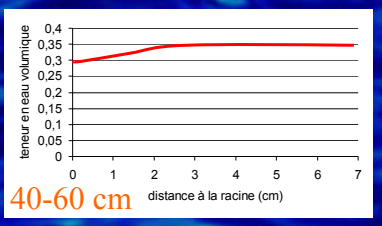
Forts gradients de teneur en eau

Intensité des gradients fonction:

- de la zone
- du temps
- de la plante







Limites transmission lumineuse

Etude à la fois à différentes échelles mais dans un cas particulier du confinement **2D** dans un sol **sableux**

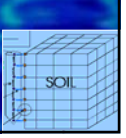
Contraintes sur la croissance des systèmes racinaires

Accélération des processus d 'extraction racinaire

Observation directe des comportements

Transfert d 'eau vers et dans les racines

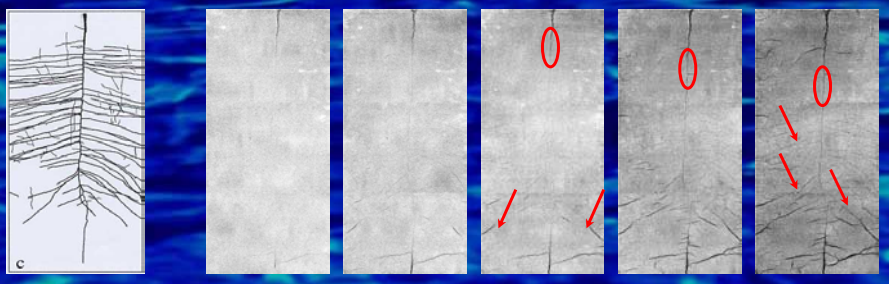
⇨ MODELISATION



Résultats expérimentaux

Rayons X

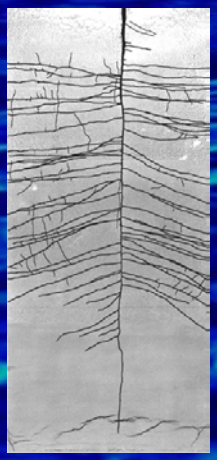
Variation de la teneur en eau (Rayons X - Limon)



Erreur mesure ≈ 10% de teneur en eau volumique

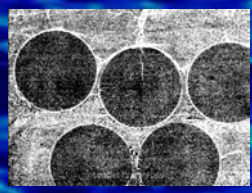
Quantification teneur en eau possible (si structure stable)

Structure du sol et systèmes racinaires



Homogène

'Mottes' denses
(rho=2 g/cm^3)

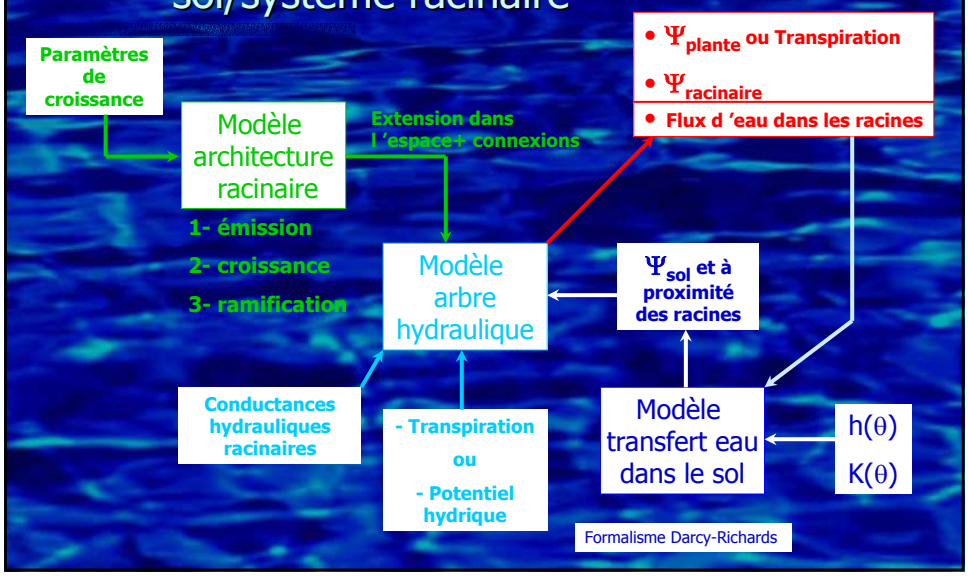


Variation de la teneur en eau

(2 jours après irrigation, plus clair= plus sec)

Présentation du modèle de *transfert d 'eau dans le système sol/système racinaire*

Présentation du modèle 3D de transfert d 'eau dans le système sol/système racinaire

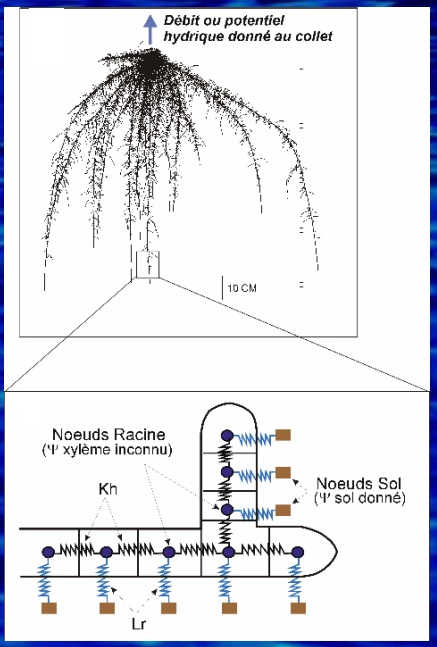


Couplage architecture racinaire et transfert d 'eau

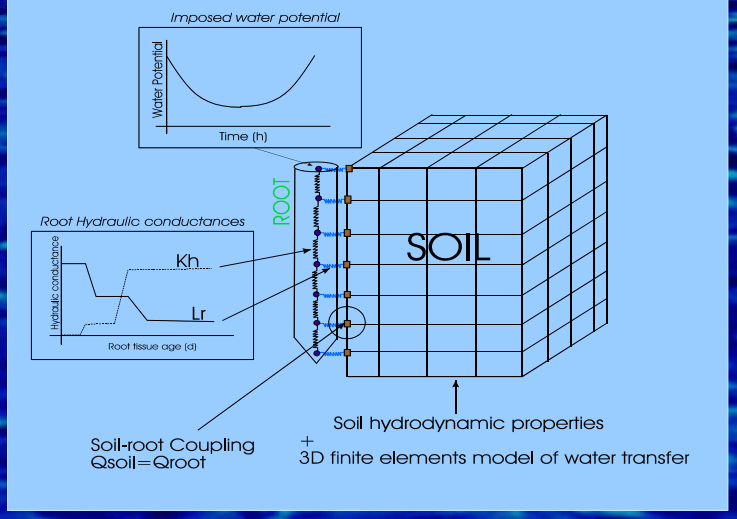
Segmentation des racines

Transfert de l 'eau gouvernée par la différence de potentiel

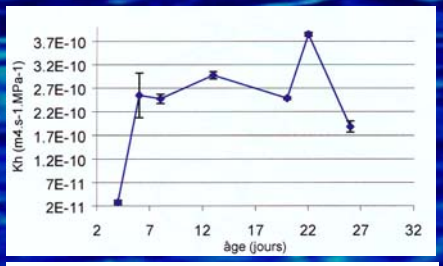
(écoulement linéaire entre 2 nœuds)

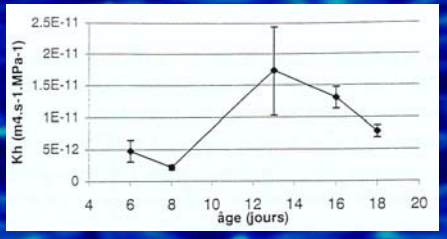


Transfert d 'eau dans le système sol/système racinaire

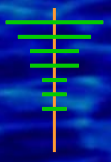


Conductances axiales racinaires





Mesure d'un flux d'eau à travers un segment de racine auquel on applique une dépression



Plantes de 30 jours

Plantes de 50 jours ?

Résultats du modèle

Comparaison humidité du sol expérience/modèle

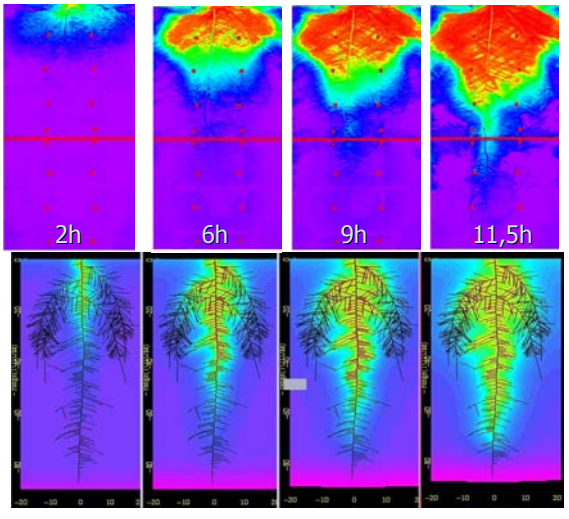
Expérience

Temps après l'irrigation :

Modèle

Teneur en eau volumique

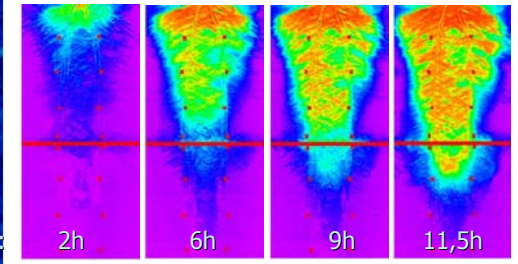
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4



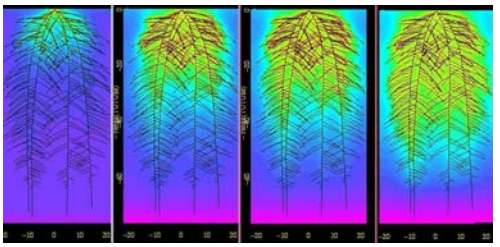
Comparaison images expérience/modèle

Expérience

Temps après l'irrigation :

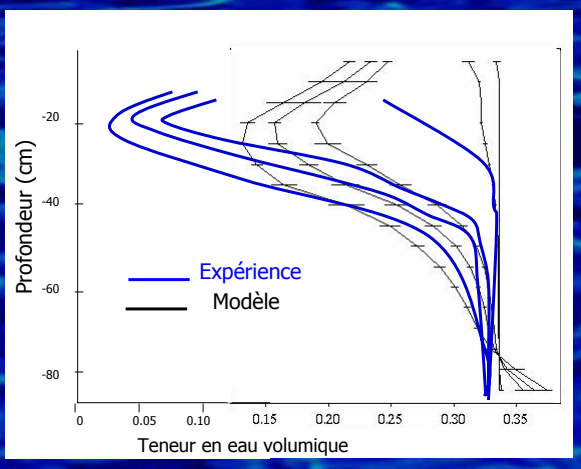


Modèle



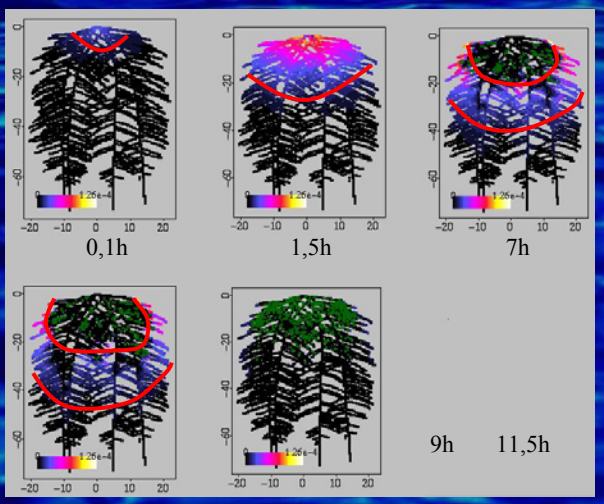
Teneur en eau volumique

Ecarts expérience / modèle



- propriétés hydrodynamiques sol
- conductances / conductivités racinaires
- Architecture racinaire
- processus non pris en compte dans le modèle

Flux d 'eau dans les racines



Mise en évidence du déplacement en profondeur du front de prélèvement

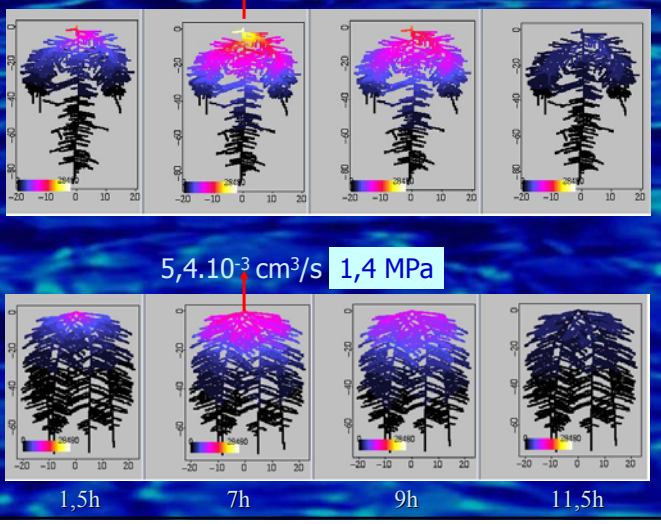
Potentiel hydrique dans les racines

Débit imposé

ψ_{collet}

4.10^{-3} cm³/s 2,8 MPa

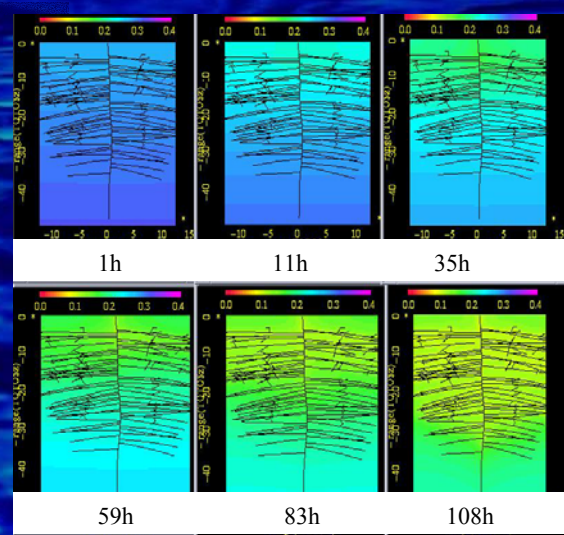
$5,4.10^{-3}$ cm³/s 1,4 MPa



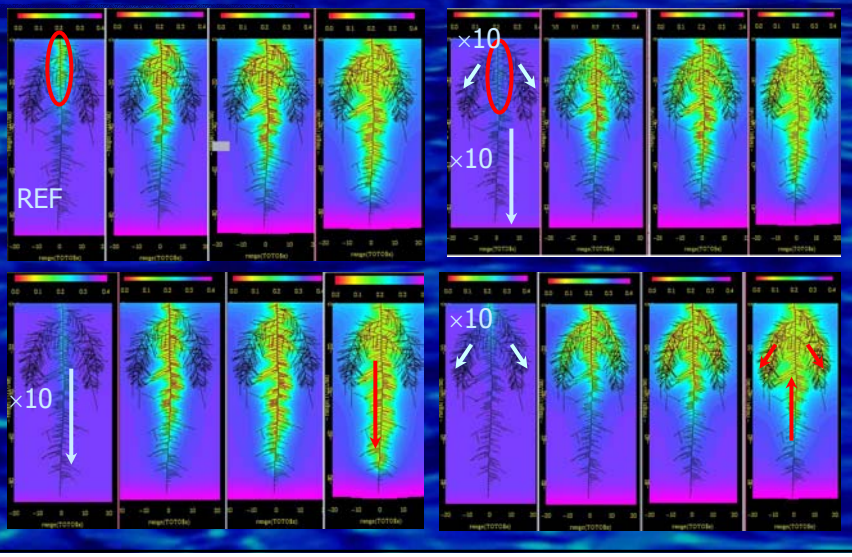
Simulation des prélèvements dans un sol limoneux (comparaison rayons X)

Variation de teneur en eau du sol plus graduelle qu'avec sol sableux.

Différence de comportement de la plante selon le type de sol.



Impact fort des conductances hydrauliques racinaires sur les prélèvements

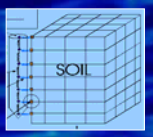


Conclusions

Comportement différent entre systèmes racinaires

Mise en évidence d 'un front de prélèvement

Mise en évidence de forts gradients d 'humidité à proximité des racines



Modèle décrit de façon réaliste/qualitative le comportement sol / plante

Impact important des conductances hydrauliques racinaires

Problème potentiel du contact sol-racine soulevé

Contribuent à la compréhension plus fine des mécanismes de prélèvements racinaires.

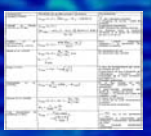
Perspectives

Thèmes à aborder :

Effet de la structure du sol → Modification de l 'architecture racinaire

Croissance de la plante → Echelle de temps plus longue

Effet du contact sol-racine → Quantifiable à l 'avenir grâce aux progrès de l 'imagerie



Simplification paramètres intégrateurs

↖ terme « puits racinaire » moins empiriques prenant mieux en compte la plante dans la modélisation

Visualisation par IRM de l'Embolie Hivernale des Vaisseaux du Xylème chez le Noyer.

Thierry Améglio (1), Loïc Foucat (2), Marc Bonhomme (1)

(1) U.M.R. PIAF (INRA-Univ. Blaise Pascal), site INRA de Crouelle, 234 av. du Brezet, F-63039 Clermont-Fd Cedex2, France
(2) STIM/SRV, INRA-Theix, 63122 Saint Genes Champanelle

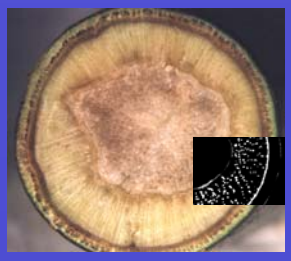


Fig. 1

Introduction: **L'embolie hivernale (vaisseaux conducteurs de sève brute pleins d'air) est un phénomène qui apparaît chaque année sous nos climats chez les différentes espèces d'arbres examinés jusqu'ici, à l'exception des conifères. Cette expression désigne en fait l'embolie liée au gel et correspond aussi à des périodes pendant lesquelles l'arbre est dépourvue de feuilles. Ses effets sur la conduction hydraulique, variables d'une espèce à l'autre, peuvent être très importants au moment du débourrement.**

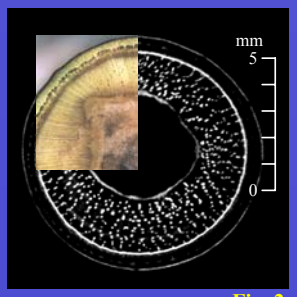


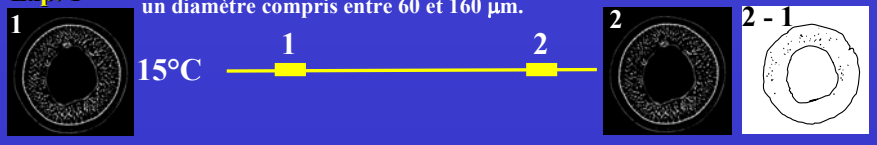
Fig. 2

Ainsi la croissance ultérieure des pousses issues de ce dernier dépend d'une bonne alimentation en eau et donc de la fonctionnalité du système hydraulique de l'arbre. Les mécanismes de cette embolie sont assez complexes ; les conditions qui la provoquent sont les alternances de gel et de dégel. Lorsque la sève gèle pour des températures peu négatives, les gaz dissous qu'elle contient sont expulsés en raison de leur moindre solubilité dans la glace ; au dégel ces bulles peuvent soit de nouveau se dissoudre soit obstruer complètement un vaisseau. Leur capacité à se dissoudre diminue avec la taille de la bulle d'air formée et donc, leur vulnérabilité est très dépendante du diamètre des éléments conducteurs : plus ceux-ci sont larges plus le dégazage est important et plus en conséquence, ils sont sensibles.
Actuellement nous disposons de deux principales méthodes destructives (hydraulique et cryo-SEM) pour quantifier cette embolie. Par contre, nous n'avons aucune autre possibilité, qu'une approche globale et statistique, de suivre la dynamique de création de l'embolie hivernale. Ces informations sur la dynamique de création et sur la localisation des vaisseaux embolisés sont visualisables et quantifiables par IRM en conditionnant thermiquement des rameaux de noyer au sein du spectromètre et en réalisant une série chronologique d'images tout au long du conditionnement (ex. avant et après gel).

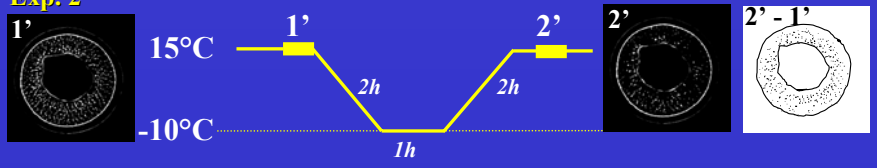
Matériels et Méthodes : les mesures ont été réalisées sur des rameaux de noyer (cv. Franquette) âgés d'un an. Un segment d'une longueur de 20 cm de long est recoupé sous l'eau pour limiter l'introduction d'air dans les vaisseaux et, du parafilm est placé aux 2 extrémités pour limiter l'évaporation. Ce segment est placé dans un spectromètre (Bruker Avance 400 + accessoires de microimagerie : IRM ^{1}H) qui permet un conditionnement thermique précis (± 0.5°C). Après une heure de conditionnement à +15°C une séquence d'acquisition d'images est lancée (*cf.* 1 et 1 ': écho de gradient : impulsion de 30°, temps d'écho TE=2.6 ms, temps de répétition : TR=150ms, 48 scans, temps d'acquisition total 30 min). Les images sont acquises sur 6 tranches contiguës de 3mm d'épaisseur (matrice 256^2, FOV = 12.8 mm^2, résolution (isotrope) : 50 µm). La même séquence est reproduite 6 h après (*cf.* 2 et 2 ') soit pour un conditionnement constant à +15°C (Témoin : exp. 1) , soit après le développement d'un épisode de gel-dégel à -10°C (exp. 2 : vitesse : 12.5°C.h^{-1}, durée : 1 h à -10°C).

Résultats : **La séquence d'acquisition développée permet, d'une part d'obtenir une image fidèle par rapport à une image photographique d'une coupe transversale de tige observée à la loupe binoculaire (Figure 1 et 2) et, d'autre part, de localiser l'eau dans la tige et de visualiser les vaisseaux du xylème qui, chez le noyer, ont un diamètre compris entre 60 et 160 µm.**

Exp. 1



Exp. 2



Les expérimentations de conditionnement montre qu'à la température de +15°C, la proportion de vaisseau qui s'embolisent reste faible (7 % : image 2-1 : vaisseaux colorés en rouge correspondent au vaisseaux ayant disparus) A l'opposé, lorsque le rameau subit un cycle de gel-dégel (Exp. 2), la proportion de vaisseaux embolisés devient très importante (67% : visualisation 2'-1').

CONCLUSIONS:

L'utilisation IRM ^{1}H permet une visualisation précise des vaisseaux du xylème plein d'eau. Cette approche, associée aux possibilités de conditionnement thermique directement dans le spectromètre donne accès à la dynamique de création de l'embolie et à la localisation des vaisseaux embolisés. Elle devrait permettre également d'aborder les processus de réparation de l'embolie associés au déplacement de l'eau au sein du rameau vers les vaisseaux.

RMN Biologique et les enjeux du vivant
Clermont-Ferrand, 12-14 Mars 2003

“ Fonctionnement hydrique du peuplement mélangé pin d’Alep - chêne vert - buis ”

R. Huc[1], C. Arnaud[1] , C. Doussan[2], S. Hallgren[4], A. Porté[1], G. Vercambre[3],

URFM[1] / CSE [2]/PSH[3] /OSU[4]

Xylème - Flux d'eau, Montpellier
27-28 mars 2003

Les espèces :

Pin d ’Alep :

Pionnière (propagation par graine)
Futaie, pas de tradition de gestion
Elle est considérée
comme peu exigeante

Le site :

Dispositif

Chêne vert :

Traité traditionnellement en taillis
(régénération par rejets de souche).
Résistant à la contrainte hydrique
Présente en sous - étage

Forêt communale de Lamanon

Alpilles, versant nord
Alt :120 m
Pluv. Ann. (Cavaillon) : 663 mm
Sol colluvial (60cm)

Buis :
Longévive. Croissance lente,
(marcottage naturel)
Pas ou peu exploité
Résistant à la contrainte hydrique
Présente en sous - bois

Xylème - Flux d'eau, Montpellier
27-28 mars 2003

Problématique :

La coexistence de ces espèces devrait se traduire par une compétition à la fois pour la lumière, pour les éléments minéraux et pour l'eau. Compte tenu de l'occurrence, en été, de longues périodes sèches combinées à une ETP élevée, nous avons privilégié :

↳ Etude des effets de la contrainte hydrique

avec comme hypothèse une altération différenciée des fonctions d'absorption et de transfert

↳ Mise en oeuvre d 'une approche hydraulique

Objectifs :

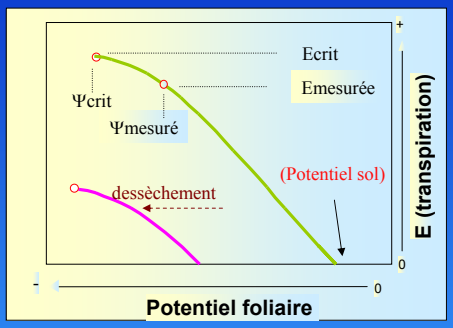
- Analyser et modéliser l'utilisation de l'eau par *chacune des espèces*, dans le continuum sol-plante-atmosphère en forêt hétérogène

- Evaluer les limitations du transport de l'eau chez ces espèces en fonction :
  - des variations de l'environnement
  - de situations de forte contrainte hydrique

↳ Combiner cette étude de fonctionnement avec les réactions de croissance

↳Utiliser cette approche dans un cadre plus général de gestion de forêt mélangée

Fonctionnement théorique *(d'après Sperry et al. 2002)*



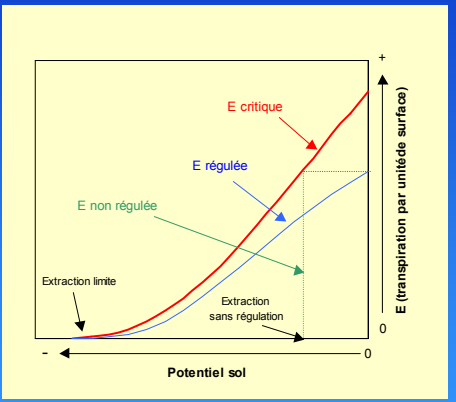
$$k_l = E / (\Psi_S - \Psi_L)$$

E = Transpiration en régime permanent (mmol s-1 m-2 de surface foliaire)
k_l = conductance hydraulique spécifique
Ψ_s = Potentiel hydrique du sol
Ψ_L = Potentiel hydrique foliaire

A potentiel du sol constant
Si E ↘ : Ψ devient plus négatif dans le continuum

k_l ↗ par cavitation ou dessèchement du sol dans la rhizosphère
E tend vers une valeur limite E_{crit} (associée à Ψ_{crit})

Approche : fonctionnement
d'après Sperry et al. (2002)



Théorie :

A chaque potentiel de sol correspond une valeur maximale de transpiration ($E_{critique}$) définie par les contraintes hydrauliques du continuum sol - feuille
La régulation stomatique, qui entraîne $E_{régulée}$, est nécessaire à la plante afin de rester à l'intérieur de ces limites hydrauliques et d'utiliser entièrement ses potentialités d'extraction

Objectif du modèle (Sperry et al. 1998):

Prédire l 'utilisation de l'eau suivant les différentes caractéristiques du continuum :
la teneur en eau du sol, les types de sol,
les surfaces d 'échange
et la structure du xylème (tige et racines)
des différentes espèces

Démarche :

Mesure des **paramètres** de l'ensemble sol-arbre,
intervenant dans les fonctions d'absorption, de transfert et de transpiration :

- Fonction de résistance à la cavitation pour les tiges et racines , $K=f(\Psi)$
(pressurisation, centrifugation)
- Rapport entre les surfaces absorbantes et transpirantes, A_B:A_L
- Conductance hydraulique de la rhizosphère

Sorties : E_{pred}, E_{crit},

Validation

Avec le suivi de transpiration E_{mes}
des 3 espèces en mélange :

par rapport à l 'évolution
- du potentiel hydrique du sol, Ψ_S
- des conditions micro-climatiques (ETP, Dsat, Rg)

Mesures :

Microclimat : Dsat, ETP

Sol — Humidité - profils
-variabilité spatiale
- potentiel hydrique sol
Conductivité hydrique

LAI — Photos hémisphériques (2 niveaux)
LAI 2000

RAI — Profils
Relations allométriques

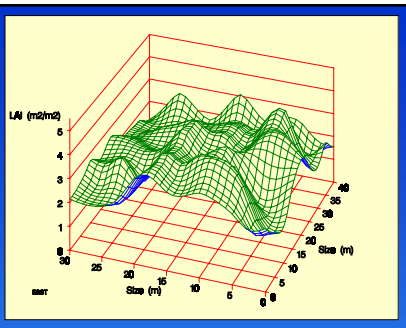
Potentiel hydrique arbre
Pb, Pm

Mesures dendrométriques

Transpiration : Chênes - pins (capteurs Granier)
Buis (bilan de chaleur)

Vulnérabilité à la cavitation (tiges et racines)

Résultats :

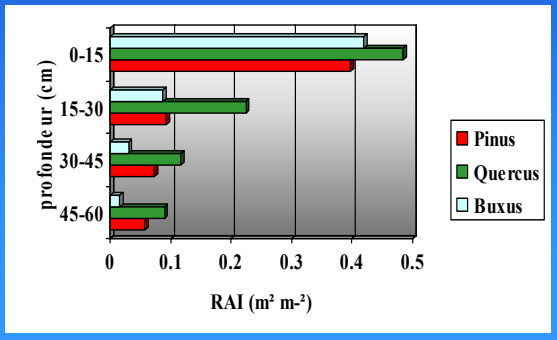


LAI

Moyenne : 2.6

Représentation des indices foliaire mesurés au LAI 2000 en prenant en compte le couvert pin + chêne
(Krigeage obtenu à partir de 111 points de mesure).

(N.B. : LAI basé sur photographies hémisphériques en cours de traitement)



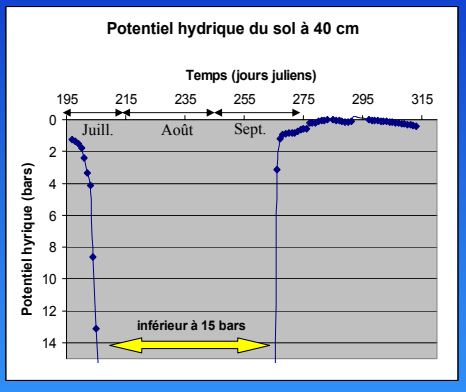
RAI

Moyenne : 2.1

Distribution des RAI
(surfaces racinaires/m²) en fonction des tranches de profondeur de sol :

le buis est présent surtout en surface.
Le chêne est , par rapport à son RAI total, davantage présent dans les couches Profondes du sol que le pin.

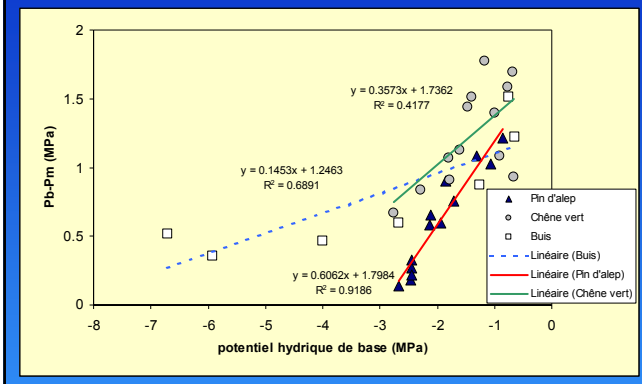
Résultats : teneur en eau du sol (2001)



Evolution du potentiel hydrique du sol à 40 cm entre juillet et octobre.

Lors de la saison sèche, on observe une chute quasi instantanée du potentiel en dessous de -15 bars, ici dès la mi-juillet, ce qui correspond à une très forte contrainte hydrique (eau difficilement extractible par les arbres).

Résultats : Comportement hydrique



Evolution de la différence Pb-Pm en fonction du potentiel de base (contrainte hydrique du sol croissante)

(Pb – Pm : gradient de pression traduisant l'intensité des échanges gazeux au niveau de la feuille)

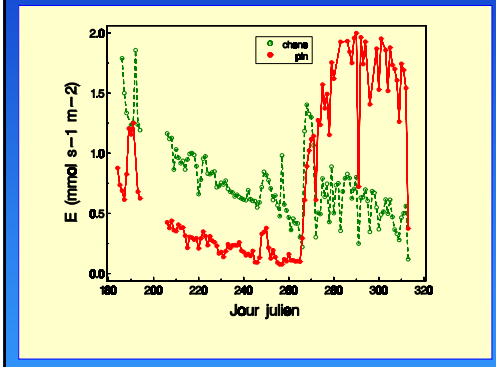
Pin ~ -3 MPa

Chêne ~ -4.8 MPa

Buis ~ -8.6 MPa

Le pin présente une décroissance très rapide en fonction du Pb et un arrêt de fonctionnement pour un « potentiel critique » de -3 MPa : espèce « évitante ».
Le buis est au contraire bien adapté à la contrainte, et peut fonctionner jusqu'à des valeurs proches de -8 MPa : « espèce tolérante ».
Le chêne présente un comportement intermédiaire, avec un seuil de fonctionnement vers -5 MPa.

Résultats : transpiration maximale (2001)



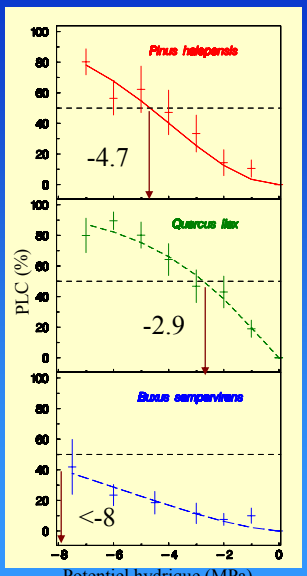
Evolution des transpirations maximales pour le pin et le chêne

-Valeurs maximales de E différentes suivant la période de l'année ;

- Le pin d 'Alep est très tôt affecté par la sécheresse estivale (espèce évitante) ;

- La reprise de la transpiration (qui intervient aux pluies d'automne) est durable chez le pin par rapport au chêne

Résultats : Vulnérabilité à la cavitation, tiges



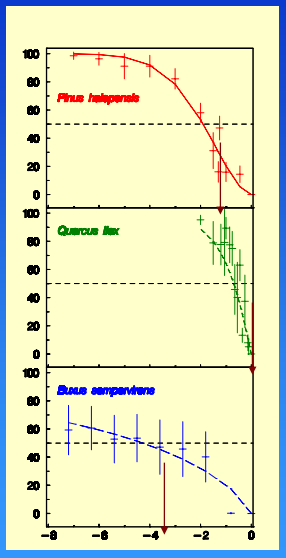
Vulnérabilité tiges

Q. ilex > P. halepensis > B. sempervirens

Courbes de vulnérabilité obtenues par pressurisation

La perte de conductivité induite à des paliers de pressions de plus en plus élevées est ici représentée pour des potentiels hydriques de plus en plus négatifs (valeur opposée à la pression appliquée).
Les valeurs de potentiel correspondant à 50 % de perte de conductivité sont indiquées par une flèche rouge.

Résultats : Vulnérabilité à la cavitation, racines



Vulnérabilité racines
Q. ilex > P. halepensis> B. sempervirens

Ψ PLC50 ≈ 2 MPa

Ψ PLC50 ≈ 0.7 MPa

Vulnérabilité du xylème à la cavitation
racines > tiges

Ψ PLC50 ≈ 4.3 MPa

Evolution du dispositif :

1 : *Modélisation du fonctionnement et de la croissance des arbres en peuplement mixte à partir d 'un modèle hydraulique sol-arbre et d 'une approche potentiel x réducteur (projet REA en cours)*

- Prise en compte de l 'effet de la contrainte hydriques saisonnière sur la croissance de chacune des espèces
- Evaluation des possibilités d 'extraction d 'eau en profondeur (chêne vert)

- Elargissement des collaborations : IMEP,Ecologie dendrochronologie; CEREGE, modélisation écophysiologique; Laboratoire de biogéochimie isotopique, T. Bariac

Evolution du dispositif :

2 : *« Impact du débroussaillement à objectif de Défense des forêts contre l 'incendie sur l 'Ecophysiologie et la croissance des strates arborées et arbustives d 'une formation à pin d 'Alep et chêne vert et conséquences sur l 'éclosion et la propagation initiale de l 'incendie de forêt » (projet labellisé GIS Incendies)*

4 parcelles expérimentales :

- témoin
- débroussaillée
- élimination des chênes
- élimination des pins

Xylem cavitation and xylem collapse in pine needle tracheids

Xylème 2003
Montpellier

Hervé Cochard
UMR-PIAF
INRA France

collaborations: Fabienne Froux
Stefan Mayr
Catherine Coutand

Two physical limitations to a water transport under negative pressures

Water vapor
(p ≈-0.1MPa)

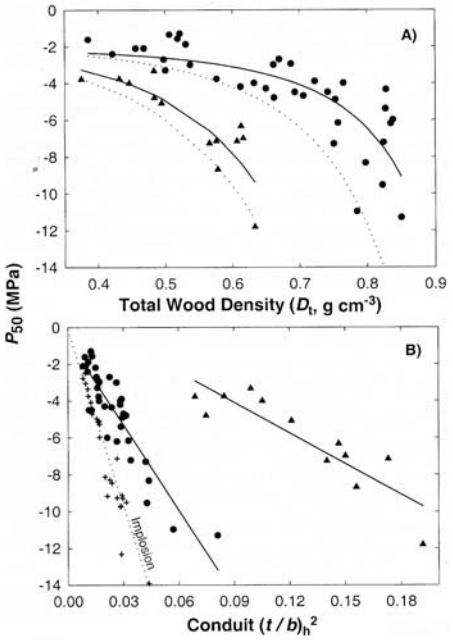
Air
(p ≈0MPa)

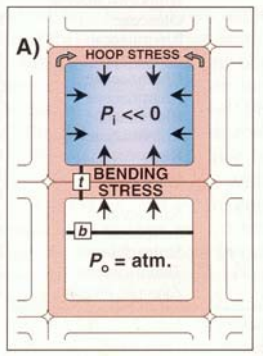
Sap Cavitation

Air Embolism

Wall Collapse

Densité du bois, anatomie et cavitation





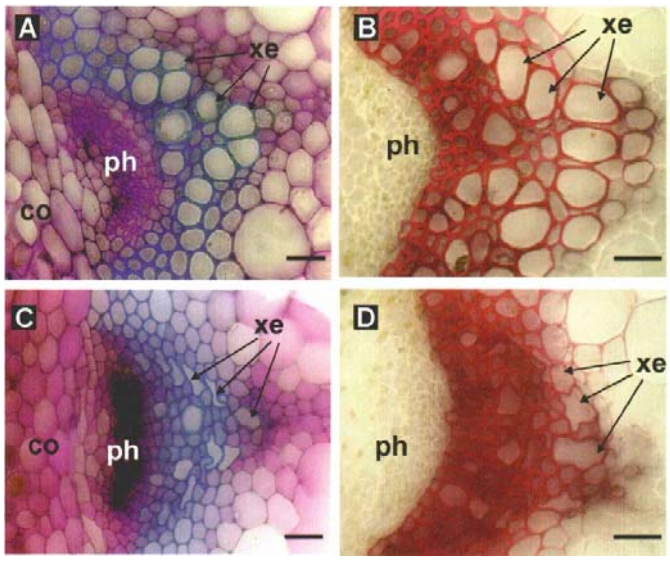
Hacke et al 2001 Oecologia 126:457-461

Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis

Wild type

Irx1 mutant

(deficient cellulose deposition in the secondary cell wall



Turner and Somerville 1997, The Plant Cell 9: 689-701

Collapsed xylem phenotype of Nicotiana

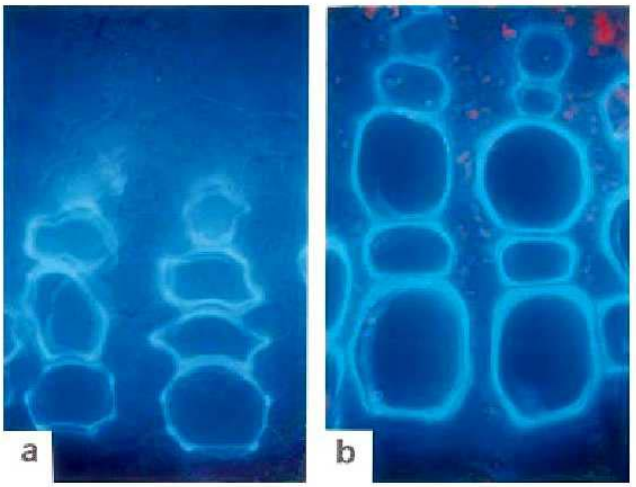


Figure 9. UV fluorescence of lignin in stem cross sections of transformant B3 (a) as compared to wild type (b). Magnification ×330.

Piquemal et al 1998 The Plant Journal 13, 71-83

Questions:

- Y a t'il un risque de collapse des parois pour des conduits xylémiens peu lignifiés (système vasculaire des feuilles par exemple)?
- La collapse des parois précède t'elle la cavitation?
- La collapse des parois évite t'elle la cavitation?
- La collapse des parois est'elle réversible?
- Y a t'il une variabilité génétique du risque de collapse?
- La collapse des parois est'elle synchrone avec la fermeture stomatique lors d 'une sécheresse?
- Quel rôle fonctionnel pour la collapse des parois?

Matériels et Méthodes

Aiguilles de 4 espèces du genre *Pinus (sylvestris, nigra, cembra, mugo)*

- trachéides peu lignifiées
- seuils de cavitation dans les tiges très contrastés
- facilité de mesure

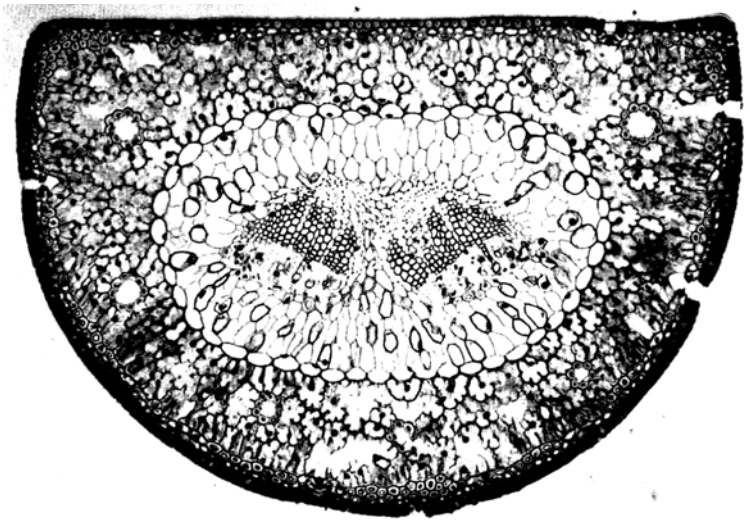
« Courbes de vulnérabilité à la collapse »:

- rameaux desséchés sur la paillasse
- mesure du potentiel hydrique du xylème
- aiguilles coupées à l'air et plongées dans LN2
- observation après cryofracture en Cryo-SEM à -150°C
- (observation en épifluorescence à -80°C)

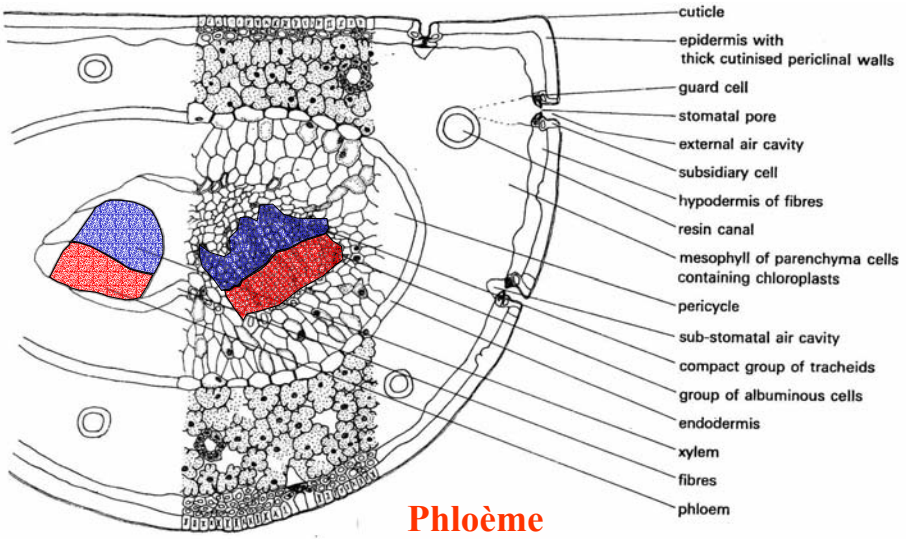
Cinétique de collapse sur Pinus nigra en pot

- cycle sécheresse édaphique en chambre climatisée
- mesure transpiration et potentiels hydiques
- échantillonnage d'aiguilles pour observation en Cryo-SEM

Anatomie d'une aiguille de Pin



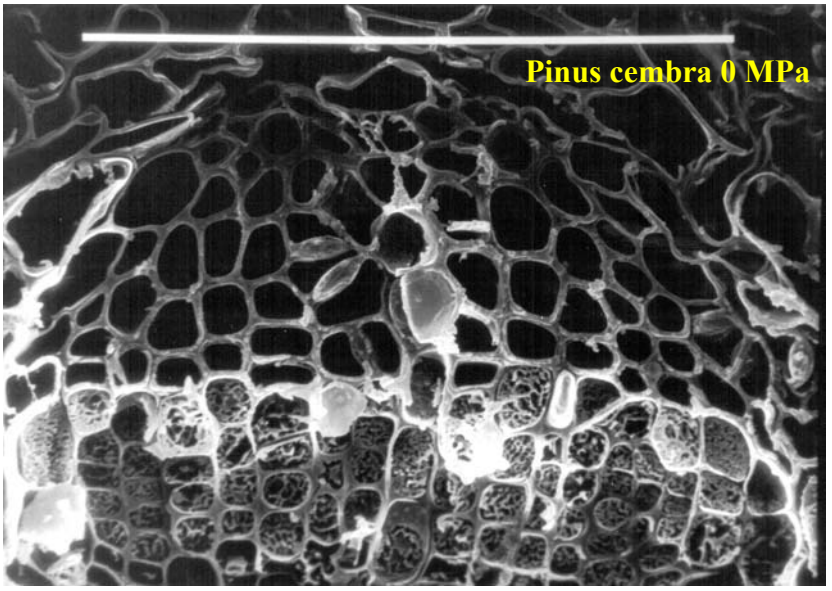
Anatomie d'une aiguille de Pin

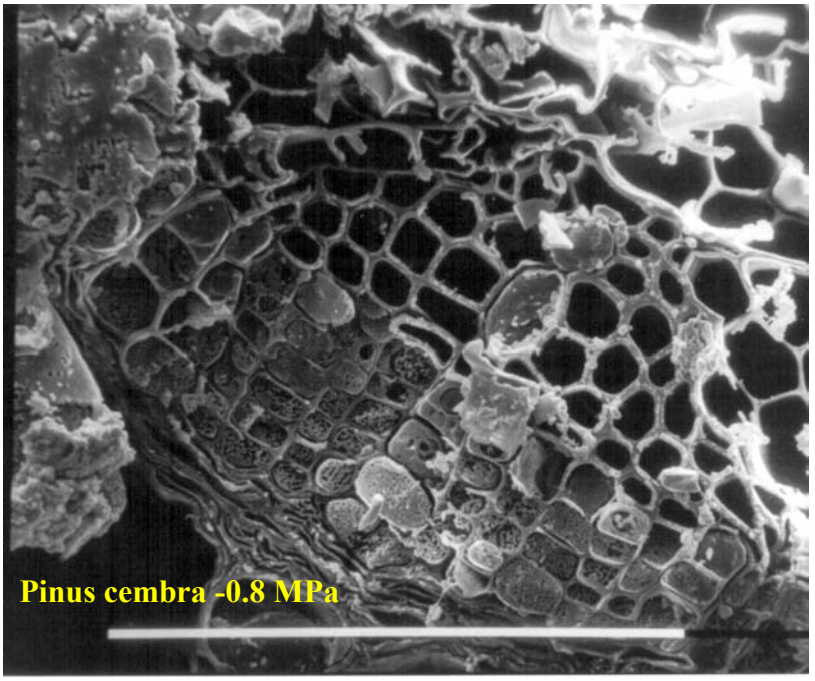


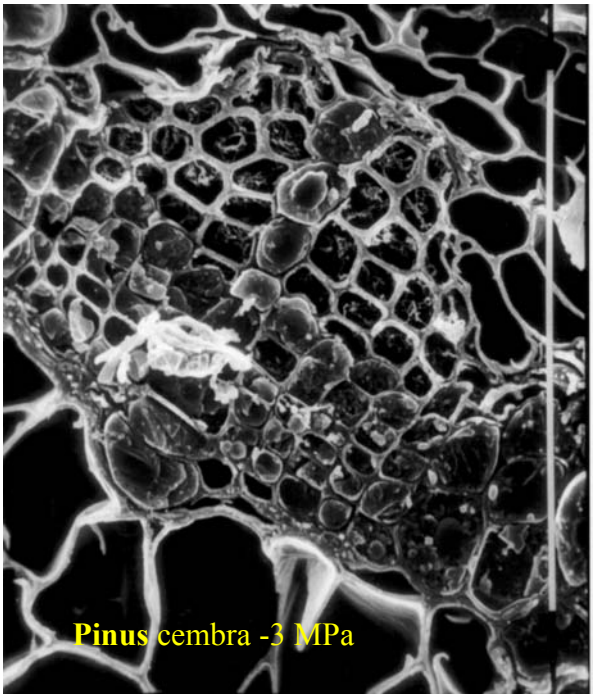
Phloème

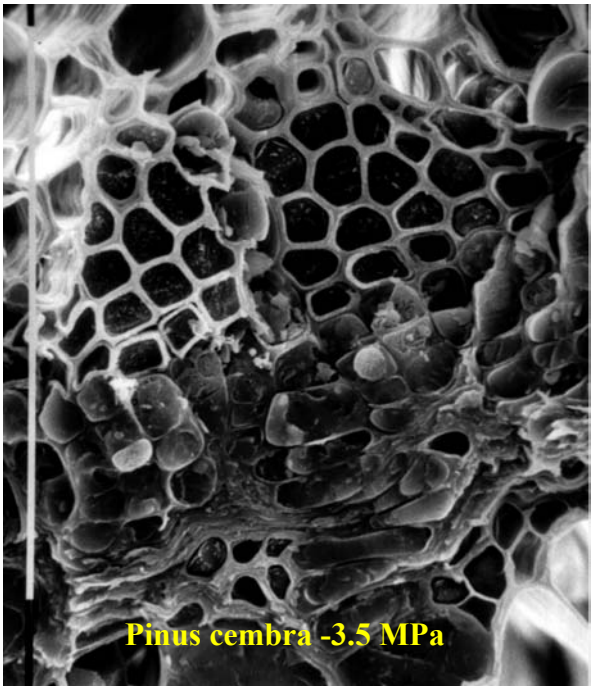
Xylème

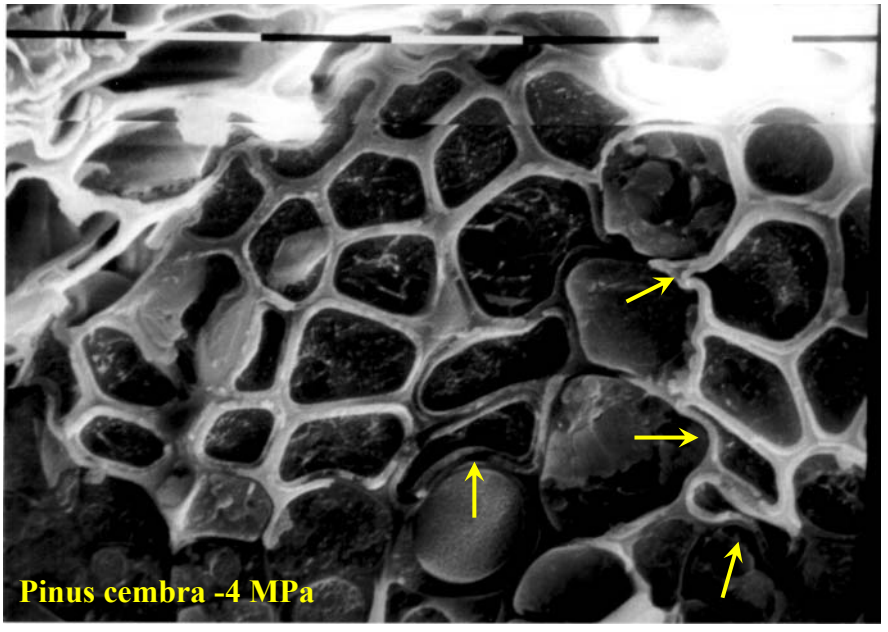
Vulnérabilité à la collapse: exemple de *Pinus cembra*

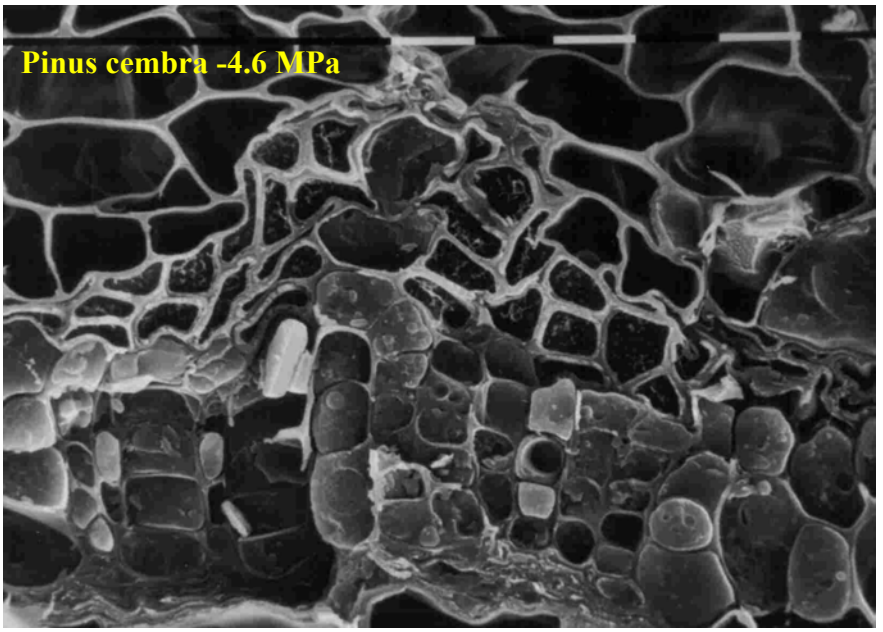


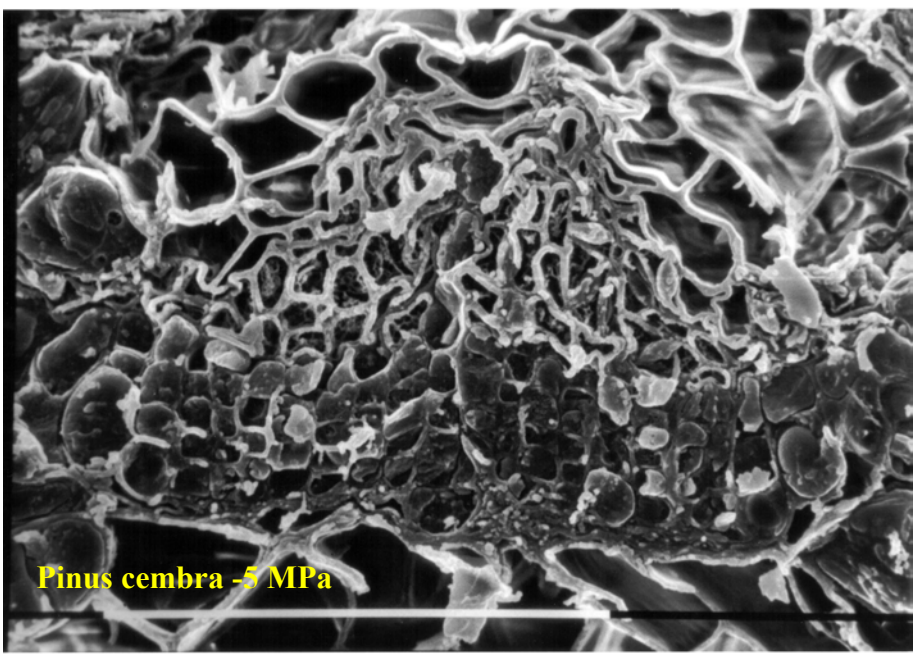

Pinus cembra -0.8 MPa

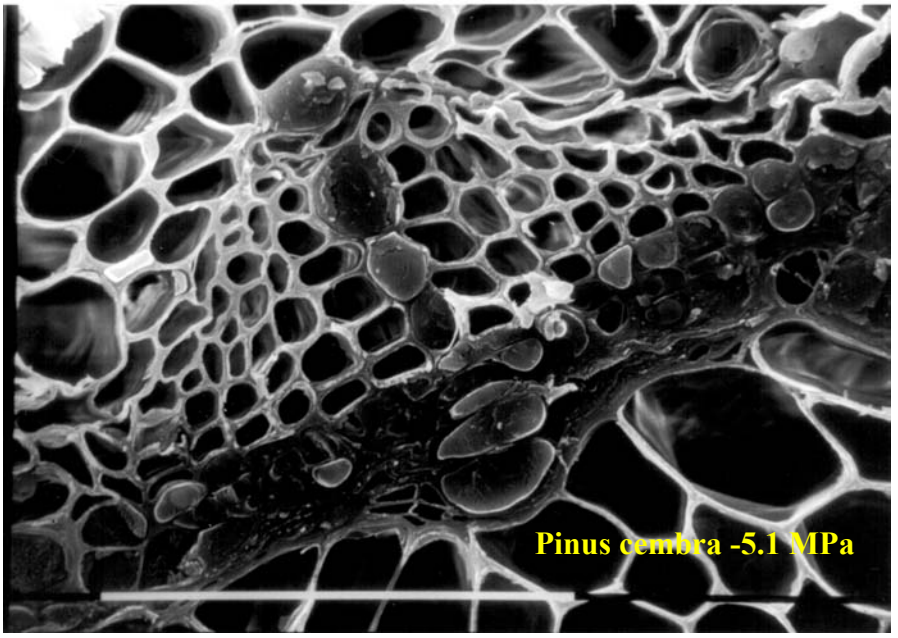

Pinus cembra -3 MPa


Pinus cembra -3.5 MPa

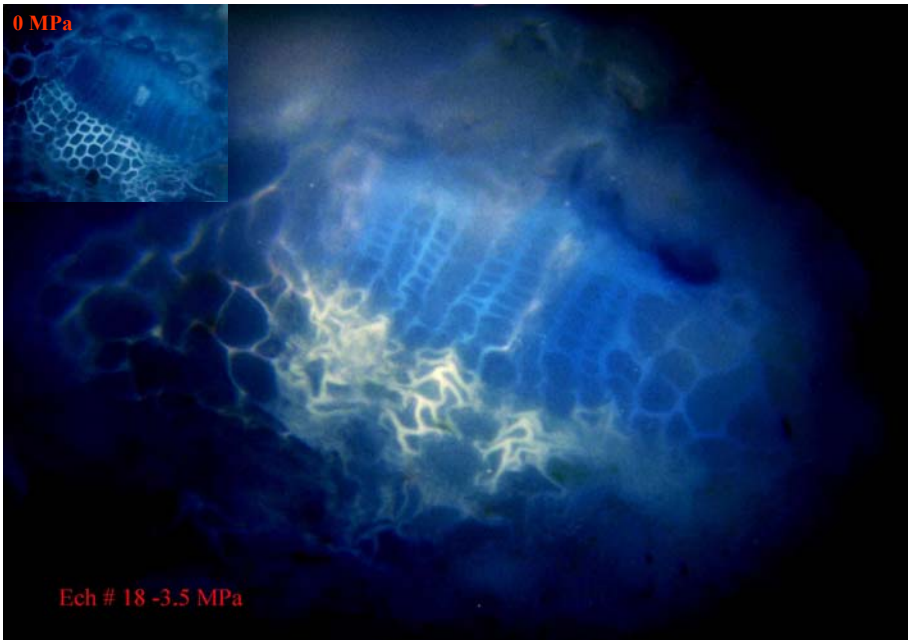

Pinus cembra -4 MPa


Pinus cembra -4.6 MPa

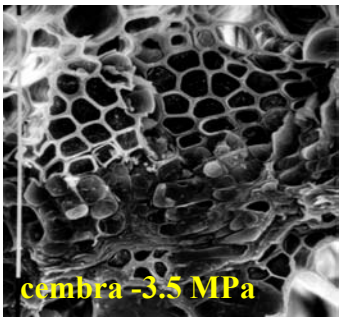

Pinus cembra -5 MPa

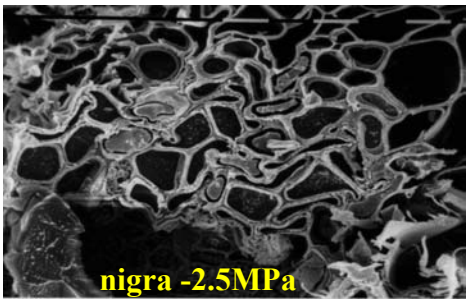


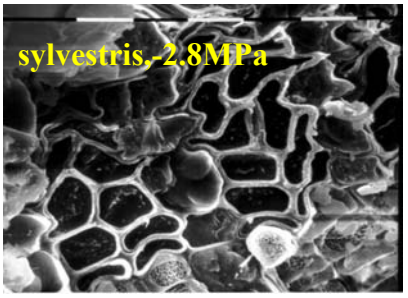
Mesures optiques en autofluoresence (*P nigra*)

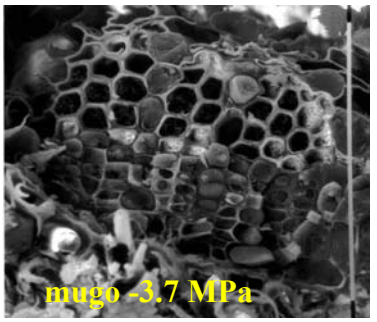


Variabilité spécifique ?







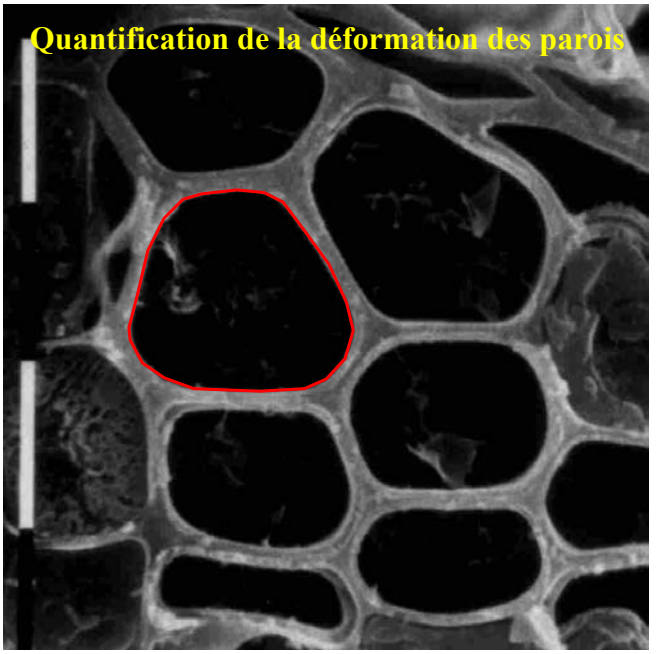


Périmètre: P

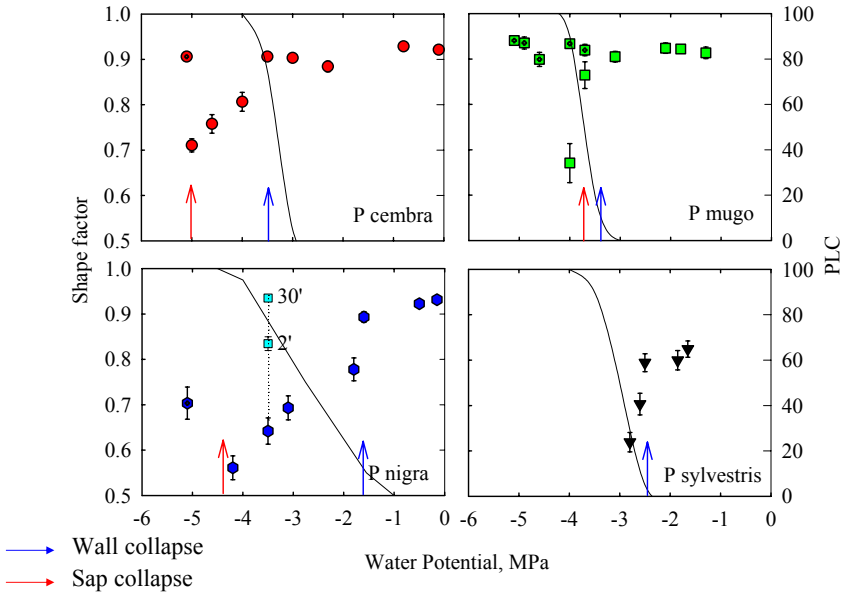
Aire: A

« rotondité »:
$A^{1/2}/P * 2\Pi^{1/2}$

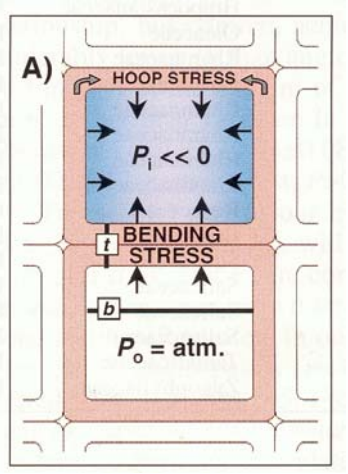
Sans dimension
varie entre 0 et 1
= 1 pour un cercle



« courbes de vulnérabilité à la collapse »



Pourquoi des seuils de collapse variable?

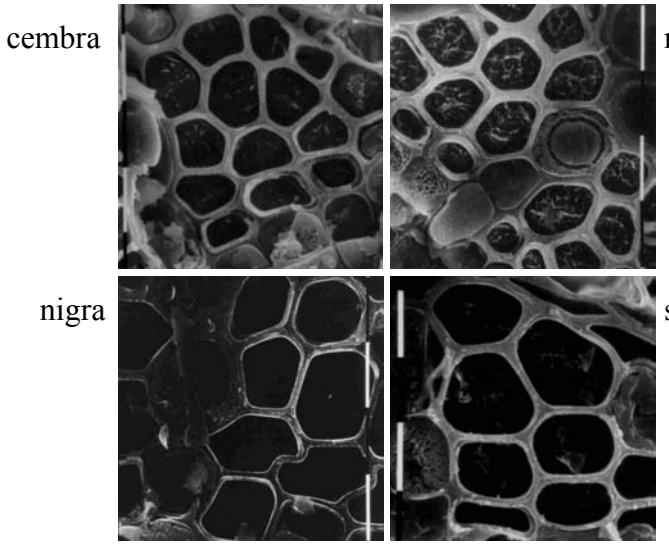


La rigidité mécanique d 'un conduit est fonction de du rapport :

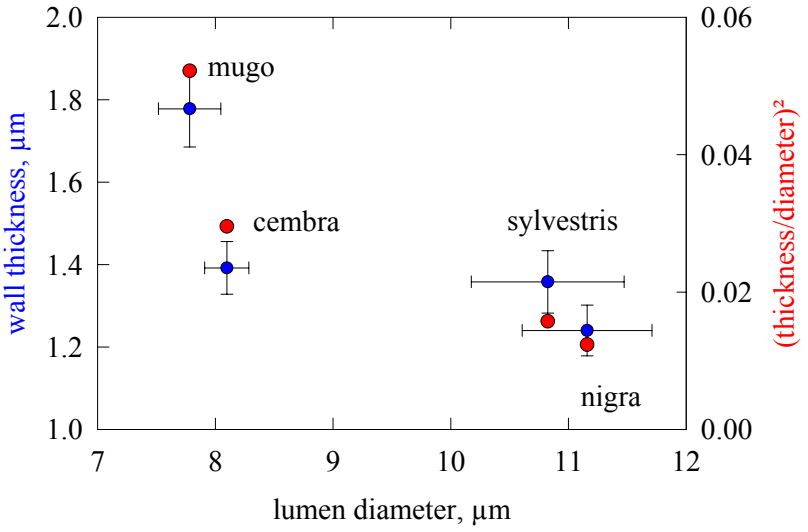
$$(t/b)^2$$

(Hacke et al 2001; Niklas 1992)

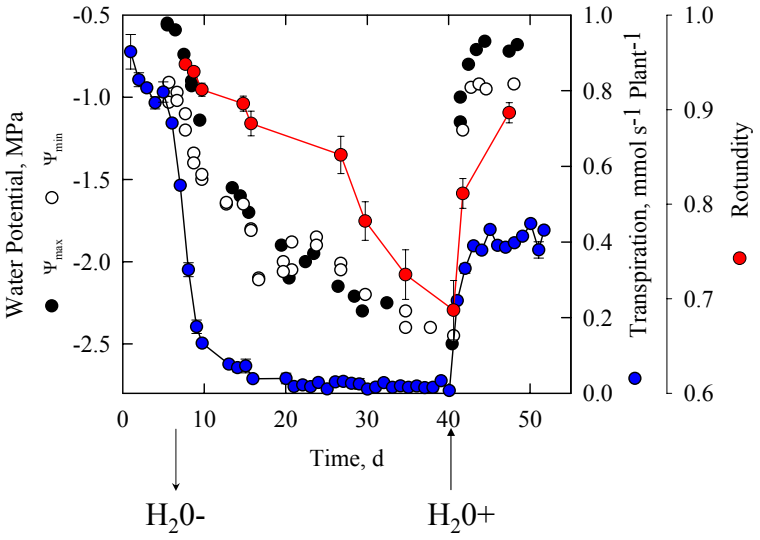
Anatomie comparée des 4 espèces

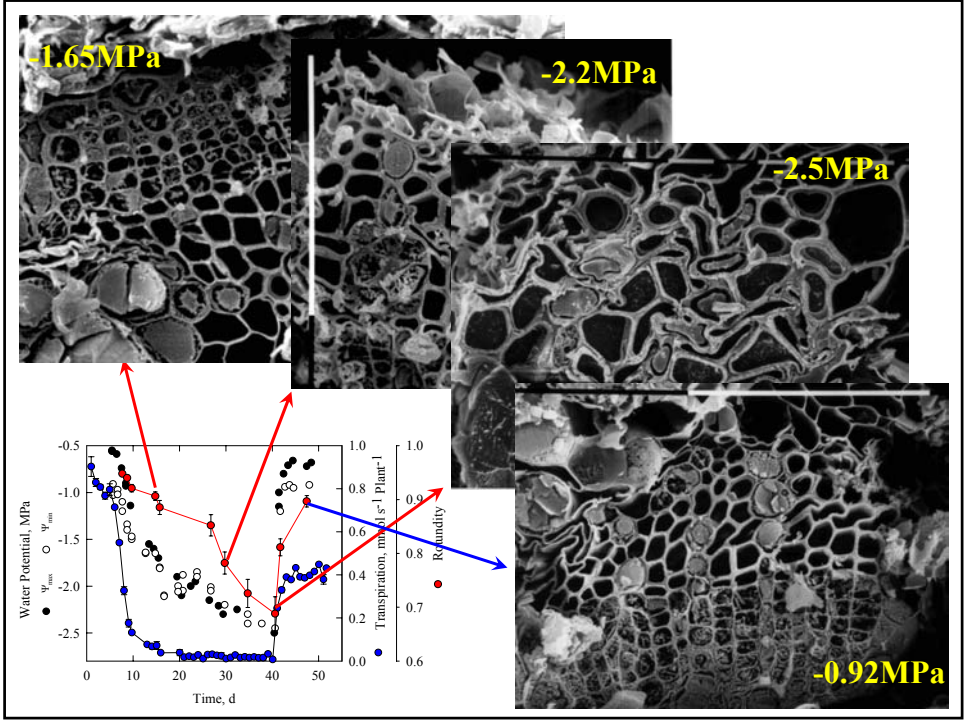


Anatomie comparée des 4 espèces

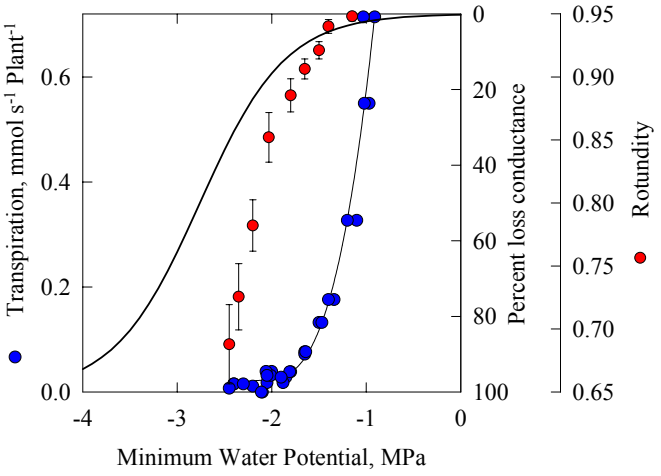


Y a t 'il collapse des parois *in planta* lors d'une sécheresse?





Collapse, cavitation, régulation stomatique...



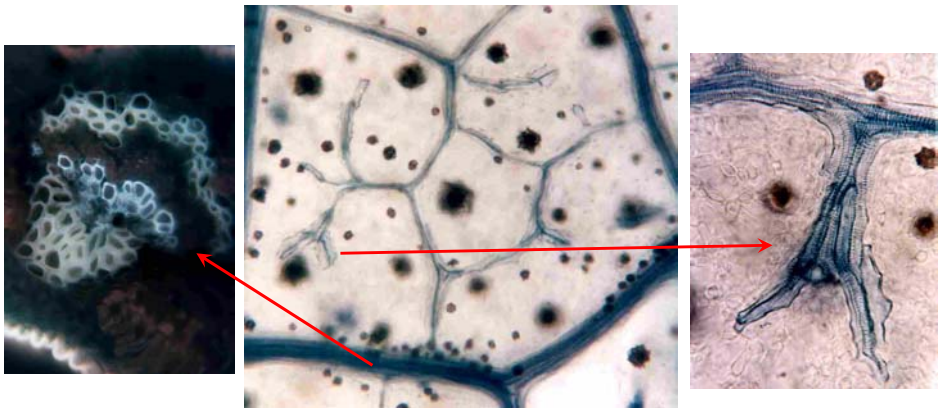
Conclusions

- Y a t 'il un risque de collapse des parois pour des conduits xylémiens peu lignifiés (système vasculaire des feuilles par exemple)? oui
- La collapse des parois précède t'elle la cavitation? oui
- La collapse des parois évite t'elle la cavitation? oui?
- La collapse des parois est'elle réversible? oui
- Y a t'il une variabilité génétique du risque de collapse? oui
- La collapse des parois est'elle synchrone avec la fermeture stomatique lors d'une sécheresse? + ou -
- Quel rôle fonctionnel pour la collapse des parois?
  - Eviter la cavitation?
  - Résistance hydrauliques variables très distales
  - Signal hydraulique précoce?
  - Illustre le compromis efficience/sûreté

Perspectives:

Analyse biomécanique du xylème (C Coutand et G Jeronimidis)

Extension à d'autres espèces (Angiospermes)



Juglans regia

Xylem Wall Collapse in Water-Stressed Pine Needles

Hervé Cochard*, Fabienne Froux, Stefan Mayr, and Catherine Coutand

Unité Mixte de Recherche Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier, Institut National de la Recherche Agronomique/Université Blaise Pascal, Site de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand, France (H.C., C.C.); Unité Mixte de Recherche Ecologie et Ecophysiologie Forestière, Institut National de la Recherche Agronomique-Université Henri Poincarré Nancy 1, Boite Postale 239, 54506 Vandoeuvre, France (F.F.); and Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Sternwartestrasse 15, A–6020 Innsbruck, Austria (S.M.)

Wall reinforcement in xylem conduits is thought to prevent wall implosion by negative pressures, but direct observations of xylem geometry during water stress are still largely lacking. In this study, we have analyzed the changes in xylem geometry during water stress in needles of four pine species (*Pinus* spp.). Dehydrated needles were frozen with liquid nitrogen, and xylem cross sections were observed, still frozen, with a cryo-scanning electron microscope and an epifluorescent microscope. Decrease in xylem pressure during drought provoked a progressive collapse of tracheids below a specific threshold pressure ($P_{collapse}$) that correlates with the onset of cavitation in the stems. $P_{collapse}$ was more negative for species with smaller tracheid diameter and thicker walls, suggesting a tradeoff between xylem efficiency, xylem vulnerability to collapse, and the cost of wall stiffening. Upon severe dehydration, tracheid walls were completely collapsed, but lumens still appeared filled with sap. When dehydration proceeded further, tracheids embolized and walls relaxed. Wall collapse in dehydrated needles was rapidly reversed upon rehydration. We discuss the implications of this novel hydraulic trait on the xylem function and on the understanding of pine water relations.

In vascular plants, xylem sap is transported under negative pressure in lignified conduits (Pockman et al., 1995). From a physical point of view, such a transport is constrained by two major limitations: (a) a risk of collapse of the water columns; and (b) a risk of collapse of the conduit walls. The first constraint originates from the metastable state of water under negative pressures. Under such conditions, vapor nucleation can occur, disrupting the water columns in the xylem and therefore the sap flow. This phenomenon is referred to the risk of cavitation. The second physical limitation, wall collapse, is due to the centripetal forces exerted on conduit walls that may implode if wall mechanical reinforcement is deficient.

Over the past decades, the risk of xylem cavitation in upper plants has received considerable attention. Significant advances were obtained after techniques for detecting cavitation events acoustically (Milburn, 1966; Tyree and Dixon, 1983) or hydraulically (Sperry et al., 1988) were introduced. These techniques confirmed that xylem transport can remarkably operate under large negative pressures for prolonged periods. Cavitation occurs when plants are exposed to severe drought and pressures exceed species-specific thresholds. These thresholds are determined by the structure of pit membranes in the xylem wall because cavitation is thought to be caused by the aspiration of an air bubble through these membranes (Zimmermann, 1983; Sperry and Tyree, 1988). In the recent literature, results obtained with new techniques have suggested that the risk of xylem cavitation was much more pronounced than previously thought (Zimmermann et al., 1994; Canny, 1995). However, more recent studies (Wei et al., 1999; Cochard et al., 2000) have demonstrated that cavitation was overestimated in these studies.

The risk of xylem wall collapse has yet received very little attention. It has long been recognized that lignification of xylem conduit walls was a mechanical adaptation to prevent vessel implosion and support plant body (Raven, 1987). However, experimental evidences and theoretical considerations for the risk of xylem wall collapse are largely lacking. Johnson (1977) has reported xylem wall bending between the helicoidal thickening of a water lily, but xylem pressures were not recorded in this study. *Vigna* sp. plants grown in presence of a lignin inhibitor exhibited collapsed xylem conduits (Smart and Amrhein, 1985). More recently, xylem wall collapse in Arabidopsis mutants deficient in cellulose deposition in their secondary cell wall has been reported (Turner and Somerville, 1997; Taylor et al., 1999). A similar pattern was shown in transformed *Nicotiana* sp. plants (Hepworth and Vincent, 1998; Piquemal et al., 1998). Furthermore, a striking correlation between xylem vulnerability to cavitation and wall resistance to bending stress has been established (Hacke et al., 2001). All of these results suggest that the risk of xylem collapse was an evolutionary constraint for vascular plants. However, to the best of our knowledge, there is no direct evidence of xylem collapse in planta to substantiate this hypothesis.

* 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.103.028357.

The objective of this study was to analyze, in planta, the concurrent patterns of xylem cavitation and xylem wall collapse during water stress in the needles of four *Pinus* spp. Because the xylem structure in conifers is fairly homogeneous and regular, this simplified the observations and the calculations. We have developed different techniques to observe both tracheid collapse and cavitation. These patterns were compared with the patterns of stomatal closure and water loss regulation during drought.

RESULTS

Xylem Anatomy

Tracheid dimensions differed significantly between species (Table I). The two alpine species exhibited smaller tracheid lumen (b) and thicker wall (t) and, as a result, much larger $(t/b)^2$ values (an estimate of wall resistance to bending stress).

Xylem Collapse in Excised Shoots

When pine shoots where dehydrated on a bench, we observed a progressive collapse of tracheid wall in the needle only when a threshold water potential was reached. The collapse patterns are shown qualitatively on the pictures in Figure 1 for *P. cembra* and quantified for all of the four species on the graphs in Figure 2. Figure 1, a to f, shows vascular bundles of *P. cembra* needles at different xylem pressures observed with the cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) technique. In well-hydrated (control) needles (Fig. 1a), tracheids were all sap filled and almost circular. When P_{xylem} was decreased to −3.5 MPa (Fig. 1b), virtually no change was noticed. At −4 MPa (Fig. 1c), tracheids walls started to bend especially where in contact with living parenchyma cells (see arrows in Fig. 1c). At −4.6 MPa (Fig. 1d), all of the tracheids were severely distorted, but their lumen were still filled with sap. At −5 MPa (Fig. 1e), walls were so distorted that it was difficult to distinguish tracheid lumens. Finally for leaf water potential (Ψ_{leaf}) below −5.1 MPa (Fig. 1f), tracheids were distinctly filled with gas (embolized), and their walls were relaxed.

Observations of frozen *Pinus nigra* needle cross sections with the epifluorescent technique yielded similar results: Tracheids in control samples appeared circular (Fig. 1g) and were completely collapsed at −3.5 MPa (Fig. 1h). We noticed that wall collapse rapidly disappeared when samples were returned to ambient temperatures.

The patterns of wall deformation in pine needle tracheids were quantified by their isoperimetric quotient (Q). For the all of the species, we found that tracheid perimeter and xylem pressure were not statistically correlated ($P = 0.05$; needles with embolized tracheids were excluded from the analysis), suggesting that tracheids remained isoperimetric during dehydration. Figure 2 gives the changes in tracheid Q versus xylem pressure for the four pine species. From these graphs, it is clear that wall collapse occurred only when P_{xylem} dropped below a threshold value $P_{collapse}$. Above $P_{collapse}$, Q was constant and not significantly different from Q for controls. $P_{collapse}$ varied greatly between species (Table I) with *P. nigra* being the most vulnerable species (−1.8 MPa) and *P. cembra* the least (−3.5 MPa). When P_{xylem} decreased below $P_{collapse}$, Q dropped progressively until tracheids embolized ($P_{cavitation}$). Q values of embolized tracheids were not different from that of controls for *P. cembra* and *Pinus mugo* (Fig. 2, white symbols). $P_{cavitation}$ values were very low, below −4 MPa, and not correlated with $P_{collapse}$ ($r^2 = 0.03$). Scots pine (*Pinus sylvestris*) samples were not dehydrated down to the point of leaf tracheid cavitation.

When *P. nigra* needles at −3.5 MPa were rehydrated before freezing, the collapsed wall recovered within minutes (Fig. 3). After 30 min of rehydration, Q values were not significantly different from those of well-watered leaves. Cryo-SEM observations of leafy stems suggested that tracheids cavitated before exhibiting detectable wall deformation.

Figure 4 shows the predicted changes in needle xylem hydraulic conductance during dehydration. These graphs represent "vulnerability curves" for water stressed-induced wall collapse. For the reason that percent loss of xylem conductance in the needles (PLC) values scale to Q^3, it can be predicted that wall collapse had a considerable effect on xylem conduc-

Table I. *Xylem anatomical and functional properties for four pine species*

Axis cavitation pressures are from published data for *P. mugo* (Mayr et al., 2003a), *P. cembra* (Mayr et al., 2003b) *P. nigra* (Froux et al., 2002), and *P. sylvestris* (Cochard, 1992). Means ± SE. Across species, data having a letter in common are not significantly different at $P = 0.01$ (t test).

	P. mugo	*P. cembra*	*P. sylvestris*	*P. nigra*
Maximum diameter (b, μm, $n = 30$)	7.78 ± 0.27a	8.1 ± 0.19a	11.6 ± 0.41b	11.8 ± 0.35b
Minimum diameter (μm, $n = 30$)	5.94 ± 0.25a	6.31 ± 0.24a	8.49 ± 0.5b	8.26 ± 0.29b
Wall thickness (t, μm, $n = 60$)	1.9 ± 0.03a	1.44 ± 0.03b	1.46 ± 0.03b	1.31 ± 0.03c
$(t/b)^2$ ($n = 30$)	$6.73e^{-2} \pm 5.9e^{-3}$a	$3.43e^{-2} \pm 2.4e^{-3}$b	$1.75e^{-2} \pm 1.4e^{-3}$c	$1.4e^{-2} \pm 1.2e^{-3}$c
Needle collapse pressure (MPa)	−3.4	−3.5	−2.6	−1.8
Needle cavitation pressure (MPa)	−3.7	−5.0	–	−4.2
Stem cavitation pressure (MPa)	−3.3	−3.0	−2.6	−1.8

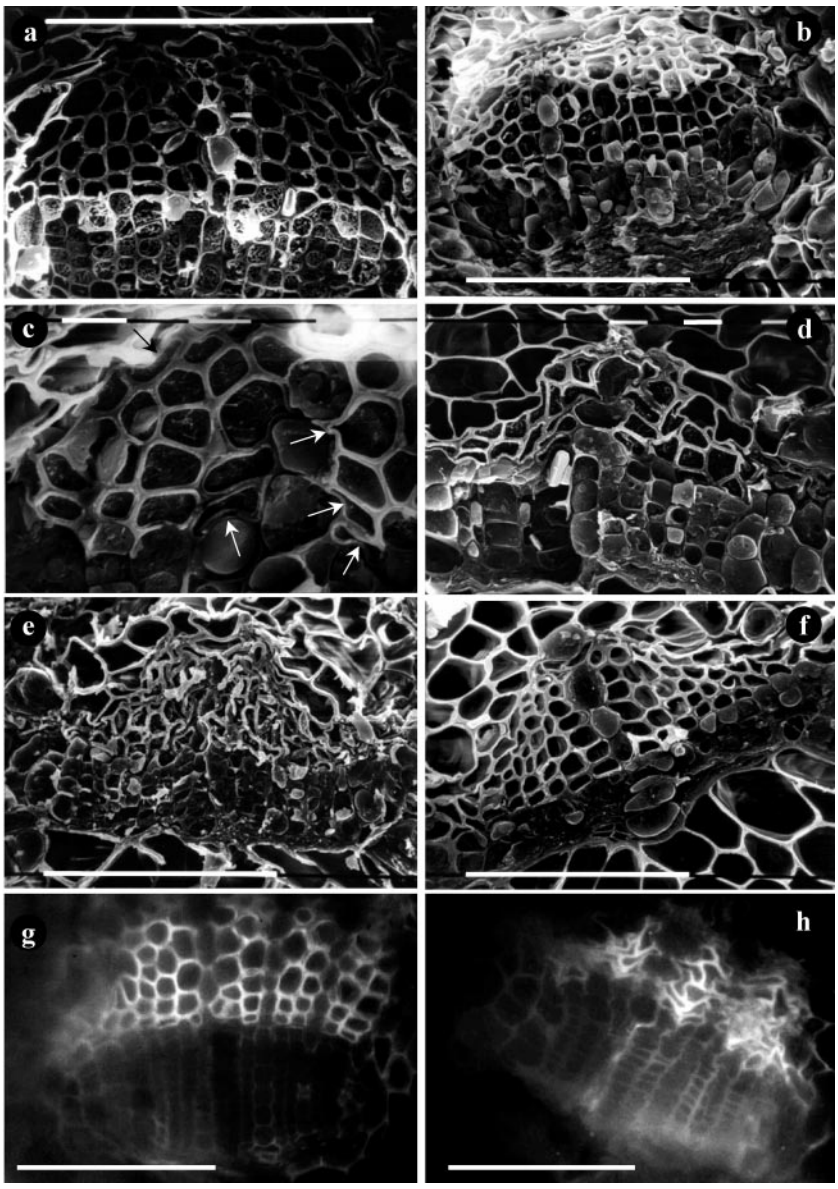


Figure 1. Representative pictures of vascular bundles in pine needles exposed to different xylem pressures. a to f, Vascular bundles in *P. cembra* observed with the Cryo-SEM technique on frozen samples coated with gold. g and h, Bundles in *P. nigra* observed with the epifluorescent technique on frozen samples. The xylem is oriented upwards and the phloem downwards. Xylem pressures were: a, 0 MPa; b, −3.5 MPa; c, −4 MPa; d, −4.6 MPa; e, −5 MPa; f, −5.1 MPa; g, 0 MPa; h, −3.5 MPa. The arrows in c indicate early collapses of tracheid walls in contact with living cells. The white bars = 100 μm except for c and d (10 μm).

tance, with more than 80 PLC noticed for the most severely collapsed samples.

Xylem Collapse in a Potted *P. nigra* Sapling

Figure 5 shows the time courses of water relations and xylem collapse of a *P. nigra* sapling exposed to a soil drought cycle. Drought effects on water relations were typical of a drought-avoiding species: Transpiration was drastically reduced a soon as drought was induced and Ψ_{leaf} started to decrease. Ten days after drought induction, stomata were completely closed, and Ψ_{leaf} values were close to −2 MPa. At that time, the differences between Ψ_{leaf} values measured in the dark or in the light were not distinguishable by our technique. This justified the hypothesis that Ψ_{leaf} equaled P_{xylem} in dehydrating shoots. After rewatering, Ψ_{leaf} recovered within 2 d but plant transpiration was reduced to one-half of its value before treatment. Significant changes in tracheid Q were noticed on the early stage of drought. Tracheids on the sides of the vascular bundles tended to collapse first. At the end of the drought treatment, most of the tracheids were collapsed, but their lumen was still filled with sap. After rehydration, Q values rapidly returned to control values.

DISCUSSION

In this study, cryo-SEM and epifluorescent observations revealed the existence of collapsed tracheids in dehydrated pine needles. To our knowledge, this is the first direct evidence of a water stress-induced xylem wall collapse in planta. We will analyze our results in terms of xylem anatomy and discuss the

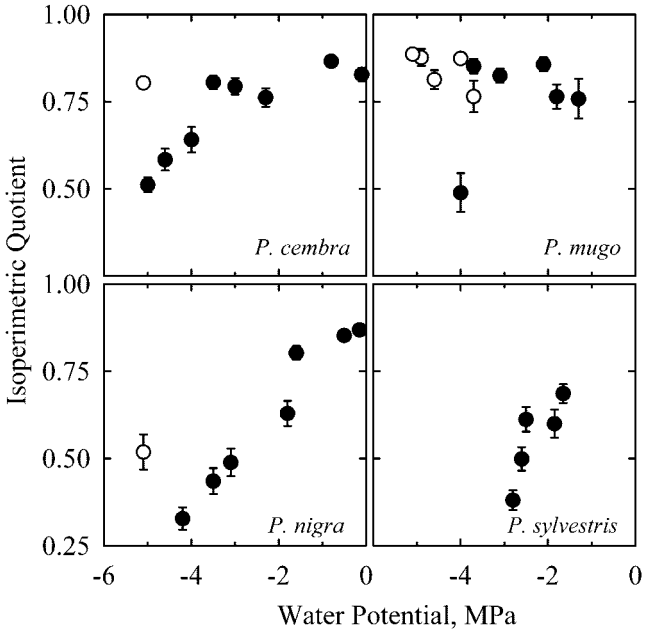


Figure 2. Tracheid Q versus Ψ_{leaf} in bench dehydrated shoots of four pine species. Q equals 1 for a circle and decreases with tracheid eccentricity. White symbols are for embolized (air-filled) tracheids. Errors bars are SE (n = 39 on average).

significance of this novel hydraulic trait for the understanding of pine water relations during drought.

Pine needles in this work were dehydrated and frozen in liquid nitrogen (LN_2) for cryo-SEM observations. The possibility that xylem wall collapse was an artifact of the freezing procedure seems low if we consider the following points. First, sap volume expand by 10% upon freezing, therefore tracheids lumen area might have been overestimated (6.5% increase). Second, tracheid wall geometry in moderately dehydrated needles (Fig. 1, a and b) and air filled tracheids (Fig. 1f) were similar. Finally, wall deformation was restricted to the vascular bundles and affected only xylem tracheids. When pine needles were dehydrating, we noticed an overall shrinkage of the needle so one may wonder if the xylem collapse was caused by negative sap pressures or compressive forces exerted by the surrounding tissues. We are confident with the former explanation for three reasons: First, the vascular bundles are surrounded by a pericycle composed of large thin-walled cells. If compressive forces were the cause of xylem collapse, then cells in the pericyle would have collapsed well before tracheids in the xylem. This was not the case. Second, when xylem cavitation occurred in severely dehydrated needles and thus xylem pressure was released to atmospheric, the patterns of collapsed walls disappeared (Fig. 1f). Finally, wall collapse was not observed in the phloem or parenchyma cells because the turgor pressures are much higher in living cells than in xylem conduits (Tyree, 1976). We are thus confident with the interpretation that highly negative sap pressures caused xylem wall collapses in this study.

From a mechanical point of view, large pipes with thin walls are more vulnerable to wall collapse (Niklas, 1992). Qualitatively, tracheid collapse in planta obeyed this law. Thin-walled tracheids on the sides of a vascular bundle tended to collapse first (Fig. 1c). Furthermore, walls in contact with living cells where more prone to collapse. This fact might be explained by two nonexclusive reasons. First, living cells have thinner and thus weaker walls. Second, there is a greater pressure difference across the wall because pressure is usually positive in living cells and negative in xylem conduits.

Between species, vulnerability to collapse was also related to tracheid anatomy, the most vulnerable species having tracheids with large lumens (b) and thin walls (t). Hacke et al. (2001) have proposed that, at the conduit level, wall resistance to bending stress scales with $(t/b)^2$. The relation between $P_{collapse}$ and $(t/b)^2$, although negative as expected, was rather weak (r^2 = 0.57) for tracheids in pine needles. Furthermore, predictions of wall collapse pressures using their equation yield values two to six times more negative than the actual $P_{collapse}$ values. This suggests that one or more assumptions in their study did not apply to our data. It is probably necessary to take into account explicitly the multicellular and heterogeneous structure of the xylem tissue and the actual tracheid wall shape. It is worth noting that vulnerabilities to cavitation and wall collapse for tracheids in the needles were not correlated (r^2 = 0.03). Apparently, wall properties determined the risk of collapse but had no impact on cavitation thresholds. Interestingly, the difference between $P_{cavitation}$ and $P_{collapse}$ was highly correlated with wall mechanical properties $(t/b)^2$: The weaker the wall, the higher the dif-

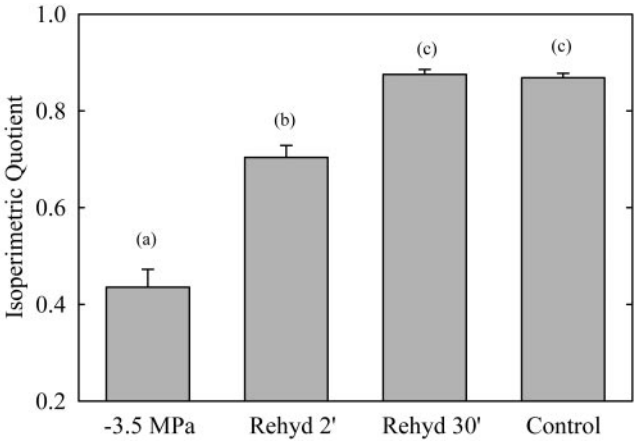


Figure 3. Change in tracheid Q during needle rehydration. Q was measured for needles of *P. nigra* dehydrated to −3.5 MPa and frozen intact for 2 or 30 min after rehydration. Q values for needles at −0.15 MPa are given as control values for well-hydrated needles. Treatments having a letter in common are not statistically different at P = 0.05. Error bars represent one SE.

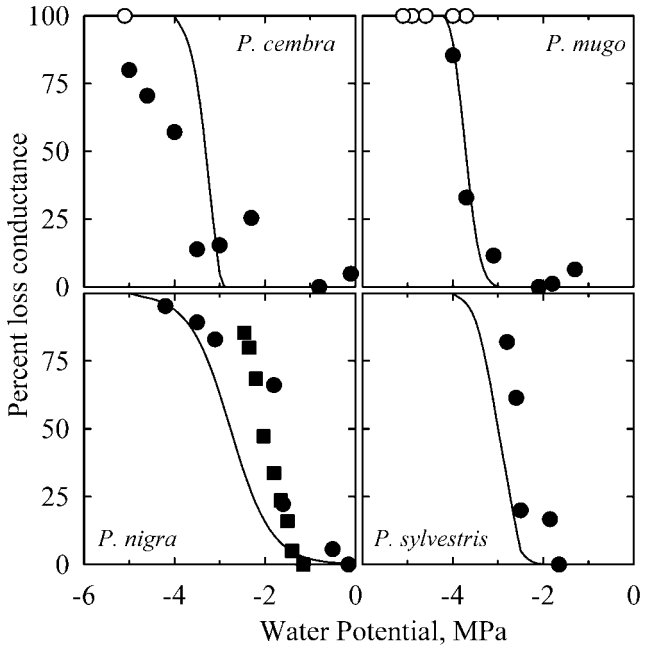


Figure 4. Predicted loss of needle xylem conductance due to wall collapse versus Ψ_{leaf} for bench dehydrated and pot dehydrated (*P. nigra* squares) pine shoots. White symbols are for embolized tracheids. Lines represent stems vulnerability to cavitation (data from previous works; see refs. in the text).

ference ($r^2 = 0.99$). In other words, it seems that when walls collapse during water stress, the risk of cavitation is avoided or delayed. In conifers, cavitation occurs when pit membranes are disrupted (Sperry and Tyree, 1990), but the mechanism by which wall collapse could lower tracheid vulnerability remains unclear.

What is the physiological significance of xylem wall collapse during water stress in pine? A thorough answer to this question will be possible only when the phenomenon has been documented for a larger number of environmental conditions. However some reasonable speculations can be formulated from the results in this study. Pines respond to soil drought by closing their stomata to reduce water losses. The mechanisms triggering stomatal closure during water stress are still poorly understood and probably very complex (Cochard et al., 2002). It has been suggested that stomata may close in response to hydraulic signals and that early cavitation events in the leaf veins might trigger stomatal closure (Comstock and Mencuccini, 1998; Sperry, 2000; Salleo et al., 2001). This was clearly not the case for the pine species in this study, because tracheid cavitation occurred at a very high degree of dehydration. However, stomata may have responded to earlier cavitation events in the stems. Wall collapse reduced lumen area and accordingly considerably increased tracheid hydraulic resistance to water flow. Therefore, wall collapse might also cause hydraulic signals and trigger stomatal closure. To better unravel the mechanism, it is important to consider the timing of events during a drought period. For the four species we have documented, there is a significant statistical correlation ($r^2 = 0.93$) between the onset of wall collapse in the needles and cavitation in the twigs (see Table I; lines on Fig. 4). Alpine *Pinus* spp. are resistant to cavitation because they are exposed to severe dehydration during the winter period when soil is frozen (Mayr et al., 2003b, 2003a). The more detailed information we have for *P. nigra* suggests that wall collapse is an earlier phenomenon than stem cavitation. This can be seen on Figure 6 where plant transpiration, stem embolism, and wall collapse in the needles are expressed as a function of Ψ_{leaf}. When plant transpiration was reduced to zero, stem embolism was still low, but tracheids conductance was already severely

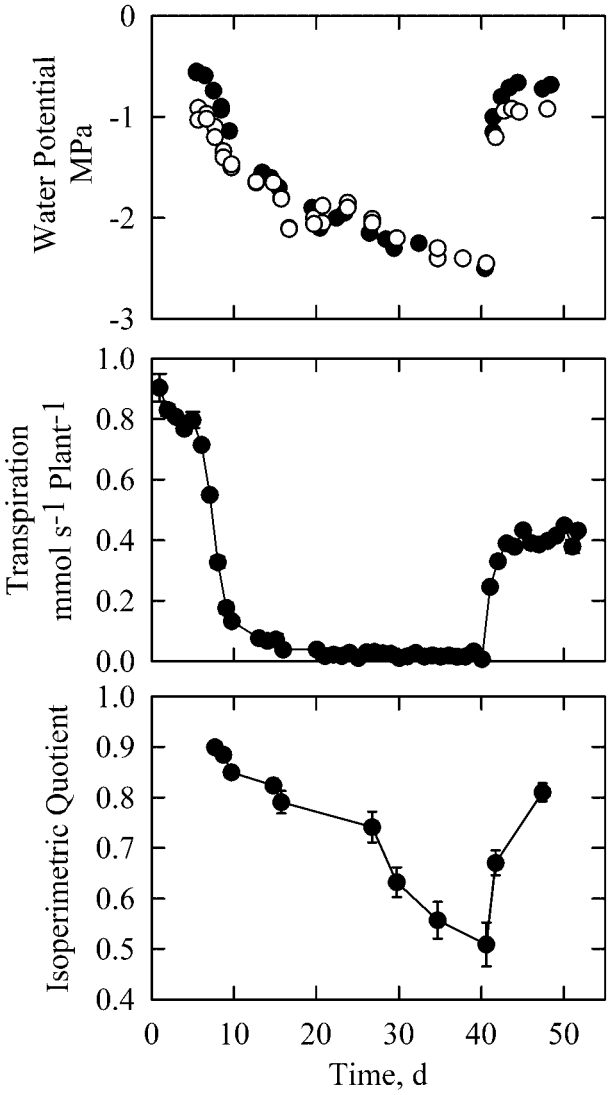


Figure 5. Time courses of Ψ_{leaf} (top), transpiration (middle), and tracheid *Q* (bottom) during a drought cycle for a potted *P. nigra* sapling. Irrigation was stopped between d 5 and 40. Black and white circles in the top panel represent Ψ_{leaf} measured in dark and full-light conditions, respectively. Means ± SE.

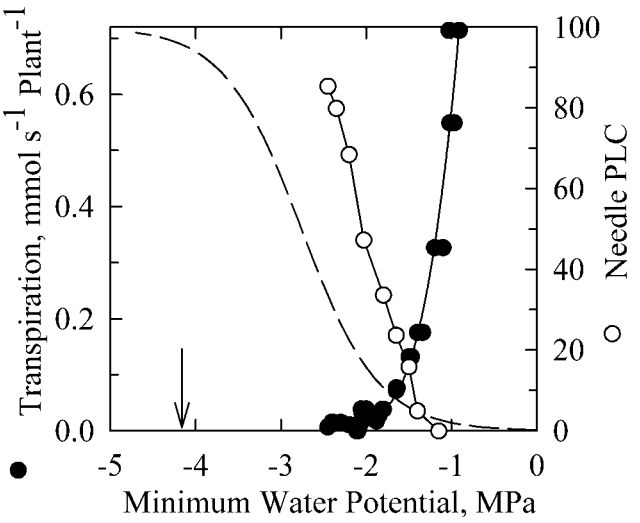


Figure 6. Dependence of transpiration (black circles), percentage of loss conductance in the needles (white circles) and the stems (dashed line) on Ψ_{leaf} during a drought cycle (data similar to Fig. 4). The arrow on the *x* axis indicates the onset of tracheid cavitation in the needles. Stem vulnerability is replotted from Froux et al. (2003).

reduced in the needles. Therefore, stomata closed at the expanse of no embolism but substantial wall collapse. The curve on Figure 6 represents the mean collapse of all of the tracheids. This hides the fact that some tracheids were already collapsed at the onset of stomatal closure. Therefore, xylem wall collapse in leaves seems a potential candidate for hydraulic signals during water stress in pine. It causes variable and reversible hydraulic conductances in the very terminal part of plant vascular system therefore minimizing the risk of xylem dysfunction in more downstream parts. Recovery from wall collapse can occur while pressures are still largely negative, contrary to cavitation-induced dysfunctions (Tyree and Yang, 1992).

Zimmermann (1983) speculated that increases in xylem efficiency were balanced by decreases in xylem safety. Xylem efficiency scales to the fourth power of conduit diameter. Safer xylem conduits have the capacity to preserve xylem efficiency at lower xylem pressures. Safety has so far been quantified by the xylem vulnerability to cavitation. Zimmermann (1983) hypothesized that wider conduits were more prone to cavitation events. However, when different species are compared, a rather weak correlation between the above parameters (Tyree et al., 1994) is found, suggesting a lack of such a tradeoff. Within a given xylem tissue, a correlation may exist (Sperry and Tyree, 1990). Our results illustrate another aspect of the tradeoff between xylem efficiency and safety in pine needles. Xylem safety shall not be thought in terms of vulnerability to cavitation but rather in terms of vulnerability to wall collapse. Tracheids less prone to wall collapse were safer because they maintained xylem efficiency at lower xylem pressures. Larger tracheid diameters conferred higher hydraulic efficiency at the expanse of a higher risk of collapse. The situation was different for woody axis because wall collapse was not observed and cavitation occurred first. This is consistent with other cryo-SEM observations on lignified plant parts in other species (Canny, 1997; Cochard et al., 2000). Contrary to needles, conifer axes have both mechanical and hydraulic functions. In the stems, xylem walls have to be thick enough to avoid collapse upon negative pressures and prevent stem rupture under dynamic or static loads (Wagner et al., 1998). Walls in the stems might thus be overreinforced and less prone to collapse. In needles, mechanical stability is not such an important function of the xylem, and wall reinforcement is dimensioned only to avoid collapse due to negative pressures. Thicker walls and higher wood densities could compensate the risk of collapse associated with larger conduits (Hacke et al., 2001), but the cost of carbon investment might become the limiting factor.

CONCLUSIONS

Our study has revealed a novel aspect of hydraulic functioning in pine. Xylem conduits in pine needles are subject to the collapse of their walls upon dehydration. Vulnerability to collapse seems related to tracheid anatomy, although a mechanical model taking explicitly into account the xylem structure and geometry remains to be elaborated. Wall collapse induces a drastic change in xylem conductance but is rapidly reversible upon rehydration. Our data on pine species suggest that wall collapse might have significant implication for the understanding of plant water relations and xylem function. We do not know yet whether these findings are specific to pine or whether they apply to other plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Experiments were conducted on four different pine species (*Pinus cembra* L., *Pinus mugo* Turra s. str., *Pinus nigra* subsp. *nigra* Arnold, and Scots pine [*Pinus sylvestris*]). The former two species typically grow at high elevation in the alpine mountains. Mayr et al. (2003b, 2003c) have shown that these species were exposed to very low xylem pressures during the winter period when the soil was frozen. *P. nigra* and Scots pine are more temperate species. These different pine species are known to greatly differ in terms of shoot vulnerability to cavitation (Cochard, 1992; Froux et al., 2003; Mayr et al., 2003b, 2003c). Two types of plant material were used in this study. First, shoots were collected in situ on mature trees of *P. cembra*, *P. mugo*, and Scots pine. The first two species were sampled in the Botanical Garden, University Innsbruck, Tyrol (elevation, 600 m). *P. cembra* is the tree species reaching highest altitudes in the European Central Alps, *P. mugo* is a coniferous shrub naturally growing above tree line in the alpine "Krummholzzone". Shoots of Scots pine originated from trees growing in grasslands at Berzet near Clermont-Ferrand, France (elevation, 800 m). The more thorough experiments on *P. nigra* were conducted on 2-year-old saplings grown in 10-L pots filled with a mixture of sand/peat and forest soil. The plants were well watered and fertilized regularly.

Leaf Dehydration

Two protocols were used to provoke shoot dehydration. First, terminal shoots of the four species were cut from the trees and allowed dehydrating on the bench of a laboratory. Periodically, one shoot was selected, and its Ψ_{leaf} was determined with a Scholander pressure chamber. Because samples dehydrated very slowly, we assumed that Ψ_{leaf} equaled the xylem pressure in the needles (P_{xylem}) in our study. The shoot was then enclosed in a plastic bag (to stop dehydration) until leaves were sampled for microscopic analyses (see below). Sample leaves were from the current and previous-year growth units. Shoots of *P. cembra* and *P. mugo* were prepared in Innsbruck (Austria) and sent by rapid mail to Clermont-Ferrand in their bags for analysis. On a sub-sample, we confirmed that Ψ_{leaf} did not change significantly during transport.

For the second procedure, we provoked a more progressive leaf dehydration by exposing a potted *P. nigra* sapling to a soil drought. A 2-year-old sapling was installed in a growth cabinet with 16 h, 28°C, 50% relative humidity/8 h, 20°C, 70% relative humidity day/night conditions. During the first 5 d, the soil was maintained at field capacity by repetitive watering. Then, water was withheld, and the plant was allowed to dehydrate for 35 d. The pot was finally rehydrated and maintained at field capacity for 12 more d. The sapling was placed on a PC interfaced digital balance (1 g resolution) to measure water losses continuously. Periodically, we determined Ψ_{leaf} by detaching a pair of needles. We measured Ψ_{leaf} in morning before lights were turned on and on transpiring leaves near the middle of the light period.

Xylem Anatomical Observations

Needle xylem characteristics were determined on samples snap-frozen by immersion in LN_2. Needles were detached from the dehydrated shoots and immediately soaked in a bath of LN_2. About 2-cm-long segments were taken from the central part of each needle and stored at −80°C until observation. The samples were thus frozen while the xylem pressure in the needles was close to the xylem pressure before excision. A few observations were also made on stem segments prepared similarly. On *P. nigra* needles dehydrated to −3.5 MPa, xylem pressure was first relaxed before freezing. Needles were sampled as before but first immersed and recut under tap water. After 2 and 30 min, needles segments were immerged in LN_2 and treated as above.

Most of the observations were done with a SEM (model SEM 505, Philips, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a cryogenic stage (model CT 1000, Hexland, Oxford Instruments Ltd, Oxford, UK) in the Laboratory of Electron Microscopy at the Institut National de la Recherche Agronomique-Theix center near Clermont-Ferrand. This equipment enables observations of xylem content on intact frozen samples (Cochard et al., 2000; Mayr and Cochard, 2003; Tyree et al., 2003). Samples stored at −80°C were first immersed in LN_2 and installed in 1-cm-deep holes in a sample holder. The samples were then rapidly transferred to a cryo-chamber on a stage at −180°C. Once vacuum was made in the chamber, the samples were cryo-fractured inside the chamber to expose the vascular bundles on a cross section. This procedure limited considerably the deposit of frost on the cross sections. The samples were then transferred to the SEM chamber and installed on a stage maintained at −160°C. Samples were first observed at a low voltage (<5 kV), and the presence of ice or air in the tracheids was noted. To better delimitate cell walls, the samples were then etched by raising the SEM stage temperature to −80°C. Finally, the samples were coated with a gold deposit in the cryo chamber (−180°C). Coating was necessary for obtaining high resolution and contrasted pictures, but this often had the effect of sublimating most of the ice in the tracheids. Nevertheless, we verified that ice sublimation had no effect on wall shape because the samples always remained below −80°C. Pictures were scanned and analyzed with standard image analysis software. Measurements were restricted to tracheids with bordered pits in the metaxylem. For each tracheid, we measured the wall perimeter (P) and the lumen area (A). Tracheid shape was estimated by their Q defined as (Weisstein, 1999):

$$Q = 4\,\Pi.A.P^{-2} \quad (1)$$

Q, a dimensionless shape factor, equals 1 if the tracheid is a perfect circle, equals 0.79 for a square, and decreases below these values with wall collapse. On average, each Q value on the graphs represents the mean value of 39 different tracheids.

We determined the effect of wall collapse on loss of hydraulic conductance (K) as follows. We assumed (a) that tracheids remained elliptical as they collapse, (b) that wall perimeter was constant, and (c) that Poiseuille's equation remained valid for collapsed tracheids. Our data show that assumption b was correct (see "Results"), but it is clear that assumptions a and c were not entirely satisfied. Our PLC estimates are thus rather imprecise and probably underestimate the actual PLC values. If a and b are the axes of the ellipse, we have:

$$a = r\,[1 + (1-Q^2)^{1/2}]^{1/2} \quad (2)$$

$$b = r\,[1 - (1-Q^2)^{1/2}]^{1/2} \quad (3)$$

with r as the radius of the circle having the same perimeter. For an ellipse, K scales to $a^3b^3/(a^2+b^2)$ (Lewis and Boose, 1995). Therefore K scales to $r^4\,Q^3$. The PLC due to wall collapse was then estimated by:

$$PLC = 100[1-(Q/Q_0)^3] \quad (4)$$

with Q_0 being the Q of tracheids in well-hydrated samples.

For well-hydrated samples of each species, we also measured the mean wall thickness (t; $n = 60$) and maximum tracheid beam (b; $n = 30$). Following Hacke et al. (2001), we determined the relative wall resistance to bending stress as $(t/b)^2$.

On some *P. nigra* samples, we used a second technique to observe wall collapse. Although the results of this technique were not precisely quantified in this study, it is worth mentioning because people without access to a cryo-SEM could employ it. The principle of the technique is to observe tracheid walls on frozen cross sections with an epifluorescent microscope. A 2.2- × 2.2-cm, 0.8-cm-thick piece of copper placed under the microscope objective was used as a cooling stage. The free end of a copper wire (0.16 cm in diameter) attached to the stage was immersed in a bath of LN_2. We adjusted the length of the wire to obtain a stage temperature around −80°C (as measured by a thermocouple inserted into the stage). Samples stored at −80°C were rapidly placed on the stage where a few drops of absolute ethanol were added. This was necessary to prevent frost deposition on the samples during observation. About 1-mm-thick cross sections were obtained with a fresh razor blade near the center of the sample and observed at a 400× magnification.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brigitte Martinie and Christian Bodet for their assistance with the Cryo-SEM. Discussions about this work with Sebastiano Salleo, Andrea Nardini, George Jeronimidis, Mel Tyree, and members of the "xylem group" (Réseau d'Ecophysiologie de L'Arbre, Institut National de la Recherche Agronomique) were stimulating. The anonymous comments of two referees were constructive.

Received June 10, 2003; returned for revision August 31, 2003; accepted September 23, 2003.

LITERATURE CITED

Canny MJ (1995) A new theory for the ascent of sap-cohesion supported by tissue pressure. Ann Bot **75:** 343–357

Canny MJ (1997) Vessel contents during transpiration: embolisms and refilling. Am J Bot **84:** 1223–1230

Cochard H (1992) Vulnerability of several conifers to air embolism. Tree Physiol **11:** 73–83

Cochard H, Bodet C, Ameglio T, Cruiziat P (2000) Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles: facts or artifacts? Plant Physiol **124:** 1191–1202

Cochard H, Coll L, Le Roux X, Améglio T (2002) Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. Plant Physiol **128:** 282–290

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

Froux F, Huc R, Ducrey M, Dreyer E (2003) Xylem hydraulic efficiency versus vulnerability in seedlings of four contrasting Mediterranean tree species (*Cedrus atlantica*, *Cupressus sempervirens*, *Pinus halepensis* and *Pinus nigra*). Ann For Sci **59:** 409–418

Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh K (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. Oecologia **126:** 457–461

Hepworth DG, Vincent JFV (1998) The mechanical properties of xylem tissue from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* 'Samsun'). Ann Bot **81:** 751–759

Johnson RPC (1977) Can cell walls bending round xylem vessels control water flow? Planta **136:** 187–194

Lewis AM, Boose ER (1995) Estimating volume flow rates through xylem conduits. Am J Bot **82:** 1112–1116

Mayr S, Cochard H (2003) A new method for vulnerability analysis of small xylem areas reveals that compression wood of Norway spruce has lower hydraulic safety than opposite wood. Plant Cell Environ **26:** 1365–1371

Mayr S, Gruber A, Bauer H (2003a) Repeated freeze-thaw cycles induce embolism in drought stressed conifers (Norway spruce, stone pine). Planta **217:** 436–441

Mayr S, Gruber A, Schwienbacher F, Dämon B (2003b) Winter-embolism in a "Krummholz"-Shrub (*Pinus mugo*) growing at the alpine timberline. Aust J For Sci **120:** 29–38

Mayr S, Schwienbacher F, Bauer H (2003c) Winter at the alpine timberline: Why does embolism occur in Norway spruce but not in stone pine ? Plant Physiol **131:** 780–792

Milburn JA (1966) The conduction of sap: 1. Water conduction and cavitation in water stressed leaves. Planta **69:** 34–42

Niklas KJ (1992) Plant Biomechanics: An Engineering Approach to Plant Form and Function. University of Chicago Press, Chicago

Piquemal J, Lapiere C, Myton K, O'Connell A, Schuch W, Grima-Pettenati J, Boudet AM (1998) Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes in lignin profiles in transgenic tobacco plants. Plant J **13:** 71–83

Pockman WT, Sperry JS, Oleary JW (1995) Sustained and significant negative water pressure in xylem. Nature **378:** 715–716

Raven JA (1987) The evolution of vascular land plants in relation to supracellular transport processes. Adv Bot Res **87:** 1287–1299

Salleo S, Lo Gullo MA, Raimondo F, Nardini A (2001) Vulnerability to cavitation of leaf minor veins: any impact on leaf gas exchange? Plant Cell Environ **24:** 851–859

Smart CC, Amrhein N (1985) The influence of lignification on the development of vascular tissue in *Vigna radiata* L. Protoplasma **124:** 87–95

Sperry JS (2000) Hydraulic constraints on plant gas exchange. Agr For Meteorol **104:** 13–23

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, Tyree MT (1988) Mechanism of water stress-induced xylem embolism. Plant Physiol **88:** 581–587

Sperry JS, Tyree MT (1990) Water-stress-induced xylem embolism in three species of conifers. Plant Cell Environ **13:** 427–436

Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR, Turner SR (1999) The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. Plant Cell **11:** 769–779

Turner SR, Somerville CR (1997) Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. Plant Cell **9:** 689–701

Tyree MT (1976) Negative turgor pressure in plant cells: fact or fallacy? Can J Bot **54:** 2738–2746

Tyree MT, Cochard H, Cruiziat P (2003) The water-filled versus air-filled status of vessels cut open in air: the 'Scholander assumption' revisited. Plant Cell Environ **26:** 613–621

Tyree MT, Davis SD, Cochard H (1994) Biophysical perspectives of xylem evolution: Is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? IAWA **15:** 335–360

Tyree MT, Dixon MA (1983) Cavitation events in *Thuja occidentalis* L.: Ultrasonic acoustic emissions from the sapwood can be measured. Plant Physiol **72:** 1094–1099

Tyree MT, Yang S (1992) Hydraulic conductivity recovery versus water pressure in xylem of *Acer saccharum*. Plant Physiol **100:** 669–676

Wagner KR, Ewers FW, Davis SD (1998) Tradeoffs between hydraulic efficiency and mechanical strength in the stems of four co-occurring species of chaparral shrubs. Oecologia **117:** 53–62

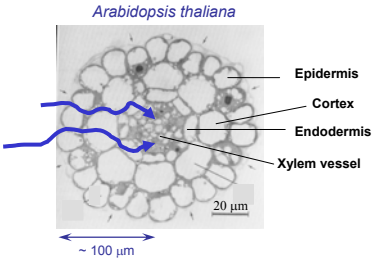
Wei C, Tyree MT, Steudle E (1999) Direct measurement of xylem pressure in leaves of intact maize plants: a test of the cohesion-tension theory taking hydraulic architecture into consideration. Plant Physiol **121:** 1191–1205

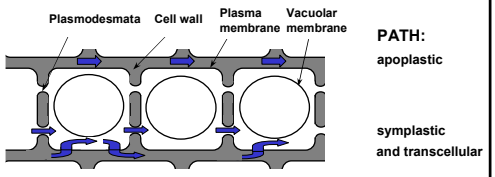
Weisstein EW (1999) CRC Concise Encyclopedia of Mathematics. CRC Press, Boca Raton, FL

Zimmermann MH (1983) Xylem Structure and the Ascent of Sap. Springer Verlag, Berlin

Zimmermann U, Meinzer FC, Benkert R, Zhu JJ, Schneider H, Goldstein G, Kuchenbrod E, Haase A (1994) Xylem water transport: Is the available evidence consistent with the cohesion theory? Plant Cell Environ **17:** 1169–1181

Water transport in plant roots

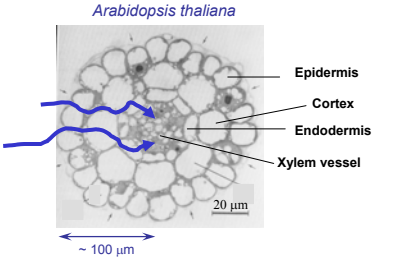




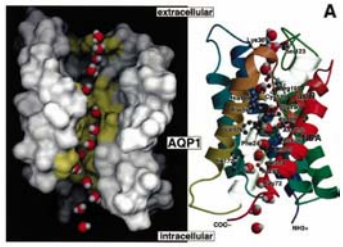
➡ Composite model of root water transport:
What the contribution of cell membranes to root water uptake?

➡ Molecular mechanisms of regulation of root water transport?

Water transport and aquaporin functions in plant roots



?

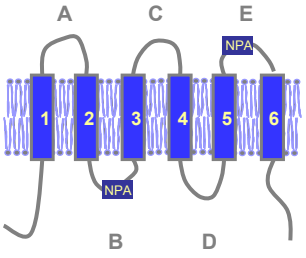


➡ Composite model of root water transport:
What the contribution of cell membranes to root water uptake?

➡ Molecular mechanisms of regulation of root water transport?

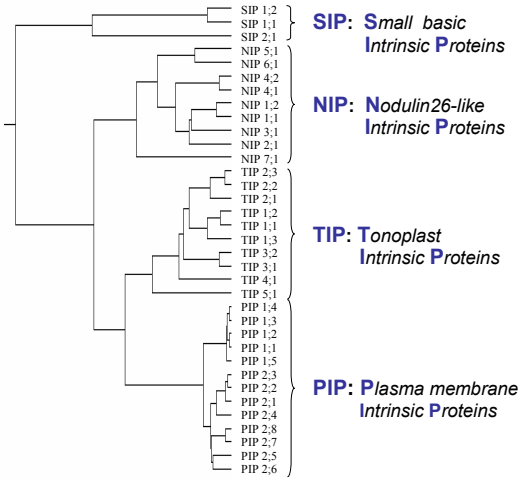
Plant aquaporin homologues

A conserved structure



Membrane

A high isoform multiplicity :
35 genes, 4 sub-families in *Arabidopsis thaliana*



SIP: **S***mall basic* **I***ntrinsic* **P***roteins*

NIP: **N***odulin26-like* **I***ntrinsic* **P***roteins*

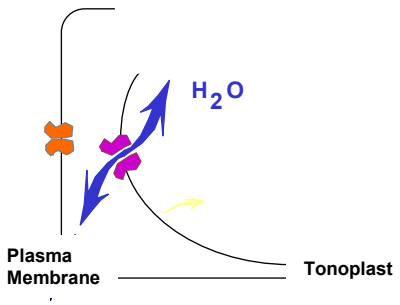
TIP: **T***onoplast* **I***ntrinsic* **P***roteins*

PIP: **P***lasma membrane* **I***ntrinsic* **P***roteins*

Plant aquaporin homologues

2 main sub-families :

- TIP: Tonoplast Intrinsic Proteins
  - ➡ Cell osmoregulation ?
- PIP: Plasma membrane Intrinsic Proteins
  - ➡ Regulation of tissue hydraulic conductivity?

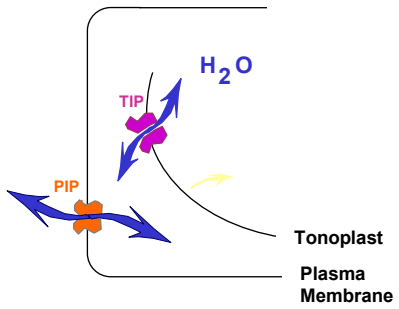


Plant aquaporin homologues

2 main sub-families :

- TIP: Tonoplast Intrinsic Proteins

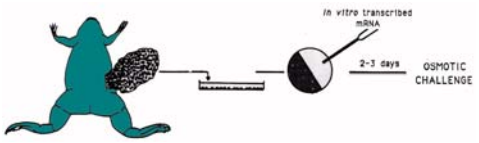
  Cell osmoregulation ?

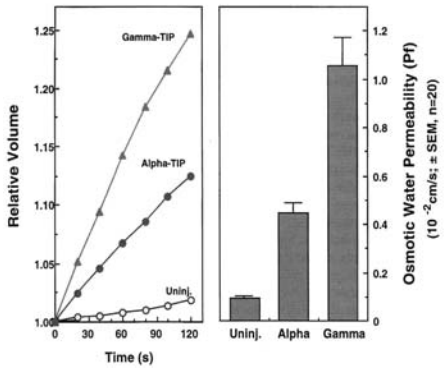


- PIP: Plasma membrane Intrinsic Proteins

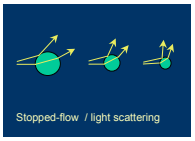
  Regulation of tissue hydraulic conductivity?

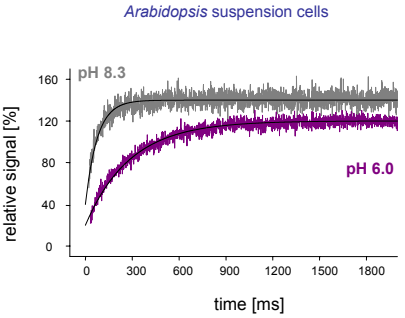
Swelling assay in Xenopus oocytes





Water transport in purified in plant plasma membrane vesicles

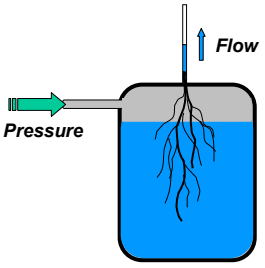


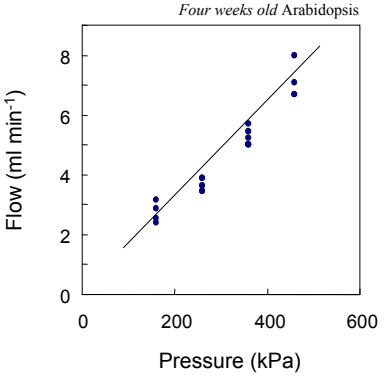


➡ The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane vesicles is regulated pH

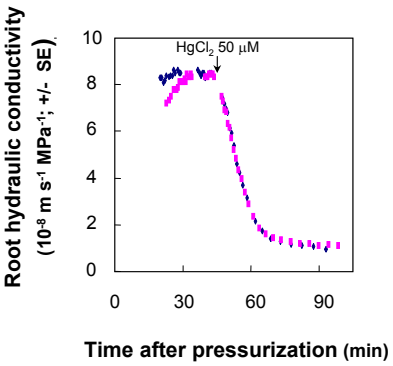
Gerbeau *et al.* (2002) *Plant J.* 30: 71-81

Measurement of root hydraulic conductivity by the pressure chamber technique



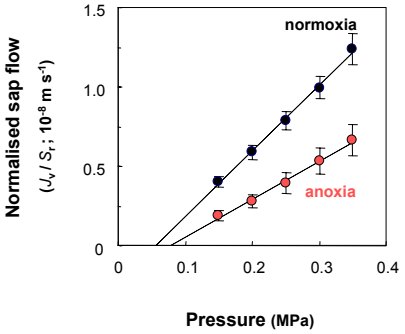


Inhibition by mercury of water transport in the *Arabidopsis* root



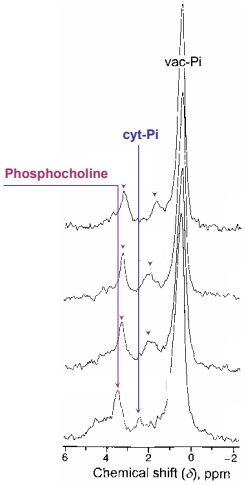
➡ Reversibility?

Water transport in the *Arabidopsis* root under anoxic stress



➡ Anoxia induces a two-fold reduction of root hydraulic conductivity

Measurements of cytosolic pH by ^{31}P-NMR

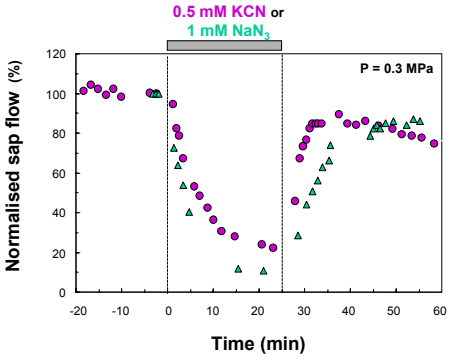


	Cytosolic pH
normoxia + 1 mM NaN_3	6.9 - 7.0
normoxia + 0.5 mM KCN	7.0 - 7.25
anoxia	7.20 - 7.25
normoxia	7.7

➡ Anoxia and respiration inhibitors induce a cytosolic acidification

Effects of cyanide and azide on root water transport

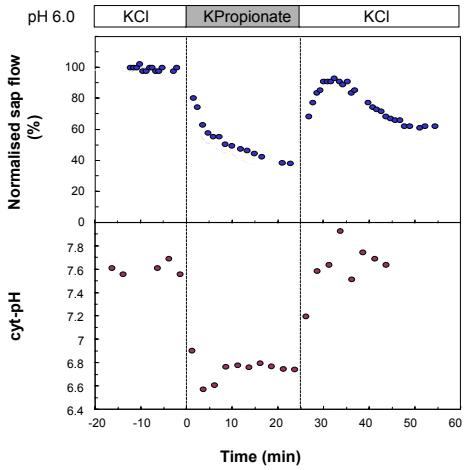
Pressure chamber measurements



➡ Respiration inhibitors reversibly inhibit root hydraulic conductivity

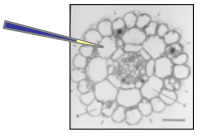
Root water transport and cytosolic pH under acid load conditions

Pressure chamber measurements

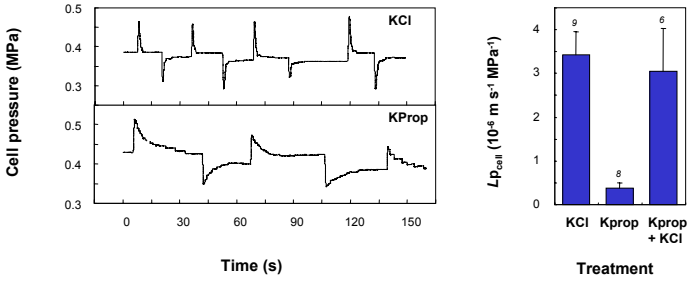


➡ A cytosol acidosis reversibly inhibits root hydraulic conductivity

Water transport in root cortical cells under acid load conditions

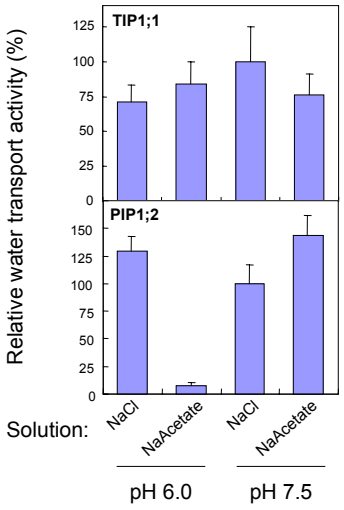


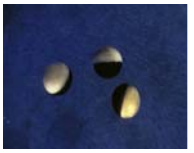
Cell pressure probe measurements



➡ A cytosol acidosis reversibly inhibits cell hydraulic conductivity

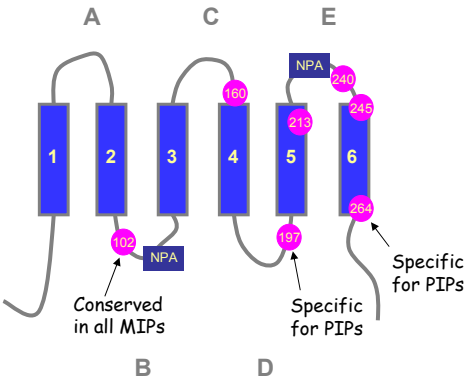
Effects of intra- and extra-cellular acidification on aquaporin activity



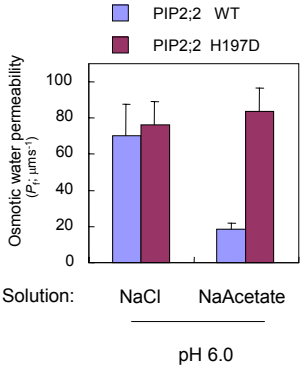


Cytoplasmic acidification specifically blocks PIP aquaporins

Molecular basis of PIP regulation by cytosolic pH



Conserved histidines in PIPs

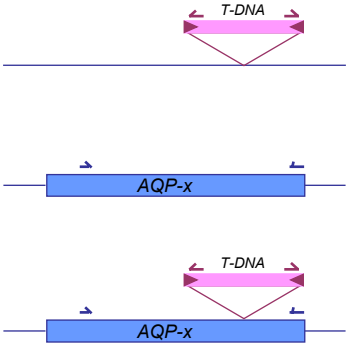


pH sensing in loopD

Regulation of water transport in the *Arabidopsis* root

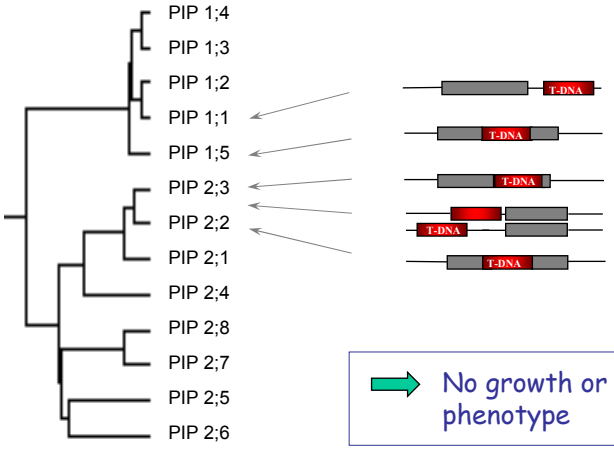
- A mechanism for sensing cytosolic protons is conserved in the PIP subfamily of plasma membrane aquaporins
- This mechanism can account for the inhibition of water transport in roots under anoxic stress

Genetic analysis of PIP aquaporin functions in *Arabidopsis*



PCR screening
of an *Arabidopsis* T-DNA insertion library

T-DNA insertion mutants of *pip* genes in *Arabidopsis*

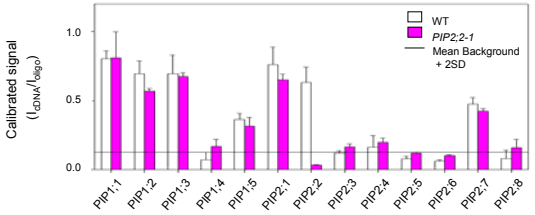


➡ No growth or developmental phenotype

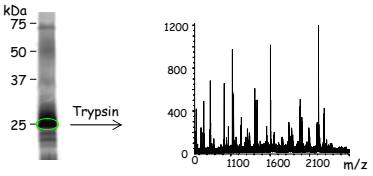
Amino acid sequence relationship of the 13 members of the *Arabidopsis pip* gene family

Inventory of PIP isoforms expressed in roots

Gene expression: Macro-array analysis using gene specific tags



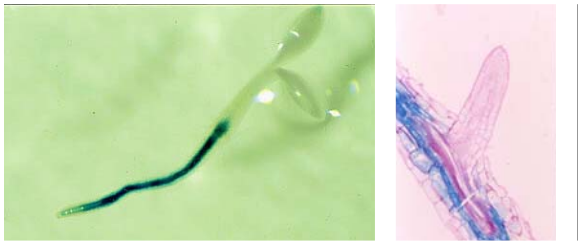
Mass spectrometry analysis



- List of masses (MALDI-TOF)
- Peptid sequences (tandem MS)

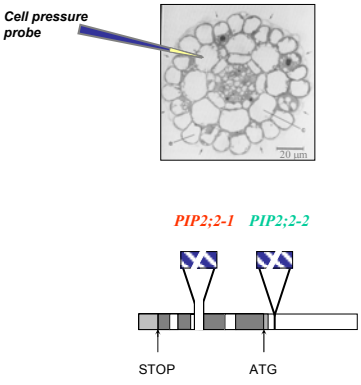
➡ PIP2;2, one of the most abundantly expressed aquaporins in roots

Cell-specific expression of the *pip2;2* gene in *Arabidopsis*

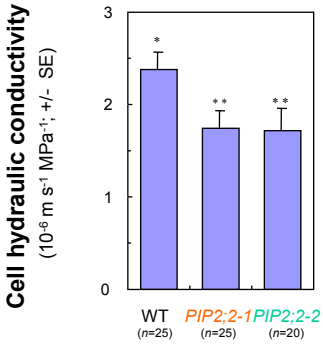


PIP2;2: GUS (in cooperation with Dr T. Schäffner, Münich, Germany)

Cell pressure probe measurements in the root cortex



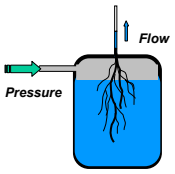
pip2;2



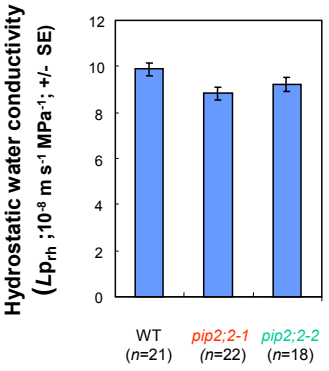
Genotype

➡ PIP2;2 contributes to 25% of cell hydraulic conductivity in the root cortex

Hydrostatic water transport in the root of WT and PIP2:2 mutant plants

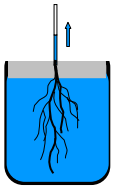


Pressure chamber

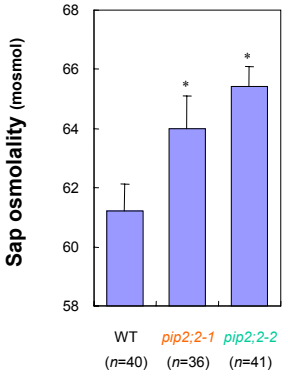


Water and solute transport in the root of PIP2:2 aquaporin mutants

Exuded sap ➡ *Osmolality*

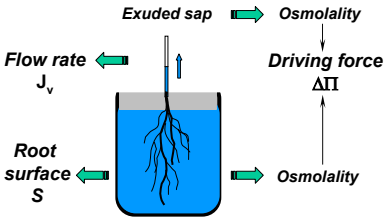


Procedure



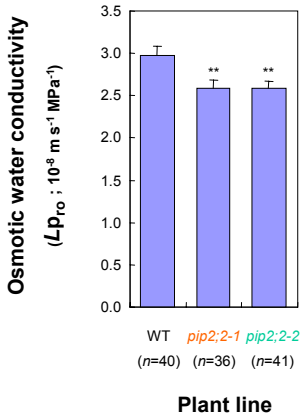
➡ Altered osmotic pumping in the roots of PIP2;2 mutants

Water and solute transport in the root of PIP2:2 aquaporin mutants



$Lp_{ro} = J_v / S \,.\, \Delta\Pi$

Procedure



Plant line

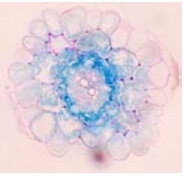
➡ Reduced osmotic water permeability in the roots of PIP2;2 mutants

Functional analysis of PIP aquaporins in the *Arabidopsis* root: a reverse genetic approach

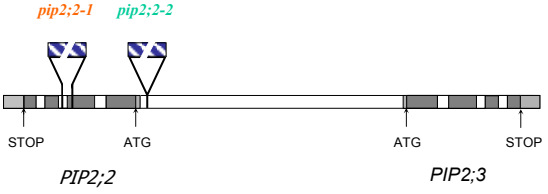
Javot *et al.* (2003) Plant Cell 15: 509-522

➡ Contribution of a single aquaporin gene to osmotically-driven water transport in roots

Optimized sap transport in quasi-isosmolar conditions



➡ Tandem duplicated aquaporin genes show differential expression and have non-redundant function



Function and regulation of plant aquaporins

Conclusions

➡ Knock-out mutants reveal the contribution of a single aquaporin isoform to root water transport

Significance of the high diversity of aquaporins in plants?

➡ Coordinate gating of plasma membrane aquaporins by cytosolic pH mediates the block of water transport in plant roots under anoxic stress

Regulation of root water transport in response to stresses?

Aquaporin group
CNRS / INRA
Montpellier, France

Hélène JAVOT

Véronique SANTONI

Colette TOURNAIRE

Yann BOURSIAC

Virginie LAUVERGEAT

and Patricia GERBEAU, Josette GÜCLÜ, Fabrice MARTIN...

Collaborations

Gabriela Amodeo
Moira Sutka
University of Buenos Aires, Argentina

Richard Bligny
Elisabeth Gout
CEA, Grenoble, France

David Bouchez
INRA, Versailles, France

Tony Schäffner
GSF, Münich, Germany

Références récentes:

- Gerbeau P, G Amodeo, T Henzler, P Ripoche, V. Santoni, C Maurel (2002) The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. Plant J., 30: 71-81.
- Javot H, C Maurel (2002) The role of aquaporins in root water uptake.Ann.Bot., 90: 301-313.
- Javot H, V Lauvergeat, V Santoni, F Martin-Laurent, J Güçlü, J Vinh, J Heyes, KI Franck, AR Schäffner, D Bouchez, C Maurel (2003) Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. Plant Cell, 15 : 509-522.
- Santoni V, J Vinh, D Pflieger, N Sommerer, C Maurel (2003) A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. Biochem. J., 373: 289-296.
- Tournaire-Roux C, M Sutka, H Javot, E Gout, P Gerbeau, D-T Luu, R Bligny, C Maurel (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. Nature, 425: 393-397.

Prélèvement d'eau par la cellule croissante de racine

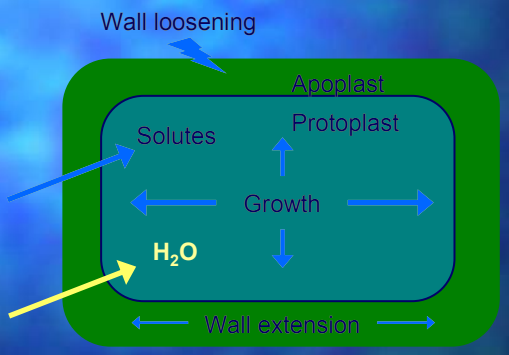
Water uptake by the growing root cell

David Hukin

October 2002

Cell growth and water uptake

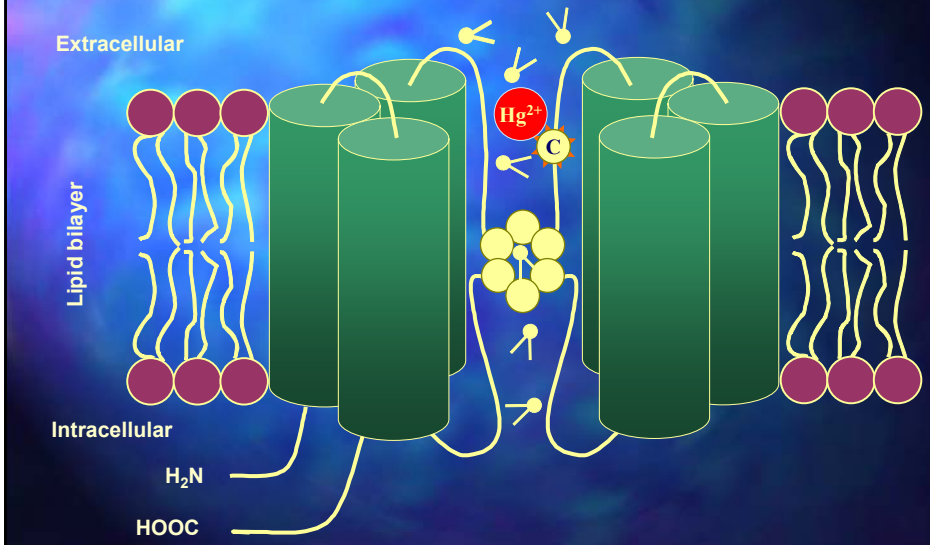
Croissance de cellules et prélèvement d'eau



David Hukin 2002

Hypothetical structure of the aquaporin

Structure hypothétique de l'aquaporin

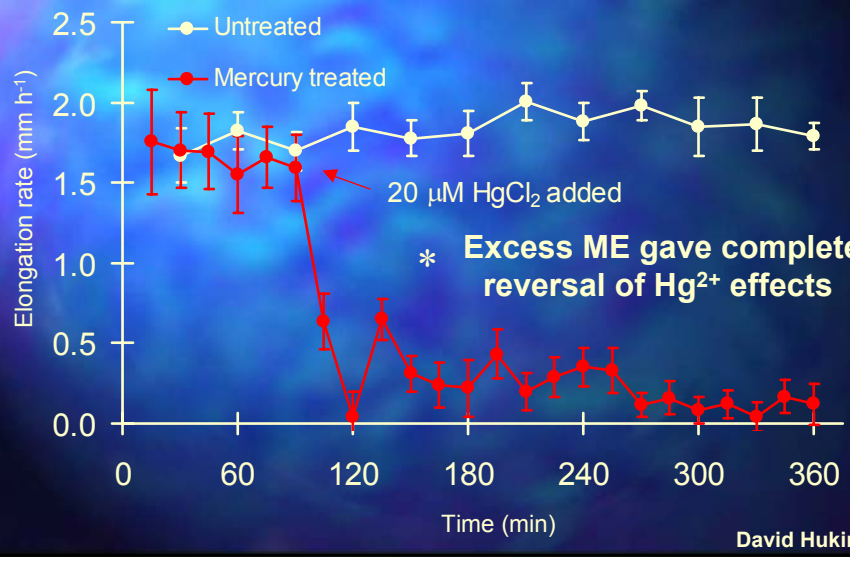


David Hukin 2002

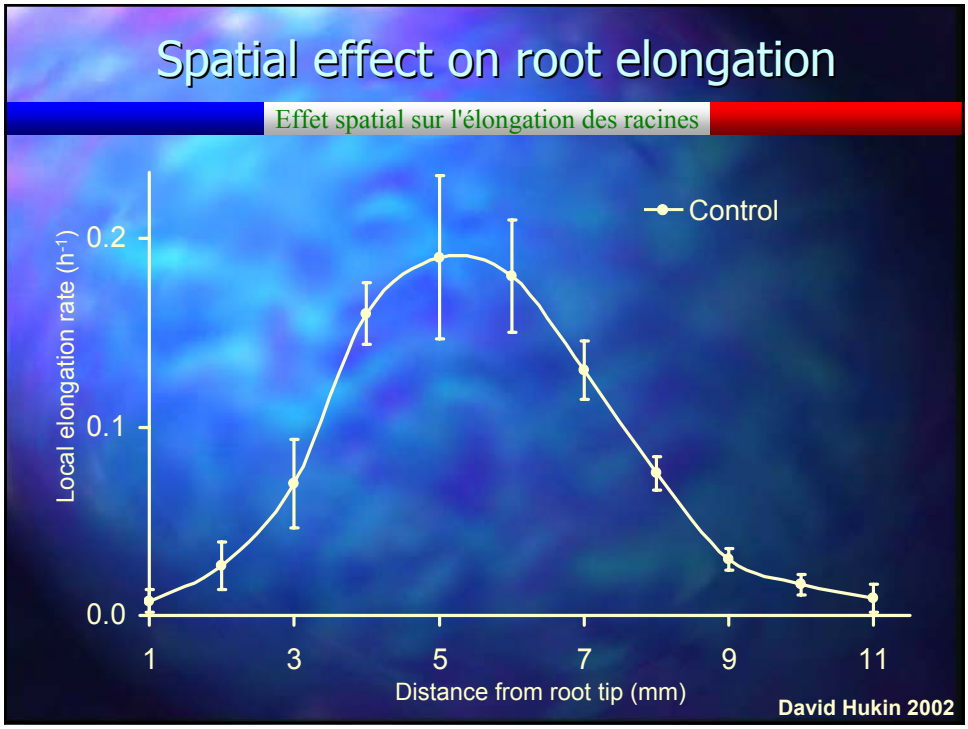
Adapted from Jung *et al*. 1994. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:14648

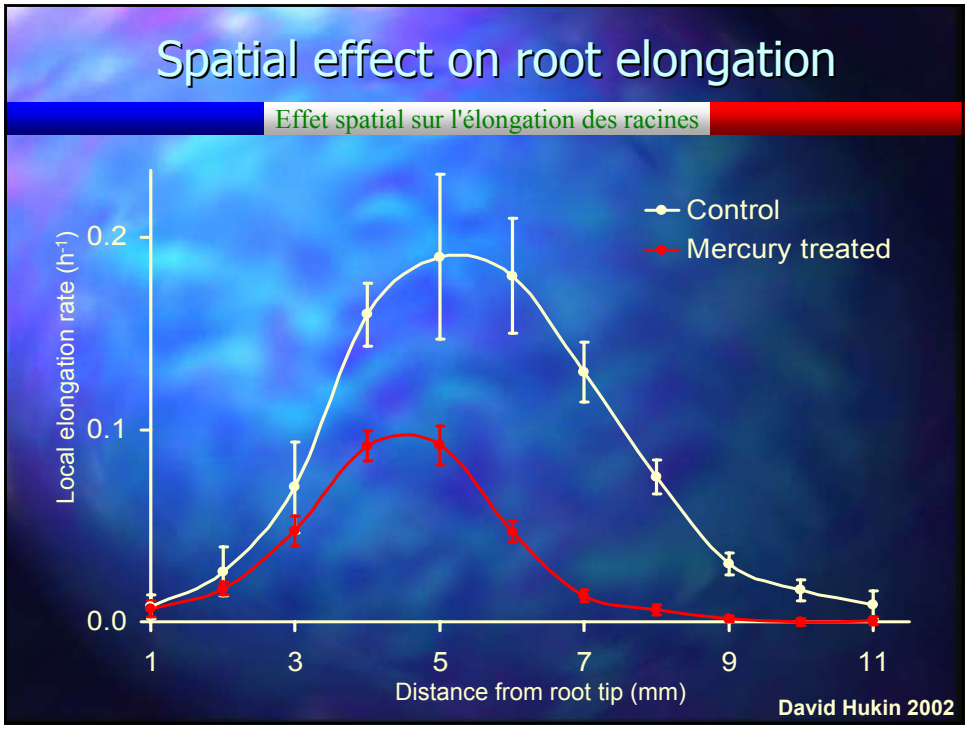
Effect on root growth

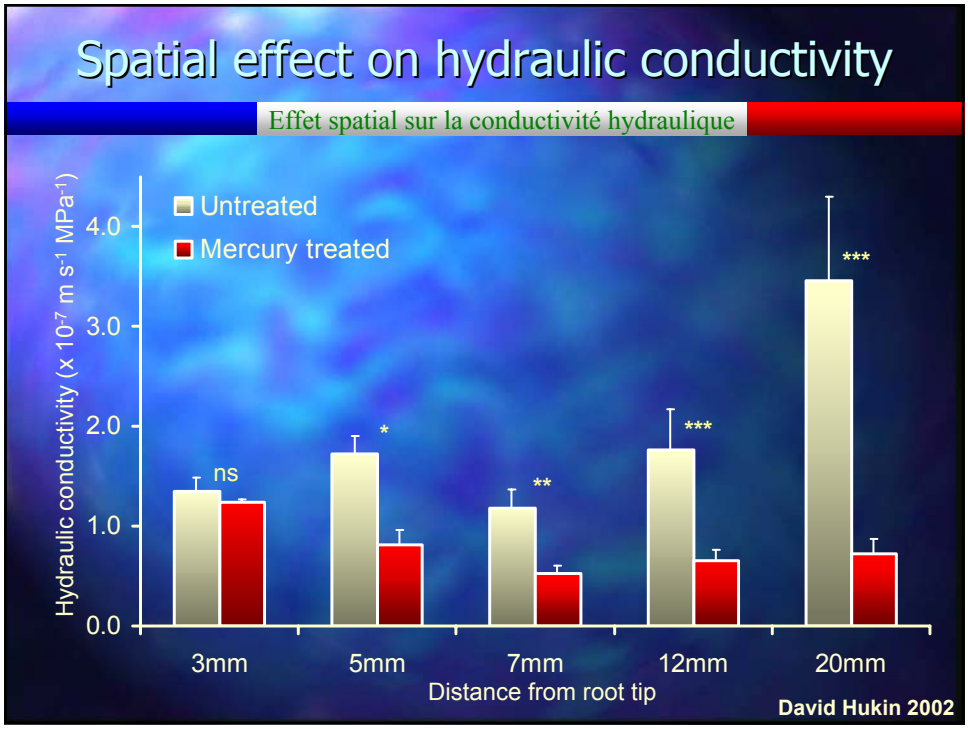
Effet sur la croissance des racines

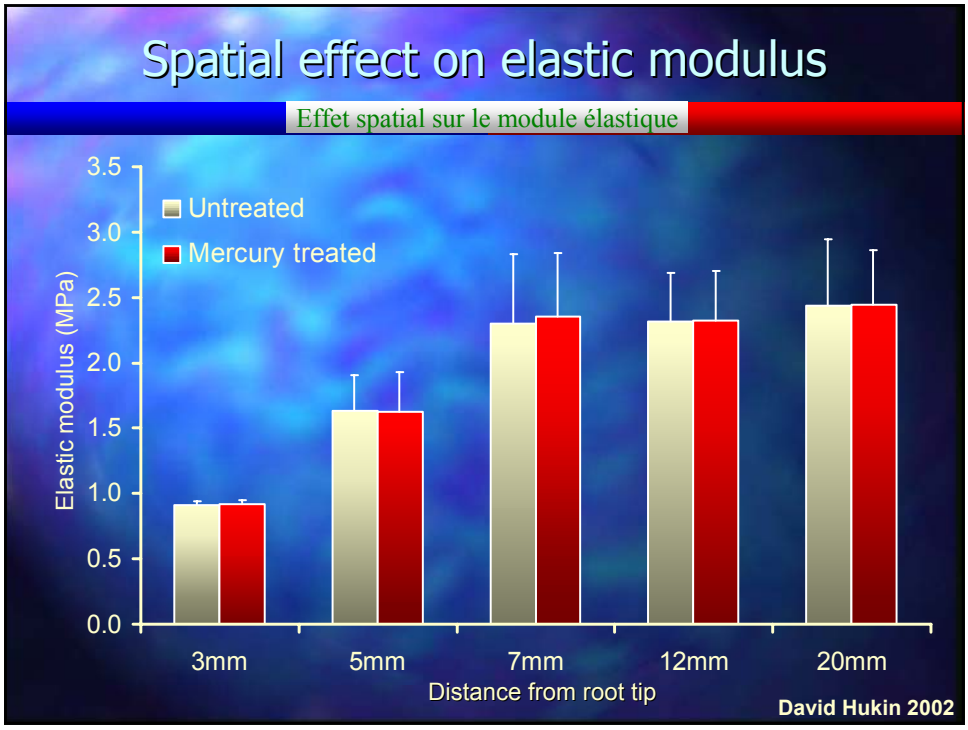


David Hukin 2002


Spatial effect on root elongation
Effet spatial sur l'élongation des racines
Control
Local elongation rate (h-1)
0.2
0.1
0.0
1
3
5
7
9
11
Distance from root tip (mm)
David Hukin 2002

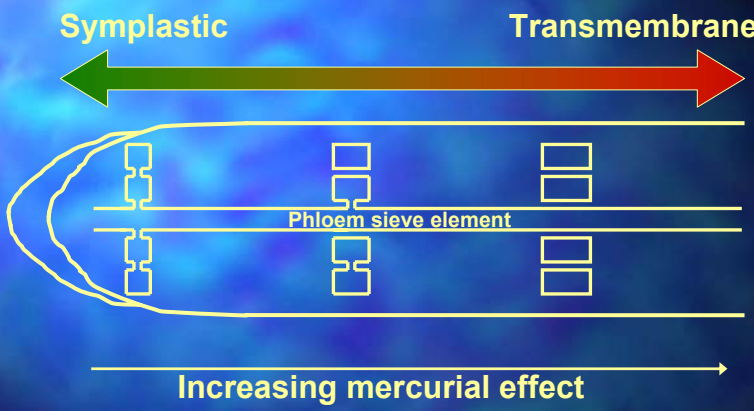

Spatial effect on root elongation
Effet spatial sur l'élongation des racines
Control
Mercury treated
Local elongation rate (h-1)
0.2
0.1
0.0
1
3
5
7
9
11
Distance from root tip (mm)
David Hukin 2002


Spatial effect on hydraulic conductivity
Effet spatial sur la conductivité hydraulique
Hydraulic conductivity (x 10-7 m s-1 MPa-1)
Untreated
Mercury treated
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
ns
*
**
***
***
3mm
5mm
7mm
12mm
20mm
Distance from root tip
David Hukin 2002


Spatial effect on elastic modulus
Effet spatial sur le module élastique
Elastic modulus (MPa)
Untreated
Mercury treated
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
3mm
5mm
7mm
12mm
20mm
Distance from root tip
David Hukin 2002

Model of water uptake for growth

Modèle de prélèvement d'eau pour la croissance



David Hukin 2002

A molecular approach

Une approche moléculaire

- *Zea mays* plasmalemma (PIP) and tonoplast (TIP) aquaporins known in the literature
- Design gene specific primers based on published sequences
- Carry out Relative-Quantitative RT-PCR using 18S rRNA as internal standard

David Hukin 2002

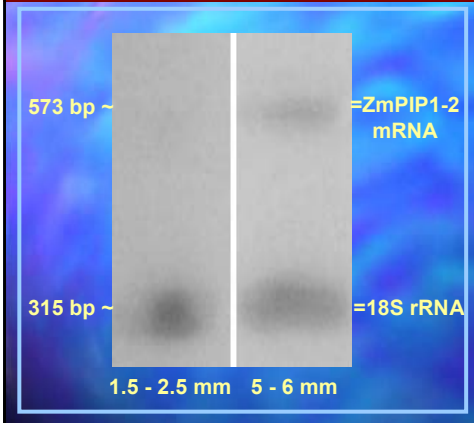
Expressed aquaporins considered

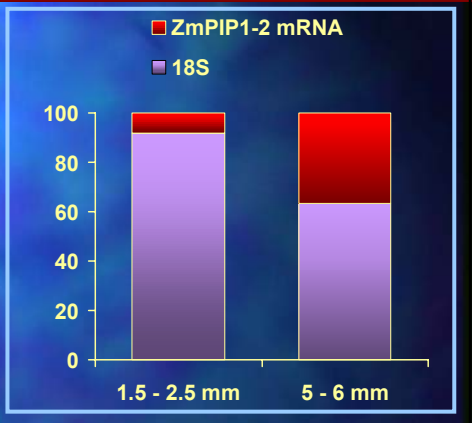
Aquaporins exprimés intervenants

- **ZmPIP1-2** - AF131201: Chaumont et al. 2000 Pl Phys 122:1025
  - uncertain hydraulic ability
- **ZmPIP2-4** - AF130975: Chaumont et al. 2000 Pl Phys 122:1025
  - mercury sensitive with high selective hydraulic ability
- **ZmTIP1** - AF037061: Chaumont et al. 1998 Pl Phys 117:1143
  - tonoplast (vacuolar membrane) aquaporin

David Hukin 2002

ZmPIP1-2 mRNA RQ-RT-PCR



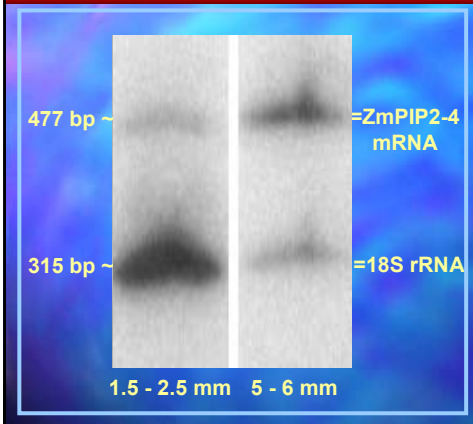


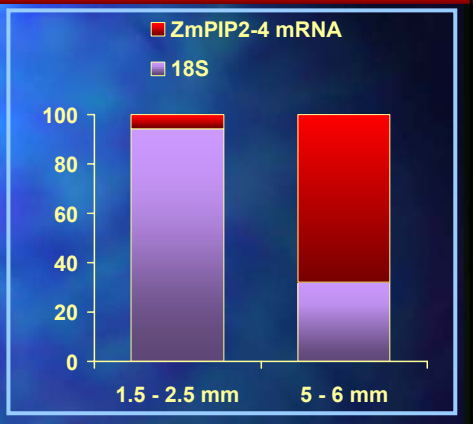
Estimate that there is a 6 fold increase in ZmPIP1-2 expression

*Analysed Bio-Rad Molecular Imager FX scanner and Bio-Rad Quantity One molecular image analysis software

David Hukin 2002

ZmPIP2-4 mRNA RQ-RT-PCR



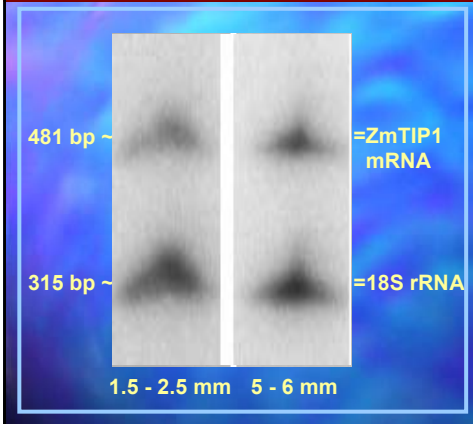


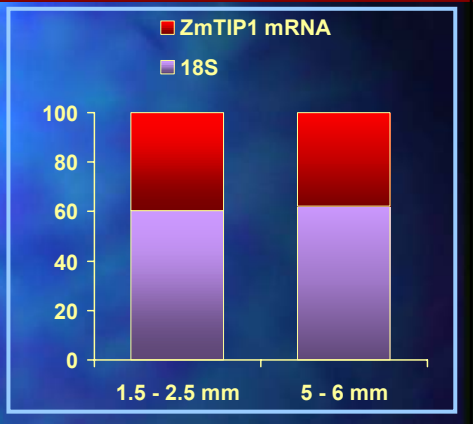
↑ Estimate that there is a 35 fold increase in ZmPIP2-4 expression

*Analysed Bio-Rad Molecular Imager FX scanner and Bio-Rad Quantity One molecular image analysis software

David Hukin 2002

ZmTIP1 mRNA RQ-RT-PCR





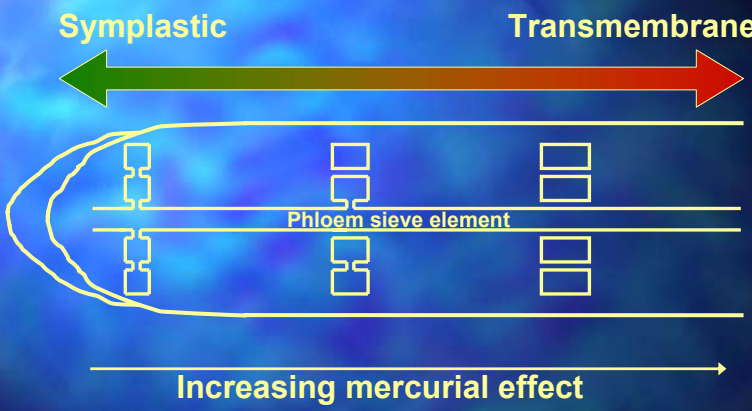
↑ Expression of ZmTIP1 is approximately the same in both regions

*Analysed Bio-Rad Molecular Imager FX scanner and Bio-Rad Quantity One molecular image analysis software

David Hukin 2002

Model of water uptake for growth

Modèle de prélèvement d'eau pour la croissance



David Hukin 2002

Carboxylfluorescein - a symplastic tracer

Carboxyfluorescein - un traceur symplastique

5-(6) Carboxyfluorescein-diacetate

(non fluorescent - membrane permeable)

systemic ↓ translocation

5-(6) Carboxyfluorescein

(fluorescent - membrane impermeable)

Apoplast -

low pH

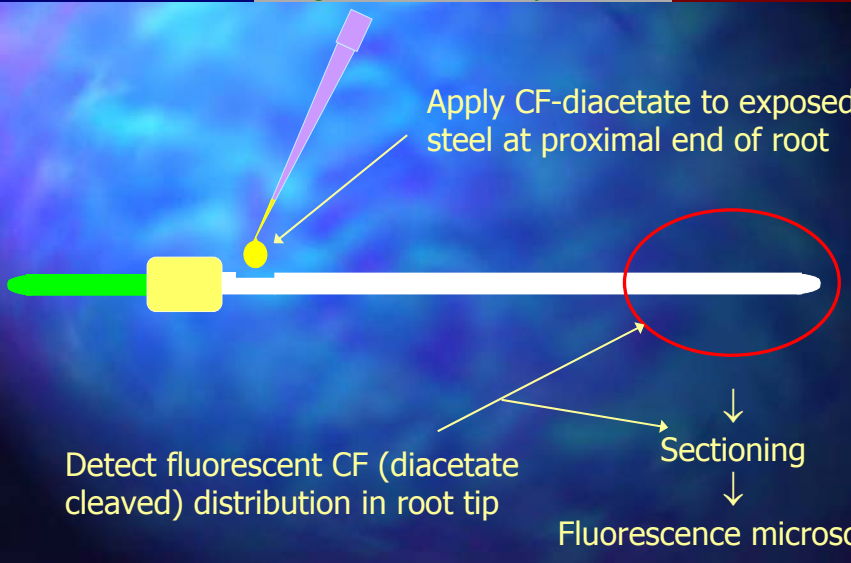
Phloem / symplast

- high pH

David Hukin 2002

Carboxyfluorescein loading

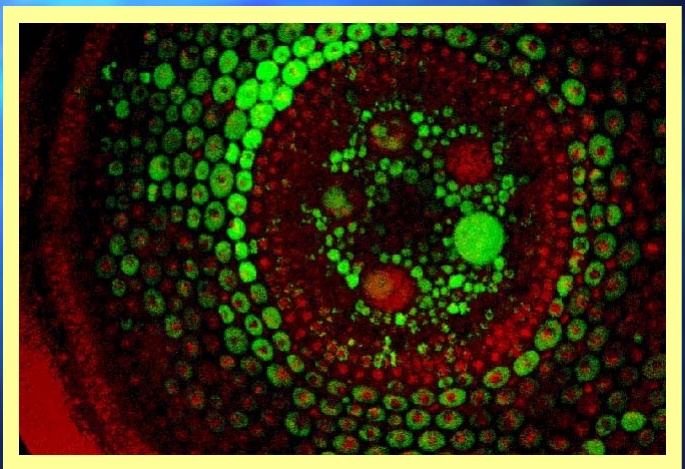
Chargement de la Carboxyfluorescein



David Hukin 2002

Carboxyfluorescein unloading

Déchargement de la carboxyfluorescein

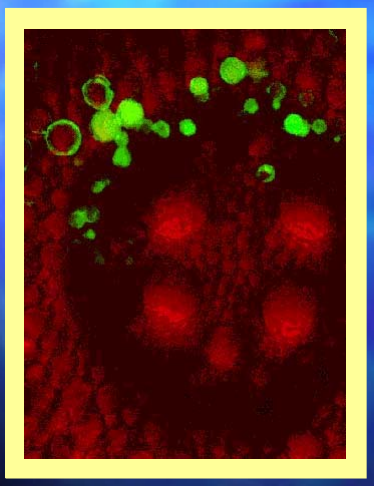


3 mm TS

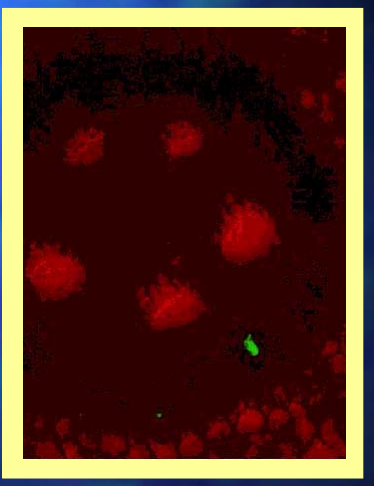
David Hukin 2002

Carboxyfluorescein unloading

Déchargement de la carboxyfluorescein



5 mm TS

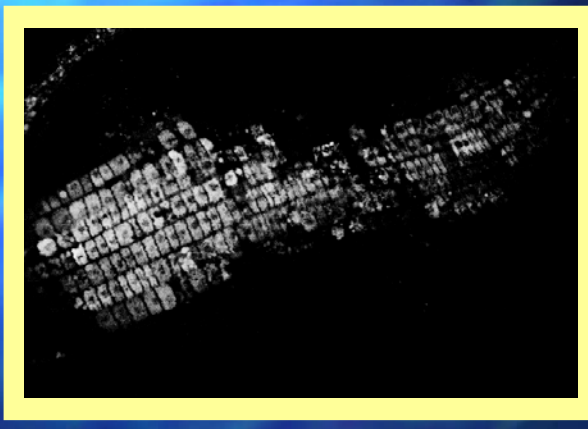


20 mm TS

David Hukin 2002

Carboxyfluorescein unloading

Déchargement de la carboxyfluorescein

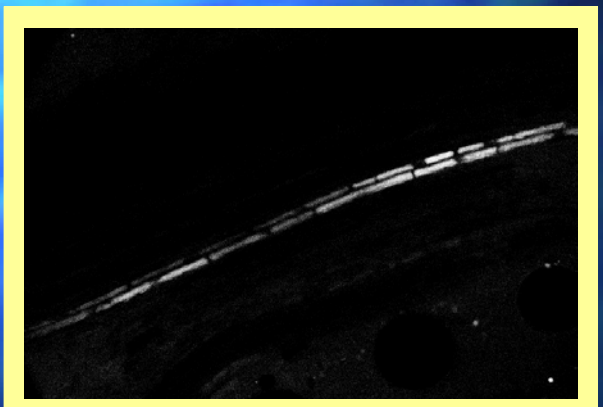


3 mm LS

David Hukin 2002

Carboxyfluorescein unloading

Déchargement de la carboxyfluorescein

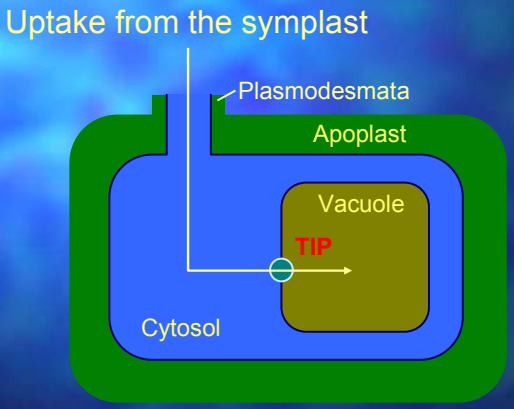


5 mm LS

David Hukin 2002

Meristematic and young elongating cells

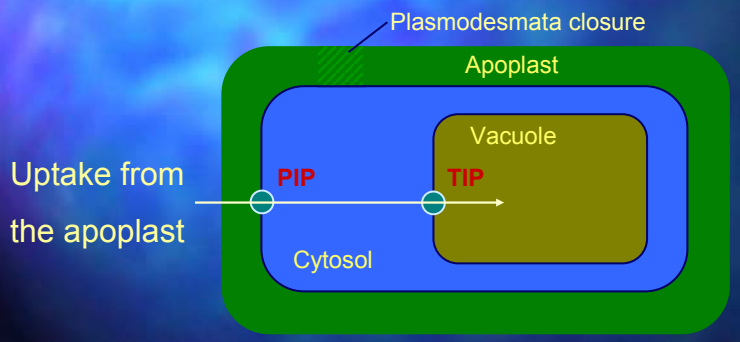
Cellules meristematiques et jeunes cellules en élongation



David Hukin 2002

Older elongating and mature cells

Cellules matures et en élongation plus âgées



David Hukin 2002

Water uptake by the growing root cell

Prélèvement d'eau par la cellule croissante de racine

D Hukin C Doering-Saad CR Thomas J Pritchard 2002
Planta **215**:1047-1056

The University of Birmingham

Impact du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée chez les graminées fourragères

Victoria Gonzalez-Dugo
Thésard à l'Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères - INRA Lusignan

1. INTRODUCTION

L'optimisation des ressources eau et azote est importante, non seulement d'un point de vue économique, mais aussi écologique, du fait du manque d'eau au niveau global et de la contamination des eaux profondes par les nitrates. La problématique autour de ces éléments est complexe. Même si on a une bonne base de connaissances de chacune d'eux, les interactions n'ont pas été étudiées en profondeur. Un des problèmes rencontrés pour les optimiser est la différente distribution dans le profil du sol dans une situation de sécheresse. L'eau se trouve en profondeur, du fait de l'évaporation, de la transpiration et de la percolation, tandis que l'azote se trouve plus en surface, où il est apporté sous forme de fertilisant.

Chez les graminées fourragères, cette question est beaucoup plus importante, étant donné que la culture est implantée sur le sol pour une durée variable, qui va d'une saison jusqu'à plusieurs années et donc qu'elles sont soumises à une possible sécheresse estivale.

Le mélange d'espèces est une technique usuelle pour maximiser le rendement des prairies. L'utilisation simultanée des plusieurs espèces permet une production de qualité et continue pendant les différentes saisons ou années. Mais cette stratégie peut induire une situation de compétition pour des différents facteurs, entre autres l'eau ou l'azote, qui sont l'objet de cette étude.

On sait que l'absorption d'azote est un processus de transport actif, mais il a été démontré qu'il y a un effet de la teneur en eau du sol sur l'absorption d'azote, surtout à fertilisation forte (Penman, 1962; Prine et al. 1963). On trouve aussi un effet de la teneur en azote sur la consommation d'eau. En effet, une disponibilité en azote non limitante implique une croissance plus importante, donc on arrive dans un état de déficit hydrique plus tôt. Le manque d'azote a aussi un effet sur la conductance stomatique et racinaire.

Indice de nutrition azotée

Pour établir l'effet du déficit hydrique sur la nutrition azotée, on utilisera l'indice de nutrition azotée (Lemaire et Denoix, 1987a et b).

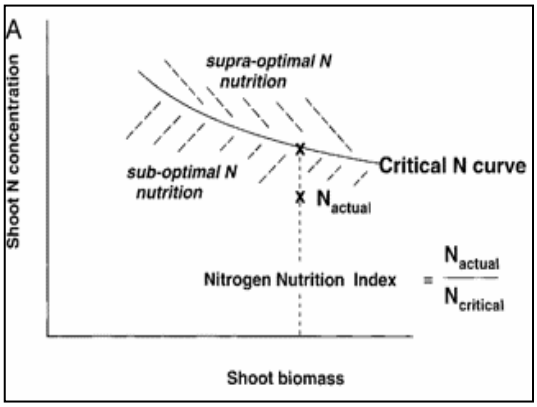


Fig. 1 : Courbe de dilution, d'après Gastal et Lemaire, 2002

Si on regarde le rapport entre la biomasse et la teneur en azote de la partie aérienne pour une culture avec une disponibilité non limitante en azote, on trouve des relations comme celle de la figure 1 dite « courbe de dilution ». Cette courbe est très constante pour chaque espèce et définit la teneur en azote optimale pour un teneur en biomasse donné. Elle sépare l'espace en deux régions : une région sub-optimale (dessous la courbe) et une supra optimale (dessus de la courbe).

Pour une culture réelle, on peut définir l'indice de nutrition azotée (INN) comme le ratio entre sa teneur en azote et le niveau optimum pour une quantité de matière sèche donné (Bélanger et al, 1992).

On peut utiliser l'INN pour étudier quel est l'effet d'un déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée quelle que soit sa biomasse (Lemaire et Denoix, 1985b).

La figure 2 montre l'évolution de l'INN par rapport aux jours de repousse chez *Festuca arundinacea* dans des traitements en sec (vide) et en irriguée (plein) et avec une fort (cercle) et faible (carré) nutrition azotée (Onillon, 1993), on peut voir un effet du déficit hydrique et du déficit de nutrition azotée sur l'INN. Les traitements fort azote sont toujours supérieurs aux traitements faible azote. On trouve la même réponse pour les traitements irrigués et secs, mais les différences sont plus importantes quand on trouve une disponibilité d'azote non limitante dans le sol. En plus, si à la fin de la repousse on fait une ré humectation dans les traitements en sec, on observe que l´INN augmente jusqu'aux niveaux normaux pour une culture irriguée, même quand son accumulation de biomasse a été limitée pendant la repousse.

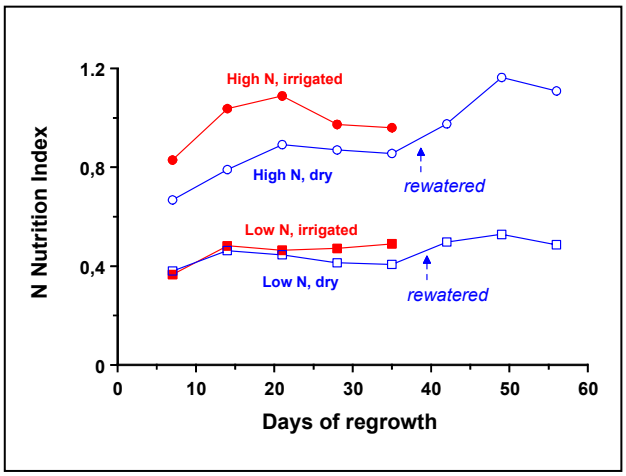


Fig. 2: Evolution de l'INN chez la *Festuca arundinacea* au cours d'une repousse par des traitements en sec (vide) et en irrigué (plein) et par des traitements avec fort (circule) et faible fertilisation azotée (carré).

2. CADRE DE THESE

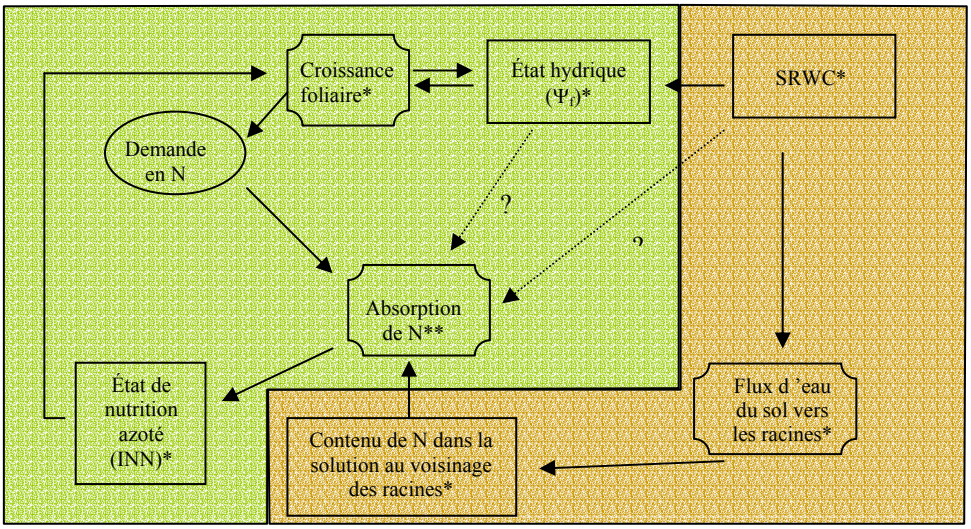


Fig. 3 : Cadre de thèse. * : Variables mesurées. ** : Variables mesurées ou estimées

Dans la figure 3, on peut voir un schéma comprenant les variables, les flux et ses relations de dépendance qui sont considérés dans cette étude.

La teneur en azote du sol a une influence sur l'absorption par des plantes, en particulier, la teneur en azote de la solution au voisinage des racines. Donc le flux d'eau du sol vers les racines va devenir une variable d'influence sur l'absorption d'azote pour son rôle en approchant le nitrate et l'ammonium vers les racines (Fig. 4). Ainsi, on arrive à une relation non directe entre l'absorption d'azote et la teneur en eau du sol.

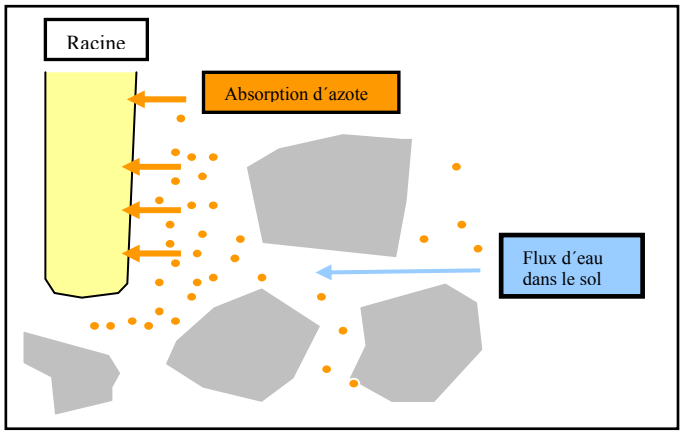


Fig. 4 : Schéma simplifié des processus de flux d'eau et d'azote autours des racines

Du côté de la plante, l'absorption est déterminée par la demande en azote, donc par la croissance foliaire réelle. Le taux de croissance instantané est influencé, d'abord, par la surface foliaire, puisque la croissance suivre une tendance exponentielle. Il dépend aussi de son état de nutrition azotée, donc son INN et de son état hydrique. La relation croissance foliaire – état hydrique est bidirectionnelle, étant donné que la teneur en eau détermine la disponibilité pour la croissance, et en même temps, elle est déterminée par la surface évaporante.

Par conséquent, on définit aussi plusieurs processus qui relient l'absorption d'azote à l'état hydrique du sol ou bien de la plante. Des travaux précédents (Lemaire et Denoix, 1987b, Onillon, 1993) ont déjà constaté l'existence d'un effet du déficit hydrique sur l'absorption d'azote.

Dans le cadre général de l'étude de l'effet du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée chez les graminées fourragères, les questions posées dans le cas d'une culture isolée sont :

- Comment quantifier l'impact du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée en conditions naturelles? Est-ce qu'on peut utiliser un modèle de culture?
- Est-ce qu'il y a un effet de la teneur en eau du sol sur l'absorption d'azote par la plante, indépendamment des flux dans le sol?
- Est-ce qu'il y a un effet de l'état hydrique de la plante sur l'absorption, indépendamment de l'état hydrique du sol?

Dans le cas d'un mélange des deux espèces qui sont en compétition pour l'eau et pour l'azote:

- Modifie-t-elle la disponibilité relative des ressources eau et azote?
- Peut-on utiliser un modèle de culture pour simuler un tel système?

3. EXPERIENCES ENVISAGEES

Un des objectifs de cette thèse est la détermination des processus qui affectent l'absorption. Tout d'abord, on peut envisager deux hypothèses : un effet de la teneur en eau du sol ou bien de la plante. Pour arriver à séparer ces deux processus, on travaillera sur des plantes avec ses systèmes racinaires partagés (en split – root) en conditions contrôlées. Ce système de culture élimine l'effet du flux d'eau du sol vers les racines.

3.1. Expériences en conditions contrôlées.

Les espèces qui ont été choisis pour ces expériences sont *Festuca arundinacea*, *Lolium multiflorum* et *Dactylis glomerata*.

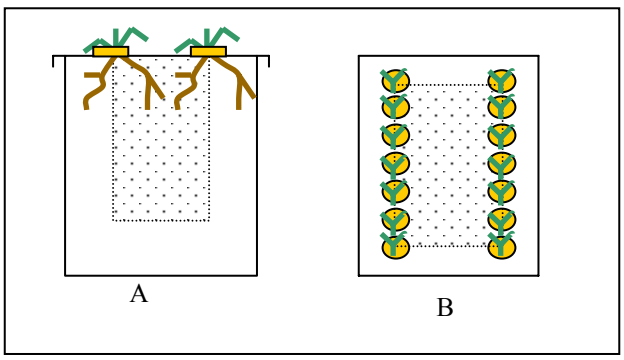


Fig. 5 : Schéma des bacs avec deux compartiments et 14 plantes dont les racines sont disposées à cheval sur la paroi qui les sépare.
A) vue de côté, B) vue de dessus.

Dans chaque bac, on a disposé 14 plantes qui étaient à cheval sur la paroi et avec ses systèmes racinaires partagés entre les deux solutions nutritives (Fig. 5).

On a envisagé cinq traitements. Les trois premiers ont été répétés trois fois. Pour les deux derniers, on n'a fait l'expérience qu'une seule fois (Fig. 6).

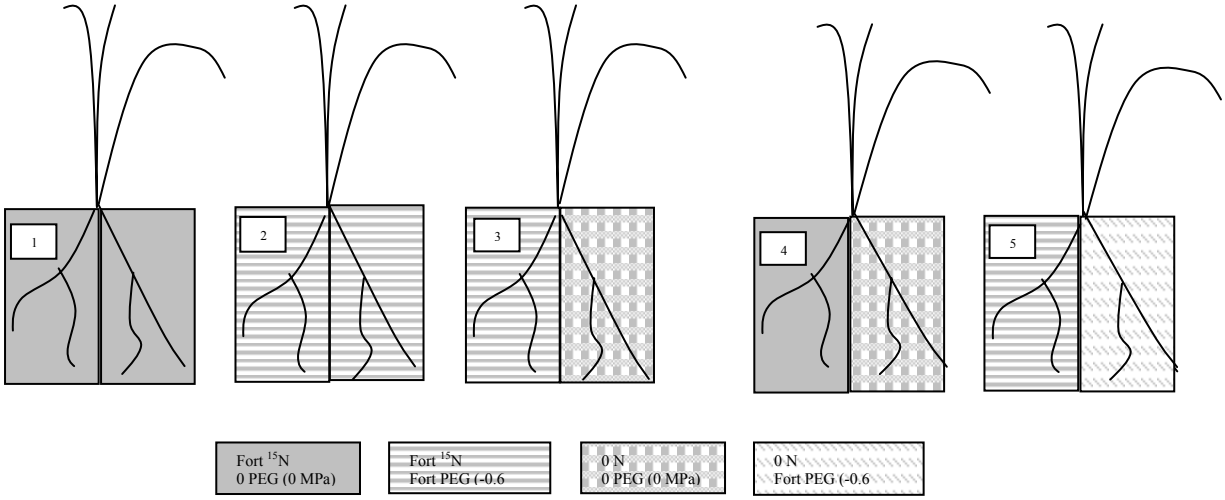


Fig. 6 : Schéma des cinq traitements envisagés pour les expériences en conditions contrôlées

- Traitement *contrôle* (Traitement 1) où il y avait de l'eau et de l'azote partout. La quantité d'azote a été de 1, 2 et 5 mM de NO_3NH_4 pour la premier, deuxième et troisième expérience respectivement. On attend que l'état hydrique et de nutrition azotée soient optimaux.
- Traitement *sec* (Traitement 2) où il y avait de l'azote partout (même concentration que pour le traitement *contrôle*), mais où on a ajouté du PEG 6000 comme agent osmotique pour élever la pression osmotique de la solution jusqu'à 0,6 MPa. Ici, la croissance des plantes est affectée par leur état hydrique. L'absorption d'azote diminue par rapport au traitement *contrôle*, mais on ne peut pas préciser s'il le fait d'une façon proportionnelle a sa réduction de croissance.
- Traitement en *split- root* (Traitement 3), où on a séparé la disponibilité d'eau et d'azote: dans le compartiment périphérique on a mis de la solution nutritive sans azote et dans le compartiment central, on a mis de la solution nutritive complète, mais avec du PEG 6000. Les plantes ont un état hydrique optimal puisqu'il y a de l'eau disponible, mais leur état de nutrition azotée peut être affecté par la restriction d'azote imposée.
- Traitement 4: Il y avait de l'eau disponible partout, mais l'azote ne se trouvait que dans un compartiment.
- Traitement 5: La pression osmotique de la solution est de 0,6 MPa partout et l'azote ne se trouvait que dans un compartiment.

Pour mesurer l'absorption d'azote pendant la semaine qu'a durée chaque expérience, on a ajouté NO_3NH_4 enrichi avec de ^{15}N. Dans les trois derniers traitements, on a utilisé de l'eau marquée avec de l'^{18}O pour déterminer la contribution de chaque compartiment à la transpiration.

Avec les trois premiers traitements, on pourra identifier quel est le facteur influençant l'absorption. Si l'état de nutrition azotée dans le traitement en *split – root* est semblable à celui du traitement *contrôle* et supérieure au traitement *sec*, l'absorption d'azote est influencée par l'état hydrique de la plante, étant donné que le traitement en *split – root* a un état hydrique optimal. Par contre, si l'état de nutrition azotée du traitement en *split – root* n'est pas optimal et semblable à celui du traitement *sec*, la variable qui influence l'absorption est l'état hydrique de la plante.

Avec les deux derniers traitements, on pourra étudier l'effet de la teneur en azote de la solution sur l'absorption d'eau. Est-ce que la plante va absorber l'eau du compartiment où il y a de l'azote préférentiellement ou bien des deux compartiments à part égale indépendamment de l'absorption d'azote ? Est-ce que cet effet est le même quel que soit le potentiel hydrique de la plante ?

3.2. Expériences en conditions naturelles

Pour étudier et quantifier l'effet du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée et, en même temps, étudier l'interaction dans une situation de compétition, des expériences en milieu naturel ont été envisagées.

Les objectifs qu'on poursuit dans ces expériences sont les suivants:

- Créer des conditions favorables à l'installation d'un déficit hydrique qui induise un déficit de nutrition azotée.
- Contrôler l'impact du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée avec le potentiel hydrique des feuilles, l'INN et la vitesse d'allongement foliaire (vaf).
- Etablir les profils d'eau, azote et racines.
- En culture mixte, déterminer l'effet et l'intensité de la compétition sur:
  - disponibilité d'azote et d'eau par chaque espèce.
  - repousse de chaque espèce.

On travaillera avec les espèces *Lolium multiflorum* et *Festuca arundinacea*, dans des parcelles avec les cultures pures et avec des mélanges des deux espèces. Avec ces expériences, on comparera la croissance de chaque espèce, en pur et aussi en mélange, pour déterminer si la compétition modifie le comportement de chaque espèce par rapport à une situation où elles sont isolées. On observera quelles sont les différences entre les deux espèces, l'une avec un système de croissance rapide qui lui permet de développer une grande surface foliaire et un système racinaire superficiel et l'autre, avec une croissance plus lente, mais avec un système racinaire plus profond pour maximiser son absorption d'eau dans une situation de sécheresse. L'effet du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée sera estimé avec l'INN.

On a prévu deux types d'expériences :

- Etude de l'impact du déficit hydrique sur l'état de nutrition azoté
- Effet de l'injection d'azote en profondeur

3.2.1. Etude de l'impact du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée

On étudiera le développement d'une culture pendant toute une repousse après une coupe. Sur des parcelles de fétuque, ray-grass et mélange des deux, on appliquera quatre traitements, résultants de la combinaison des traitements en sec et en irrigué et fort et faible azote (150 et 40 unités respectivement). Pour réussir à avoir des conditions sèches à la période voulue, on installera des abris à pluie sur les parcelles qui permettent maîtriser la quantité d'eau appliquée et dont on pourra les retirer lorsqu'il n'y a pas risque de pluie. On minimise ainsi l'effet sur le rayonnement.

On peut attendre que l'absorption soit modifiée chez une espèce quand elle est en compétition avec d'autres espèces, surtout chez l'espèce dominée.

Pour déterminer l'état hydrique du système, on fera des mesures de potentiel hydrique foliaire de base et de l'humidité volumétrique du sol avec une sonde à neutron et une sonde TDR. Pour déterminer l'INN on utilisera la teneur en azote des feuilles éclairées comme référence (Farrugia et al ., 2002). Les mesures envisagées pour suivre le développement des cultures sont le LAI (avec un LiCor 2000), la vitesse d'allongement foliaire et la biomasse aérienne et racinaire.

3.2.2. Azote en profondeur (NEP)

On disposera des tubes par où on injectera des solutions concentrées d'azote à différentes profondeurs (Fig. 8). Toutes les parcelles seront en sec. On pourra injecter à quatre profondeurs. La quantité d'azote et les différentes profondeurs envisagées sont encore à déterminer. Avec cette expérience, on n'attend pas de résultats quantitatifs sur l 'absorption. On cherche plutôt à répondre à la question qualitative: Est-ce que l'effet du déficit hydrique sur la nutrition azotée est dû à la différente distribution de l'eau et l'azote dans le profil? On peut attendre une meilleure réponse de l'état de nutrition azotée chez la fétuque ce qui, du fait d'un éventuel avantage hydrique lui donnera une supériorité dans la culture en mélange. On mesurera le potentiel hydrique de base pour évaluer l'état hydrique des plantes et la teneur en N des feuilles qui sont éclairées pour évaluer leur état nutritionnel. La vitesse d'allongement foliaire va être mesurée pour déterminer quel est l'effet des traitements sûr le fonctionnement des plantes. L'étude sera faite en fonction de distance au tube d'injection. On s'attend à ce que l'effet de l'injection sur les plantes autour diminue avec la distance.

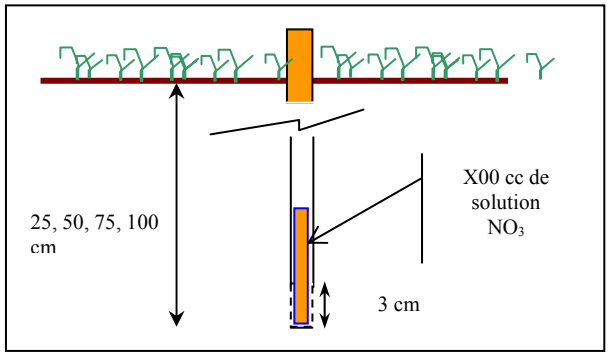
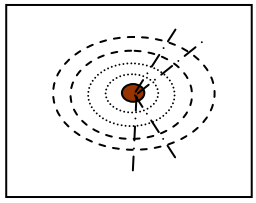


Fig. 8 : Schéma de l'injection d'azote en profondeur.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bélanger, G, Gastal, F et Lemaire, G. 1992. Growth analysis if a tall festue sward fertilised with different rates of nitrogen. Crop Sci., 32: 1371 - 1376.

-Farruggia, A., Gastal, F., Duru, M., Scholefield, D. 2002. Simplified sward nitrogen assessment from N concentration of upper leaves. Proceeding of the European Grassland Federation. Volume 7: 294-295.

- Gastal, F. et Lemaire, G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. Journal of Exp.Botany, 53 (370): 789 - 799.

- Lemaire, G. et Denoix, A. 1987a. Croissance estivale en matière sèche de peuplement de fétuaue élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) et de dactyle (*Dactylis glomerata* L.) dans l'Ouest de la France. I. Etude en conditions de nutrition azotée et d'alimentation hydrique non limitantes, 7 (6): 373 - 380.

- Lemaire, G. et Denoix, A. 1987b. Croissance estivale en matière sèche de peuplement de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) et de dactyle (*Dactylis glomerata* L.) dans l'Ouest de la France. II. Interaction entre les niveaux d'alimentation hydrique et de nutrition azotée. Agronomie, 7 (6): 381 - 389.

- Onillon, B. 1993. Effets d'une contrainte hydrique édaphiques sur la croissance de la fétuque élevée soumise à différents niveaux de nutrition azotée. Etude à l'échelle foliaire et à celle du couvert végétal. Thèse doctorale.

- Penman, H.L. 1962. Woburn irrigation, 1951-59. II. Results for grass. J. Agric. Sci. Camb. 58 : 349-64.

- Prine, G.M., Gardner, F.P. et Willard, C.J. 1963. Irrigation and nitrogen treatment of forage crops. Ohio Agric. Exp. Stn. Res. Circular 119.

Modulation du fonctionnement hydrique : résistances au transfert de la sève brute

BARIGAH T., BOGARD A., FAIVRE-VUILLIN B., DREYER E.

Unité Mixte de Recherches INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Centre INRA Nancy, F 54280 Champenoux

Remerciements

Tyree MT., Sperry J., Bogeat-Triboulot MB., Maillard P., Gross P., Clerc B., Gioria J-M., Willm F., Ibrahim T. Collin M.

Contexte général et cadre du travail

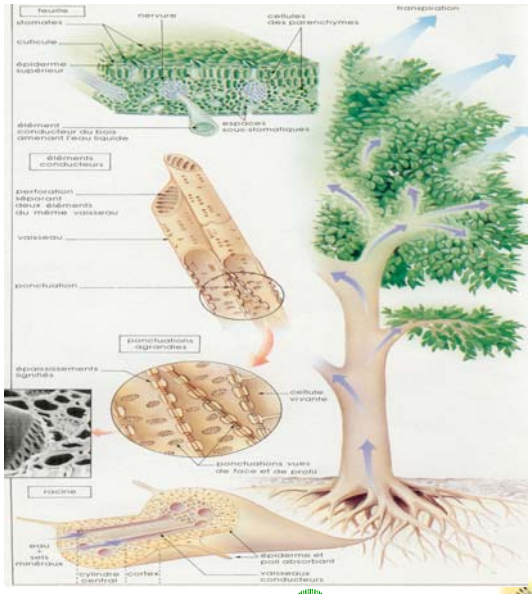
Savoir comment les plantes répondent aux disponibilités en ressources dans leur milieu reste une question centrale en Ecophysiologie et pour cause leur survie, croissance, développement et reproduction en dépendent.

Les plants exposées à un faible niveau de lumière modifient leur mode d'allocation de ressources en favorisant la croissance de la tige et des feuilles au dépens des racines et des enzymes associées à la fixation du carbone (Bloom et al., 1985).

La croissance en biomasse d'une plante s'accompagne de mise en place de structures vasculaires lui permettant de véhiculer les substances dissoutes dans l'eau et nécessaires à son métabolisme

Cochard et al. (1999) ont montré une nette dépendance de la perte de conductivité de la sève chez le hêtre et les conditions lumineuses de croissance.

Circulation de l 'eau dans l 'arbre



Demande évaporative de l 'air

⇩

transpiration foliaire

⇩

Déficit hydrique foliaire

⇩

Tensions

⇩

Transmission des tensions
(Cohésion des molécules d 'eau dans les conduits du xylème)

⇩

Tensions

⇩

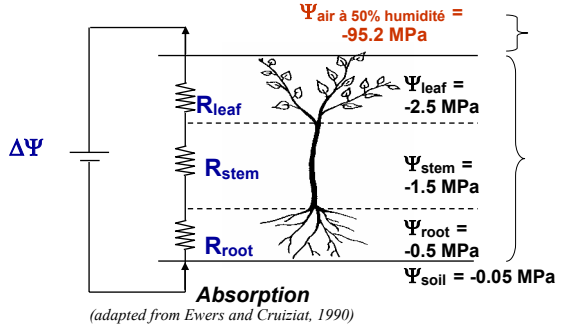
Déficit hydrique au niveau des racines

⇩

Absorption racinaire

Modèle « ohmique » de la circulation

en condition de flux conservatif : absorption=transpiration



(adapted from Ewers and Cruiziat, 1990)

Tranpiration = phase gazeuse

$E = L_A\ g_s\ (w_i - w_a)$

phase liquide

$\Psi_{leaf} = \Psi_{soil} - R_h \cdot F$

Paramètres dépendants de la taille du plant / de l'organe :

Résistance hydraulique : **R**

Conductance hydraulique : **k = 1 / R**

Paramètres indépendants de la taille du plant / de l'organe :

Conductivité hydraulique : **K = k x l**

Conductance hydraulique spécifique foliaire : **LSC = K / A_L**

Facteurs de modulation du potentiel hydrique foliaire

contrainte hydrique
(cavitation, subérisation, ...)
climat lumineux,
température,
structures vasculaires,
variations saisonnières,
espèce, ...

VDP,
lumière,
température, ...

sécheresse

stomates

$$\Psi_{feuille} = \Psi_{sol} - (\Sigma R_h) \cdot Flux$$

- *Croissance*
- *Photosynthèse*

(adapted from Ewers and Cruiziat, 1990)

Objectifs

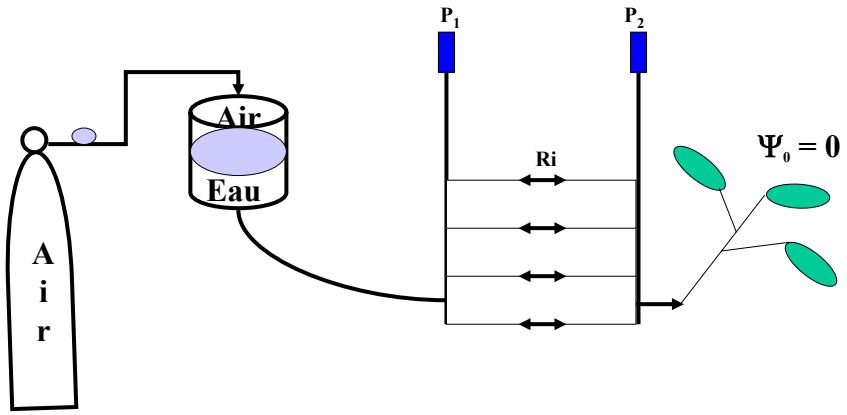
1. **Déterminer les zones de moindres résistances**
2. **caractériser et quantifier les résistances au transfert de l'eau et leur éventuelle plasticité en réponse au microclimat lumineux;**
3. **établir la plasticité de l'anatomie des voies de transport de l'eau dans la plante**

Matériel végétal et conditions de croissance

- **Semis et jeunes plants en pot de 2 espèces d'essences forestières tempérées (*Acer pseudoplatanus, Fraxinus excelsior*) en conditions de serre tunnel sous un éclairement relatif de 11%, 22%, 39% du plein découvert**
- **Jeunes plants en pot de 3 espèces d'essences forestières tropicales (*Dicorynia guianensis, Eperua falcata, Virola michelii*) en conditions de serre sous un éclairement relatif de 25% du plein découvert**
- **9 espèces d'arbustes du genre *Psychotria in situ* en forêt le long d'un gradient de lumière et d'eau dans l'isthme du Panama.**

Approches méthodologiques

Diagram of High Pressure FlowMeter

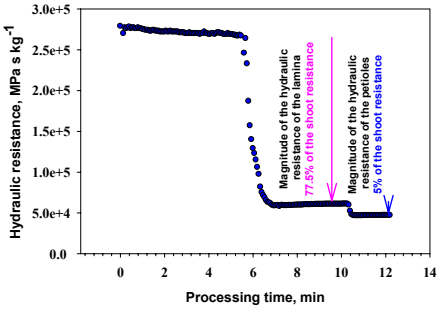


$$R_h = \Delta\Psi / F = P_2 / [(P_2-P_1) / R_i)]$$

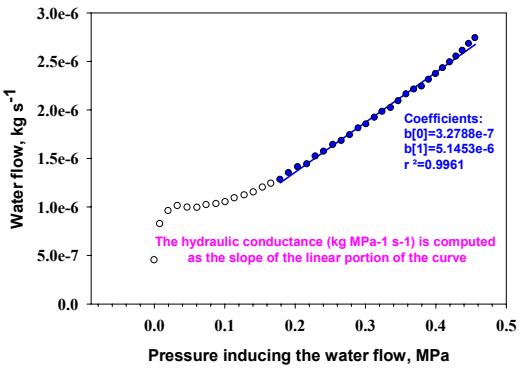
Hydraulic Pressure Flow Meter and processing of hydraulic conductance measurements on shoot components

Séquence de la mesure de la résistance hydraulique de la partie aérienne avant et après ablation des limbes puis des pétioles.

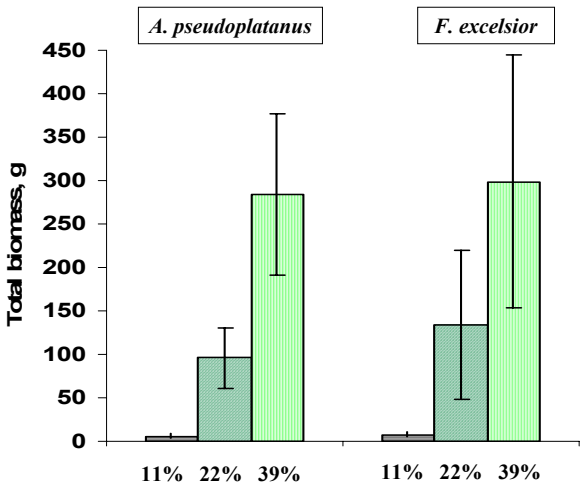
Components of the shoot hydraulic resistance in a potted *Tabebuia heterophylla* seedling

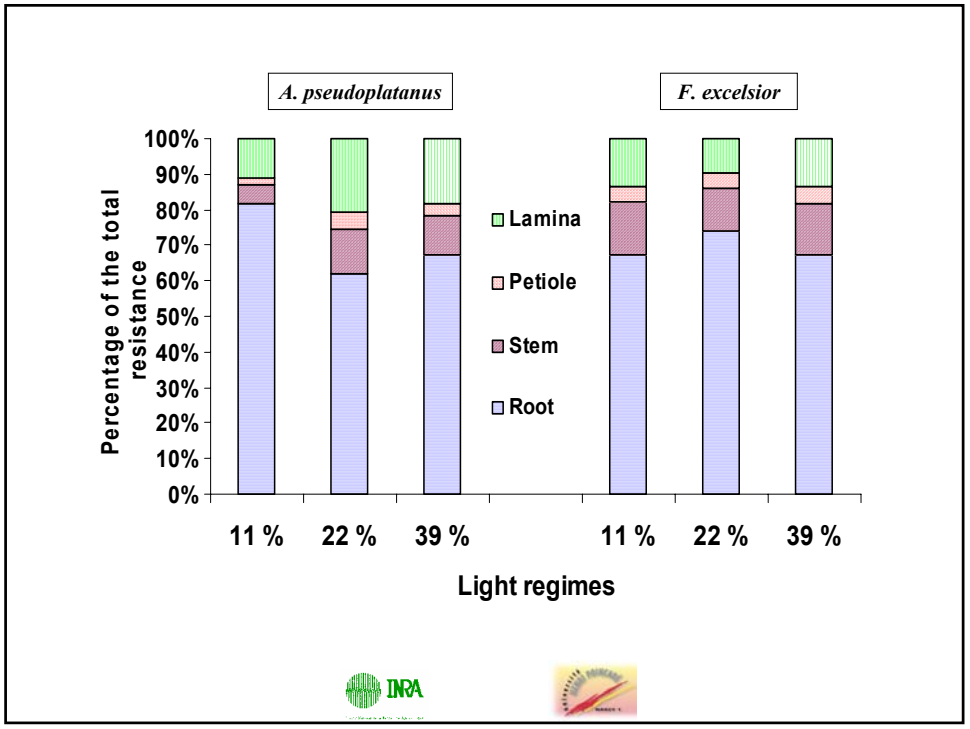


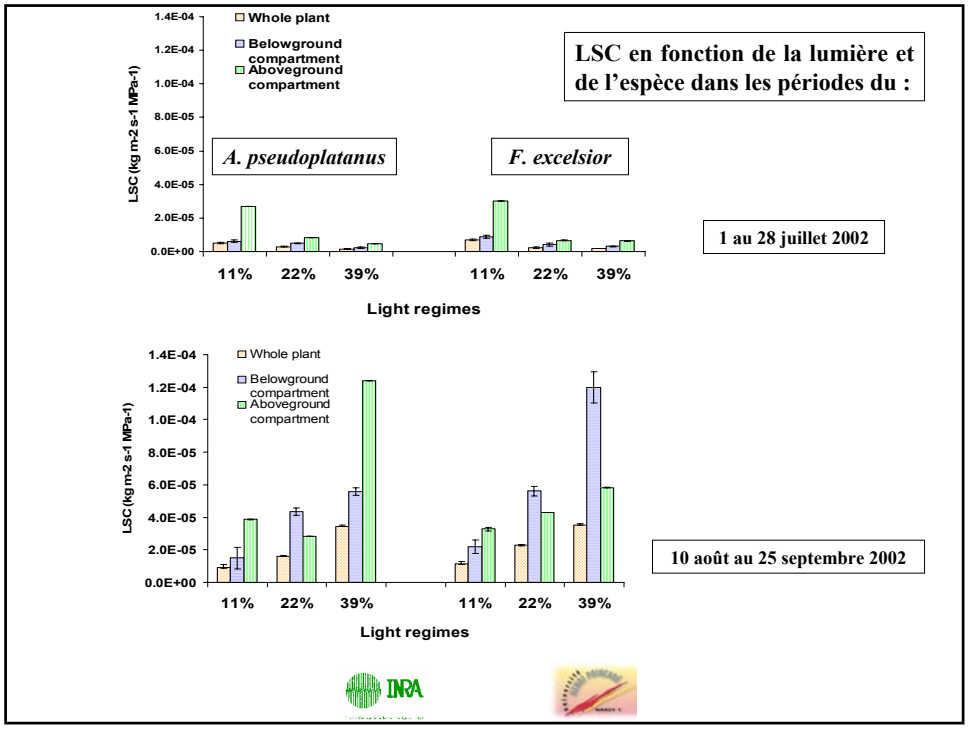
Root hydraulic conductance of a potted *Tabebuia heterophylla* tree seedling



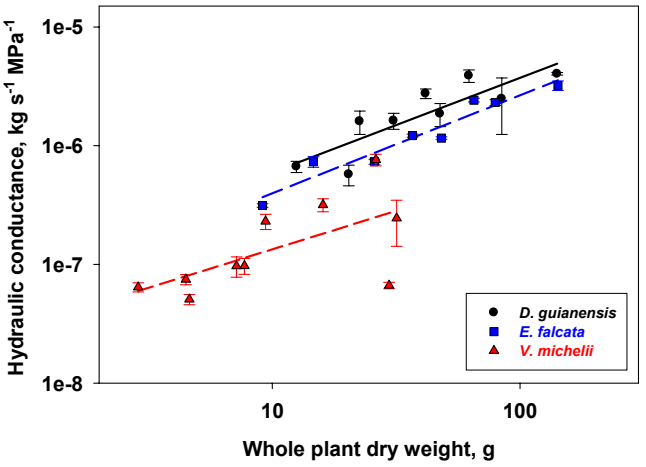
Résultats


A. pseudoplatanus
F. excelsior
Total biomass, g
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
11% 22% 39%
11% 22% 39%

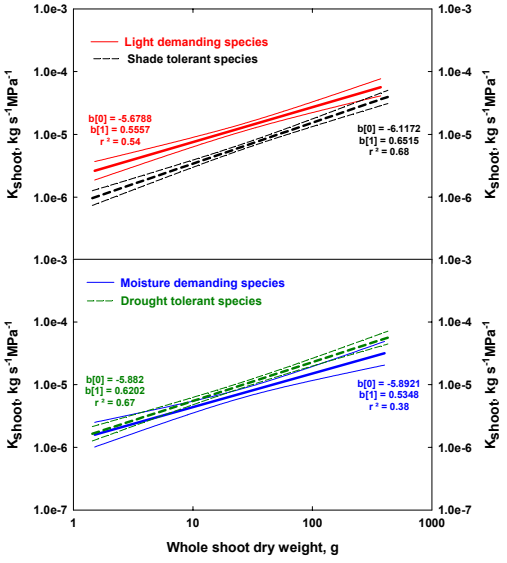

A. pseudoplatanus
F. excelsior
Percentage of the total resistance
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Lamina
Petiole
Stem
Root
11 %
22 %
39 %
11 %
22 %
39 %
Light regimes


LSC en fonction de la lumière et de l'espèce dans les périodes du :
Whole plant
Belowground compartment
Aboveground compartment
LSC (kg m-2 s-1 MPa-1)
1.4E-04
1.2E-04
1.0E-04
8.0E-05
6.0E-05
4.0E-05
2.0E-05
0.0E+00
A. pseudoplatanus
F. excelsior
11%
22%
39%
11%
22%
39%
Light regimes
1 au 28 juillet 2002
10 août au 25 septembre 2002

Total hydraulic conductance of potted seedlings versus whole plant dry weight



Shoot hydraulic conductance versus whole shoot dry weight



❖**Les résistances hydrauliques dans les organes du compartiment aérien sont inégalement réparties; la contribution essentielle est celle des limbes; celle des pétioles est généralement négligeable et celle des tiges et branches reste faible. La contribution des limbes varie fortement en fonction du niveau de rayonnement;**

❖**Des différences de conductance hydraulique spécifique (conductance rapportée à la surface foliaire) sont apparues entre espèces et microclimats lumineux. La conductance spécifique a tendance à augmenter sensiblement en pleine lumière.**

Conclusions et perspectives

•Différences d'architecture hydraulique entre les espèces
- intrinsèques : distribution des résistances hydrauliques dans la plante
- extrinsèques : réponses aux conditions de croissance étudiées durant leur phase initiale de croissance et d'installation.

•Plasticité phénotypique de l'architecture hydraulique observée a été confortée.

•?

•Approfondir ces observations en prenant en compte l'effet de l'âge des plants et de la dynamique saisonnière sur le fonctionnement hydraulique des espèces retenues

•Poids respectif de l'ontogenèse et de la plasticité propre de la réponse à la lumière.

Merci de votre attention