



Caractérisation des contraintes biotiques et abiotiques sur la phénologie printanière du chêne : expliquer les patrons de diversité et prédire les changements futurs

Cécile Dantec

► To cite this version:

Cécile Dantec. Caractérisation des contraintes biotiques et abiotiques sur la phénologie printanière du chêne : expliquer les patrons de diversité et prédire les changements futurs. Ecologie, Environnement. Université de Bordeaux, 2014. Français. ⟨NNT : 2014BORD0042⟩. ⟨tel-01133083v2⟩

HAL Id: tel-01133083

<https://theses.hal.science/tel-01133083v2>

Submitted on 18 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENT
ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE, FONCTIONNELLE ET DES COMMUNAUTÉS

Par Cécile DANTEC

**CARACTÉRISATION DES CONTRAINTES BIOTIQUES ET
ABIOTIQUES SUR LA PHÉNOLOGIE PRINTANIÈRE DU CHÊNE**
Expliquer les patrons de diversité et prédire les changements futurs

Sous la direction de :
Desprez-Loustau, Marie-Laure et Delzon, Sylvain

Soutenue le 22 mai 2014

Membres du jury :

M. van Leeuwen, Kees
M. Sache, Ivan
M. Améglio, Thierry
M. Lebourgeois, François
M. Marçais, Benoît

Pr Bordeaux Sciences Agro
Pr AgroParisTech
DR INRA Clermont-Ferrand
MCU AgroParisTech - ENGREF
DR INRA Nancy

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de doctorat est rédigé sous forme de thèse sur publications. Cette thèse a été financée sur une durée de 3 ans par l'INRA (département Ecologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques (EFPA)) et la Région Aquitaine, dans le cadre du projet « Phénologie et Stratégies Temporelles ». Ce contrat a été prolongé de trois mois, financés par le département EFPA de l'INRA, puis de deux mois, financés par le projet ANR A22000753 RESIPATH (*Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens*). Ce travail de recherche s'est déroulée au sein de l'UMR 1202 Biodiversité, Gènes et Communautés (BIOGECO) INRA – Université de Bordeaux, au sein des équipes de Génétique et Ecologie des Maladies de la Forêt (GEMFor) et d'Ecologie et de Génomique Fonctionnelles (EGF).

REMERCIEMENTS

Moult gens à remercier ! Allez tiens, on va procéder géographiquement ! En espérant n'oublier personne !

Nous sommes tout d'abord à Pierroton, au bout du couloir de l'étage de l'Aquarium... Dominique et Brigitte, merci pour ces moments très sympathiques dans ce bureau hétéroclite, ou autour d'une charlotte aux fraises et de bulles ! Audrey, ça m'a manqué de ne pas croiser ta bouille ces derniers mois dans les couloirs, merci pour ton soutien, nos papotages, pour tous ces bons moments au labo, ou ailleurs (autour d'un bon plat hummm) ! Callaghan te remercie Cyril pour les chansons westerns et le chocolat, on se recroisera sûrement pour échanger du fromage contre des légumes ! Boris, merci pour ces moments franco-anglo-russe, au labo ou au détour d'une boisson au raifort ! Marie-Laure ! Un grand merci pour ta bonne humeur, ton soutien, ton aide, tes idées, ton envie de partager... Qui font que travailler avec toi est un plaisir, jusque dans les Pyrénées ! Sans oublier ton amour de la Bretagne, une très bonne chose ! Corinne, Cécile, merci pour ces discussions au coin café et votre aide ! Merci aux collègues entomo du bout du couloir (mais tous les autres aussi !), toujours de bonne humeur !

On descend l'escalier, on traverse le hall, bienvenue dans le bureau des stagiaires (non actuellement occupé par des stagiaires) ! Merci les copaincs, Fred, Thomas, Marie, Damien (oui tu es toujours là !), pour ces chouettes parties de cartes, cette belle imitation de T.P., ce retour en folie de Roquetaillade, ce courage de supporter les gars, ces trajets en covoiturage... Vous vous reconnaitrez ! Prenez soin de Pacman ! Hugo, en un mot (qui n'est pas merci mais je te remercie !) : Toulenn ! Fabrice, merci pour ta bonne humeur et tes conseils, et ton sauvetage de 205 en panne de batterie ! Allez hop, direction l'autre bout du hall, voilà le bureau de Martine et Xavier ! Merci à tous les deux, Martine, tes incroyables histoires, tes incroyables choses à grignoter, et ton rire ! Xavier, que d'aventures !! Merci pour nos virées pyrénéennes, ton aide sur le terrain comme en carto, on se recroisera sur un chemin de rando c'est sûr, ou autour d'un fromage et de vin ! Merci Gilles, le cavalier ! Ah et je tiens à ne surtout pas remercier Olivier ! Roohh je rigole merci de m'avoir laissé te frapper pendant ces merveilleuses manips, j'espère que les zigottos vont bien prendre le relai ! Carole, la petite te remercie d'avoir toujours été aux nouvelles, et pour ta joie et ta bonne humeur !

Allez hop, on sort de l'Aquarium, et on vadrouille dans Pierroton. Merci à Véro, Chantal et Flo, quel chouette trio vous faites ! Jean-Marc, l'Homme de la montagne, merci pour ces virées en Kangoo et sur les chemins des Pyrénées, en raquettes, en chaussures, ou en traineau ! Merci à François, de m'avoir initiée au ping-pong, d'avoir supporté une belle andouillette, et de ton aide, même si je ne te félicite pas de ta passion pour Nolwenn Leroy ! Remercions aussi Vicky... Merci petite Hélène, l'œil du tigre, pour ton soutien envers et contre tout, ta patate-pêche-bonne humeur, tous ces chouettes moments de journée ou de soirée ! Merci à Sarah et ses folies, Bob l'Eponge l'éponge est toujours sur mon bureau, merci à Loïc, je t'en ai fait voir un peu de toutes les couleurs, mais les bretons s'en sortent toujours ! Merci à Frédéric B, Frédéric R, Antoine, Thierry, Patrick, Philippe... qui m'ont apportée leur aide lorsque j'en ai eu besoin.

Et maintenant direction... l'aéroport ! Ou plus exactement, l'Irlande ! Je remercie Colin Kelleher de m'avoir accueillie au sein du National Botanic Garden de Dublin, pendant un mois, ainsi que toute la petite équipe, tous très sympathiques, et je remercie plus particulièrement Philippe pour m'avoir emmenée sur le terrain et son aide dans la vie de tous les jours ! Retour en France, à Toulouse, où je remercie Michel Bartoli d'avoir partagé avec passion sa connaissance des forêts pyrénéennes et de leur histoire. Tiens on va aussi faire un petit détour par Montpellier où je remercie Isabelle Chuine de m'avoir accueillie au sein du CEFE et pour toute son aide en modélisation. Merci à Sandrine de m'avoir accueillie lors de mes visites à Montpellier, sans toi et tes clés mystérieuses je n'aurais pas pu être en retard au premier jour ! Un dernier détour par Clermont-Ferrand où je remercie Marc Bonhomme, pour m'y avoir accueillie et pour toute son aide pour les expérimentations de dormance. En fait allons même jusqu'en Suisse, merci beaucoup Yann pour toute l'aide que tu m'as apportée et pour toutes tes connaissances. Retour maintenant à Bordeaux, et plus particulièrement au campus de l'Université, bâtiment B2 !

Sylvain, je compte sur toi maintenant pour m'en apprendre autant sur les vaches que tu m'en as appris sur la phénologie ! Un grand merci pour ton enthousiasme, ton aide à toute heure, ta pédagogie et bien sûr pour ta belle carte postale, l'homme qui plantait des arbres ! Annabel, merci pour ton écoute, ton aide, ton entrain, j'espère avoir réussi mon rôle de demi-thésarde ! Et j'attends avec impatience les beaux jours pour faire des grillades peinturlurées... Régis, Manu, Gaëlle, Virgil, Jean-Paul.... merci à tous pour ces discussions ou aide ou autre ! Les petits zouaves des bureaux doctorants, merci à Elsa pour ses conseils en friperie, paquets cadeaux, et sa bonne humeur ! Merci à la fine équipe des burgerophiles et raclettes-top-secrètes-ophiles, Marie, digne représentante des Sauvages, toujours à fond, merci pour ton soutien !, Adrien, même si bon tu as choisi le soleil et la glandouille par intermittente sous les tropiques !, Nadège, vive la Réunion !, Pauline et ses burgers géants ! Je n'en reviens toujours pas, Nastasia, plongée, burgers, pruneaux et fiesta ! Merci poulette pour ton soutien, tes encouragements, ta bonne humeur et ton accent !

Merci bien sûr à tous les copain·s, de Bretagne, Nantes, Toulouse, Bordeaux, La Réunion, et d'ailleurs, merci à toute la famille, particulièrement ma maman pour son soutien, et à toute la belle-famille, qui n'ont pas arpenté ses couloirs mais qui étaient bien là ! Et bien sûr merci à mon petit Paul Fromage, pour... tellement de choses !! Je vais juste dire ici que tu es le meilleur du monde en bases de données, on sait jamais si quelqu'un de Google lit ces remerciements, mais c'est surtout pour tout le reste que je tiens à te remercier moultement !

Avant de vous laisser vous lancer dans ce qui suit, un dernier petit mot aux espions qui ont volé et dissimulé toutes les données de cette thèse, si près du but... obligeant par la suite Xavier à travailler sur les cartes enfermées dans son bureau, téléphone coupé... Et bah on a réussi quand même !!! Elle est là et belle et bien là cette petite thèse !! Avec le recul, je me demande si ce n'était pas un coup des écureuils (hein Hugo ?)... Car on sait bien qu'un jour, drogués par l'oïdium, ils envahiront le monde !

SOMMAIRE



CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

1**ETAT DE L'ART**

3

1. LA PHENOLOGIE DES ARBRES EN MILIEU TEMPERE 3

2. DEBOURREMENT ET EXPOSITION AUX PRESSIONS ENVIRONNEMENTALES 14

3. PROCESSUS MIS EN JEU DANS L'ADAPTATION AUX PRESSIONS 30

4. REPONSES PHENOLOGIQUES FACE AU CHANGEMENT CLIMATIQUE 36

OBJECTIFS 31

MATERIELS ET METHODES 34

CHAPITRE II

50

Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range

Dantec CF, Vitasse Y, Bonhomme M, Louvet JM, Kremer A, Delzon S (2014) *International Journal of Biometeorology* doi: 10.1007/s00484-014-0787-7

CHAPITRE III

73

Including dormancy break into budburst models to better forecast tree phenology

Dantec CF, Delzon S, Desprez-loustau ML, Bonhomme M, Chuine I (*in prep*)

CHAPITRE IV

97

Avoidance of spring frost and disease through phenological variations in oak populations along elevation gradients

Dantec CF, Ducasse H, Capdevielle X, Fabreguettes O, Delzon S, Desprez-Loustau ML (*submitted in PLOS ONE*)

CHAPITRE V

122

A biotroph parasite changes growth patterns in its host tree: host tolerance response and potential manipulation of host physiology by the parasite

Desprez-Loustau ML, Saint-Jean G, Barrès B, Dantec CF, Dutech C (2014) *Annals of Forest Science* doi: 10.1007/s13595-014-0364-6

CHAPITRE VI : SYNTHESE ET DISCUSSION

134

SYNTHÈSE ET DISCUSSION AUTOUR DES PRINCIPAUX RÉSULTATS	3
1. PRESSION EXERCÉE PAR LES TEMPERATURES DE <i>CHILLING</i> ET DE <i>FORCING</i> SUR LE DEBOURREMENT	4
2. EXPOSITION DU CHENE AUX CONTRAINTES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES	4
3. QUAND L'OÏDIUM MODIFIE LA PHENOLOGIE DE LA CROISSANCE DU CHENE	4
4. ROLE DES INTERACTIONS ENTRE LES FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES DANS L'INTENSITE DES DEGATS	4
5. BILAN	4
QUESTIONS SOULEVÉES ET PERSPECTIVES	4
1. LA PHENOLOGIE : DES MECANISMES SOUS-JACENTS PEU CONNUS	4
2. PRESSIONS DE SELECTION PASSES ET FUTURES SUR LA PHENOLOGIE DU CHENE	4

BIBLIOGRAPHIE	164
----------------------	------------

ANNEXE	184
---------------	------------

De nouvelles maladies menacent nos forêts

Desprez-Loustau ML et Dantec C (2013) Sud-Ouest Nature N°159

CHAPITRE I

Etat de l'art, objectifs, matériels et méthodes



ETAT DE L'ART **3**

1. LA PHENOLOGIE DES ARBRES EN MILIEU TEMPERE	3
1. LA PHENOLOGIE FOLIAIRE	4
2. LA DORMANCE DES BOURGEONS	5
<i>Les différentes phases de dormance</i>	5
<i>Les facteurs impliqués dans le contrôle de la dormance</i>	7
<i>Mécanismes physiologiques de la résistance au froid</i>	8
3. MODELISATION DE LA PHENOLOGIE PRINTANIERE	10
4. DIVERSITE PHENOTYPIQUE DU DEBOURREMENT	11
2. DEBOURREMENT ET EXPOSITION AUX PRESSIONS ENVIRONNEMENTALES	14
1. DES PRESSIONS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES	14
2. COMMENT FAIRE FACE AUX PRESSIONS	16
3. PROCESSUS MIS EN JEU DANS L'ADAPTATION AUX PRESSIONS	20
1. DIVERSITE GENETIQUE ET FORCES EVOLUTIVES	21
<i>Mutation, migration et dérive génétique</i>	22
<i>Zoom sur la sélection naturelle</i>	22
2. LA PLASTICITE PHENOTYPIQUE	24
4. REPONSES PHENOLOGIQUES FACE AU CHANGEMENT CLIMATIQUE	26
1. LES MODIFICATIONS DU CLIMAT	26
2. IMPACTS SUR LA PHENOLOGIE	28

OBJECTIFS **31**

MATERIELS ET METHODES **34**

1. LES ESPECES ETUDIEES	34
2. LE GRADIENT ALTITUDINAL	37
3. CARACTERISTIQUES DES POPULATIONS	38
4. ETUDE DE LA PHENOLOGIE	41
1. SUIVI <i>IN SITU</i> DU DEBOURREMENT DU CHENE	41
2. SUIVI <i>IN SITU</i> DE LA SPORULATION DE L'OÏDIUM	43
3. SUIVI DE LA DORMANCE DU CHENE EN CONDITIONS CONTROLEES	46
4. MODELISATION DE LA PHENOLOGIE DU CHENE	47
5. SUIVI DES EFFETS DE L'OÏDIUM SUR LA PHENOLOGIE DU CHENE AU COURS DE LA SAISON	48
5. NOTATIONS D'INFECTION	49

ETAT DE L'ART

1. La phénologie des arbres en milieu tempéré

La phénologie est apparue récemment comme une priorité importante pour la recherche écologique, car c'est un très bon indicateur des conditions climatiques locales et donc des changements climatiques, étant un caractère très sensible aux variations thermiques (Schwartz 1999 ; Chmiliwski & Rötzer 2001 ; Sparks & Menzel 2002). Thompson & Clark (2004), à travers le suivi de 27 stations à travers le monde, ont ainsi révélé que le début du cycle saisonnier du CO₂ atmosphérique, i.e. sa fixation par les végétaux, a été avancé au cours des dernières décennies.

La phénologie est la répartition dans le temps des événements biologiques cycliques (de la flore ou de la faune) qui sont influencés par l'environnement (Schwartz 2003). Le champ d'étude de la phénologie peut aussi être élargi à l'étude des facteurs qui l'influencent (Defila & Clot 2001). Chez les arbres, deux catégories d'événements phénologiques se produisent au cours d'une année. La première catégorie concerne la phénologie foliaire, et affecte la photosynthèse, la productivité et la survie des individus (débourrement des bourgeons au printemps, sénescence foliaire à l'automne...). La deuxième catégorie concerne la floraison et la maturation des fruits, et affecte la reproduction et la descendance de l'arbre. Ainsi, la phénologie est cruciale pour la fitness des plantes (Fenner 1998 ; Bennie et al. 2010), car elle affecte leur croissance, leur survie et leur reproduction. Chez les arbres en climat tempéré, les événements phénologiques sont généralement vus comme un moyen de s'adapter aux stress environnementaux, leur permettant de persister au sein d'une niche temporelle locale (Pau et al. 2011). Les études phénologiques peuvent être utilisées à différentes fins. Elles enrichissent la connaissance de l'autécologie des essences, de leurs capacités adaptatives et sont depuis peu employées afin d'étudier la réponse de la végétation au changement climatique (sujet abordé partie 4). Pour les forestiers, ces études peuvent permettre de choisir les espèces et les provenances les mieux adaptées à un contexte climatique particulier, voire fournir des outils dans des programmes d'amélioration génétique.

1. La phénologie foliaire

Nous nous intéressons ici plus particulièrement à la phénologie foliaire des arbres caducifoliés en climat tempéré. Celle-ci peut être séparée en deux phases, leur permettant de s'adapter à l'alternance des saisons et notamment aux variations de régime thermique : une phase de dormance durant l'automne/hiver et une phase active de croissance (saison de végétation) durant le printemps/été (Figure 1).

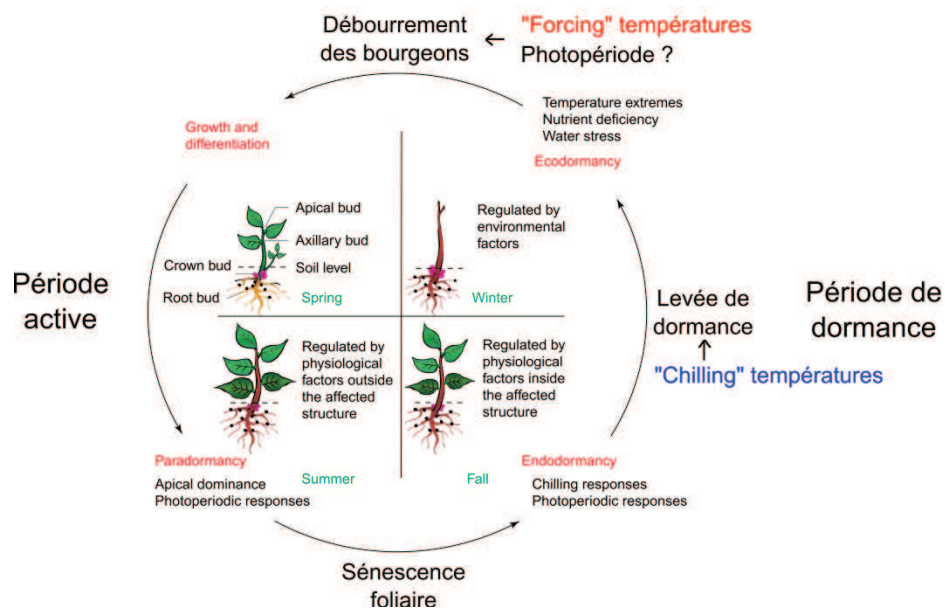


Figure 1. Représentation schématique du cycle saisonnier des arbres caducifoliés en climat tempéré, avec les différents signaux environnementaux permettant l'entrée et la sortie des trois types de dormance. D'après Horvath et al. (2003).

La dormance est une suspension temporaire de la croissance affectant n'importe quelle structure de la plante comportant un méristème, ici les bourgeons végétatifs. Le débourrement est l'éclatement des bourgeons et la mise en place des feuilles au printemps. La date de débourrement détermine la longueur de la saison de végétation et est ainsi un déterminant majeur de la croissance (Dickson 1989, Borchert 1999) et de la survie (Morin et al. 2008). L'arbre rentre donc ensuite en saison de végétation, qui a été définie de multiples façons. Pour certains auteurs, il s'agit de la période pendant laquelle s'effectue la croissance en hauteur de l'arbre (Fontanel 1979). Comps et al. (1987) la définissent comme étant la période photosynthétiquement active. La fin de la période de végétation est marquée

par une période de sénescence du feuillage. Il s'agit d'un processus débutant par l'apparition de la coloration automnale, qui marque la fin du cycle annuel de croissance et de fonctionnement des feuilles, et aboutissant à la chute des feuilles ou des aiguilles. Les ébauches de feuilles (ou primordia) passent ensuite l'hiver protégées au sein des bourgeons végétatifs, et le cycle se répète. Il est important de noter que la phénologie du chêne est caractérisée par le phénomène de polycyclisme : l'arbre est capable d'exprimer plusieurs cycles de croissance au cours d'une même saison (croissance rythmique). Ce phénomène est plus marqué chez les semis (Barnola et al. 1990 ; Collet et al. 1997), qui peuvent présenter jusqu'à 4 ou 5 pousses pendant une saison, mais est aussi observé chez les adultes (le plus souvent simplement deux pousses au cours d'une saison). Cependant, ce sont les premières pousses qui participent le plus activement à la croissance de l'arbre.

Cette étude s'intéresse plus particulièrement à la phénologie du débourrement. Nous allons donc décrire plus précisément les différentes phases de dormance, dont la sortie permet la reprise de la vie active.

2. La dormance des bourgeons

Les différentes phases de dormance

Les arbres et les autres plantes ligneuses pérennes en climat tempéré se distinguent donc par une période de dormance en hiver, afin d'échapper aux gels de l'automne jusqu'au printemps. L'entrée en dormance est principalement contrôlée par la diminution de la photopériode (Doorenbos 1953 ; Horvath et al. 2003). La sortie de dormance au printemps, une fois que les températures sont de nouveau aptes à la croissance, est quant à elle contrôlée principalement par des adaptations complexes liées aux températures froides et chaudes (Howe et al. 2003). La dormance des bourgeons peut être divisée en trois états successifs, basés sur la localisation du facteur exerçant le contrôle instantané sur la croissance : la paradormance, l'endodormance (ou dormance *sensu stricto*), et l'écodormance (ou quiescence) (revus dans Lang et al. 1987) (**Figure 1**). La paradormance est due à une inhibition exercée par des organes ou des tissus plus ou moins éloignés des ébauches, primordium et méristèmes de la structure concernée. Dans notre cas, il a été noté que généralement des signaux des bourgeons

apicaux inhibent la croissance des bourgeons latéraux (Horvath et al. 2003). La croissance peut reprendre dès la suspension de l'effet inhibiteur ; il s'agit d'une inhibition corrélative (Chouard 1951). L'origine de l'endodormance se situe par contre au sein-même du bourgeon. La croissance est impossible même si les conditions environnementales sont favorables et que les inhibitions corrélatives ont été supprimées : il s'agit vraiment d'un état de dormance au sens strict (Chouard 1951, Doorenbos 1953). Enfin, la dernière phase de dormance chez les bourgeons, l'écodormance, est imposée par un facteur externe à l'arbre défavorable à la croissance, les températures trop basses. Cet état disparaît dès le retour à des conditions favorables, c'est donc un état de quiescence (Chouard 1951 ; Vegis 1964 ; Champagnat 1973).

De nombreuses études se sont intéressées à essayer de caractériser expérimentalement l'évolution des bourgeons pendant la dormance automno-hivernale dans les zones tempérées. Le test de « boutures de nœuds isolés » a été utilisé chez de nombreuses espèces, principalement d'arbres fruitiers (Pouget 1963 ; Rageau 1978 ; Champagnat 1989 ; Rageau 1978 ; Balandier et al. 1993). On observe dans ce test la capacité de croissance du (ou des) bourgeon(s) situé(s) sur un fragment de rameau ne comportant qu'un seul nœud (élimination de la paradormance à longue distance) et placé dans un environnement favorable à la croissance (élimination d'écodormance). L'absence de croissance peut donc être attribuée aussi bien à l'endodormance qu'à la paradormance à courte distance. Cependant, la sortie de cette phase de croissance lente correspond bien à une sortie de dormance. Gendraud (1975, 1977) développa le test « nucléosides » basé sur la capacité ou l'incapacité des bourgeons à augmenter leurs teneurs en nucléosides tri-phosphates adényliques (ATP) et non adényliques (NTP). Dans les conditions du test, les bourgeons non dormants augmentent leurs teneurs en ATP et NTP. Les bourgeons dormants n'augmentent au mieux que leur teneur en ATP. L'absence de capacité d'accumulation de NTP caractérise une incapacité potentielle de croissance intrinsèque au bourgeon lui-même. Cependant, malgré le grand nombre d'auteurs et de travaux pour améliorer la compréhension des contrôles de la dormance, il reste difficile de rattacher clairement les observations et les mesures réalisées aux différents états de dormance décrits précédemment.

Les facteurs impliqués dans le contrôle de la dormance

L'endodormance est levée via l'action des températures froides, dites températures de *chilling* (revue dans Howe et al. 1999). Le rôle des températures froides dans la phénologie du débourrement a été bien démontré, en particulier pour les arbres fruitiers (Ruiz et al. 2007 ; Luedeling 2012 ; Darbyshire et al. 2013), mais il reste de nombreuses zones d'ombre dans notre connaissance. A ce jour, aucune étude n'a précisément déterminé la gamme des températures efficaces et la température optimale pour lever la dormance chez la plupart des arbres forestiers (Shirazi 2003). Il est tout de même admis que les températures froides efficaces sont généralement inférieures à 10°C, avec une gamme optimale entre 2 et 7°C pour la plupart des espèces (Coville 1920 ; Doorenbos 1953 ; Nienstaedt 1966 ; Cannell 1989 ; Battey 2000). Une fois que les besoins en froid ont été satisfaits, les températures chaudes, dites températures de *forcing*, permettent généralement l'initiation de la croissance primaire pendant l'écodormance jusqu'au débourrement (Sakai & Larcher 1987 ; Bigras et al. 2001). Cependant, la relation entre les périodes de *forcing* et de *chilling* est encore sujette à controverse. Les températures froides pourraient être actives dès le début de l'endodormance jusqu'au début de la quiescence (i.e. écodormance) ou jusqu'au débourrement, et les températures chaudes pourraient être actives dès le début de l'endodormance ou à partir de la quiescence, jusqu'au débourrement (revu dans Chuine et al. 2000). Ceci n'étant pas clairement déterminé, il n'y a pas encore de consensus sur la succession ou la superposition des phases d'endodormance et d'écodormance. Dans l'hypothèse où les phases de *chilling* et de *forcing* se superposeraient, il est généralement établi que la quantité de températures chaudes nécessaires au débourrement décroît à mesure que la durée et quantité de températures froides augmente (Cannell & Smith 1983 ; Murray et al. 1989 ; Hänninen et al. 1993 ; Cannell 1997). Chez certaines espèces d'arbres tempérés, la date de débourrement peut aussi être contrôlée par la photopériode, en interaction avec les besoins en températures chaudes (Laube et al. 2013 ; Vitasse & Basler 2013). Laube et al. (2013) ont démontré expérimentalement que les espèces de chêne (*Quercus robur* et *Q. rubra*) étaient insensibles à la photopériode, bien que *Q. bicolor* y réponde faiblement, contrairement au hêtre (*Fagus sylvatica* L.) qui est sensible à la photopériode lorsque les besoins en froid ne sont pas satisfaits.

Les besoins en température sont sous contrôle génétique. Ceci concerne essentiellement deux processus (Rousi & Pusenius 2005 ; Sanz-Perez et al. 2009) : le premier contrôle agit sur la durée de la période de froid et la quantité de froid requise pour lever l'endodormance (Bennett 1949 ; Nooden and Weber 1978 ; Perry & Wu 1960 ; Samish 1954 ; Sherman et al. 1977), et le deuxième agit sur la sensibilité aux températures chaudes, comme il a été démontré dans des plantations de châtaigniers (Mauget & Germain 1980 ; Charrier et al. 2011). Un grand nombre de gènes sont potentiellement impliqués dans le contrôle de la phénologie du débourrement (Lang 1994 ; Derory et al. 2006). La forte héritabilité du débourrement, reportée à la fois pour les espèces d'arbres caducifoliés (Howe et al. 2000 ; Baliuckas et al. 2005 ; Alberto et al. 2011) et persistantes (Billington & Pelham 1991), confirme ce fort déterminisme génétique. Les hormones sont impliquées dans la régulation de la dormance (Anderson et al. 2001 ; Araki 2001 ; Horvath et al. 2003). Les deux principales hormones impliquées sont les gibbérellines et l'acide abscissique (ABA). La concentration en ABA dans le bourgeon suit un cycle saisonnier avec un maximum durant la phase d'endodormance et un déclin progressif jusqu'à la fin de l'écodormance (Ofir & Kigel 1998 ; Naor et al. 2008) ; cette hormone semble plutôt ralentir la levée de dormance. Burg & Burg (1968) a aussi démontré un rôle de l'éthylène dans l'inhibition de la croissance des bourgeons. Les gibbérellines semblent avoir un rôle opposé (Anderson et al. 2001), pouvant stimuler fortement la croissance des bourgeons (Falusi & Calamassi 2003).

Mécanismes physiologiques de la résistance au froid

Les écailles des bourgeons jouent un rôle d'isolation thermique des organes sensibles au froid, ici les ébauches de feuille, durant l'hiver (Derreudre & Gazeau 1992). Parallèlement à cela, la plante met en place des processus physiologiques d'acclimatation aux températures gélives au sein des bourgeons, dits processus d'endurcissement, en réponse à la diminution de la photopériode et de la température (Weiser 1970 ; Christersson 1978 ; Larcher 2005) (**Figure 2**). Pour protéger le contenu des cellules, les plantes favorisent le gel extracellulaire. Le dégagement de chaleur provoqué par ce gel permet de maintenir la température intracellulaire (Wolfe & Bryant 2001 ; Cavender-Barès et al. 2005). Les

dégâts liés au gel sont finalement liés à la rupture des membranes biologiques, si de la glace se forme à l'intérieur des cellules (Ziegler & Kandler 1980 ; Sung et al. 2003 ; voir la revue de Larcher 2005). Par conséquent, une partie importante de la résistance au gel est de maintenir une fluidité de la membrane et de tolérer la déshydratation dans le plasma de la cellule, induite par le phénomène de congélation extra cellulaire. Pour ce faire, les plantes synthétisent des déhydrines et des protéines antigel au cours de la phase de pré-durcissement en fin d'automne. Ensuite, les plantes augmentent la concentration en proline et polyol au cours de la phase initiale de durcissement. La dernière étape du durcissement se fait par une exposition répétée à des températures gélives pendant la dormance en hiver, accentuant les processus physiologiques et conduisant à une résistance maximale aux températures gélives, spécifique à l'espèce. Au début du printemps, avant le débourrement, la synthèse des diverses molécules diminue et la résistance au gel diminue progressivement à mesure qu'augmente la température (période de désendurcissement), atteignant un minimum lorsque les nouvelles feuilles apparaissent (Till 1956 ; Weiser 1970). La sortie de dormance des bourgeons s'accompagne d'une réhydratation des tissus foliaires. Une fois le développement commencé au printemps, la résistance au gel est irréversiblement perdue et les plantes ne peuvent pas se ré acclimater à de basses températures (Sakai & Larcher 1987 ; Repo 1991 ; Rapacz 2002). Au cours de la maturation des nouvelles feuilles, la résistance au gel du feuillage augmente légèrement; la résistance maximale de feuilles actives est atteinte au milieu de l'été (Till 1956). Durant leur période de croissance, en général, les plantes ne sont pas ou peu résistantes au gel car les conditions environnementales sont favorables (i.e. absence de températures gélives) (Fitter & Hay 1987).

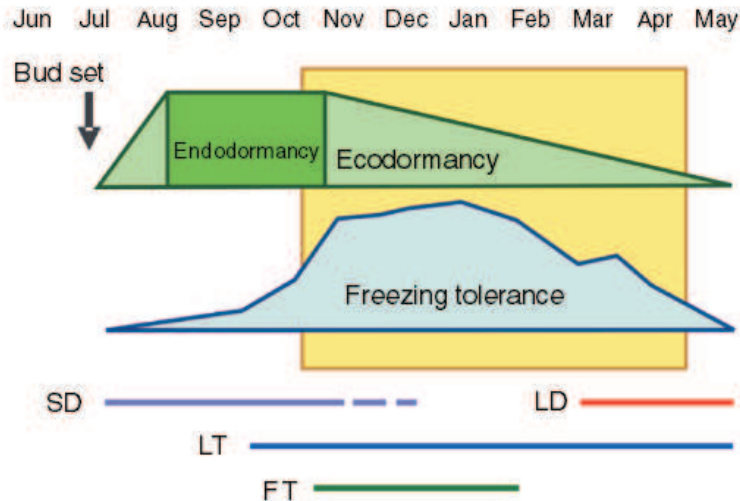


Figure 2. Evolution annuelle de la dormance et la tolérance au gel chez le bouleau cultivé en plein champ pendant l'hiver dans le nord de la Finlande. Les barres horizontales indiquent la période de l'année où les différents facteurs environnementaux ont le plus grand impact sur la croissance des arbres. SD, photopériode courte (short day length) ; LD, photopériode longue (long day length) ; LT, températures basses mais pas gélives (low non-freezing temperatures) ; FT, températures gélives (freezing temperature). D'après Welling et al. (1997, 2004), Rinne et al. (1998), synthétisé dans Welling & Palva (2006).

La résistance au gel des arbres caducifoliés est donc étroitement liée à leur phénologie, en particulier à l'état de dormance des bourgeons (Larcher & Mair 1968 ; Weiser 1970 ; Campbell & Sorensen 1973 ; Ibanez et al. 2010). Ainsi, pendant l'hiver les tissus foliaires enfermés dans les bourgeons sont résistants au gel, mais cette résistance diminue peu à peu jusqu'au débourrement (Lenz et al. 2013 ; Cannell 1997). Les jeunes feuilles sont alors particulièrement vulnérables au gel (dont la probabilité d'occurrence à cette époque n'est pas nulle), étant de plus très concentrées en eau et en azote en plus de leur faible niveau de dureté (i.e. pas de résistance physique contre le gel) (Cannell 1997 ; Coley & Kursar 1996 ; Herms & Mattson 1992). La phénologie est donc un élément particulièrement important concernant l'évitement du risque de gel printanier (Langlet 1937 ; Tranquillini 1979).

3. Modélisation de la phénologie printanière

La modélisation de la phénologie printanière, du fait de son importance pour la fitness des arbres, a été fortement étudiée afin de prédire la réponse des arbres à des variations climatiques. Il existe deux principaux types de modèles pour modéliser les phénomènes biologiques : les modèles empiriques, qui ajustent statistiquement des données expérimentales, et les modèles mécanistes, qui cherchent

principalement à expliquer, mais aussi à prédire, les réponses en intégrant les processus sous-jacents. La modélisation de la phénologie printanière est basée sur une approche mécaniste mais comprend encore une forte dose d'empirisme.

Deux classes de modèles ont été développés pour la simulation de la phénologie foliaire printanière : les modèles considérant seulement l'action des températures chaudes (modèles à une phase) (Cannell & Smith 1983 ; Hunter & Lechowicz 1992), et les modèles considérant aussi l'action des températures froides, impliquées dans la levée de dormance des bourgeons en hiver (modèles à deux phases) (Landsberg 1974 ; Sarvas 1974 ; Murray et al. 1989 ; Hänninen 1990 ; Kramer 1994). Dans les modèles à une phase, il est implicitement admis que les bourgeons ont reçu assez de froid, i.e. que la dormance est entièrement levée avant le début de l'accumulation des températures chaudes. Ainsi, le débourrement a lieu une fois qu'une certaine quantité de chaud a été atteinte, à partir d'une certaine date. Les modèles à deux phases présument que le débourrement a lieu une fois que la quantité critique de températures chaudes a été atteinte, cette valeur critique dépendant de la quantité de températures froides reçues. Ceci peut concerner directement la quantité de froid, et/ou la date de levée de dormance dépendant de la quantité de froid (Cannell & Smith 1983 ; Chuine 2000 ; Hänninen & Kramer 2007). Les modèles décrits dans la littérature varient de par leur fonction mathématique de réponse aux températures froides et chaudes. Selon la période d'action des températures de *chilling* et de *forcing*, trois types de modèles à deux phases ont été définis : le modèle séquentiel (action des températures froides puis des températures chaudes) (Sarvas 1974), le modèle alternatif (action simultanée des températures froides et chaudes dès le début de la dormance mais s'arrêtant avant le débourrement pour les températures froides) (Cannell & Smith 1983) et le modèle synthétique (action simultanée des températures froides et chaudes pendant la période aux alentours de la levée de dormance) (Hänninen 1990).

4. Diversité phénotypique du débourrement

Une population (ou dème) est un groupe d'individus de la même espèce qui occupent un espace déterminé à un moment donné, chaque membre pouvant potentiellement se reproduire avec tout autre

membre du groupe. On parle aussi de métapopulation, pour un ensemble de populations d'individus d'une même espèce séparées spatialement ou temporellement et étant interconnectées par la dispersion, et de sous-population, qui regroupe des individus ayant plus d'interactions entre eux qu'avec les autres membres de la population. Cependant, le terme de sous-population est souvent utilisé en tant que synonyme de population.

La phénologie du débourrement des arbres forestiers présente de forts patterns géographiques de variation entre les populations, associés avec l'altitude, la latitude ou la longitude. Lebourgeois et al. (2002) ont observé une différence de près d'un mois et demi entre les peuplements de hêtre commun les plus précoces et les plus tardifs en France. L'augmentation d'altitude, en raison de la décroissance thermique, se traduit souvent par un retard du débourrement : délai de 7 jours / 100 m d'élévation chez l'épicéa (Oswald 1969), 4 jours / 100 m chez le chêne (Lavarenne-Allary 1965), 2.6 jours / 100 m chez le hêtre (Malaisse 1967) ou encore 6.6 jours / 100 m chez le mélèze (Worrall 1983). Les différences phénotypiques observées *in situ* reflètent à la fois des variations environnementales et génétiques. Des observations réalisées en test de provenance (i.e. des individus issus de différents milieux sont placés dans un environnement commun), permettant de s'affranchir des effets de l'environnement (Morgenstern 1996 ; Matyas 1995), montrent que ces différences reflètent souvent une forte variation génétique pour le débourrement. Gomory & Paule (2011) ont ainsi détecté des clines altitudinaux et longitudinaux pour des provenances de hêtre commun de toute l'Europe. Ducouso et al. (1996) ont mis en évidence des variations importantes dans le comportement phénologique de 50 populations de chêne sessile en Europe, qui ont pu être reliées à la latitude et l'altitude. Vitasse et al. (2009a) ont observé des clines altitudinaux significatifs concernant la phénologie foliaire chez six espèces ligneuses pyrénéennes. Les arbres peuvent présenter des clines *cogradient* (les populations provenant de hautes altitudes présentent une feuillaison plus tardive que celles issues de basses altitudes) comme le frêne et le chêne, ou *countergradient* (les populations provenant de hautes altitudes présentent une feuillaison plus précoce que celles issues de basses altitudes dans un environnement commun) comme le hêtre.

Il a aussi été montré dans de nombreux tests de provenance que malgré les fortes différenciations génétiques entre les populations vivant dans des climats contrastés, les populations conservent

généralement un haut niveau de diversité génétique entre les arbres au sein d'une même population (Morgenstern 1996 ; Howe et al. 2003). Billington & Pelham (1991) ont ainsi démontré une forte variation génétique dans la date du débourrement du bouleau au sein de populations en Ecosse. Baliuckas et al. (2005) ont démontré une forte variation génétique intra populationnelle chez le sorbier (*Sorbus aucuparia* L.) et le cerisier à grappes (*Prunus padus* L.). Salmela et al. (2013) ont étudié la phénologie printanière de semis de pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) provenant de montagnes écossaises et a démontré une forte variation génétique au sein des populations, croissante des basses vers les hautes altitudes, où l'écart-type des populations peut atteindre 11 jours (**Figure 3**).

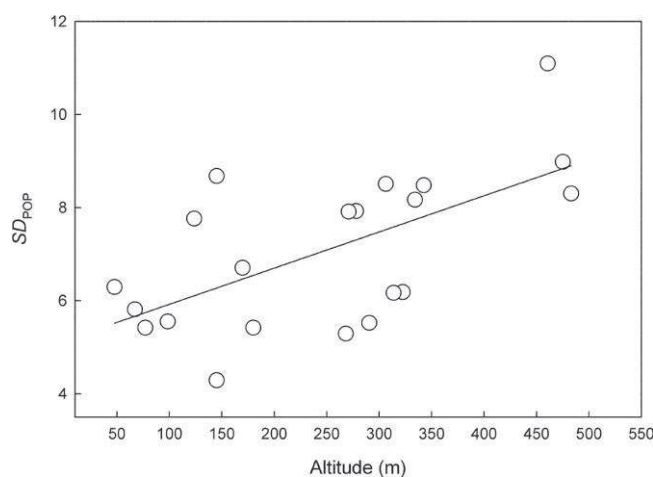


Figure 3. Relation entre l'altitude d'origine et la quantité de variation (écart-type de la population) pour le timing du débourrement au sein de populations de *Pinus sylvestris* dans le test de provenance ($P < 0.01$, $R^2 = 35\%$) (Salmela et al. 2013).

La variation génétique pour les caractères phénologiques est un élément clé de la capacité adaptative. A l'échelle de l'espèce, une forte diversité génétique entre les populations augmente les chances que certaines populations puissent être mieux adaptées à un changement environnemental. A l'échelle de la population, une forte diversité génétique permettra la sélection d'individus possédant des génotypes favorables si la population est exposée à de nouvelles contraintes environnementales.

2. Débourrement et exposition aux pressions environnementales

1. Des pressions biotiques et abiotiques

La phénologie apparaît comme un caractère adaptatif permettant aux plantes de faire face à des pressions environnementales diverses, comme la sécheresse, la compétition pour les ressources, la température, ou la photopériode (Rathcke & Lacey 1985). Cependant, les pressions opposées liées à l'occurrence des gels tardifs au printemps et à la durée de la saison de végétation semblent être les plus contraignantes sur le timing du débourrement (Lockart 1983 ; Leinonen & Hänninen 2002 ; Gomory & Paule 2011). En effet, les plantes doivent faire un compromis entre diminuer le risque de dégâts liés au gel sur les parties en pleine croissance et maximiser l'assimilation de carbone et la production de biomasse. La quantité de matière sèche produite par les plantes chaque année est étroitement liée à la quantité d'énergie lumineuse interceptée par le feuillage pour l'activité photosynthétique. Favoriser la photosynthèse au printemps semble donc particulièrement important, car le rayonnement solaire intercepté par les feuilles y est bien plus important qu'à l'automne (Cannell 1997 ; Vitasse et al. 2009c). Cependant, les dégâts liés au gel diminuent la surface foliaire, affectant l'énergie et le budget carbone des arbres, ces derniers participant alors à la refoliation de l'arbre, et diminuant ainsi potentiellement la longueur de la saison de végétation (Agrawal et al. 2004, Schwartz et al. 2006, Augspurger 2011). Ainsi, il a longtemps été considéré que le timing du débourrement était le reflet d'un compromis entre ces deux pressions de sélection. Lockart (1983) énonce ce compromis purement en termes de bilan carbone, la production gagnée durant la saison de végétation par un débourrement précoce et la production perdue à cause des dégâts liés au gel pouvant être traduits en gains et pertes de carbohydrates.

Cependant, après avoir longtemps été une question controversée (Ollerton & Lack 1992), aujourd'hui le timing du débourrement des arbres tempérés est aussi vu comme une réponse adaptative aux interactions biotiques, mutualistes ou antagonistes (Fenner 1998 ; Pau et al. 2011 ; Rathcke & Lacey 1985 ; Polgar & Primack 2011). Les jeunes feuilles étant particulièrement vulnérables aux attaques d'insectes et de pathogènes (Edwards & Ayres 1982 ; Lieberman & Lieberman 1984 ; Lowman &

Heatwole 1992), ces derniers sont de plus en plus vus comme des déterminants majeurs des processus écologiques et évolutifs (Fenner 1998 ; Schmid-Hempel 2009). Une étude de Lobo et al. (2003) (l'une des rares à étudier simultanément des facteurs biotiques et abiotiques affectant la phénologie de l'arbre) suggère que la phénologie de la floraison de la famille Bombacaceae dans les forêts sèches néo tropicales est principalement contrainte par les pressions de sélection liées à la compétition pour les pollinisateurs, même si des facteurs abiotiques liés aux précipitations et à la teneur du sol en semblent aussi réguler le débourrement.

La contribution relative des forces biotiques et abiotiques à la phénologie peut dépendre des conditions locales, particulièrement le long de gradients environnementaux (Pau et al. 2011 ; Agrawal et al. 2004) (**Figure 4**). Aux latitudes ou altitudes élevées, on s'attend à une forte sélection directionnelle due aux gels (Agrawal et al. 2004 ; Alberto et al. 2011). Inversement, les ravageurs et les maladies y exercent certainement une pression plus faible, car la densité des arbres hôtes et les facteurs climatiques y sont moins favorables au développement de fortes populations d'insectes et de pathogènes qu'aux plus faibles latitudes ou altitudes (Desprez-Loustau et al. 2010a ; Wairegi et al. 2010 ; Pau et al. 2011). Les forces sélectives biotiques et abiotiques ont fréquemment des effets opposés sur les populations locales, car les principales contraintes physiques liées aux faibles températures agissent plutôt en amont du débourrement (contraintes liées à l'hiver), alors que les interactions avec les insectes et les pathogènes ont plutôt un effet une fois que le débourrement a eu lieu (jeunes feuilles sensibles). Ainsi, les interactions avec les pollinisateurs, les herbivores ou les pathogènes peuvent moduler voire annuler les patterns de sélection contrôlés par l'environnement physique (Elzinga et al. 2007 ; Pilson 2000 ; Tikkanen & Julkunen-Tiitto 2003 ; Ghelardini & Santini 2009). A ce jour, la plupart des études ont porté séparément sur la relation des facteurs biotiques ou abiotiques avec la phénologie (mais voir Matias & Jump 2012). Il y a donc un besoin de recherches considérant les deux types de facteurs simultanément (Pau et al. 2011 ; Elzinga et al. 2007).

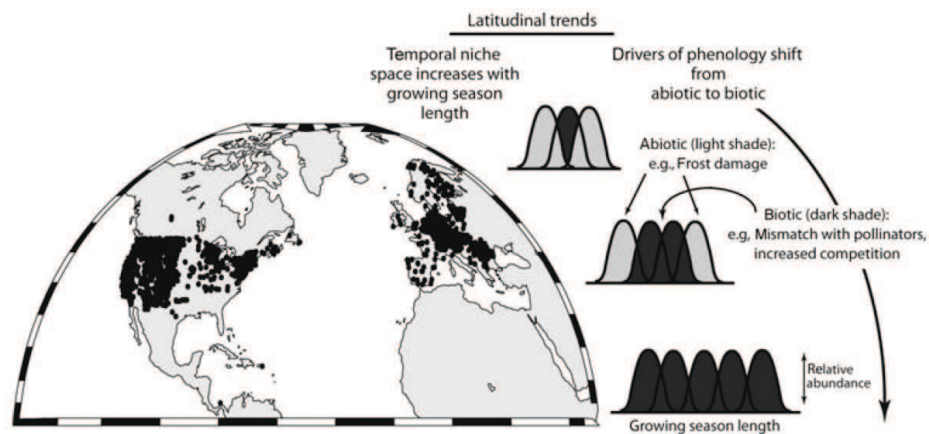


Figure 4. Variations latitudinales des pressions de sélection (biotiques et abiotiques) et des longueurs de saisons de végétation dans l'hémisphère nord (Pau et al. 2011).

2. Comment faire face aux pressions¹

Les organismes se sont adaptés aux contraintes abiotiques et biotiques auxquels ils ont à faire face en développant différents mécanismes de survie, c'est-à-dire en modifiant des traits d'histoire de vie afin d'atténuer les effets négatifs des dégâts sur leur fitness (Pagán et al. 2008). L'évitement par la phénologie est un élément-clé de la survie des plantes. Cependant, si un évitement total n'est pas possible ou efficace, les organismes peuvent limiter les effets délétères des événements aléatoires auxquels ils sont exposés par de la résistance (*sensu lato*). La résistance implique deux processus : la résistance *sensu stricto*, qui limite (activement) le niveau de dégât, et la tolérance, qui est la capacité de la plante à maintenir la fitness malgré les dégâts (Simms 2000 ; Koskela et al. 2002 ; Horns & Hood 2012) (**Figure 5**). La tolérance aux maladies a été initialement définie dans la littérature des sciences de l'agriculture, en 1951, en tant que capacité à produire du grain en présence de la maladie (Painter 1951). La résistance peut être induite, c'est-à-dire s'exprimant seulement en présence du facteur de stress, ou au contraire constitutive (Agrawal & Karban 1999 ; Agrawal 1999). Face aux attaques biotiques ou aux facteurs abiotiques, la plante peut se défendre par la mise en place de barrières (cuticule, poils, barrière chimique par la sécrétion de composés toxiques, renforcement des

¹ Nous ne nous intéressons donc ici qu'aux contraintes défavorisant la croissance, la survie ou la reproduction des individus (*top-down forces*, Elsinga et al. 2007). Nous n'aborderons pas les mécanismes favorisant la rencontre avec des facteurs environnementaux favorables (*bottom-up forces*) tels que les pollinisateurs ou de fortes ressources en nutriments.

parois cellulaires et des structures tissulaires...) ou par la production de molécules de défense : antibiotiques ou pesticides naturels, expression de peptides ou protéines de défense... La tolérance de la plante suite aux dégâts peut s'exprimer par des modifications d'allocation des ressources entre compartiments, des modifications phénologiques ou physiologiques, ou un fort taux de croissance relative (Strauss & Agrawal 1999). Etant donné le risque de réduction de la fitness pouvant être causé par des facteurs biotiques ou abiotiques, on pourrait s'attendre à une forte sélection pour les traits de défense qui protègent les hôtes contre les parasites par exemple (Baucom & de Roode 2011), mais ceci est contrecarré par le coût élevé de la résistance pour la plante (Burdon & Thrall 2003 ; Paul-Victor et al. 2010 ; van Hulten et al. 2006).

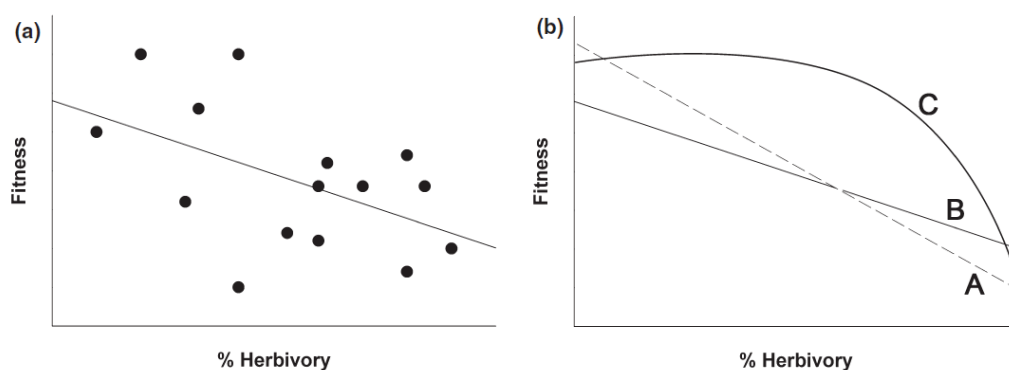


Figure 5. Représentation graphique de tolérance (synthèse de la littérature). (a) Norme de réaction utilisée pour estimer la tolérance, où la pente de la ligne représente le niveau de tolérance aux dommages (dans ce cas les herbivores). (b) Normes de réaction de trois génotypes, montrant les variations de tolérance au sein d'une population, avec le génotype C présentant une relation non linéaire entre la fitness et les dommages. Le génotype A est moins tolérant aux dommages que le génotype B, comme le montre la pente plus importante, qui représente plus de changement dans la fitness par unité de dégâts (Baucom & de Roode 2011).

Les processus d'évitement et de résistance *sensu stricto* peuvent être étroitement liés. Afin d'optimiser la durée de la période d'exposition à un fort rayonnement solaire, et donc la photosynthèse et la croissance, un débourrement précoce au printemps semble particulièrement important (Cannell 1997). Cependant, Aussenas (1973) a montré qu'un gain de tardiveté est nécessaire pour diminuer les risques de dégâts liés aux gels, les jeunes tissus y étant particulièrement sensibles. L'évitement est ainsi certainement le premier mécanisme de défense face aux gels de printemps (Gomory & Paule 2011). Lenz et al. (2013) ont montré que quelle que soit l'espèce, la (faible) résistance au gel au moment du

débourrement est sensiblement la même à toutes les altitudes, ceci pouvant s'expliquer par l'efficacité de l'évitement lié au délai de débourrement avec l'altitude. Cependant, certaines espèces sont plus sensibles au gel pendant le débourrement que d'autres, comme le chêne sessile (*Q. petraea*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*) par rapport au sorbier (*Sorbus aucuparia*) et au merisier (*Prunus avium*) (Lenz et al. 2013) (**Figure 6**). D'autre part, Agrawal et al. (2004) ont montré différentes tolérances au gel chez des génotypes de radis sauvage (**Figure 7**). Ils ont aussi démontré une forte sélection pour la résistance aux gels (positivement corrélée à la résistance à l'herbivorie) et une sélection contre la tolérance. Cependant, la définition de la résistance ici est assez ambiguë entre la résistance *sensu stricto* et l'évitement.

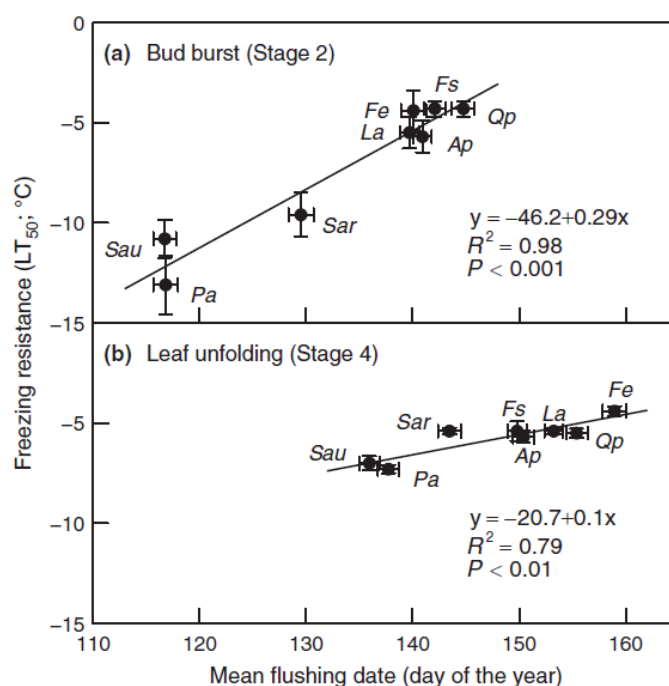


Figure 6. Relation entre la résistance au gel ($LT_{50} \pm SE$) et la date de débourrement ($\pm SE$) prédite à 1500m d'altitude pour huit espèces d'arbres caducifoliés. Les corrélations sont représentées pour deux stades très proches du débourrement : éclatement des bourgeons et émergence des premières feuilles (stade 2 ici) et étalement de la première feuille (stade 4 ici). Ap : *Acer pseudoplatanus*, Fe : *Fraxinus excelsior*, Fs : *Fagus sylvatica*, La : *Laburnum alpinum*, Pa : *Prunus avium*, Qp : *Quercus petraea*, Sar : *Sorbus aria* et Sau : *Sorbus aucuparia* (Lenz et al. 2013).

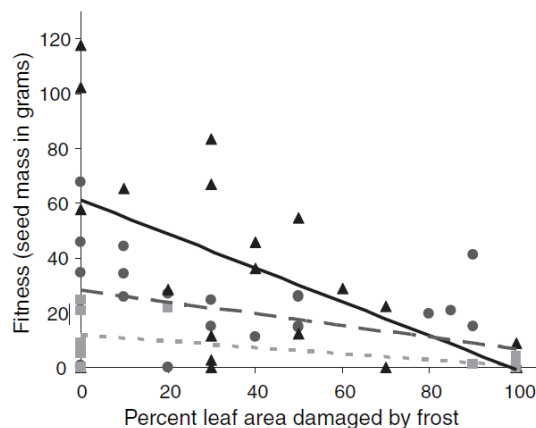


Figure 7. Tolérance des plantes (radis sauvage) au gel, décrit par la relation entre les niveaux naturels de dégâts sur les feuilles et la fitness de la plante représentée par la masse des graines. La tolérance est définie comme la pente de la régression entre la fitness et la proportion dégâts liés aux gels (pourcentage de surface foliaire endommagée par les gels). La variation génétique dans la tolérance au gel est montrée par trois familles de demi-frères (triangles, cercles et carrés). La ligne continue est la régression pour les triangles, la ligne pointillée est la régression pour les cercles et la ligne de points correspond aux carrés (Agrawal et al. 2004).

Des observations de Murali & Sukumar (1993) montrent que les arbres tardifs de la forêt de mousson indienne subissent des dommages d'insectes significativement plus élevés que les arbres plus précoces, car les insectes herbivores ont émergé avec les pluies. D'autre part, Ghelardini & Santini (2009) ont démontré que le débourrement précoce chez l'orme représentait un mécanisme d'évitement de la graphiose de l'orme, maladie létale causée par l'agent pathogène *Ophiostoma ulmi*, permettant une asynchronie entre la période sensible de l'hôte et la période d'infection naturelle par les vecteurs de cette maladie (scolytes). D'autre part, la variation phénologique au sein d'une population peut être une stratégie de défense face aux herbivores. Tikkanen & Julkunen-Tiitto (2003) ont démontré qu'un fort niveau de variations phénologiques dans la production foliaire au niveau de la population peut limiter la colonisation des arbres voisins par la dispersion des larves d'insectes. Inversement, une émergence des feuilles simultanée au sein de la population peut être une stratégie de défense si la production de biomasse foliaire dépasse la capacité de consommation des insectes herbivores (Lamarre et al. 2014). Cependant, les mécanismes de résistance et de tolérance jouent généralement un rôle essentiel dans l'adaptation des plantes aux contraintes biotiques (Bell 1981 ; Burdon 1987 ; Strauss & Agrawal 1999 ; Combes 2001 ; Rausher 2001 ; Baucom & de Roode 2011). En effet, une grande différence entre les contraintes abiotiques et biotiques est que les agents biotiques peuvent s'adapter aux traits de l'hôte impliqués dans les interactions, tels que la phénologie (van Asch &

Visser 2007 ; Combes 2001). La phénologie des arbres étant sous contrôle génétique et répétée d'une année sur l'autre (dans la limite des conditions météorologiques et de la plasticité phénotypique), les espèces d'herbivore peuvent et ont besoin pour survivre de se synchroniser avec la phénologie de l'hôte, entre et au sein des différentes populations. Ce processus est appelé la formation de dème adaptatif (van Asch & Visser 2007). La relation du parasite avec son hôte peut ainsi être analysée à travers le concept de filtre d'association : dans tout système formé par deux organismes aux génomes différents, la sélection naturelle tend à maximiser indépendamment leur fitness (Combes 2001). Il existe deux types de filtres dans le système hôte / parasite : le filtre de rencontre et le filtre de compatibilité. Les parasites tendent à ouvrir les filtres (sélection de gènes pour « rencontrer » ou « survivre ») alors que les hôtes tendent à fermer les filtres (sélection de gènes pour « éviter » ou « tuer »). Les deux « courses aux armements » ne sont pas indépendantes : à la sélection de gènes pour « rencontrer » dans une population de parasites, une population d'hôtes peut répondre par la sélection de gènes pour « tuer ».

3. Processus mis en jeu dans l'adaptation aux pressions

Face à l'hétérogénéité de l'environnement, les plantes peuvent répondre immédiatement par la plasticité phénotypique et/ou par l'adaptation génétique (Wagner 1997 ; Kawecki & Ebert 2004 ; Savolainen et al. 2007 ; Elzinga 2007 ; Donnelly 2012). Ceci est à l'origine de la variabilité phénotypique des populations, qui peut donc être dissociée en trois composantes : $V_P = V_G + V_E + V_{G \times E}$ (**Figure 8**). La variabilité génétique V_G rend compte de l'effet des gènes dans l'expression du phénotype tandis que la réponse du phénotype à l'environnement est représentée par les variabilités environnementales V_E et par l'interaction entre la composante génétique et l'environnement $V_{G \times E}$.

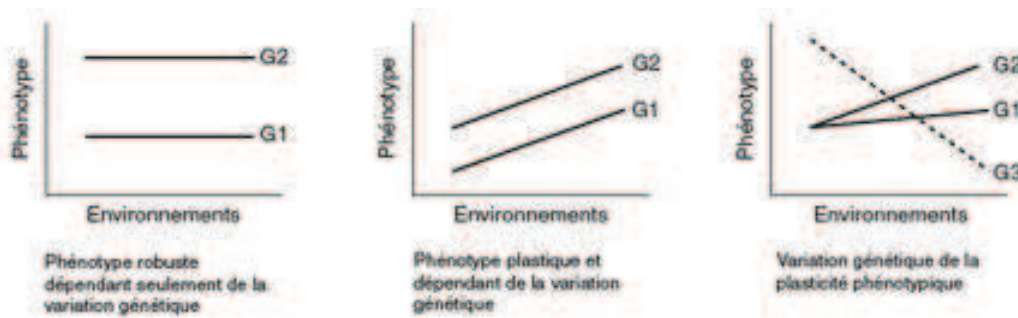


Figure 8. Expression phénotypique et environnement. Plusieurs phénotypes et plusieurs environnements. La relation phénotype-environnement est illustrée pour différents génotypes (G1, G2, G3). La figure rend compte des notions de robustesse et de plasticité phénotypiques (Frelin 2012).

La variation génétique d'une population est issue de processus évolutifs comprenant les mutations génétiques, les flux de gènes (Alberto et al. 2010 ; Kremer et al. 2012) et la dérive génétique, les phénotypes avantageés étant ensuite sélectionnés par des processus de sélection naturelle (Lindner et al. 2010). Soularue & Kremer (2012) ont montré que l'homogamie, i.e. le fait de se croiser avec des individus présentant les mêmes caractères phénotypiques, ici la phénologie, intervient aussi dans le maintien de la diversité génétique.

1. Diversité génétique et forces évolutives

L'information génétique est portée par les gènes. Au sein d'une même espèce, les génomes des individus sont tous différents (polymorphisme génétique). Un gène est déterminé par un locus, qui correspond à un emplacement donné sur un chromosome. Il peut exister dans les populations naturelles plusieurs séquences différentes pour un même locus. On parle alors de différents allèles : ce sont des versions différentes d'un même gène. La variation génétique s'exprime par les fréquences relatives des différents allèles. Les forces évolutives sont les processus qui agissent sur les fréquences alléliques au sein ou entre les populations.

Mutation, migration et dérive génétique

Il existe quatre forces évolutives qui agissent en interaction et font évoluer les fréquences alléliques et ainsi génotypiques en populations naturelles : la mutation, la dérive génétique, la migration (ou flux de gènes) et la sélection naturelle, que nous développerons de manière plus approfondie.

L'échange d'individus ou de gamètes entre populations permet les flux de gènes. Il s'agit du phénomène de migration. En l'absence d'autres forces évolutives, la migration homogénéise les fréquences alléliques entre populations. Le modèle de migration (la façon dont les individus/gamètes se déplacent dans l'espace par exemple) influence beaucoup la distribution spatiale du polymorphisme.

La mutation est la source fondamentale de nouvelles variations génétiques. Il s'agit d'une modification spontanée d'un état allélique en un autre, par substitutions nucléotidiques, délétions, insertions, inversions ou translocations chromosomiques. C'est un événement évolutif rare pour un gène donné et un individu donné : 10^{-4} à 10^{-6} nouvelles mutations par copie de gène et par génération. Cependant, c'est une force évolutive importante dans les grandes populations, car le nombre de mutations par génération y est non négligeable. Les fréquences alléliques peuvent aussi varier d'une génération à l'autre simplement sous l'effet du hasard. On appelle cette variation de fréquence aléatoire, due à l'effet d'échantillonnage aléatoire parmi les gamètes, la dérive génétique (dans une population de taille finie). La dérive génétique est un processus important dans les petites populations, y entraînant un changement des fréquences alléliques. La mutation permet donc l'apparition de nouveaux allèles, dont le devenir va dépendre des autres forces évolutives. Si l'allèle est sélectivement neutre, c'est-à-dire s'il ne confère aucun avantage ni désavantage sélectif, son devenir sera déterminé par la dérive génétique (l'allèle mutant peut être fixé ou éliminé). Si l'allèle est non neutre son devenir sera déterminé par la sélection naturelle.

Zoom sur la sélection naturelle

Charles Darwin définit la sélection naturelle comme la « préservation des variations favorables dans la lutte pour la vie, et le rejet des variations préjudiciables » (L'origine des espèces, 1859). Il s'agit ici d'une évolution par la sélection des individus les plus adaptés. Les individus peuvent être sélectionnés

pour leur capacité de survie (viabilités différentielles ; la viabilité étant la probabilité qu'un individu survive depuis la fécondation jusqu'à l'âge reproducteur) et/ou pour leur capacité reproductive (fertilités différentielles ; la fertilité étant l'espérance du nombre de descendants d'un individu). A l'âge de la reproduction, les génotypes porteurs de caractères sélectionnés (au stade juvénile) se reproduisent mieux et contribuent de façon disproportionnée à la descendance de la génération suivante. Ceci entraîne une augmentation en fréquence des allèles qui améliorent la survie et la reproduction, ce qui conduit à une meilleure adaptation des organismes à leur environnement (force directrice de l'évolution). Pour induire la sélection d'un caractère biologique particulier dans une population, il faut que ce caractère varie d'un individu à l'autre, que cette variation individuelle soit héritable pour pouvoir être transmise au descendant, et que cette variation soit corrélée à la fitness de l'individu. La phénologie du débourrement présente toutes ces caractéristiques et est donc soumise à la sélection naturelle (caractère adaptatif).

Les pressions de sélection sont donc définies comme des contraintes environnementales agissant sur une population, la faisant évoluer en faveur des individus les plus avantageés par rapport à ces contraintes. La sélection naturelle peut être divisée en 3 modes d'action agissant sur la distribution des phénotypes dans une population (Kingsolver & Pfennig 2007) (**Figure 9**):

- la sélection directionnelle : elle favorise un phénotype extrême unique au sein de la population,
- la sélection stabilisatrice (ou conservatrice) : elle favorise les phénotypes moyens ou intermédiaires dans la population, et
- la sélection divergente (ou diversifiante) : elle favorise simultanément les phénotypes des deux extrêmes de la population, aux dépens des phénotypes intermédiaires ; cela peut même amener à la différenciation en deux populations différentes.

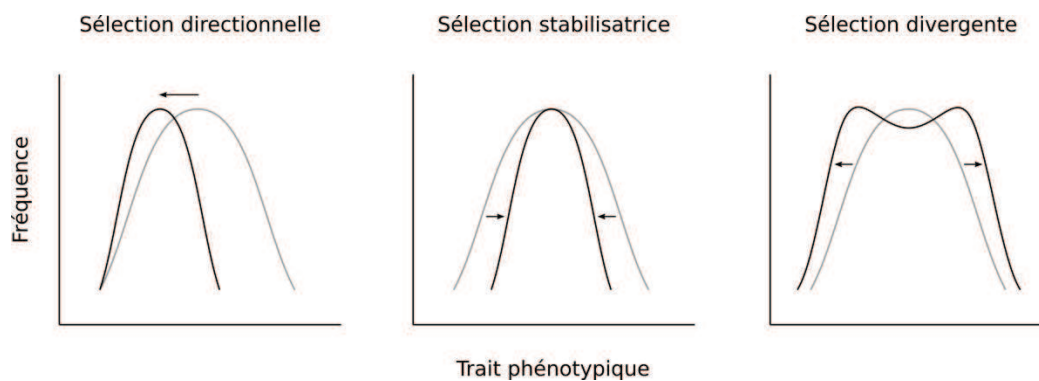


Figure 9. Schémas explicatifs des différents types de sélection basés sur la distribution des phénotypes favorisés. D'après Conner et Hartl (2004), dans Eveno (2008).

Une adaptation peut être définie comme un caractère phénotypique à déterminisme génétique favorisé par les pressions de sélection environnementales (abiotique ou biotique) (Howe et al. 2003 ; Howe & Brunner 2005). Pour une espèce donnée, on parle d'adaptation locale d'une de ses populations lorsque cette population présente dans son milieu d'origine une fitness relativement supérieure à celles d'autres populations issues d'environnements différents plantées dans ce même milieu (Kawecki & Ebert 2004) (seulement utilisable pour les populations connectées entre elles par flux de gènes).

2. La plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est la capacité d'un organisme à modifier sa physiologie, sa morphologie ou son développement en réponse à des variations environnementales à la fois biotiques et abiotiques (Callahan et al. 1997 ; Fordyce 2006 ; Whitman & Agrawal 2009) (Figure 6). La plasticité phénotypique permet à un individu de s'acclimater de façon relativement rapide et réversible à un changement dans son environnement (**Figure 10**).

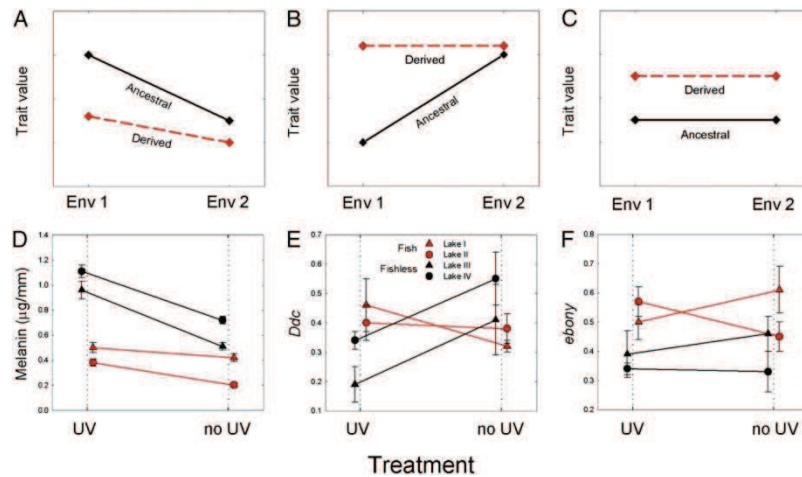


Figure 10. Illustration de la plasticité phénotypique (pour la quantité de mélanine produite et via l'expression de gènes *DDc* et *ebony*) de zooplancton *Daphnia melanica* (ancestral ou descendant) en présence ou absence de prédateurs dans des traitements avec ou sans UV. Ces graphes montrent l'évolution des normes de réaction. Trois schémas théoriques sont présentés (A, B, C) ainsi que leurs résultats (D, E, F) (Scoville & Pfrender 2010).

Kramer et al. (1995) ont analysé les observations phénologiques de clones de *Larix decidua*, *Betula pubescens*, *Tilia cordata*, *Populus canescens*, *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* et *Picea abies*, répartis sur une large gamme de latitude en Europe. Il a été constaté que les réponses à la température de la date de débourrement des clones étaient d'une ampleur similaire à celles d'arbres génétiquement différents de la même espèce répartis sur une partie de la gamme de latitudes. Cela démontre que les arbres possèdent une plasticité considérable et sont en mesure de répondre phénotypiquement à un changement majeur dans leur climat local. Vitasse et al. (2010) ont montré une forte plasticité phénotypique pour le chêne (*Quercus petraea*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*) le long de gradients altitudinaux, quelle que soit l'altitude. Les normes de réaction (voir **Figure 10**) de la date de débourrement en fonction de la température en test de provenance montrent une accélération linéaire pour les deux espèces, de 5.7 jours par degré d'augmentation en moyenne. En ce qui concerne la sénescence, ils ont montré une tendance hyperbolique pour le hêtre et aucune tendance pour le chêne. Une controverse scientifique concerne la forme du contrôle génétique de la plasticité phénotypique (Schlichting & Pigliucci 1993 ; Via et al. 1995). Existe-t-il des loci spécifiques qui déterminent les réponses plastiques (Bradshaw 1965 ; Schlichting 1986 ; Scheiner and Lyman 1989, 1991), ou est-ce que la plasticité est simplement un épiphénomène de sélection sur différentes moyennes d'un trait dans différents environnements (Via & Lande 1985 ; Via 1987) ? Le premier point de vue est que la

plasticité phénotypique est un caractère à part entière, séparé de la valeur moyenne du caractère auquel il est associé dans les différents environnements, et sous son propre contrôle génétique. Ce point de vue considérant que la moyenne et la plasticité d'un trait sont séparées amène à des discussions sur les rôles possibles de « gènes de la plasticité » et à des suggestions sur le fait que la sélection puisse agir sur la plasticité elle-même. Le deuxième point de vue est que la plasticité phénotypique se fait par le biais de modifications de l'expression moyenne des gènes d'un caractère donné en réponse à différents signaux environnementaux, et les loci qui affectent le phénotype moyen dans chaque environnement déterminent aussi la plasticité. Ces phénomènes, dits phénomènes épigénétiques, peuvent être définis dans un sens restreint comme les phénomènes de modification du patron d'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique : par exemple méthylation des cytosines ou des protéines histones liées à l'ADN. Des réponses de ce type ont été mises en évidence chez des plants de tabac en réponse à un fort stress biotique et abiotique, par intervention d'ARN interférent (i.e. acide ribonucléique dont l'interférence avec un ARN messager spécifique conduit à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine) (Madlung & Comai 2004). Cependant, de récentes études se portent plutôt en faveur de l'existence de gènes de la plasticité phénotypique. Shimizu et al. (2010) ont identifié des QTL contrôlant la plasticité chez le riz sauvage et cultivé, et ont confirmé que ces deux espèces présentent une différenciation génétique distincte pour la plasticité phénotypique.

4. Réponses phénologiques face au changement climatique

1. Les modifications du climat

Le réchauffement climatique, ou réchauffement global, est un phénomène d'augmentation de la température moyenne des couches océaniques superficielles et de l'atmosphère, observé à l'échelle mondiale depuis le début du XX^e siècle. Ce phénomène, encore controversé il y a une vingtaine d'années, est devenu une réalité nettement perceptible qui suscite un vaste effort de recherche depuis plusieurs années. Ce réchauffement climatique se différencie des autres périodes de réchauffement que la Terre a connues par la vitesse rapide à laquelle les changements ont lieu, et par son origine

anthropique (dernier rapport du Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC), 2013). Chacune des trois dernières décennies a été successivement plus chaude que toutes les décennies précédentes depuis 1850 (**Figure 11**). Pratiquement l'ensemble de la planète Terre a connu un réchauffement estimé à environ 0,85°C depuis 1880.

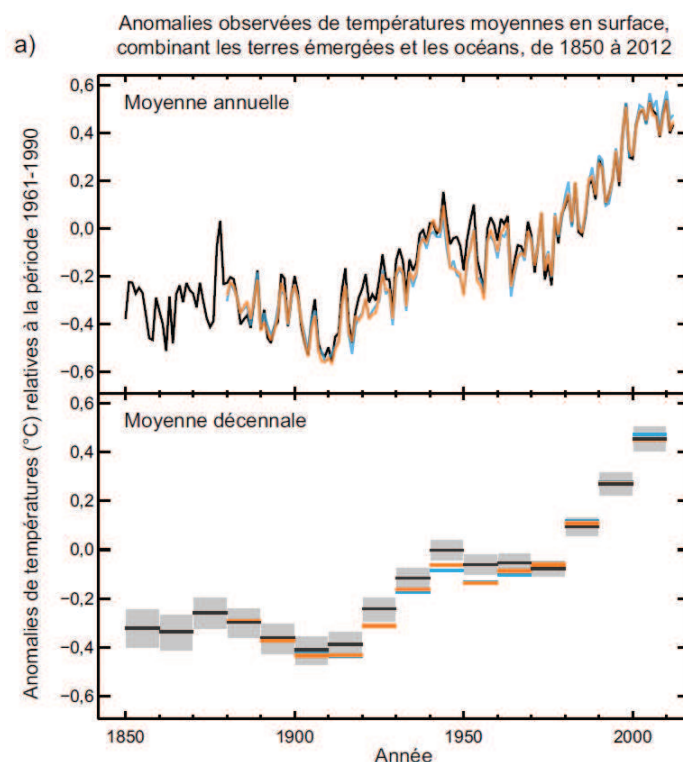


Figure 11. Anomalies observées de températures moyennes à la surface du globe, combinant les terres émergées et les océans, de 1850 à 2012, tirées de trois ensembles de données. Partie supérieure: valeurs moyennes annuelles. Partie inférieure: valeurs moyennes décennales comprenant l'estimation d'incertitude pour un ensemble de données (noir). Les anomalies sont relatives à la moyenne sur la période 1961–1990. Dernier rapport du GIEC (2013).

En conséquence directe de l'augmentation des températures, on observe aussi une diminution de la masse des calottes glaciaires, entraînant une élévation anormale du niveau moyen des mers par rapport au taux moyen d'élévation des deux derniers millénaires. De plus, parallèlement à l'augmentation des températures, les événements climatiques extrêmes tels que les vagues de chaleur, les fortes précipitations, ou les tempêtes de vent, augmentent en intensité et en fréquence (Easterling et al. 2000 ; Planton et al. 2008 ; Beniston et al. 2007 ; McGregor et al. 2005). Zaehle et al. (2007) ont cependant démontré un gradient Nord/Sud en ce qui concerne les précipitations, avec une diminution des

précipitations dans le Sud et une augmentation pour les latitudes plus élevées. Depuis quelques années, on observe une multiplication des études visant à modéliser ces événements climatiques extrêmes (Beniston 2009 ; Della-Marta & Beniston 2008 ; Lopez-Moreno & Beniston 2009).

Les projections des modèles climatiques présentées dans le dernier rapport du GIEC indiquent que la température de surface du globe est susceptible d'augmenter de 1,1 à 6,4 °C supplémentaires au cours du XXI^e siècle. Les différences entre les projections proviennent de l'utilisation de modèles ayant des sensibilités différentes pour les concentrations de gaz à effet de serre et utilisant différentes estimations (scénarios) pour les émissions futures.

2. Impacts sur la phénologie

La phénologie étant un caractère très sensible à la température (Sparks & Menzel 2002 ; Walther 2004), l'augmentation récente de la température de l'air a conduit à de forts changements dans la phénologie du débourrement chez les espèces d'arbres tempérés (Root et al. 2003 ; Menzel et al. 2006 ; Richardson et al. 2006). Une grande majorité des études réalisées sur des arbres montre une avancée des dates de débourrement des feuilles (Ahas et al. 2002 ; Chmielewski & Rötzer 2002 ; Menzel & Fabian 1999 ; Menzel et al. 2006 ; Root et al. 2003 ; Schwartz & Reiter 2000 ; Vitasse et al. 2011) et un retard de la sénescence foliaire (Chmielewski & Rötzer 2001 ; Defila 2001 ; Menzel & Fabian 1999 ; Menzel et al. 2006), résultant en un allongement de la saison de végétation. En moyenne le débourrement des feuilles a avancé de 2.5 jours / décade en Europe, correspondant à 2.5 jours / °C, mais ces changements diffèrent considérablement entre les espèces d'arbres tempérés (Chmielewski & Rötzer 2001 ; Peñuelas et al. 2002 ; Karlsson et al. 2003 ; Vitasse et al. 2009b ; Vitasse et al. 2011 ; Parmesan & Yohe 2003). Par exemple, Lebourgeois et al. (2008) ont démontré qu'une augmentation de 1°C de la température en mars a provoqué une avancée de la date de débourrement du chêne sessile de 4.6 jours. Chmielewski & Rötzer (2001) ont montré qu'un réchauffement de 1°C au début du printemps (Février-Avril) a provoqué une avancée du début de la saison de croissance de 7 jours chez *Betula pubescens*, *Prunus avium*, *Sorbus aucuparia* et *Ribes alpinum*. Menzel & Fabian (1999), à partir de 30 ans d'observations du réseau européen *International Phenological Gardens* (IPG –

observations de clones d'arbres et d'arbustes sur un large éventail de latitudes et longitudes en Europe) ont montré une augmentation de 10,8 jours de la saison de végétation depuis le début des années 1960 (débourrement plus précoce de 6 jours et sénescence plus tardive de 4.8 jours) attribuée à une augmentation de la température de l'air. Parallèlement à ces études d'observations directes *in situ*, des études indirectes exploitant des données satellitaires ont également montré un allongement de la saison de végétation au cours des dernières décennies. Des analyses de données satellites réalisées par Tucker et al. (2001) ou Zhou et al. (2001) ont montré une avancée de 18 jours sur 1891-1999. Myneni et al. (1997), à travers une analyse de données satellites de 1981 à 1991, ont estimé une avance d'environ 8 jours pour le début de la saison de croissance active, et une prolongation d'environ 4 jours de la sénescence, ce qui a entraîné un allongement de la saison de croissance active de 12 jours environ.

Depuis quelques années, les modèles phénologiques sont largement employés pour prédire les conséquences du réchauffement climatique sur la phénologie des arbres (Hänninen *et al.* 1993 ; Kramer 1994 ; Hänninen 1995 ; Kramer 1995). A ce jour, la plupart des prédictions ont prévu une continuité de l'avancée de la date de débourrement chez les espèces d'arbres tempérés dans un futur proche (Morin et al. 2009 ; Vitasse et al. 2011). Fait intéressant, plusieurs études ont démontré que les simples modèles à une phase sont actuellement aussi performants que les modèles à deux phases (Hunter & Lechowicz 1992 ; Linkosalo et al. 2006), voire les surpassent dans certains cas (Linkosalo et al. 2006 ; Linkosalo et al. 2008 ; Fu et al. 2012). Ceci suggère que, dans les conditions actuelles, la quantité de froid peut être suffisante pour permettre de façon systématique une levée complète de la dormance (Vitasse et al. 2011). Cependant, certaines études récentes ont fait remarquer une meilleure performance des modèles à deux phases, plus spécialement pour les espèces à débourrement tardif (Morin et al. 2009 ; Thompson & Clark 2008 ; Vitasse et al. 2011). Il a été énoncé que le manque de froid pourrait altérer les performances des modèles à une phase dans les années à venir (Linkosalo et al. 2008 ; Thompson & Clark 2008), plus spécialement pour les espèces situées aux marges sud de leur aire de répartition (Vitasse et al. 2011).

Les modifications phénologiques des arbres liés au changement climatique amènent aussi à des modifications d'exposition aux contraintes biotiques et abiotiques. Plusieurs études ont montré que l'avancée majeure dans la date de débourrement augmente la fréquence des dommages liés aux gels

tardifs (Kramer 1995 ; Hänninen 2006). Toutefois, certaines études ont indiqué une diminution du risque de gel avec le changement climatique, car la date du dernier gel avance plus rapidement que la date de débourrement (Anandhi et al. 2013 ; Ge et al. 2013). En Europe, Schwartz et al. (2006) ont montré que ces configurations varient selon les régions étudiées : les zones continentales occidentales présentent une avancée plus rapide des dates de dernier gel que de la date de débourrement, certaines zones centrales présentent des taux d'avancement identiques et les dates de débourrement de certaines zones du Nord et de l'Est de l'Europe avancent plus rapidement que les dates de dernier gel. Le changement climatique modifie également les relations phénologiques entre les espèces en interaction, car leurs relations au climat peuvent varier (Both et al. 2009 ; Singer & Parmesan 2010). Singer & Parmesan (2010) ont démontré que le changement climatique avait modifié les (a)synchronies des interactions au sein du système impliquant le papillon Damier de Edith (*Euphydryas editha*), la chenille hivernale de la Phalène brumeuse (*Operophtera brumata*) et leur plante hôte. Le changement climatique a aussi un impact sur la fréquence des infestations de ravageurs et le succès de sporulation et de colonisation des pathogènes fongiques (revu dans Lindner et al. 2010).

OBJECTIFS

Ce sujet de thèse s'inscrit dans la thématique générale du rôle de la sélection naturelle dans l'évolution des caractères biologiques chez les végétaux, et plus précisément de la phénologie. Nous avons choisi comme modèle d'étude le chêne sessile (*Quercus petraea* L.), espèce dominante des forêts françaises, ainsi que le champignon responsable de la maladie la plus répandue sur cette espèce en Europe, l'oïdium (complexe d'espèces, *Erysiphe* sp.). La phénologie du débourrement du chêne (et de son pathogène) a été étudiée le long d'un gradient altitudinal, dans des populations présentant une forte différenciation génétique pour ce trait, associée au gradient de température. De plus, ces populations présentent une forte diversité phénologique au sein des populations, ce phénomène s'atténuant avec l'altitude. Pour un caractère aussi important pour la croissance et la survie de l'individu qu'est le débourrement, nous pourrions nous attendre à ce que la sélection naturelle ait favorisé une date optimale à chaque altitude. Il est donc étonnant d'observer une forte variation génétique du débourrement au sein des populations. Le but principal de ce travail est donc d'étudier les différentes contraintes de sélection (biotiques et abiotiques) s'exerçant sur la phénologie du débourrement des populations de chêne : sont-elles à l'origine des patrons de diversité (intra et inter populations) observés le long du gradient altitudinal ? Quels sont les besoins en températures froides (*chilling*) et chaudes (*forcing*) pour la phénologie du débourrement et varient-ils entre et au sein des populations ? Nous avons choisi d'articuler ce mémoire de thèse selon la chronologie des contraintes auxquelles le chêne doit faire face afin d'optimiser son débourrement (pré débourrement, pendant le débourrement, post débourrement). Les trois objectifs principaux de cette thèse sont les suivants :

- (i) caractériser la pression exercée par les températures de *chilling* et de *forcing* nécessaires au débourrement foliaire. Les variations du timing du débourrement au sein et entre les populations sont-elles dues à des différences de besoins en températures de *chilling* et/ou de *forcing* ? Comment la contrainte liée au *chilling* (besoin en froid) agit-elle et va-t-elle agir (modèles de prédiction) sur la phénologie du débourrement avec le réchauffement des températures ?

- (ii) quantifier l'exposition actuelle du chêne à la fois aux contraintes abiotiques (gels tardifs) et biotiques (maladie) lors du débourrement foliaire. Cette exposition est-elle la même pour tous les individus au sein et entre les populations ? D'un point de vue évolutif, ces pressions de sélection peuvent-elles être à l'origine du maintien de la variation génétique intra populationnelle (plaine) et de la différenciation génétique inter populationnelle observée le long du gradient altitudinal pour le débourrement ?
- (iii) caractériser la contrainte exercée par l'oïdium sur la phénologie des pousses au cours de la saison de végétation. L'infection par l'oïdium modifie-t-elle la phénologie de la croissance du chêne durant l'été ? Comment cela impacte-t-il l'exposition du chêne au froid de l'hiver ?

Ce travail de recherche s'inscrit à l'interface entre l'écophysiologie, la phytopathologie et l'écologie évolutive. Pour répondre à ces questions, trois types d'approches méthodologiques ont été utilisés, faisant appel de l'observation *in situ*, de l'expérimentation et de la modélisation.

Tout d'abord, pour caractériser la pression exercée par les températures de *chilling* et de *forcing* nécessaires au débourrement, nous avons utilisé un suivi long terme de la phénologie du chêne (et du hêtre, autre Fagacée dominante des forêts pyrénéennes) en milieu naturel le long du gradient altitudinal pyrénéen. Ceci nous a permis de déterminer la sensibilité de ces espèces aux températures printanières, et d'estimer les variations de leurs besoins en chaud pour le débourrement en fonction du *chilling* reçu (**Chapitre 2**). De plus, nous avons suivi expérimentalement la phénologie de la dormance du chêne (et du hêtre) à l'aide du test dit de « boutures de nœuds isolés » en chambre climatique, sur des individus précoces et tardifs de basse et haute altitudes. Ceci nous a permis d'observer les différentes phases de la dormance, d'estimer les besoins en température froides (*chilling*) et chaudes (*forcing*) nécessaires au débourrement, et enfin de déterminer la date de levée de dormance à différents niveaux (inter espèces, inter populations, intra population) (**Chapitre 2**). Enfin, nous avons testé l'importance de prendre en compte les besoins en *chilling* pour lever la dormance dans les modèles de débourrement, à travers l'établissement de modèles tenant compte de la date de levée de dormance déterminée expérimentalement. Nous avons de plus simulé et comparé la phénologie de la dormance et

du débourrement en basse et haute altitude au cours du siècle, i.e. dans un contexte de réchauffement climatique, à l'aide des différents modèles paramétrés (**Chapitre 3**).

Ensuite, pour quantifier l'exposition actuelle du chêne à la fois aux gels tardifs et à la maladie pendant le débourrement foliaire, nous avons utilisé les données de suivi de la phénologie du chêne en populations naturelles mais aussi des relevés météorologiques (nous permettant d'estimer les évènements de gel) le long du gradient. De plus, nous avons suivi la phénologie de l'oïdium par des captures de spores (capture passive, filtres papiers) dans la canopée d'arbres précoces et tardifs au sein des différentes populations de chêne le long du gradient altitudinal. Ces filtres ont ensuite été analysés au laboratoire (extraction d'ADN des spores, PCR, révélation sur gels d'agarose). Ces suivis ont aussi été réalisés au niveau de semis, représentant la future génération de chênes. Ainsi, nous avons pu estimer une « marge de sécurité » temporelle des arbres vis-à-vis des contraintes liées au gel et à l'oïdium au moment du débourrement, aux niveaux intra et inter populationnels. Nous avons aussi vérifié si les différents niveaux d'exposition à l'oïdium avaient des conséquences en termes d'infection (**Chapitre 4**).

Enfin, pour caractériser la contrainte exercée par l'oïdium sur la phénologie des pousses au cours de la saison de végétation, la phénologie de semis de chêne expérimentalement exposés à plus ou moins d'oïdium a été suivie en plaine tout au long de la saison de végétation. Ceci nous a permis de mesurer l'impact de l'oïdium sur la phénologie des différentes pousses au cours de la saison (i.e. le polycyclisme), et l'impact de l'infection sur la fitness des semis (mesurée par la hauteur qui en est un bon proxy, Sage et al. (2011)) (**Chapitre 5**). Pour ce chapitre, je n'ai pas participé à la collecte des données, mais j'ai pris part à leur analyse.

Le descriptif des différentes méthodes utilisées est détaillé dans la partie suivante.

La dernière partie (**Chapitre 6**) synthétise les principaux résultats obtenus à travers les différentes approches méthodologiques. Nous tenterons de répondre aux objectifs formulés précédemment et soulignerons les conclusions et perspectives de cette étude.

MATERIELS ET METHODES

1. Les espèces étudiées

Le chêne sessile (*Quercus petraea* L.) est une espèce caducifoliée de la famille des Fagacées, se rencontrant dans la majeure partie de l'Europe et à haute valeur environnementale, culturelle, et économique. Sa longévité est importante (de 500 à 1000 ans) et il peut atteindre une hauteur de 40 m. C'est une espèce monoïque dont la floraison a lieu en même temps que la feuillaison. Le chêne sessile couvre une majeure partie de l'Europe. Son aire naturelle s'étend de l'Irlande à l'ouest de l'Ukraine, du nord-ouest de la péninsule ibérique au sud de la Scandinavie. Son aire de répartition est incluse dans celle du chêne pédonculé (*Quercus robur* L.). Notre zone d'étude se situe en limite Sud de l'aire de répartition pour les deux espèces, ce qui en fait un outil intéressant car ces populations sont sujettes à de l'extirpation si l'adaptation au changement climatique n'est pas suffisante (Hampe & Petit 2005 ; Thuiller 2003). Le chêne sessile se rencontre depuis le niveau de la mer jusqu'à 1650 m d'altitude. Cette espèce a une préférence pour les climats doux et humides, les sols meubles, bien drainés et même relativement secs (Berges et al. 2005) (contrairement au chêne pédonculé), mais ne supporte pas les sols pauvres en minéraux et les faibles capacités en eau du sol, même si c'est une espèce à large amplitude écologique. Il semble que la phénologie du chêne sessile soit plus précoce (d'environ une semaine) que celle du chêne pédonculé (observations dans le Nord Est de la France, Lebourgeois et al. 2002). Ces deux espèces sont génétiquement très proches, capables de s'hybrider, et il n'est pas toujours facile de les différencier génétiquement (Guichoux et al. 2011).

Pour les études sur les besoins en températures froides et chaudes pour le débourrement, nous avons aussi travaillé sur le hêtre commun (*Fagus sylvatica* L.), également de la famille des Fagacées, car c'est une espèce co-occurente avec le chêne sessile en Europe présentant une phénologie assez contrastée. Son aire de répartition est incluse dans celle du chêne sessile. Le hêtre est considéré comme une espèce de fin de succession, tolérante à l'ombre, qui a une forte dynamique de remplacement des arbres pionniers.

L'oïdium est l'une des maladies fongiques les plus courantes des chênes caducifoliés en Europe (Mougou et al. 2008) (particulièrement sur chêne pédonculé). Les oïdiums (ordre des Erysiphales au sein des Ascomycota) sont des champignons parasites biotrophes obligatoires, infectant les organes photosynthétiques (Glawe 2008). Le champignon détourne les nutriments des cellules vivantes de son hôte grâce à des structures hautement spécialisées, appelées haustoria. Ces structures sont une interface active non seulement pour l'absorption des nutriments, mais aussi pour l'exportation de facteurs fongiques, tels que les effecteurs, permettant au parasite de prendre le contrôle du métabolisme de l'hôte à son profit (Schulze-Lefert & Panstruga 2003). La maladie est causée par un complexe de plusieurs espèces étroitement apparentées : *Erysiphe alphitoides*, *E. hypophylla*, *E. quercicola* et *Phyllactinia guttata*, avec *E. alphitoides* actuellement très prédominante, mais probablement d'origine exotique (Mougou et al. 2008 ; Mougou-Hamdane et al. 2010). Les premières épidémies d'oïdium des chênes en Europe datent de 1907 (*Phyllactinia guttata* ayant été mentionné de façon plus ancienne, et pourrait être indigène). Les chênes présentent une résistance ontogénique à l'oïdium : seules les jeunes feuilles en expansion sont sensibles à la maladie (Edwards & Ayres 1982). Comme les chênes, le champignon est affecté par la saisonnalité et présente un développement polycyclique au cours de la saison. L'oïdium peut hiverner sous forme de mycélium, dans les bourgeons infectés au cours de la saison précédente (phénomène de pousse-drapeau au printemps) ou en formant des chasmothèces (organes de dormance), qui sont responsables de la production des spores (ascospores) formant l'inoculum primaire au printemps (Glawe 2008 ; Marçais et al. 2009) (**Figure 12**). L'infection résulte en la production d'un mycélium, correspondant au feutrage blanc à la surface des feuilles typique des oïdiums. Ce mycélium produit un très grand nombre de spores (conidiospores) à la surface de la feuille, qui constituent l'inoculum secondaire, avec des cycles ultérieurs d'infection au cours de la saison résultant en un accroissement des populations fongiques. L'infection foliaire provoque une diminution de la photosynthèse nette et un changement plus général dans le métabolisme, pouvant affecter la croissance et la survie des arbres, surtout pour les jeunes plants (Hewitt & Ayres 1975 ; Marçais & Desprez-Loustau 2014), mais aussi sur les arbres adultes lorsqu'elle est associée avec d'autres facteurs de déperissement (Marçais & Desprez-Loustau 2014).

Les relations hautement spécialisées entre les parasites biotrophes et leurs hôtes amènent à une adaptation des cycles de vie. Ceci est particulièrement critique pour les parasites foliaires des arbres caducifoliés dans les régions tempérées, qui doivent s'adapter à la saisonnalité de l'hôte. L'initiation des épidémies annuelles chaque printemps nécessite que la libération des spores des chasmothèces se fasse au moment où les tissus sensibles de l'hôte (jeunes feuilles en développement) sont disponibles, après le débourrement (Edwards & Ayres 1982). L'interaction entre les schémas de croissance du chêne et la période de susceptibilité à la maladie peut donc déterminer à la fois les performances de l'hôte et du parasite.

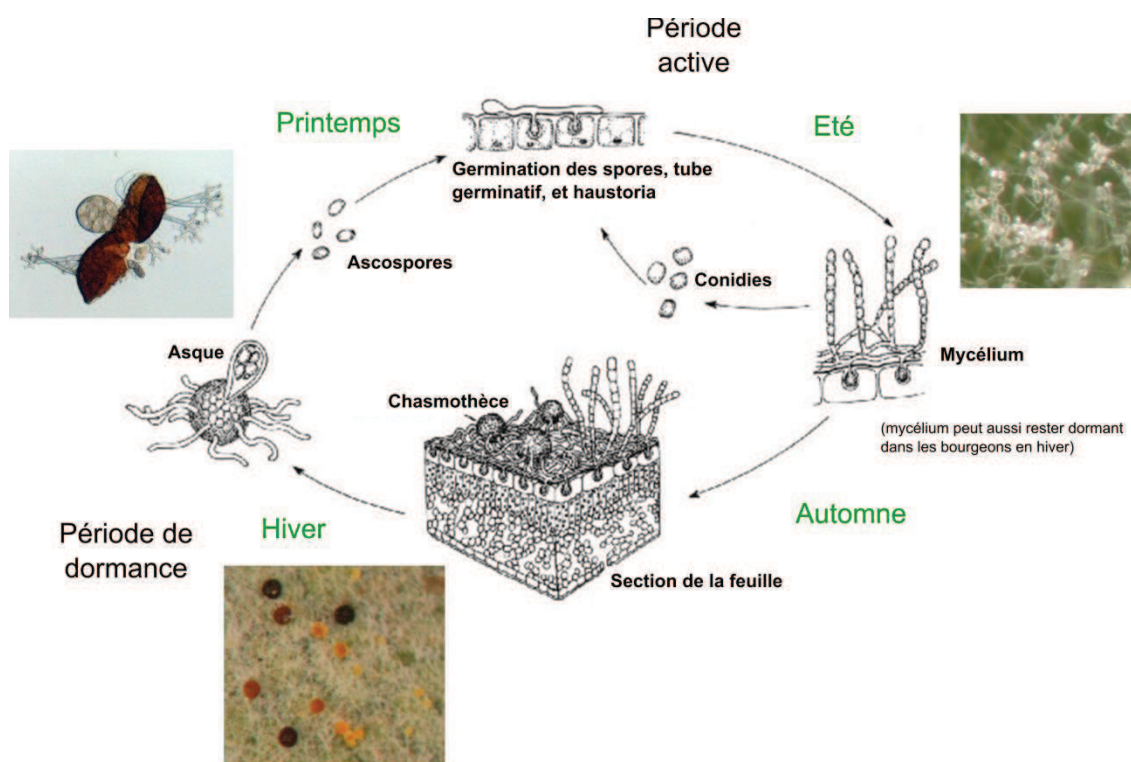


Figure 12. Cycle biologique de l'oïdium. D'après Schumann (1991).

2. Le gradient altitudinal

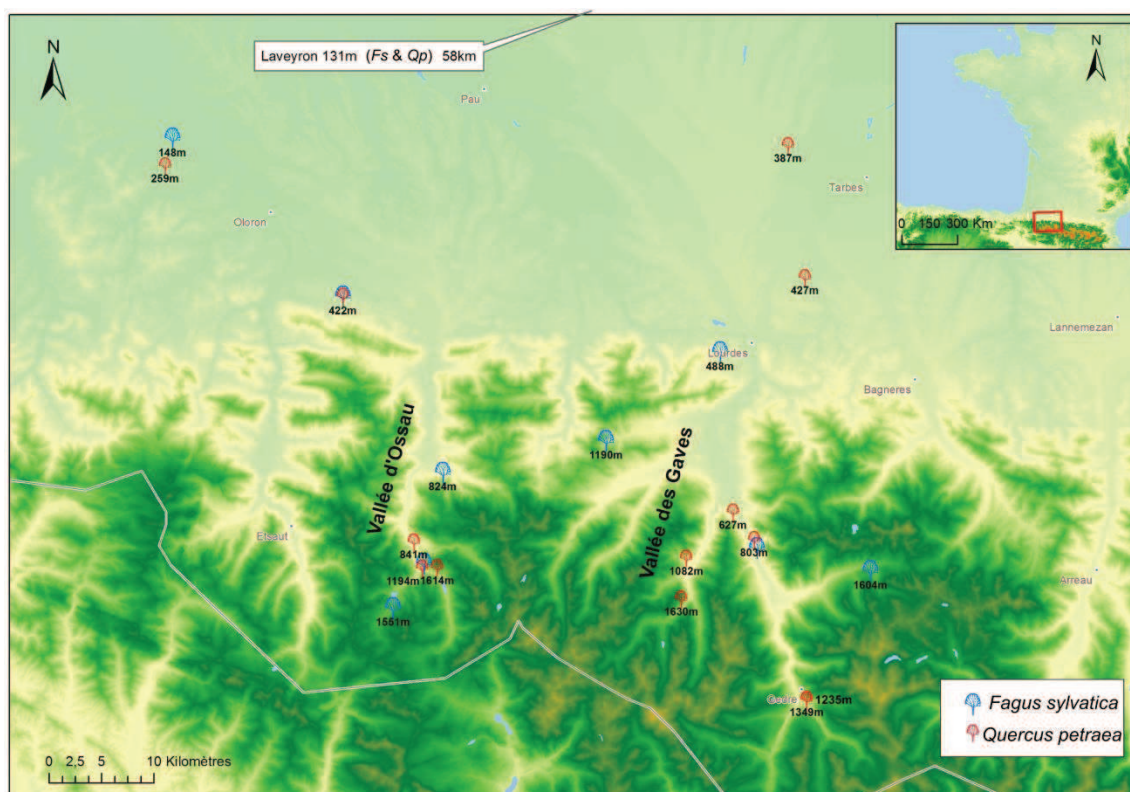


Figure 13. Répartition des populations de chêne (*Quercus petraea*) et de hêtre (*Fagus sylvatica*) étudiées dans le massif montagneux des Pyrénées. Carte : Xavier Capdevielle.

Les gradients altitudinaux permettent d’observer en peu de temps des traits (dont la phénologie) dans des situations climatiques très contrastées (gradient thermique). L’étude a été réalisée le long de deux transects altitudinaux au sein du massif montagneux des Pyrénées, au Sud de la France (de 43°15’N, 00°44’O à 42°52’N, 00°07’E). Ces deux transects sont des sites-ateliers de l’UMR BIOGECO depuis 2004, principalement pour l’espèce modèle de l’unité qu’est le chêne. Le premier transect a été établi dans la vallée des Gaves (Hautes Pyrénées) et le second dans la vallée d’Ossau (Pyrénées Atlantiques) (**Figure 13**). Les études de suivi de la dormance en conditions contrôlées et de la phénologie de l’oïdium n’ont cependant été faites que sur le transect de la vallée des Gaves. Les deux vallées sont parallèles, et présentent une altitude croissante du nord vers le sud. Elles ne sont situées qu’à 30 km de distance, et jouissent donc d’un climat océanique tempéré comparable, avec une température moyenne annuelle de 12.4°C (1931–2011) en basse altitude (Lourdes – 43°06’18’’N, 00°03’42’’W, Météo

France). Les températures moyennes annuelles diminuent linéairement avec l'altitude, d'environ 0.43°C pour chaque élévation de 100 m (moyenne 2005-2011).

La température de l'air a été enregistrée toutes les heures à l'aide de capteurs météorologiques (HOBO Pro RH/Temp, Onset Computer Corporation, Bourne, MA) depuis le 1^{er} janvier 2005, au sein de 24 sites d'étude. Tous les capteurs ont été inter calibrés au laboratoire avant l'installation. A chaque site, les capteurs ont été installés à 1.5m de hauteur, dans un espace ouvert à proximité de la population d'étude (dans une zone de 10 à 100 m de rayon, à la même altitude). Les capteurs étaient protégés par un couvercle en plastique blanc, pour prévenir de l'exposition à la pluie et au soleil direct. Plusieurs stations météorologiques ont souffert de problèmes techniques sur de courtes périodes. Pour la plupart des stations, les données manquantes ont été complétées à l'aide d'interpolations linéaires à partir des données des stations météorologiques les plus fortement corrélées ($R^2 > 0.91$). Si cela n'était pas possible, les populations et/ou les années concernées ont alors été retirées des analyses.

3. Caractéristiques des populations

Au total, 14 populations naturelles de chêne sessile ont été suivies pour les différentes expérimentations, réparties le long des gradients altitudinaux, de 131 m (plaine) à 1630 m (montagne) d'altitude (**Table 1**) (**Figure 13**). La différence d'altitude atteint 1499 m dans la vallée des Gaves et 1355 m dans la vallée d'Ossau. Dans chacune de ces 14 populations, 10 à 34 arbres adultes dominants et de tailles semblables ont été suivis. La distance moyenne entre les arbres étudiés au sein d'une population est de 109 m dans la vallée des Gaves et de 50 m dans la vallée d'Ossau. Les arbres ont été sélectionnés pour leur phénologie (évaluée pour la première fois en 2005), dans le but de capter la plus large variation phénotypique possible (i.e. les arbres les plus précoces et les plus tardifs) pour chaque population.

Des travaux antérieurs sur les populations de chêne du gradient ont permis de décrire leur phénologie en milieu naturel, ainsi que leurs caractéristiques génétiques et leur plasticité phénotypique. Le long des gradients, la phénologie du débourrement du chêne est retardée de 35 jours par 1000 m d'élévation en altitude (Vitasse et al. 2009a). La variabilité phénotypique du débourrement observée le long du

gradient altitudinal est associée à un déterminisme génétique et environnemental. Vitasse et al. (2009a) montrent que cette variabilité est expliquée en grande partie par la plasticité phénotypique mesurée lors de tests de transplantation réciproque. En effet, la température permet d'expliquer plus de 77% de la variabilité phénologique observée dans les Pyrénées. Toutes les populations le long du gradient présentent la même plasticité phénotypique (Vitasse et al. 2010) (**Figure 14**).

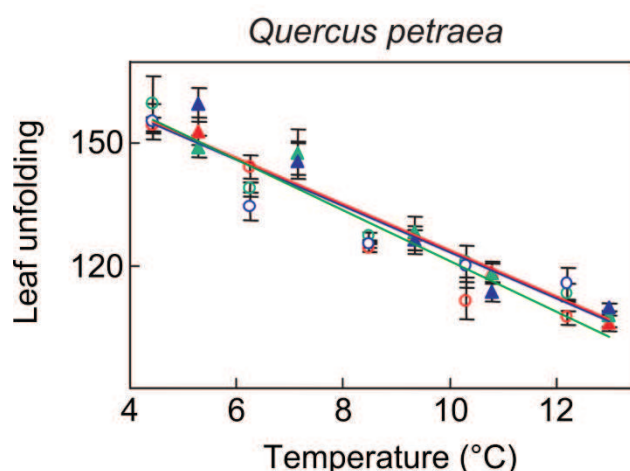


Figure 14. Dates de débourrement (jour Julien) en fonction de la température moyenne de printemps des tests de provenance pour trois populations de chêne. Les couleurs correspondent aux populations (altitude d'origine) : rouge, population de 400 m, vert, 800 m et bleu, 1200 m. Triangles pleins et les cercles vides représentent les observations phénologiques en 2007 et 2008 respectivement. Les valeurs correspondent à la moyenne de tous les individus par test de provenance et par la population et les bars à l'erreur-type. Les régressions linéaires ont été faites par population (Vitasse et al. 2010).

Cependant, même si la part de la plasticité phénotypique est importante, la part de la variation génétique n'est pas négligeable. Des observations phénologiques en tests de provenance (Vitasse et al. 2009a) ainsi que l'étude de l'architecture génétique des populations en test de provenance et *in situ* (Alberto et al. 2011 ; Alberto et al. 2010) ont permis d'y montrer une forte différenciation génétique pour le débourrement le long du gradient ($F_{ST}=1.8\%$ et 2.8% ($P<0.001$) en vallée des Gaves et d'Ossau, respectivement, et F_{ST} global $=2.3\%$ en test de provenance à Pierroton) (**Figure 15**), liée au gradient thermique (**Figure 16**).

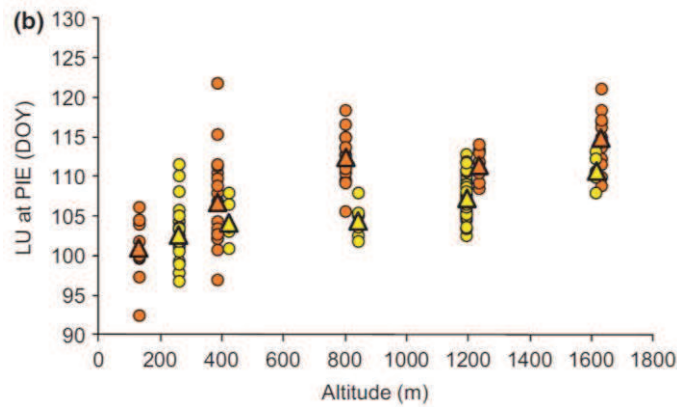


Figure 15. Variabilité du débourrement le long du gradient d'altitude, mesurée en test de provenance à Pierroton. Les triangles représentent la moyenne et les cercles représentent la valeur moyenne des familles, en orange pour la vallée des Gaves et en jaune pour la vallée d'Ossau. L'axe horizontal correspond à l'altitude des sites de provenances et de l'axe vertical représente la date de débourrement en jour Julien à Pierroton (Alberto et al. 2011).

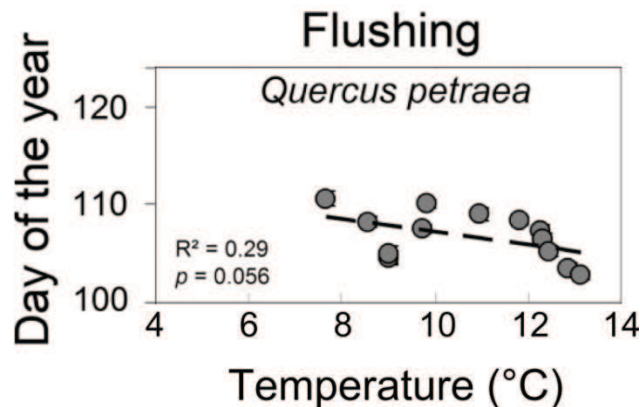


Figure 16. Dates de débourrement de populations de chêne en 2007 en test de provenance en fonction de la température moyenne annuelle de leur site d'origine (R^2 : coefficient de détermination ; p : p-value de la régression) (Vitasse et al. 2009a).

De plus, les populations de chêne présentent un profil de type *cogradient* en test de provenance – contrairement au hêtre, Fagacée lui aussi, qui présente un profil *countergradient*. Malgré une différenciation génétique très marquée pour le débourrement, les populations des gradients présentent une forte variabilité génétique intra populationnelle (Figure 12), qui diminue toutefois avec l'augmentation en altitude (Alberto et al. 2011). En effet, en test de provenance, les variances génétiques diminuent de 70.9 pour les populations provenant de 400 m à 19.5 pour les populations de 1200 m ($P < 0.05$). La variabilité est accentuée dans les populations naturelles, avec un écart de 24 jours entre le débourrement des individus précoces et tardifs à basse altitude, et de 12 jours à haute

altitude (moyennes calculées entre 2005 et 2010, à 150 m et 1650 m respectivement, pour les deux vallées confondues). Ainsi, la variation de timing de débourrement au sein des populations de basses altitudes est quasiment équivalente à la variation entre les populations de 100 m et 800 m d'altitude. Alberto et al. (2011) ayant démontré une forte héritabilité du débourrement pour ces populations de chêne ($h^2 > 0.87$), cette variation est maintenue d'une année sur l'autre. Un fort flux de gènes relie les populations des basses vers les hautes altitudes. Les auteurs ont aussi observé une diminution de la taille efficace des populations (i.e. de la taille d'une population idéale (de type Wright-Fisher) pour laquelle on aurait une fluctuation du polymorphisme équivalente à celle de la population naturelle) avec l'augmentation en altitude. Enfin, le taux d'hybridation entre les différentes espèces de chêne (*Quercus petraea*, *Q. robur*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica*) augmente avec l'altitude, ce qui peut participer à l'adaptation locale des populations (Alberto et al. 2010).

4. Etude de la phénologie

1. Suivi *in situ* du débourrement du chêne

J'ai pu profiter de données de suivi de la phénologie du débourrement d'arbres adultes collectées depuis 2005 (excepté en 2008 et 2013) le long des deux gradients au sein des 14 populations décrites précédemment. Quant au hêtre, dix populations ont été suivies (**Table 1**) (**Figure 16**). Des semis naturels de chêne (de 60 à 80, protégés dans des enclos grillagés de 20 semis pour empêcher le pâturage par des mammifères herbivores) de 20-30 cm de hauteur ont aussi été suivis au sein des deux populations de plus basse altitude dans la vallée des Gaves, en 2011 et 2012. Le développement des bourgeons a été suivi tous les 10 jours, dans chaque population, de Mars à Juin. Les observations sur arbres adultes ont été faites par un ou deux observateurs entraînés à l'aide de jumelles (pouvoir de grossissement : x10), à environ 15 m de distance des arbres. A chaque date, la proportion de bourgeons à un stade phénologique donné a été estimée pour chaque arbre. Les différents stades notés sont : bourgeon dormant, bourgeon gonflé, bourgeon vert et en expansion, éclatement du bourgeon et au moins une feuille étalée (**Table 2**).

Table 1. Caractéristiques des populations de chêne et de hêtre suivies le long des deux transects altitudinaux (vallée, nom du site, altitude (m) et coordonnées géographiques). Nombre d'individus suivis pour : DEB, la phénologie débourrement (valeur minimale-maximale du nombre d'arbres suivis, de plus en plus d'arbres étant suivis depuis 2005), OID : la phénologie de l'oïdium, INF : l'infection par l'oïdium, DORM : la dormance en conditions contrôlées.

Espèce	Vallée	Site	Altitude	Coordonnées	DEB	DORM	OID	INF
<i>Fagus sylvatica</i>	Gave	Laveyron	131	43°45'N, 00°13'O	10-22	10		
	Gave	Lourdes	488	43°05'N, 00°05'O	10-20			
	Gave	Chèze	773	42°55'N, 00°02'O	10-28			
	Gave	Haugarou	1190	43°00'N, 00°12'O	10-21			
	Gave	Barèges	1604	42°53'N, 00°06'E	10-25	10		
	Ossau	Josbaig	148	43°15'N, 00°44'O	10-21			
	Ossau	Bager	422	43°07'N, 00°32'O	10-20			
	Ossau	Eaux-Bonnes	824	42°56'N, 00°22'O	10-20			
	Ossau	Fabrèges	1260	42°52'N, 00°24'O	10-24			
	Ossau	Bious	1551	42°51'N, 00°27'O	10-27			
<i>Quercus Petraea</i>	Gave	Laveyron	131	43°45'N, 00°13'O	10-28		8	8
	Gave	Ibos	387	43°07'N, 00°32'O	10-25	10	8	8
	Gave	Adé	427	43°08'N, 00°00'O	10-34			
	Gave	Pierrefitte	627	42°56'N, 00°03'O	10-22			
	Gave	Chèze	803	42°55'N, 00°02'O	10-25		8	8
	Gave	Bourdalats	1082	42°54'N, 00°06'O	10-29			
	Gave	Gèdre Bas	1235	42°47'N, 00°01'E	10-28	10	8	8
	Gave	Gèdre Haut	1349	42°47'N, 00°02'E	10-27			
	Gave	Péguère	1630	42°52'N, 00°07'E	10-27		8	8
	Ossau	Josbaig	259	43°15'N, 00°44'O	10-26			8
	Ossau	Bager	422	43°07'N, 00°32'O	18			8
	Ossau	Le Hourcq	841	42°54'N, 00°26'O	10-22			8
	Ossau	Gabas	1194	42°53'N, 00°25'O	10-34			8
	Ossau	Artouste	1614	42°53'N, 00°24'O	11-15			8

Au sein de notre étude, nous avons considéré deux stades successifs de la phénologie du débourrement. Le premier stade (*budburst*) a été défini comme la date à laquelle 50% des bourgeons de l'arbre ont éclaté et les premières feuilles ont commencé à émerger (stade 3, premier stade de faible résistance au gel (Lenz et al. 2013)). Le deuxième stade (*leaf unfolding*) a été défini comme la date à laquelle la première feuille est étalée pour 50% des bourgeons du houppier (stade 4, début de la période de forte susceptibilité à l'oïdium (Edwards & Ayres 1982)). Pour les semis, seul le bourgeon apical a été considéré (i.e. le premier stade a été déterminé à la date pour laquelle le bourgeon apical a éclaté et ses premières feuilles ont commencé à émerger et le deuxième stade a été déterminé à la date à laquelle la première feuille du bourgeon apicale est étalée). Les dates de ces deux stades ont été estimées, pour chaque arbre adulte et semis, par régression linéaire entre deux campagnes de mesure. Au final, la date de débourrement a été calculée pour chaque population, comme la moyenne des dates de débourrement de chaque arbre adulte. Nous avons attribué le statut de « précoce » aux arbres du

premier quartile de la population concernant la date de débourrement (*budburst* et *leaf unfolding*), et le statut de « tardif » aux arbres du dernier quartile, par population et par année (la phénologie des individus étant fortement stable due à la forte héritabilité du débourrement).

Table 2. Signification phénologique des codes de développement des bourgeons utilisés sur le terrain. Le premier stade de débourrement étudié ici (*budburst*) est atteint quand 50% des bourgeons ont atteint le stade 3, et le deuxième stade (*leaf unfolding*) est atteint quand 50% des bourgeons ont atteint le stade 4 (Vitasse et al. 2009b).

Code	<i>A. alba</i>	<i>A. pseudoplatanus</i>	<i>C. betulus</i>	<i>F. sylvatica</i>	<i>F. excelsior</i>	<i>I. aquifolium</i>	<i>Q. petraea</i>
0	Dormant winterbud	Dormant winterbud	Dormant winterbud	Dormant winterbud	Dormant winterbud	Dormant winterbud	Dormant winterbud
1	Buds expanding and are new green behind a transparent cupule	Bud-swollen (a whitish down is visible)	Bud-swollen	Bud-swollen	Bud-swollen and green	Bud-opening	Bud-swollen
2	Needles unfolding, cupule coming off	Buds expanding and green	Bud-burst	Bud-burst	Bud-burst	At least one leaf unfolding	Buds expanding and are new green
3		Bud-burst	At least one leaf unfolding	At least one leaf unfolding	At least one leaf unfolding		Bud-burst
4		At least one leaf unfolding					At least one leaf unfolding

2. Suivi *in situ* de la sporulation de l'oïdium



Figure 17. Piégeage des spores : filtre de papier Whatman® de 24 cm de diamètre placé sur un support horizontal en bois suspendu dans la canopée du chêne. Photographies : Xavier Capdevielle.

Nous avons suivi la phénologie de la sporulation de l'oïdium au printemps dans cinq sites de la vallée des Gaves, en 2011 et 2012 (**Table 1**). La présence de spores a été évaluée par piégeage, suivie par une détection moléculaire par PCR spécifique. Dans chaque population de chêne, des pièges ont été placés dans la canopée de 8 arbres, à une hauteur d'environ 10 m au-dessus du sol (**Figure 17**). Pour

prendre en compte la possible variation de la phénologie fongique associée à la phénologie des arbres, nous avons sélectionné quatre arbres précoces et quatre arbres tardifs, dispersés dans la population. Ces arbres ont aussi été sélectionnés pour leur facilité d'accès et de mise en place du dispositif. Un piège a également été placé dans chaque enclos de semis (décrits précédemment). Les spores ont été recueillies (capture passive) sur un filtre de papier Whatman® de 24 cm de diamètre (Garbelotto et al. 2008 ; Schweigkofler et al. 2004) placé sur un support horizontal en bois suspendu dans la canopée du chêne, ou fixée sur un piquet en bois de 50 cm de haut dans les enclos (**Figure 17**). Les filtres ont été pulvérisés avec du tampon Tris-EDTA (dilution 4X, pH = 8) avant l'exposition, pour améliorer la capacité de piégeage et la conservation des spores (Schweigkofler et al. 2004). Les filtres ont été changés à intervalles réguliers (15 jours en moyenne), de Mars à Septembre en 2011, et de Mars à Juillet en 2012 (cette année-là nous avons recentré nos captures sur la période d'émission des spores ; nous avons changé les filtres tous les 10 jours et arrêté le suivi plus tôt). A la fin de la période d'exposition, les filtres ont été placés individuellement dans des pochettes en papier et ramenés au laboratoire. À l'arrivée, chaque filtre a été séché à température ambiante puis placé dans une pochette en plastique et stocké à -80°C jusqu'au lavage si celui-ci n'avait pas lieu immédiatement. Pour récupérer les spores, nous avons lavé les filtres individuellement en distribuant 40 ml de tampon Tris-EDTA chauffé à 65°C dans chaque pochette en plastique (Garbelotto et al. 2008 ; Schweigkofler et al. 2004). Une suspension de spores a été générée par des mouvements de va-et-vient, et en frictionnant les filtres à travers la pochette. Chaque suspension a été versée dans un tube Falcon® de 50 mL (contenu de lavage de 1 filtre par tube). Si la suite des manipulations n'était pas immédiate, les tubes étaient conservés à -20°C. Afin de pouvoir procéder ultérieurement à l'extraction d'ADN, les spores de chaque tube ont été concentrées sur un support adéquat, c'est-à-dire en filtrant la solution à l'aide d'une pompe de filtration (Systèmes Combisart® de Sartorius). Les spores étaient alors récupérées sur une membrane de nitrocellulose stérile de 47 mm de diamètre, avec des pores de 0,45 µm de diamètre (Sartorius Stedim Biotech), diamètre plus petit que celui des spores. Les membranes ont ensuite été découpées en deux parties égales avec un scalpel, et chaque moitié a été placée dans un tube Eppendorf® de 2 mL avec deux billes d'acier de 2 mm de diamètre. Les échantillons ont été lyophilisés puis broyés pendant 2 minutes, à 30 Hz, dans un broyeur Qiagen® Tissue Lyser. L'ADN a

ensuite été extrait à l'aide d'un kit, utilisé selon les instructions du fabricant (Invisorb® Spin Plant Mini Kit de Invitex). Pour l'amplification de fragments spécifiques ciblant *E. alphitoides*, *E. quercicola* et *E. hypophylla*, les amorces d'oligonucléotides eryl-F (5' CTC AGT CGT GGC ATC TGC T 3', (Mougou et al. 2008)) et o-micro-rev (5' CCG CTC CAG GCC AAA CC 3', (Heuser & Zimmer 2002)), permettant d'amplifier un fragment dans la région ITS1 de l'ADN ribosomique, ont été utilisés pour la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Pour chaque échantillon, nous avons réalisé une PCR avec de l'ADN pur et dilué au 1/10^{ème} (pour diluer des inhibiteurs potentiels de PCR) pour la PCR. Un mélange des composants suivants a été ajouté à chaque extrait d'ADN (1,5 µL), pour un volume final de 20 µl : 13,55 µL d'eau distillée, 2 µL de tampon PCR 10x (Life Technologies, Karlsruhe, Allemagne), 1,2 µL de MgCl₂ 25mM, 0,8 µL de dNTP, 0,4 µL de chaque amorce et 0,15 µL de *Taq* DNA polymérase (Life Technologies, Karlsruhe, Allemagne). La PCR a été réalisée sur 45 cycles (30 s à 94°C, 40 s à 55°C, 50 s à 72°C) précédés par une phase de dénaturation primaire (3 minutes à 94°C) et suivie d'une phase d'élongation terminale (7 minutes à 72°C). La présence ou l'absence d'ADN a été déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose (concentré à 2%, migration pendant 25 minutes à 100 V). Nous avons sélectionné deux échantillons de produits PCR par arbre, en 2011 et 2012, qui ont été séquencés avec les mêmes amorces d'oligonucléotides, par la méthode de Sanger (*dye-terminators*), à l'aide d'un séquenceur Applied Biosystems® 3730 (Life Technologies, Karlsruhe, Allemagne), afin de déterminer les espèces présentes (*E. alphitoides*, *E. quercicola* et *E. hypophylla*) grâce aux 3 sites polymorphes.

Les spores d'oïdium étaient considérées comme présentes dans un piège donné pour une période donnée lorsqu'au moins un des quatre tests PCR (2 membranes x 2 dilutions) était positif. La date de capture a été définie comme la date du milieu de la période d'exposition du filtre. Pour chaque arbre, le début de la période de sporulation a été défini à la première date pour laquelle des spores ont été détectées.

3. Suivi de la dormance du chêne en conditions contrôlées

Nous avons suivi la phénologie de la dormance de populations de chêne sessile et de hêtre situées sur le transect de la vallée des Gaves, à l'aide du test de « boutures de nœuds isolés » décrit précédemment. Pour chaque espèce, nous avons sélectionné deux populations : une première à basse altitude (< 387 m) et une seconde à haute altitude (> 1235 m) (**Table 1**). Dans chaque population, nous avons sélectionné cinq arbres précoces et cinq arbres tardifs parmi ceux suivis pour la phénologie foliaire. Toutes les deux semaines environ, de mi-October 2010 à mi-Avril 2011, nous avons échantillonné des rameaux contenant de nombreux bourgeons sur chaque arbre sélectionné dans chaque population, à une hauteur d'environ 10 m, à l'aide d'un échenilloir (ou d'un fusil de chasse si les branches n'étaient pas accessibles avec l'échenilloir). Les branches étaient immédiatement placées dans des boîtes en polystyrène pour les maintenir au froid, et y étaient transportées jusqu'au laboratoire. Une fois au laboratoire, pour le chêne les rameaux ont été coupés en segments de 5 cm de long, portant chacun un seul bourgeon ; nous avons suivi cinq bourgeons par individu. Pour les bourgeons non apicaux, la partie supérieure des segments a été recouverte avec de la cire. Aucune différence significative dans le timing du débourrement n'a été observée entre les bourgeons apicaux et non apicaux pour ces espèces (Marc Bonhomme, résultats non publiés). Les segments ont été plantés dans de la laine de roche, celle-ci étant ensuite placée dans un plateau en aluminium rempli d'eau du robinet, dans laquelle nous ajoutons un morceau de charbon pour purifier l'eau et éviter le développement de moisissures. Comme ce type de bouture meurt rapidement chez le hêtre, pour cette espèce les rameaux ont été découpés en segments d'une vingtaine de centimètres, chacun portant environ 10 bourgeons. Nous avons suivi 34 bourgeons en moyenne par individu. Les segments ont ensuite été placés dans des bocaux de verre remplis d'eau du robinet, avec un morceau de charbon de bois. Toutes les boutures ont ensuite été placées dans une chambre de croissance, dans des conditions de photopériode longue (16h, $230 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), à température chaude (25 °C) et avec une humidité maintenue à 70%. Les boutures s'avèrent être de bons indicateurs de l'évaluation de la phénologie des arbres adultes (Vitasse & Basler 2014). Le développement des bourgeons a été contrôlé tous les deux à trois jours jusqu'à mi-mai, et nous avons noté la date à laquelle les bourgeons

étaient au stade 3 de l'échelle phénologique décrite par Vitasse et al. 2009b (**Table 2**) (équivalent stade BBCH 9). Nous avons ensuite calculé une date moyenne de débourrement par individu (n=5 et n=34 en moyenne pour le chêne et le hêtre, respectivement). Nous avons également calculé le taux de débourrement (%), correspondant au nombre de bourgeons ayant débourré sur le nombre total de bourgeons échantillonnés à une date donnée.

4. Modélisation de la phénologie du chêne

Nous avons ajusté des modèles phénologiques de débourrement du chêne à l'aide du logiciel *Phenology Modeling Platform* PMP 5.5 (Chuine et al. 2013). Cet outil permet d'ajuster un modèle phénologique à des données et de faire des simulations. Pour ajuster un modèle à ses jeux de données météorologiques et phénologiques, l'utilisateur peut se baser sur un modèle phénologique préexistant ou définir un nouveau modèle en utilisant les fonctions prévues dans le logiciel. De cette manière, PMP permet de créer une infinité de modèles. Chaque modèle est défini par le nombre de phases qu'il décrit, les variables environnementales qui déclenchent chaque phase, les fonctions de réponse du développement de la plante à ces variables, et la façon dont les phases sont connectées. La qualité de l'ajustement est estimée par l'efficacité du modèle (*EFF*, « qualité interne » estimée par le logiciel), la corrélation entre les valeurs prédites vs. observées extérieures à l'ajustement du modèle (*RMSE*) et la pertinence des fonctions de réponse.

La particularité des modèles que nous avons ajustés est que nous y avons intégré la date de levée de dormance, déterminée à l'aide du suivi de dormance en conditions contrôlées. Les variables d'entrée utilisées pour ajuster les modèles provenaient de cette même expérimentation, et nous avons validé nos modèles à l'aide des données du suivi de débourrement *in situ* le long du gradient altitudinal. Ensuite, nous avons réalisé des simulations prospectives de la levée de dormance et du débourrement des chênes au cours du 21^{ème} siècle, à l'aide de données de températures simulées par le modèle ARPEGE de Météo France (Déqué et al. 1998), d'après le scénario A1B du GIEC (GIEC, 2007). Nous avons réalisé ces simulations pour les populations de chêne de basse et haute altitudes.

5. Suivi des effets de l'oïdium sur la phénologie du chêne au cours de la saison

L'étude de la réponse phénologique du chêne à l'infection par l'oïdium a été réalisée dans un dispositif expérimental installé en 2009 sur le domaine expérimental de l'INRA à Pierroton, Cestas (44°44'10.4"N, 0°46'29.5"O), près de Bordeaux (projet Realtime sur le déterminisme génétique de la sensibilité/résistance des chênes à l'oïdium et sélection « en temps réel »). Ce site subit un climat océanique tempéré pouvant être comparé à celui du site de basse altitude de Laveyron du transect de la vallée des Gaves. L'étude porte sur le chêne pédonculé (*Q. robur*), espèce de chêne prédominante sur le site, plus sensible à l'oïdium que le chêne sessile.

Le dispositif a été mis en place dans une clairière entourée de pins (*Pinus pinaster*) et de feuillus (principalement *Quercus robur*). Le site expérimental a été clôturé pour empêcher le pâturage par les mammifères herbivores. Le dispositif comprend neuf placettes, séparées l'une de l'autre par une distance de 4 m. Des glands ont été semés en Avril 2009 à 10cm*10 cm de distance dans chaque placette, sur huit rangées de 38 plants. Les glands ont été collectés à l'automne 2008 sous 15 chênes matures isolés (c'est-à-dire dont la canopée ne chevauchait pas celle d'un arbre voisin) à Pierroton. L'ascendance de l'arbre-mère de chaque plant a été vérifiée à l'aide d'un ensemble de 9 marqueurs microsatellites (Guichoux et al. 2011). Les individus avec des données non conformes par rapport à la mère supposée (arbre sous lequel avait été récolté le gland) ont été rejetés des analyses. Les glands des différentes familles de demi-frères ont été répartis de façon aléatoire à l'intérieur et entre les placettes, avec 173 glands semés par famille en moyenne (minimum=118; maximum=285). Chaque placette a été entourée par une rangée de garde avec des glands d'une provenance en vrac.

Trois niveaux d'exposition à l'oïdium ont été répartis de façon aléatoire sur les neuf placettes (trois placettes par niveau d'exposition) : un niveau faible (obtenu par des applications répétées de fongicides), un niveau moyen (correspondant à l'infection naturelle) et un niveau élevé (obtenu par soufflage de spores à partir de feuilles fortement infectées par l'oïdium au-dessus des jeunes plants, à l'aide d'un appareil à air comprimé portatif). La phénologie du débourrement de chaque plant a été suivie en 2010 et 2011, par une évaluation hebdomadaire en Avril-Mai (4-5 dates par an).

L'occurrence de pousses ultérieures (i.e. polycyclisme) issues du bourgeon apical sur l'axe principal a ensuite été suivie jusqu'à la fin de la saison de croissance, où la hauteur (proxy de fitness) des semis a été mesurée.

5. Notations d'infection

Les dégâts d'infection d'oïdium ont été évalués à la fin du mois de Juillet, dans cinq populations dans la vallée des Gaves (2011 et 2012) et cinq populations de la vallée d'Ossau (2012) (**Table 1**). Dans les populations de la vallée des Gaves, nous avons suivi les mêmes arbres et semis que ceux utilisés pour le piégeage des spores. Dans les populations de la vallée d'Ossau, nous avons suivi quatre arbres adultes précoces et quatre arbres adultes tardifs. Des notations d'infection ont aussi été réalisées sur les jeunes plants de Pierroton en mai-juin et septembre-octobre 2009, 2010 et 2011. Pour chaque chêne adulte étudié, nous avons échantillonné un rameau à chacun des quatre points cardinaux (Nord, Sud, Est et Ouest) dans la canopée à une hauteur d'environ 10 m, à l'aide d'un échenilloir – si cela était possible. Deux feuilles ont ensuite été choisies au hasard sur la première pousse de chaque rameau (les deuxièmes pousses étaient assez rares). Le taux d'infection de chaque feuille, évalué à l'œil nu, a été estimé comme étant le pourcentage de surface foliaire recouverte de mycélium. Une loupe a été utilisée pour faciliter cette évaluation si nécessaire. Le pourcentage d'infection par arbre a ensuite été calculé comme la moyenne du taux d'infection de chaque feuille. Pour les jeunes plants, l'infection a été évaluée comme étant le pourcentage de surface foliaire recouverte de mycélium sur la plante entière.

CHAPITRE II

Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range

Cécile F. Dantec, Yann Vitasse, Marc Bonhomme, Jean-Marc Louvet, Antoine Kremer and Sylvain Delzon

International Journal of Biometeorology (2014) doi: 10.1007/s00484-014-0787-7



Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range

Cécile F. Dantec · Yann Vitasse · Marc Bonhomme ·
Jean-Marc Louvet · Antoine Kremer · Sylvain Delzon

Received: 9 October 2013 / Revised: 3 December 2013 / Accepted: 31 December 2013
© ISB 2014

Abstract With global warming, an advance in spring leaf phenology has been reported worldwide. However, it is difficult to forecast phenology for a given species, due to a lack of knowledge about chilling requirements. We quantified chilling and heat requirements for leaf unfolding in two European tree species and investigated their relative contributions to phenological variations between and within populations. We used an extensive database containing information about the leaf phenology of 14 oak and 10 beech populations monitored over elevation gradients since 2005. In parallel, we studied the various bud dormancy phases, in controlled conditions, by regularly sampling low- and high-elevation populations during fall and winter. Oak was 2.3 times more sensitive to temperature for leaf unfolding over the elevation gradient and had a lower chilling requirement for dormancy release than beech. We found that chilling is currently insufficient for the full release of dormancy, for both species, at the lowest elevations in the area studied. Genetic variation in leaf

unfolding timing between and within oak populations was probably due to differences in heat requirement rather than differences in chilling requirement. Our results demonstrate the importance of chilling for leaf unfolding in forest trees and indicate that the advance in leaf unfolding phenology with increasing temperature will probably be less pronounced than forecasted. This highlights the urgent need to determine experimentally the interactions between chilling and heat requirements in forest tree species, to improve our understanding and modeling of changes in phenological timing under global warming.

Keywords Climate change · Phenology · Cuttings · Heat/chilling requirement · Leaf unfolding · Sessile oak · European beech

Abbreviations

GDD Growing degree days

T_b Base temperature for chilling and heat accumulation

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00484-014-0787-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. F. Dantec · J.-M. Louvet · A. Kremer · S. Delzon
INRA, UMR 1202 BIOGECO, 33610 Cestas, France

C. F. Dantec · J.-M. Louvet · A. Kremer · S. Delzon (✉)
Université de Bordeaux, UMR 1202 BIOGECO, 33610 Cestas,
France
e-mail: sylvain.delzon@u-bordeaux1.fr

Y. Vitasse
Institute of Botany, University of Basel, 4056 Basel, Switzerland

M. Bonhomme
INRA, UMRA547 PIAF, 63100 Clermont-Ferrand, France

M. Bonhomme
Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMRA547 PIAF,
63000 Clermont-Ferrand, France

Introduction

The timing of leaf unfolding is a key phenological event in temperate tree species because it affects their productivity (Myneni et al. 1997; Hasenauer et al. 1999; White et al. 1999; Zhou et al. 2001), distribution range (Chuine and Beaubien 2001; Chuine 2010), and, indirectly, the climate (Richardson et al. 2013). In most temperate trees, the timing of leaf unfolding depends mostly on temperature, with some species, including European beech, also sensitive to photoperiod (Polgar and Primack 2011; Basler and Körner 2012; Laube et al. 2013; Vitasse and Basler 2013). The recent increase in surface air temperature has led to strong phenological shifts in the timing of leaf unfolding in temperate trees

(Root et al. 2003; Menzel et al. 2006; Richardson et al. 2006). These shifts differ substantially between temperate tree species: An 1 °C increase in air temperature in spring advances leaf unfolding by 2 to 10 days, depending on the species (Chmielewski and Rotzer 2001; Penuelas et al. 2002; Karlsson et al. 2003; Vitasse et al. 2009b, 2011). Frost-sensitive active tissues in the buds are protected against frost damage in temperate trees by an endodormancy phase in winter (controlled by internal factors), generally induced and released by photoperiod and chilling temperatures, respectively (Coville 1920; Doorenbos 1953; Nienstaedt 1966; Heide 1993; Horvath et al. 2003; Campoy et al. 2012), followed by an ecodormancy phase of sensitivity to warm temperatures (reviewed in Lang 1987). However, there are complex relationships between chilling and heat requirements.

Warmer temperatures in early spring affect flushing by shortening the ecodormancy phase. By contrast, warmer temperatures during winter may lead to later endodormancy release or to insufficient chilling for the full release of endodormancy in temperate regions, increasing the heat required for leaf unfolding in a nonlinear manner (Wareing 1953; Sarvas 1972; Cannell and Smith 1986; Murray et al. 1989). Thus, the role of chilling may become more important with increasing air temperature, warmer temperatures therefore leading to a nonlinear advance in tree leaf unfolding phenology in the future (Chuine et al. 2010; Fu et al. 2012a; Laube et al. 2013). The relationship between heat and chilling requirements differs considerably between species (Murray et al. 1989; Cannell 1997; Vitasse and Basler 2013). In trees with a low chilling requirement, leaf unfolding will probably occur earlier in the next few decades under conditions of continued climate change, whereas species with a high chilling requirement may display unchanged or even delayed leaf unfolding date because chilling requirements are not satisfied or endodormancy release occurs later (Murray et al. 1989; Harrington et al. 2010; Morin et al. 2010; Vitasse et al. 2010; Polgar and Primack 2011; Fu et al. 2012a). However, the environmental mechanisms involved in bud dormancy processes are far from fully understood (Cooke et al. 2012).

The timing of leaf unfolding in temperate tree species is highly plastic with respect to temperature changes and also has a genetic determinism (Derory et al. 2006; Vitasse et al. 2010), with high heritability reported for both deciduous (Howe et al. 2000; Baliuckas et al. 2005; Alberto et al. 2011) and evergreen tree species (Billington and Pelham 1991). In particular, temperature requirements are under strong genetic control, essentially of two types (Rousi and Pusenius 2005; Sanz-Perez et al. 2009): the first acts on the duration of the chilling period and the “amount” of chilling required to overcome endodormancy (Bennett 1949; Nooden and Weber 1978; Perry and Wu 1960; Samish 1954; Sherman et al. 1977) and second acts on sensitivity to heat temperatures as demonstrated in several plantations of walnut trees (Mauget

and Germain 1980; Charrier et al. 2011). However, the threshold temperature to which buds are sensitive during the ecodormancy phase and the optimum chilling temperature for dormancy release are known accurately for only a few species, principally fruit trees (reviewed in Faust et al. 1997). Moreover, it has been shown that, within species, populations often have different chilling and heat requirements, depending on their climate of origin (Charrier et al. 2011; Polgar and Primack 2011). Clinal variations in the timing of leaf unfolding along gradients of elevation and latitude have been observed in *common garden* experiments (along elevation gradients: Vitasse et al. 2009a; Gomory and Paule 2011; along latitudinal gradients: Myking and Heide 1995), possibly due to genetically determined temperature requirements (Vitasse et al. 2010). Interestingly, these genetic clines may run in the same direction as the phenotypic in situ cline occurring along these biogeographical gradients (cogradient variation), as in *Quercus petraea*, *Fraxinus excelsior*, and *Acer pseudoplatanus*, for example, or they may run in the opposite direction (counter-gradient variation), as in *Fagus sylvatica* or *Pseudotsuga menziesii* (Chmura and Rozkowski 2002; Acevedo-Rodriguez et al. 2006; Vitasse et al. 2009a, 2013; Alberto et al. 2011; Gomory and Paule 2011), for example. This raises questions as to whether the genetic difference in leaf unfolding timing between populations growing in contrasting climates results from differences in chilling or heat requirements. The resolution of this issue would have important implications for improving phenological predictions for temperate forests under climate warming.

Renewed interest in predicting changes in temperate forest phenology in response to climate change has triggered the development of numerous phenological models, of various degrees of complexity, integrating the main drivers of leaf unfolding phenology: heat and chilling requirements, photoperiod, and their interactions. Most predictions to date have forecasted an advance in the timing of leaf unfolding in temperate tree species in the near future (Morin et al. 2009; Vitasse et al. 2011). However, in fruit tree, delayed leaf unfolding due to insufficient chilling has recently been demonstrated for pistachio trees in Tunisia (Elloumi et al. 2013), walnut trees in California and cherry trees in Germany (Luedeling and Gassner 2012; Luedeling et al. 2013), and apple trees in Japan (Honjo 2007). Legave et al. (2013) recently reported a delayed endodormancy release for apple trees in the south of France, but with no effect on leaf unfolding date. However, models including chilling are generally outperformed by classic models based on heat requirement only (such as the widely used thermal model; Fu et al. 2012b). This may be because they were calibrated over the whole distribution of a given species, such that only a very small number of populations located in the warmest part of the species distribution would lack chilling during warm winters, or in the central part of the distribution, in which chilling was

probably sufficient. Thus, predictions based on these data are likely to underestimate the role of chilling because the data used for calibration include too few years and/or populations undergoing insufficient chilling to constrain the models. There is an urgent need to understand the role and importance of chilling requirements in tree phenology because the frequency of winters with insufficient chilling is likely to increase, particularly in the southernmost parts of species ranges (Darbyshire et al. 2013b; Legave et al. 2013). A combination of in situ observations in the warmest part of the species distribution, together with warming and photoperiod experiments, is a useful approach likely to improve prediction of the phenological shift over the next few decades.

We used an extensive phenological database containing data acquired along two elevation gradients, to assess and compare the heat and chilling requirements of European beech and sessile oak in natural conditions. These two species are the predominant deciduous trees in Europe, with markedly different phenological sensitivities to temperature (Kramer 1995; Vitasse et al. 2009b; Čufar et al. 2012; Phillimore et al. 2013; Schieber et al. 2013; Vitasse and Basler 2013). Our study area is located at the warmest limit of the species distribution range, in which chilling requirements for the release of bud dormancy may remain unsatisfied in lowland forests. In parallel, we experimentally characterized the chilling (for endodormancy release) and heat (for ecodormancy release) requirements for leaf unfolding, in cuttings from low- and high-elevation populations, including early- and late-flushing individuals from the same population. For both species studied, we aimed (a) to determine the extent of change in heat requirements over a range of chilling durations, (b) to determine whether genetic variations in the timing of leaf unfolding between and within populations are driven by changes in heat and/or chilling requirements, and (c) to determine whether populations growing in the warmest area of the species distribution currently experience insufficient chilling for full dormancy release.

Materials and methods

Study area and species description

This study was conducted in two valleys of the Pyrenees mountains in southern France (from 43°15'N, 00°44'W to 42°53'N, 00°06'E). A first transect was set up in the Ossau valley (Pyrénées Atlantiques), and a second was established in the Gave valley (Hautes Pyrénées) (Table 1). These two valleys, located 30 km apart, are parallel and display an increase in elevation from north to south. This region is characterized by a temperate oceanic climate, with mean annual and winter (from January 1st to the end of March) temperatures of 12.4 and 7.0 °C, respectively (1931–2011), at low elevation (Lourdes—43°06'18"N; 00°03'42"W, Météo

France). Mean annual temperatures decreased linearly with elevation, by about 0.43 °C for every 100 m increase in elevation (mean from 2005 to 2011). We selected two common deciduous European tree species with different responses to spring temperature (Vitasse et al. 2009b): European beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). European beech occurs mostly in central and western Europe, in various habitats, ranging from mountainous regions in southern and eastern Europe to lowlands in central Europe (Bolte et al. 2007). Sessile oak occurs throughout most of Europe, from the Mediterranean to southern Scandinavia and from Ireland to the Ural Mountains in Russia. Thus, in the Pyrenees, both species are at the southern limit of their distribution range. For these two species and the two transects, 24 natural established populations were monitored for leaf unfolding phenology, from 131 to 1,630 m above sea level, in hill and mountain vegetation belts (Table 1). The range of elevation extended over 1,499 m for oak and 1,473 m for beech. For each population, we monitored 10 to 34 dominant, mature individuals of comparable height. Beech populations were located on north-facing slopes, and oak populations were located on south-facing slopes.

Phenological observations in situ

We monitored the timing of leaf unfolding along the two elevation gradients, for 7 years (2005–2007 and 2009–2012). Bud development was monitored at 10-day intervals in each population, from March to June, on the same selected individuals. Observations were made by two observers with binoculars (magnifying power 10), about 15 m away from the tree. We considered leaf unfolding date to have been reached for a bud when at least one of its leaves was fully unfolded (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, and Chemische Industrie (BBCH) scale, stages 10 to 19—see Meier 2001), and we visually evaluated the percentage of buds at this stage in the bulk of the foliage. At the tree level, leaf unfolding date was considered to have been reached when 50 % of the buds had reached this threshold. This date was estimated, for each selected tree, by linear regression between two measurement campaigns. Finally, for each population, leaf unfolding date was calculated as the mean of the estimated dates for the sampled individuals.

Meteorological measurements

Air temperature was recorded with data loggers (HOBO Pro RH/Temp, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) at each study site (24 sites). All sensors were intercalibrated in the laboratory before installation. At each site, sensors were installed 1.5 m above the ground, in an open area close to the study population (10 to 100 m away, at the same elevation). Sensors were protected by a white plastic shelter, to prevent exposure to rain or direct sunlight. Data were recorded at 15-

Table 1 Elevation (meters above sea level), coordinates, number of trees (n) for phenology monitoring, number of trees (n) for the bud dormancy experiment, mean spring temperature calculated from the February 1 to the May 31 of each year for the 2005–2007 and 2009–2012 periods (T_{mean} , in degree Celsius) and mean date of leaf unfolding for the all populations during the 2005–2007 and 2009–2012 periods (LU_{mean} , in Julian days) for each site in the two different valleys for the species *Fagus sylvatica* and *Q. petraea*

Species	Valley	Site	Elevation (m ASL)	Coordinates	PM (n)	BDE (n)	T_{mean} (°C)	LU_{mean} (JD)
<i>Fagus sylvatica</i>	Gave	Laveyron	131	43°45'N, 00°13'W	10–22	10	11.11	111
	Ossau	Josbaig	148	43°15'N, 00°44'W	10–21		9.68	116
	Ossau	Bager	422	43°07'N, 00°32'W	10–20		10.52	114
	Gave	Lourdes	488	43°05'N, 00°05'W	10–20		9.52	116
	Gave	Chèze	773	42°55'N, 00°02'W	10–28		8.03	129
	Ossau	Eaux-Bonnes	824	42°56'N, 00°22'W	10–20		7.71	121
	Gave	Haugarou	1,190	43°00'N, 00°12'W	10–21		4.29	127
	Ossau	Fabriges	1,260	42°52'N, 00°24'W	10–24		4.41	124
	Ossau	Bious	1,551	42°51'N, 00°27'W	10–27		3.18	136
	Gave	Barèges	1,604	42°53'N, 00°06'E	10–25	10	3.77	134
<i>Quercus petraea</i>	Gave	Laveyron	131	43°45'N, 00°13'W	10–28		11.11	95
	Ossau	Josbaig	259	43°15'N, 00°44'W	10–26		11.27	92
	Gave	Ibos	387	43°07'N, 00°32'W	10–25	10	10.51	95
	Ossau	Bager	422	43°07'N, 00°32'W	18		11.69	97
	Gave	Adé	427	43°08'N, 00°00'W	10–34		10.37	102
	Gave	Pierrefitte	627	42°56'N, 00°03'W	10–22		9.68	111
	Gave	Chèze	803	42°55'N, 00°02'W	10–25		8.70	120
	Ossau	Le Hourcq	841	42°54'N, 00°26'W	10–22		7.03	119
	Gave	Bourdalats	1,082	42°54'N, 00°06'W	10–29		7.19	123
	Ossau	Gabas	1,194	42°53'N, 00°25'W	10–34		6.40	125
	Gave	Gèdre Bas	1,235	42°47'N, 00°01'E	10–28	10	7.08	128
	Gave	Gèdre Haut	1,349	42°47'N, 00°02'E	10–27		5.96	130
	Ossau	Artouste	1,614	42°53'N, 00°24'W	11–15		4.22	141
	Gave	Péguère	1,630	42°52'N, 00°07'E	10–27		4.69	143

PM phenology monitoring, BDE bud dormancy experiment

min intervals from 1 January 2005 to 15 June 2005 and hourly from 15 June 2005 to October 2012. Several weather stations suffered from technical faults over short periods. For most stations, the missing data were inferred by gap filling by linear interpolations from data from the most strongly correlated weather stations ($R^2 > 0.91$). However, in some years, the correlations were too weak for the estimation of missing temperature values at specific stations. We therefore did not calculate the heat and chilling requirements at these stations, for the years concerned. We compared the response of leaf unfolding timing to early spring temperature in situ between the two species studied, by averaging temperatures from February 1 to May 31, corresponding to about 2 months before the first date of leaf unfolding at low elevation and to the last date of leaf unfolding at high elevation, respectively.

Dormancy release in controlled conditions

The bud dormancy experiment was conducted on European beech and sessile oak populations from the Gave valley

transect. For each species, two populations were selected: one at low elevation (<387 m above sea level) and one at high elevation (>1,235 m above sea level, see Table 1). In each population, 10 trees were selected from among those used for phenology monitoring. For the low-elevation populations, in which a high level of phenological diversity for leaf unfolding was observed, we selected five early-flushing and five late-flushing trees. At intervals of about 2 weeks, from mid-October 2010 until mid-April 2011, twigs containing numerous buds were sampled from each selected tree in each population, at height of about 10 m, with a pole pruner (or from higher up, with a shotgun). The twigs were immediately placed in cooling boxes, in which they were transported to the laboratory. They were then placed in a growth chamber under long-day conditions (16 h, $230 \text{ mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), at a warm temperature (25 °C) and a humidity of 70 %. Cuttings were shown to be a good proxy for adult trees, for the assessment of phenology (Vitasse and Basler 2014). For oak, twigs were cut in the laboratory into 5-cm-long pieces, each bearing a single bud (the classical “one-node cutting” method—e.g.,

Pouget 1963; Rageau 1978; Champagnat 1989; Balandier et al. 1993), and we studied five buds per individual. For non-apical buds, the top of the stem segments was covered with wax. No significant difference in timing of leaf unfolding was observed between non-apical and apical buds for these species (Marc Bonhomme, unpublished results). Segments were planted in rockwool and then in an aluminum tray filled with tap water and a piece of charcoal to purify the water. Because short-cuttings die rapidly in beech, we used 20-cm-long cuttings carrying about 10 buds. We studied a mean of 34 buds per individual. Shoot cuttings were placed in glass bottles with tap water and a piece of charcoal. Bud development was monitored at 2- to 3-day intervals until mid-May, and we recorded the time at which stage 9 occurred on the BBCH scale (i.e., buds opening), when reached (stages 10–19 are not observed on cuttings because the buds on cuttings generally dry out rapidly after this stage. By contrast, stage 9 is difficult to observe on mature trees). We then calculated a mean date of leaf unfolding per individual ($n=5$ and $n=34$ for oak and beech, respectively). We also calculated the leaf unfolding rate, corresponding to the number of buds from which leaves were produced by harvesting date over the total number of buds (as a percentage).

Assessment of chilling and heat requirements

Over the last four decades, numerous methods have been generated to assess chilling and heat requirement necessary for dormancy release and budburst, respectively. We selected two classical methods to compute chilling and heat accumulation, commonly used in alternating (Cannell and Smith 1983; Murray et al. 1989; Kramer 1994) and sequential models (Sarvas 1974; Hänninen 1987, 1990; Kramer 1994). For each method, we tested two base temperatures (T_b): 5 and 10 °C, with and without the inclusion of negative temperatures in chilling accumulation. We explored different start dates (t_1) for chilling and forcing units accumulation ranged, respectively, between September 1 and January 1 and between September 1 and March 1. We explored different end dates (t_2) for chilling accumulation between January 1 and the leaf unfolding date whereas the end date for heat accumulation was set by the leaf unfolding date. These different dates' combinations led us to compute chilling (C) and heat (H) accumulations alternatingly, sequentially or in parallel.

Computation 1

$$C = \sum_{t_1}^{t_2} y(T) \quad (1)$$

$$y(T) = \begin{cases} 0, & T > T_b \\ 1, & T \leq T_b \end{cases}$$

where T is the daily mean temperature.

$$H = \sum_{t_1}^{t_2} y(T) \quad (2)$$

$$y(T) = \begin{cases} 0, & T \leq T_b \\ T - T_b, & T > T_b \end{cases}$$

Computation 2

$$C = \sum_{t_1}^{t_2} y(T) \quad (3)$$

$$y(T) = \begin{cases} 0, & T \leq -3.4 \text{ or } T \geq 10.4 \\ \frac{T + 3.4}{T_b + 3.4}, & -3.4 < T \leq T_b \\ \frac{T - 10.4}{T_b - 10.4}, & T_b < T < 10.4 \end{cases}$$

$$H = \sum_{t_1}^{t_2} y(T) \quad (4)$$

$$y(T) = \begin{cases} 0, & T \leq 0 \\ \frac{28.4}{1 + e^{-0.185(T - 18.4)}}, & T > T_b \end{cases}$$

We assessed the relationship between heat and chilling accumulation by fitting several different equations (exponential, power, logarithmic, and linear). We selected the best fit on the basis of the coefficient of determination (R^2) and the coefficient of variation (CV; root mean square error divided by the mean of the values) for each base temperature (5 and 10 °C). All these tests were carried out on data from phenological observations in situ. We then applied the same method of computation with the same start and end dates to calculate chilling and heat accumulation for the growth chamber experiment.

Results

Phenological sensitivity to spring temperature

Significant linear trends were found for the relationship between the timing of leaf unfolding and spring temperatures for both species studied along the elevation gradients (Fig. 1, $P < 0.0001$). However, the slopes of the linear regressions differed considerably between the two species: Oak had a much stronger response to spring temperature (leaf unfolding advanced by 6.48 days °C⁻¹ increase in temperature) than

beech (2.76 days °C⁻¹). These values remained stable over time, from 2005 to 2012, and oak also displayed higher levels of between-year variation than beech (Table S1).

Chilling and heat requirements

Assessment of chilling and heat requirements

For both species and each base temperature (5 and 10 °C), the best fit was that obtained with (a) method of computation 1 (i.e., chilling days and growing degree days (GDD)), (b) chilling requirements calculated from the November 1 to the date of leaf unfolding and heat requirements from the January 1 to the date of leaf unfolding, and (c) a linear model for beech and a power model for oak. Better performances were obtained if negative temperatures were included in the chilling accumulation.

In situ monitoring

Irrespective of the threshold used for chilling and heat accumulation (i.e., 5 °C or 10 °C), a clear trend toward a decrease in heat requirements was observed with increasing accumulation of chilling, for both species (Fig. 2, $P < 0.0001$). However, as the 5 °C threshold outperformed the 10 °C threshold for both species, we subsequently consider only the results obtained with this threshold (Fig. 2).

For oak, a power model fitted the data better than a linear model. Growing degree days tended to reach a plateau beyond 90 chilling days (the value at which the derivative of the power function fell below one). Populations at low elevations (below 500 m above sea level), which displayed low chilling values, had the highest heat requirements (steep increase in growing degree days); conversely, GDD requirements were the lowest for some high-elevation populations (above 1,000 m above sea level) with the highest levels of chilling. By contrast, for beech, the best relationship between heat and chilling requirements was achieved with a linear regression. For sites with low numbers of chilling days (at low elevation), heat requirement was higher for beech than for oak, whereas for sites with large numbers of chilling days (high-elevation populations), oak had the higher heat requirement.

Interestingly, the highest heat requirements by elevation for oak were observed in 2007 (Fig. 2), a year with an unusually warm winter (from the November 1 through the end of February, 3.17 °C warmer than the winters of 1931–2011 in Lourdes, southwest France (43°06'18"N; 00°03'42"W), Météo France) (Fig. S1). For beech, only low-elevation populations displayed a higher heat requirement in this year.

Controlled experiment

The use of 10 °C as the threshold was more appropriate (Fig. 3) for estimating the chilling received in situ before sampling and for the heat requirement accumulating in the conditions of the test (25 °C, 16 h of light). We therefore consider only the results obtained with this threshold later in this section.

We observed the same patterns as in situ, with a plateau for oak and a linear decline for beech and with a higher heat requirement under conditions of low chilling for beech (Fig. 3). We observed differences in heat requirements for leaf unfolding between low- and high-elevation populations for oak, but not for beech. Indeed, for a given number of chilling days, high-elevation populations of oak required a larger number of growing degree days to reach the leaf unfolding stage in controlled conditions than did low-elevation populations. In addition, three phases of dormancy were clearly observed for the high-elevation oak population: entry into endodormancy, reflected by an increase in the number of growing degree days required for leaf unfolding to a maximum at 40 chilling days; endodormancy release, as demonstrated by a decrease in the number of growing degree days for leaf unfolding until a minimum at 90 days of chilling (endodormancy released) for 250 GDD; and, finally, the ecodormancy phase, in which an increase in chilling (up to 130 chilling days) had no significant effect on the number of growing degree days required for leaf unfolding at cooler locations, whereas a decrease was observed at warmer locations (low elevation). For beech, a markedly different pattern was observed: After reaching the endodormancy maximum, the number of growing degree days for leaf unfolding decreased linearly until the end of the experiment for the highest location and until 120 days of chilling for the lowest population, corresponding to 200 GDD. At the end, for both species (except for the high-elevation beech population), we observed a rapid decline due to bud growth in situ before sampling, permitted by temperature (above 90 and 140 chilling days for oak low- and high-elevation populations, respectively, and 120 chilling days for the beech low-elevation population).

Within populations (no difference in chilling between individuals), late-flushing oak required more degree days for leaf unfolding than early-flushing oak after entry into dormancy, whereas no differences were observed for beech (Fig. 4—the last sampling date for oak has been removed because leaf unfolding was still occurring in situ for early- and late-flushing individuals). For oak, the low-elevation population had a higher leaf unfolding rate (76 % on average) than the high-elevation population (37 % on average), throughout the experiment. A similar low rate of leaf unfolding was observed for both beech populations (26 %).

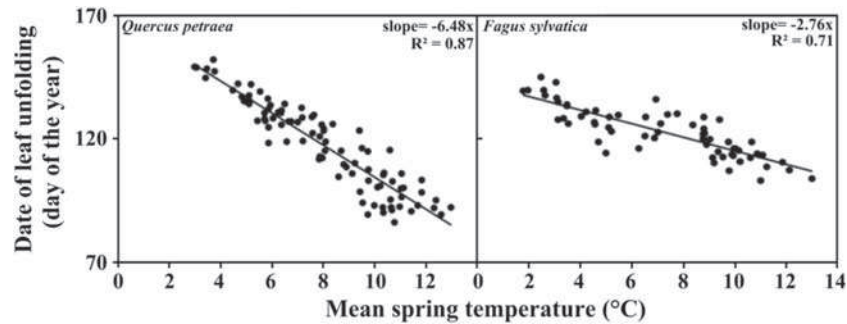


Fig. 1 Mean date of leaf unfolding against mean spring temperature (calculated from February 1 to May 31) for populations of *Q. petraea* and *Fagus sylvatica* monitored across two elevation gradients in the Pyrenees mountains during the 2005–2007 and 2009–2012 periods (R^2 , coefficient of determination— $P < 0.0001$). The studied sites covered 10

populations of *Fagus sylvatica* and 14 populations of *Q. petraea*, at elevations ranging from 131 to 1,630 m above sea level. Air temperature at a height of 1.5 m from the ground was recorded hourly at each site, and leaf unfolding was monitored every 10 days

Discussion

Phenological sensitivity to temperatures differed considerably between the two species studied. Sessile oak showed much greater phenological variation than European beech along the elevation gradients and between years, as previously reported (Vitasse et al. 2009b). This difference probably reflects a

complex interplay between winter and spring temperatures. A substantial change in forcing temperature requirement as a function of chilling duration was observed for both species, but beech displayed (a) a higher chilling requirement for full dormancy release and (b) a higher sensitivity to chilling temperature (i.e., a faster decrease in forcing requirement over the same gradient of chilling duration). Moreover, genetic

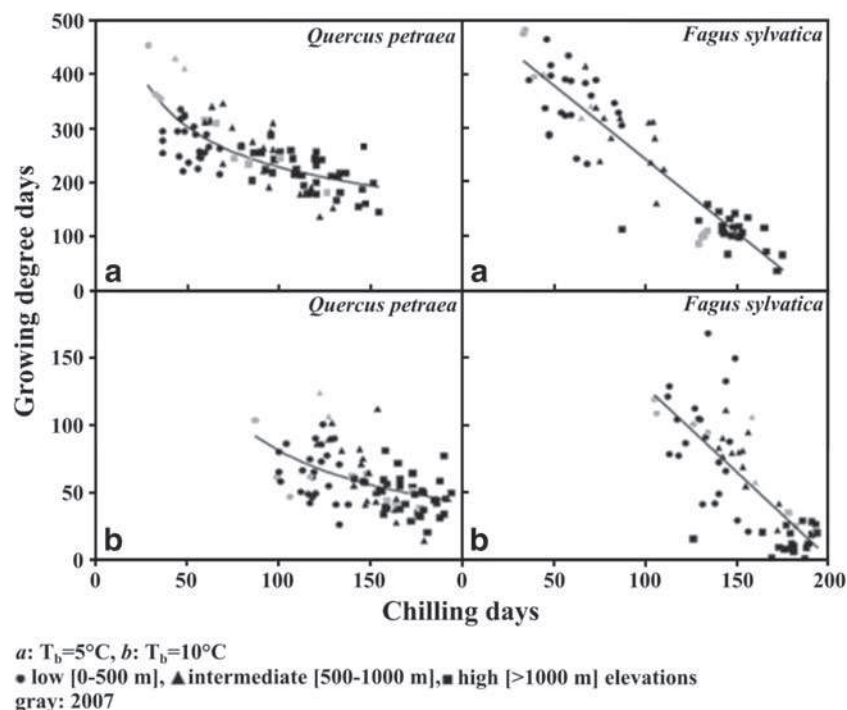
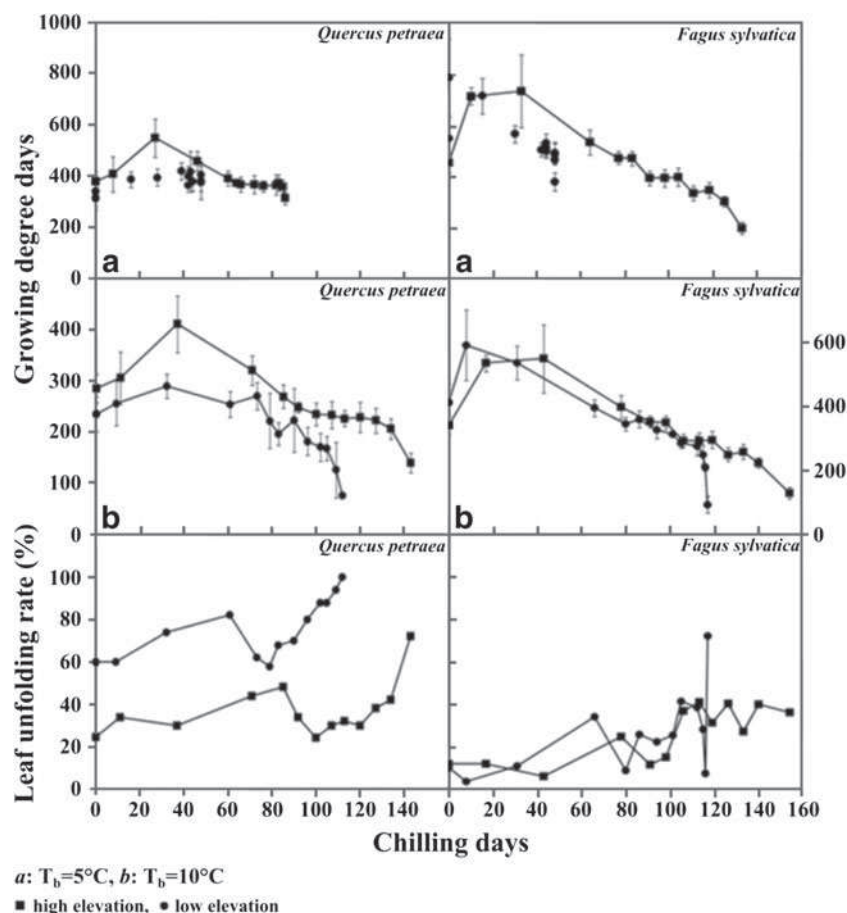


Fig. 2 Relationship between the heat requirement for leaf unfolding, calculated as the sum of growing degree days > 5 or 10°C from January 1 to the date of leaf unfolding, and the cumulative number of chilling days < 5 or 10°C from November 1 to the date of leaf unfolding (y), for populations of *Q. petraea* and *Fagus sylvatica* monitored across two elevation gradients in the Pyrenees mountains, during the 2005–2007 and 2009–2012 periods (R^2 and CV coefficients of determination, $P < 0.0001$). A linear regression model was fitted to the data for *Fagus sylvatica* (5°C : $y = -2.7382x + 514.9$, $R^2 = 0.84$, $\text{CV} = 0.21$; 10°C : $y =$

$-1.2723x + 255.62$, $R^2 = 0.59$, $\text{CV} = 0.48$), and a power model was fitted to the data for *Q. petraea* (5°C : $y = 1,437.7x^{-0.3997}$, $R^2 = 0.98$, $\text{CV} = 0.16$; 10°C : $y = 5679.4x^{-0.9234}$, $R^2 = 0.91$, $\text{CV} = 0.33$). The studied sites covered 10 populations of *Fagus sylvatica* and 14 populations of *Q. petraea*, at elevations ranging from 131 to 1,630 m above sea level. Air temperature at a height of 1.5 m above the ground was recorded hourly at each site, and leaf unfolding was monitored every 10 days. *a* $T_b = 5^\circ\text{C}$, *b* $T_b = 10^\circ\text{C}$; black circle low (0–500 m), black triangle intermediate (500–1,000 m), black square high ($> 1,000$ m) elevations; gray 2007

Fig. 3 Relationship between the heat requirement for leaf unfolding in the growth chamber, calculated as the sum of growing degree days >5 or 10°C from January 1 2011 to the date of leaf unfolding, and the cumulative number of chilling days <5 or 10°C from November 1 2010 to the date of leaf unfolding, for cuttings sampled on 13 different dates from mid-October 2010 until mid-April 2011, from 10 individuals from each population of *Q. petraea* (387 and 1,235 m above sea level) and *Fagus sylvatica* (131 and 1,604 m above sea level). Air temperature was recorded hourly, at a height of 1.5 m above ground level, at each site. *a* $T_b=5^{\circ}\text{C}$, *b* $T_b=10^{\circ}\text{C}$; black square high elevation, black circle low elevation



variation in the timing of leaf unfolding between and within oak populations is probably due to differences in heat requirements rather than differences in chilling requirements, whereas no differences in forcing requirement were found for a given amount of chilling in beech. Finally, in most beech populations, chilling requirements were not fully satisfied in

current conditions, whereas chilling was insufficient only in 2007 for oak populations, due to an unusually warm winter. This raises the possibility that the widely expected advance in the timing of leaf unfolding with increasing temperatures might be offset by a lack of chilling, particularly in the warmest areas of the distribution of the species concerned.

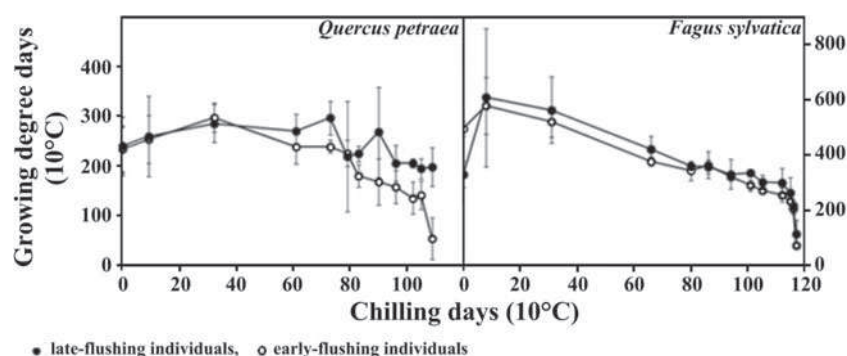


Fig. 4 Relationship between the heat requirement for leaf unfolding in the growth chamber, calculated as the sum of growing degree days $>10^{\circ}\text{C}$ from January 1 2011 to the date of leaf unfolding, and the cumulative number of chilling days $<10^{\circ}\text{C}$ from November 1 2010 to the date of leaf unfolding, for cuttings sampled at 12 and 13 different dates from mid-October 2010 until mid-April 2011 from five early-flushing and five late-flushing individuals from low-elevation

populations of *Q. petraea* (387 m above sea level) and *Fagus sylvatica* (131 m above sea level), respectively (the last sampling date was excluded for oak because leaf unfolding was still occurring in situ for early- and late-flushing individuals). Air temperature was recorded hourly, at a height of 1.5 m above the ground, at each site. Black circle late-flushing individuals, white circle early-flushing individuals

Relationship between heat and chilling requirements

The linear relationship between heat and chilling requirements found in both experimental and natural conditions confirmed the high chilling requirement for dormancy release in beech (Murray et al. 1989; Falusi and Calamassi 1990; Heide 1993; Caffarra and Donnelly 2011; Vitasse and Basler 2013). In this study, we found that sessile oak required a larger number of growing degree days (high heat requirement) for leaf unfolding than beech after long periods of chilling accumulation in natural conditions. However, for oak, this heat requirement reached a minimum after 90 chilling days ($T_b=5\text{ }^{\circ}\text{C}$), suggesting that chilling requirements were fulfilled at this point, whereas it continued to decrease until 175 chilling days in beech. For the latter species, heat requirements may likely reach a plateau beyond a certain threshold that cannot be determined with our current dataset. In conclusion, full chilling requirements were not satisfied in most of the beech populations studied, except, perhaps, for the populations at the highest elevations, which experienced about 150 chilling days over the winter. The lower sensitivity of beech to spring temperatures may reflect the lack of sufficient chilling for full dormancy release in the beech populations in our study area. These patterns obtained in situ took both population genetic differentiations and phenotypic plasticity into account, and a common garden experiment would be required to disentangle these effects.

Our results appear to indicate a higher full chilling requirement for dormancy release in beech (at least 120 vs. 90 chilling days) and, probably, higher heat requirements after dormancy release in oak (250 vs. 200 GDD) ($T_b=10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Indeed, while full chilling requirements did not appear to be satisfied in beech populations at high elevation, the minimal beech chilling requirement at low elevation can be approximated to 120 chilling days, corresponding to a heat requirement of 200 GDD ($T_b=10\text{ }^{\circ}\text{C}$), values at the beginning of the final rapid decline (Fig. 3). For oak, chilling requirements were fulfilled for 90 chilling days, corresponding to the plateau of 250 GDD ($T_b=10\text{ }^{\circ}\text{C}$) at high elevation and to the final decline at low elevation. Chilling days, widely used in phenological studies to compare species, are a simple proxy to describe a very complex physiological process such as dormancy release, and the amount of chilling requirement should therefore be interpreted with caution. Moreover, the relationship between heat and chilling requirements could be altered by differences in photoperiod between sampling campaigns. However, as all populations were collected through the same day at each campaign, the comparison of chilling and heat requirements was robust and accurate in detecting genetic differentiation and species-specific differences.

Vitasse and Basler (2013) suggested that the date of leaf unfolding in beech is probably driven by both chilling and heat, with an interaction between photoperiod and heat

requirement. Laube et al. (2013) confirmed experimentally that this species was sensitive to photoperiod when chilling requirements are not satisfied. In our experiment, during the endodormancy phase, we observed no difference in temperature requirements between low- and high-elevation populations of beech. Cuttings were exposed to a longer photoperiod in the growth chamber than in situ. As long days have been shown to substitute partially for winter chilling in this species (Falusi and Calamassi 1996), this may have buffered the possible genetic differences in chilling requirements between low- and high-elevation populations.

Differences in requirements between and within populations

Our experiment under controlled conditions allowed us to compare heat and chilling requirements both between and within populations of the two tree species. For the same amount of chilling, oak high-elevation populations required more degree days for leaf unfolding than low-elevation populations, even during the endodormancy phase. Similarly, within populations at low elevation, late-flushing individuals required larger numbers of growing degree days for leaf unfolding than early-flushing individuals (after entry into endodormancy). All these populations seemed to have the similar full chilling requirement for dormancy release (90 chilling days, $T_b=10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Thus, genetic differentiation between and within populations may be associated with a difference in heat requirement for oak. This may explain the cogradient variation found in *common gardens* for oak (Vitasse et al. 2009a; Alberto et al. 2011): Populations from high elevations may flush later due to higher heat requirements rather than chilling requirements. Charrier et al. (2011) and Mauget and Germain (1980) also observed a higher heat requirement after the same amount of chilling for late genotypes of walnut trees.

For beech, for the same amount of chilling, no differences in heat requirements for leaf unfolding were observed between low- and high-elevation populations and between early- and late-flushing individuals throughout most of the experiment. However, at the end of the experiment, we observed a rapid decline of growing degree days for the low-elevation population, but not for the high-elevation population. Thus, differences observed in situ and the counter-gradient pattern observed in *common gardens* (vonWuehlisch et al. 1995; Chmura and Rozkowski 2002; Vitasse et al. 2009a; Gomory and Paule 2011) between populations may be due to differences in chilling requirements for dormancy release rather than in heat requirements, which are clearly low for both populations.

However, differences between and within species may also be accounted for by differences in cumulative chilling thresholds. High-elevation populations may have a slightly lower threshold for heat accumulation, or may simply accumulate

growing degree days more efficiently (more sensitive). Furthermore, different populations may accumulate chilling in different ways, with different ranges of effective temperatures. A more detailed experiment, with variations of chilling and heat temperatures for different populations, would be required to improve characterization of the range of temperatures over which both chilling and heat are effective.

Implications for global warming

Many studies have reported an advance in the timing of leaf unfolding in temperate trees with current increases in air temperature (Root et al. 2003; Menzel et al. 2006; Richardson et al. 2006), but such advances may not necessarily occur at the southern limit of the species distribution range. In 2007, the winter in the Pyrénées was unusually warm until late February (Météo France, Lourdes, see Fig. S1) and followed by two typical months (March and April 2.08 °C warmer than 1931–2011 but only 0.38 °C warmer than our other years of study). There may therefore have been insufficient chilling in that year. Delpierre et al. (2009) reported a general trend toward earlier leaf unfolding in the forest trees of Europe in 2007. By contrast, we observed no change, or even a delay (7 days) in the timing of leaf unfolding for oak, at high and low elevations, respectively (versus the average for the whole study period), probably due to a lack of chilling. Oak populations thus seem to have required much more heat temperatures to achieve leaf unfolding in this year than in the other years, even if the date of leaf unfolding was not itself delayed (Fig. 2). By contrast, we did not observe this pattern for beech at low elevations in 2007 because full chilling requirements were not satisfied in most of the beech populations along the gradient in any of the years studied. Climatic events such as that in 2007 are likely to become increasingly frequent in the next few years. These results strongly suggest that populations growing in the warmest areas of the current species distribution will rapidly be faced with conditions of insufficient chilling for full dormancy release.

Looking into the black box

The role of chilling in the timing of leaf unfolding is well documented in temperate tree species, particularly for fruit trees (Ruiz et al. 2007; Luedeling 2012; Darbyshire et al. 2013a), but a large gap remains in our knowledge, concerning the range and optimum for chilling temperatures and the complex interplay between chilling and heat requirement (Shirazi 2003). No data are currently available for determining the optimum temperature for dormancy release in most forest tree species, including *Q. petraea* and *Fagus sylvatica*. Effective chilling temperatures are assumed to be below 10 °C, with an optimum range of 2–7 °C for most species (Coville 1920; Doorenbos 1953; Nienstaedt 1966; Cannell 1989; Battey

2000). The heat vs. chilling requirement relationship for in situ populations estimated with $T_b=10$ °C was unrealistic for beech, with several GDD values equal to 0 for high chilling days. Consistent with the R^2 values, we thus discarded this relationship and selected the one with $T_b=5$ °C. However, we did not find any pattern with $T_b=5$ °C for the experiment in climatic chamber, with unrealistic GDD and chilling days values at low elevation. This discrepancy between optimal temperature thresholds found in situ and for the climatic chamber experiments might be due to the interaction between photoperiod and chilling requirements (Vitasse and Basler 2013). Furthermore, chilling temperatures clearly overlap active growth temperatures, making it difficult to include this interplay in phenological models. Moreover, our experiment demonstrates that active growth temperatures could act in conditions in which dormancy was not totally released (i.e., leaf unfolding observed for buds sampled from October to January). This phenomenon therefore undoubtedly occurred in situ. Chilling and heat temperatures cannot be disentangled in situ, and chilling requirements are probably satisfied in most of the distribution area of temperate trees, masking their role and making them difficult to study. This study thus highlights the difficulties involved in unraveling the complex interplay between chilling and heat requirements for leaf unfolding and the relationships between genetics and environment. These results will be of great importance for the future modeling of budburst dates. Indeed, chilling requirements will increasingly need to be taken into account in models, together with the local adaptation of populations. This will require further experiments, with controlled chilling.

Acknowledgments We thank Marie-Laure Desprez-Loustau and Isabelle Chuine for their valuable comments on the study. We also thank Xavier Capdevielle and Yann Guengant for field assistance and Paul Fromage for assistance with computing and analysis. The research leading to these results was conducted as part of the Aquitaine “Phénologie et Stratégies Temporelles” project.

References

- Acevedo-Rodriguez R, Vargas-Hernandez JJ, Lopez-Upton J, Mendoza JV (2006) Effect of geographic origin and nutrition on shoot phenology of Mexican Douglas-Fir (*Pseudotsuga* sp.) seedlings. *Agrociencia* 40:125–137
- Alberto F, Bouffier L, Louvet JM, Lamy JB, Delzon S, Kremer A (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 24:1442–1454
- Balandier P, Gendraud M, Rageau R, Bonhomme M, Richard JP, Parisot E (1993) Bud break delay on single node cuttings and bud capacity for nucleotide accumulation as parameters for endo- and paradormancy in peach trees in a tropical climate. *Sci Hortic-Amst* 55:249–261
- Baliuckas V, Lagerstrom T, Norell L, Ersson G (2005) Genetic variation among and within populations in Swedish species of *Sorbus aucuparia* L. and *Prunus padus* L. assessed in a nursery trial. *Silvae Genet* 54:1–8

- Basler D, Körner C (2012) Photoperiod sensitivity of bud burst in 14 temperate forest tree species. *Agr Forest Meteorol* 165:73–81
- Batley NH (2000) Aspects of seasonality. *J Exp Bot* 51:1769–1780
- Bennett JP (1949) Temperature and bud rest period. *Calif Agric* 4(9):12–14
- Billington HL, Pelham J (1991) Genetic-variation in the date of budburst in Scottish birch populations—implications for climate change. *Funct Ecol* 5:403–409
- Bolte A, Czajkowski T, Kompa T (2007) The north-eastern distribution range of European beech—a review. *Forestry* 80:413–429
- Caffarra A, Donnelly A (2011) The ecological significance of phenology in four different tree species: effects of light and temperature on bud burst. *Int J Biometeorol* 55:711–721
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J (2012) Temperature effect on dormancy release in apricot when applied in different dormant stages. *Acta Horticult* 966:155–161
- Cannell MGR (1989) Chilling, thermal time and the data of flowering of trees. In: Wright CJ (ed) *Manipulation of fruiting*. Butterworths, London, pp 99–113
- Cannell MGR (1997) Spring phenology of trees and frost avoidance. *Weather* 52:46–52
- Cannell MGR, Smith RI (1983) Thermal time, chill days and predictions of budburst in *Picea sitchensis*. *J Appl Ecol* 20:951–963
- Cannell MGR, Smith RI (1986) Climatic warming, spring budburst and frost damage on trees. *J Appl Ecol* 23:177–191
- Champagnat P (1989) Rest and activity in vegetative buds of trees. *Ann Sci For* 46:9s–26s
- Charrier G, Bonhomme M, Lacombe A, Améglio T (2011) Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control? *Int J Biometeorol* 55:763–774
- Chmielewski FM, Rotzer T (2001) Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agr Forest Meteorol* 108:101–112
- Chmura DJ, Rozkowski R (2002) Variability of beech provenances in spring and autumn phenology. *Silvae Genet* 51:123–127
- Chuine I (2010) Why does phenology drive species distribution? *Phil Trans R Soc B* 365:3149–3160
- Chuine I, Beaubien EG (2001) Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecol Lett* 4:500–510
- Chuine I, Morin X, Bugmann H (2010) Warming, photoperiods and tree phenology. *Science* 329:277–278
- Cooke JEK, Eriksson ME, Junttila O (2012) The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ* 35:1707–1728
- Coville FC (1920) The influence of cold in stimulating the growth of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 6:434–435
- Čufar K, De Luis M, Saz MA, Črepinšek Z, Kajfež-Bogataj L (2012) Temporal shifts in leaf phenology of beech (*Fagus sylvatica*) depend on elevation. *Trees* 26:1091–1100
- Darbyshire R, Webb L, Goodwin I, Barlow EWR (2013a) Evaluation of recent trends in Australian pome fruit spring phenology. *Int J Biometeorol* 57:409–421
- Darbyshire R, Webb L, Goodwin I, Barlow EWR (2013b) Impact of future warming on winter chilling in Australia. *Int J Biometeorol* 57:355–366
- Delpierre N, Soudani K, François C et al (2009) Exceptional carbon uptake in European forests during the warm spring of 2007: a data–model analysis. *Glob Chang Biol* 15:1455–1474
- Derory J, Léger P, Garcia V et al (2006) Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytol* 170:723–738
- Doorenbos J (1953) Review of the literature on dormancy in buds of woody plants. Medelingen Landbouwhogeschool Wageningen/Nederland 53:1–24
- Elloumi O, Ghrab M, Kessentini H, Ben Mimoun M (2013) Chilling accumulation effects on performance of pistachio trees cv. Mateur in dry and warm area climate. *Sci Hortic* 159:80–87
- Falusi M, Calamassi R (1990) Bud dormancy in beech (*Fagus sylvatica* L.). Effect of chilling and photoperiod on dormancy release of beech seedlings. *Tree Physiol* 6:429–438
- Falusi M, Calamassi R (1996) Geographic variation and bud dormancy in beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.). *Ann Sci For* 53:967–979
- Faust M, Erez A, Rowland LJ, Wang SY, Norman HA (1997) Bud dormancy in perennial fruit trees: physiological basis for dormancy induction, maintenance, and release. *Hortscience* 32:623–629
- Fu YH, Campioli M, Deckmyn G, Janssens IA (2012a) The impact of winter and spring temperatures on temperate tree budburst dates: results from an experimental climate manipulation. *PLoS One* 7:e47324
- Fu YH, Campioli M, Van Oijen M, Deckmyn G, Janssens IA (2012b) Bayesian comparison of six different temperature-based budburst models for four temperate tree species. *Ecol Model* 230:92–100
- Gomory D, Paule L (2011) Trade-off between height growth and spring flushing in common beech (*Fagus sylvatica* L.). *Ann For Sci* 68:975–984
- Hänninen H (1987) Effects of temperature on dormancy release in woody plants: implications of prevailing models. *Silva Fenn* 21:279–299
- Hänninen H (1990) Modelling bud dormancy release in trees from cool and temperate regions. *Acta For Fenn* 213:1–47
- Harrington CA, Gould PJ, St. Clair JB (2010) Modeling the effects of winter environment on dormancy release of Douglas fir. *For Ecol Manag* 259:798–808
- Hasenauer H, Nemani RR, Schadauer K, Running SW (1999) Forest growth response to changing climate between 1961 and 1990 in Austria. *For Ecol Manag* 122:209–219
- Heide OM (1993) Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days. *Physiol Plant* 89:187–191
- Honjo H (2007) Effects of global warming on dormancy and flowering behavior of temperate fruit crops in Japan. *Hortic Res* 6:1–5
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci* 8:534–540
- Howe GT, Saruul P, Davis J, Chen THH (2000) Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F2 family of hybrid poplars. *Theor Appl Genet* 101:632–642
- Karlsson PS, Bylund H, Neuvonen S, Heino S, Tjus M (2003) Climatic response of budburst in the mountain birch at two areas in northern Fennoscandia and possible responses to global change. *Ecography* 26:617–625
- Kramer K (1994) Selecting a model to predict the onset of growth of *Fagus sylvatica*. *J Appl Ecol* 31:172–181
- Kramer K (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell Environ* 18:93–104
- Lang GA (1987) Dormancy—a new universal terminology. *Hortscience* 22:817–820
- Laube J, Sparks TH, Estrella N, Höflers J, Ankerst DP, Menzel A (2013) Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Glob Chang Biol*. doi:10.1111/gcb.12360
- Legave JM, Blanke M, Christen D, Giovannini D, Mathieu V, Oger R (2013) Comprehensive overview of the spatial and temporal variability of apple bud dormancy release and blooming phenology in Western Europe. *Int J Biometeorol* 57:317–331
- Luedeling E (2012) Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: a review. *Sci Hortic* 144:218–229
- Luedeling E, Gassner A (2012) Partial least squares regression for analyzing walnut phenology in California. *Agric For Meteorol* 158:43–52
- Luedeling E, Guo L, Dai J, Leslie C, Blanke MM (2013) Differential responses of trees to temperature variation during the chilling and forcing phases. *Agric For Meteorol* 181:33–42
- Mauget JC, Germain E (1980) Dormance et précocité de débourrement des bourgeons chez quelques cultivars de Noyer (*Juglans regia* L.). *CR Acad Sci Paris Ser D* 290:135–138

- Meier U (2001) Growth stages of mono- and dicotyledonous plants, BBCH monograph, 2nd edn. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Brunswick
- Menzel A, Sparks TH, Estrella N et al (2006) European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Glob Chang Biol* 12:1969–1976
- Morin X, Lechowicz MJ, Augspurger C, O'Keefe J, Viner D, Chuine I (2009) Leaf phenology in 22 North American tree species during the 21st century. *Glob Chang Biol* 15:961–975
- Morin X, Roy J, Sonié L, Chuine I (2010) Changes in leaf phenology of three European oak species in response to experimental climate change. *New Phytol* 186:900–910
- Murray MB, Cannell MGR, Smith RI (1989) Date of budburst of fifteen tree species in Britain following climatic warming. *J Appl Ecol* 26: 693–700
- Myking T, Heide OM (1995) Dormancy release and chilling requirement of buds of latitudinal ecotypes of *Betula pendula* and *B. pubescens*. *Tree Physiol* 15:697–704
- Myneni RB, Keeling CD, Tucker CJ, Asrar G, Nemani RR (1997) Increased plant growth in the northern high latitudes from 1981 to 1991. *Nature* 386:698–702
- Nienstaedt H (1966) Dormancy and dormancy release in white spruce. *For Sci* 12:374–384
- Nooden EA, Weber DP (1978) Environmental and hormonal control of dormancy in terminal buds of plants. In: Clutter M (ed) Dormancy and developmental arrest. Academic, New York, pp 221–268
- Penuelas J, Filella I, Comas P (2002) Changed plant and animal life cycles from 1952 to 2000 in the Mediterranean region. *Glob Chang Biol* 8:531–544
- Perry TO, Wu WC (1960) Genetic variation in the winter chilling requirement for date of dormancy break for *Acer rubrum*. *Ecology* 41: 790–794
- Phillimore AB, Proios K, O'Mahony N, Bernard R, Lord AM, Atkinson S, Smithers RJ (2013) Inferring local processes from macro-scale phenological pattern: a comparison of two methods. *J Ecol* 101:774–783
- Polgar CA, Primack RB (2011) Leaf-out phenology of temperate woody plants: from trees to ecosystems. *New Phytol* 191:926–941
- Pouget R (1963) Recherches physiologiques sur le repos végétatif de la vigne (*Vitis vinifera* L.): la dormance des bourgeons et le mécanisme de sa disparition. *Ann Amélior Plantes* 13:1–247
- Rageau (1978) Croissance et débourrement des bourgeons végétatifs de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) au cours d'un test classique de dormance. *CR Acad Sci Paris Ser D* 287:1119–1122
- Richardson AD, Bailey AS, Denny EG, Martin CW, O'Keefe J (2006) Phenology of a northern hardwood forest canopy. *Glob Chang Biol* 12:1174–1188
- Richardson AD, Keenan TF, Migliavacca M, Ryu Y, Sonnentag O, Toomey M (2013) Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system. *Agr Forest Meteorol* 169:156–173
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421:57–60
- Rousi M, Pusenius J (2005) Variations in phenology and growth of European white birch (*Betula pendula*) clones. *Tree Physiol* 25:201–210
- Ruiz D, Campoy JA, Egea J (2007) Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ Exp Bot* 61:254–263
- Samish RM (1954) Dormancy in woody plants. *Annu Rev Plant Physiol* 5:183–204
- Sanz-Perez V, Castro-Diez P, Valladares F (2009) Differential and interactive effects of temperature and photoperiod on budburst and carbon reserves in two co-occurring Mediterranean oaks. *Plant Biol* 11:142–151
- Sarvas R (1972) Investigations on annual cycle of development of forest trees. Active period. *Commun Inst For Fenn* 76:1–110
- Sarvas R (1974) Investigations on the annual cycle of development of forest trees. II. Autumn dormancy and winter dormancy. *Commun Inst For Fenn* 84:1–101
- Schieber B, Janik R, Snopkova Z (2013) Phenology of common beech (*Fagus sylvatica* L.) along the altitudinal gradient in Slovak Republic (Inner Western Carpathians). *J For Sci* 59:176–184
- Sherman WB, Soule J, Andrews CP (1977) Distribution of Florida peaches and nectarines in the tropics and subtropics. *Fruit Var J* 31:75–78
- Shirazi AM (2003) Standardizing methods for evaluating the chilling requirements to break dormancy in seeds and buds (including geophytes): introduction to the workshop. *Spec Insert HortScience* 38(3)
- Vitasse Y, Basler D (2013) What role for photoperiod in the bud burst phenology of European beech. *Eur J For Res* 132:1–8
- Vitasse Y, Basler D (2014) Is the use of cuttings a good proxy to explore phenological responses of temperate forests in warming and photoperiod experiments? *Tree Physiol* (in press)
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A (2009a) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can J For Res* 39:1259–1269
- Vitasse Y, Delzon S, Dufrêne E, Pontailier JY, Louvet JM, Kremer A, Michalet R (2009b) Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: do within-species populations exhibit similar responses? *Agr Forest Meteorol* 149:735–744
- Vitasse Y, Bresson CC, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2010) Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Funct Ecol* 24:1211–1218
- Vitasse Y, François C, Delpierre N, Dufrêne E, Kremer A, Chuine I, Delzon S (2011) Assessing the effects of climate change on the phenology of European temperate trees. *Agr Forest Meteorol* 151: 969–980
- Vitasse Y, Hoch G, Randin CF, Lenz A, Kollas C, Scheepens JF, Körner C (2013) Elevational adaptation and plasticity in seedling phenology of temperate deciduous tree species. *Oecologia* 171:663–678
- vonWuehlisch G, Krusche D, Muhs HJ (1995) Variation in temperature sum requirement for flushing of beech provenances. *Silvae Genet* 44:343–346
- Wareing PF (1953) Growth studies in woody species. V. Photoperiodism in dormant buds of *Fagus sylvatica* L. *Physiol Planta* 6:692–706
- White MA, Running SW, Thornton PE (1999) The impact of growing-season length variability on carbon assimilation and evapotranspiration over 88 years in the eastern US deciduous forest. *Int J Biometeorol* 42:139–145
- Zhou L, Tucker CJ, Kaufmann RK, Slayback D, Shabanov NV, Myneni RB (2001) Variations in northern vegetation activity inferred from satellite data of vegetation index during 1981 to 1999. *J Geophys Res* 106:20069–20083

Supporting information

Table S1 Slopes of the linear regressions representing mean date of leaf unfolding against mean spring temperature by year (calculated from February 1 to May 31) for populations of *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica* monitored across two elevation gradients in the Pyrenees mountains, from 2005 to 2007 and 2009 to 2012 (R^2 , coefficient of determination)

year	<i>Quercus petraea</i>		<i>Fagus sylvatica</i>	
	slope	R^2	slope	R^2
2005	-7.72x	0.93	-2.14x	0.77
2006	-6.92x	0.89	-1.56x	0.50
2007	-5.52x	0.91	-1.80x	0.59
2009	-8.01x	0.89	-3.50x	0.81
2010	-6.74x	0.95	-4.34x	0.92
2011	-5.44x	0.89	-2.90x	0.72
2012	-8.04x	0.93	-2.39x	0.82
All years	-6.48x	0.87	-2.76x	0.71

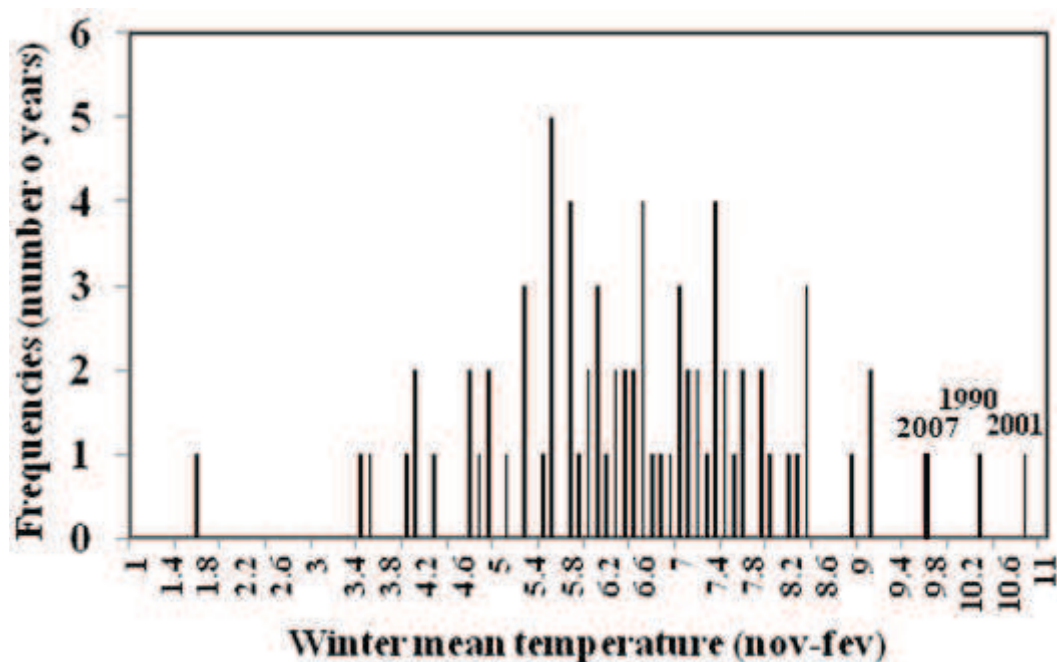


Fig. S1 Representation of the winter mean temperatures (calculated from the November 1st to the end of February) from 1931 to 2011 in Lourdes (43°06'18''N ; 00°03'42''O)

CHAPITRE III

Including dormancy break into budburst models to better forecast tree phenology

Cécile F. Dantec, Sylvain Delzon, Marie-Laure Desprez-Loustau, Marc Bonhomme and Isabelle Chuine

En préparation

Abstract

Many studies reported an advance in the timing of temperate tree budburst with the current increase in temperature, and this trend is predicted to continue in the near future. Warmer temperatures in early spring affect flushing by accelerating the bud growth. However, warmer temperatures during winter may lead to insufficient chilling for the full release of the previous endodormancy phase. Warmer temperatures may therefore lead to a nonlinear advance in tree budburst phenology in the future contrary to what was predicted by recent studies. Two classes of process-based models predicting the date of budburst have been developed: models considering only the action of warm (forcing) temperatures for the bud growth (single-phase models), and models considering also the action of chilling temperatures involved in the break of endodormancy during winter (two-phase models). These models are classically parameterized with budburst dates only, with no information on the dormancy break date because this information is scarce. Here we tested how integrating dormancy break date into phenological models could affect the current simulations and future predictions over the 21st century in an oak species. Our findings highlighted that, for the current period, (i) both single-phase and two-phase sequential models were able to accurately estimate budburst dates in oak populations for the current period, (ii) the integration of the dormancy break date did not systematically improve predictions of budburst. However, for the next decades, long term simulations differed according to the model, especially at low elevation. Although our results predicted a global advance in the timing of budburst both at high and low elevations (-3.6 and -1.8 days per decade, respectively), budburst was predicted to be delayed from the 2050 by the two-phase models at low elevation. All together, these results suggest that chilling temperatures are not likely a limiting factor for budburst in oak under current climate conditions, but will become increasingly critical in the future. Finally, they claim for the urgent need of knowledge on the physiological processes underlying the dormancy phase.

Key words: phenological models, budburst, dormancy break, elevation gradient, climate change, *Quercus petraea*

Introduction

The timing of spring life-history events is crucial to the fitness of deciduous trees in regions with seasonality (Rathcke and Lacey 1985; Fenner 1998; Bennie et al. 2010). In particular, the timing of budburst determines the growing season length and is thus a major determinant of growth (Dickson 1989; Borchert 1999) and survival (Morin et al. 2008), ultimately driving the geographic distribution of species. A renewed interest in phenological studies emerged few decades ago, with the recognition of phenological data as a valuable tool for addressing the question of ecosystems responses to climate change (Menzel et al. 2006). In most temperate trees, the timing of budburst is mainly regulated by temperature (Chuine et al. 1999; Polgar and Primack 2011; Laube et al. 2013). Many studies reported an advance in the timing of tree budburst with the current increase in air temperature (Root et al. 2003; Menzel et al. 2006; Richardson et al. 2006; Polgar and Primack 2011), more or less important according to the species (Chmielewski and Rotzer 2001; Menzel et al. 2001; Penuelas et al. 2002; Karlsson et al. 2003; Vitasse et al. 2011).

To protect leaves primordia against frost damage, buds fall in dormancy during winter. The first phase of buds rest, endodormancy (dormancy *sensu stricto*, controlled by endogenous factors), is generally released by chilling temperatures (Heide 1993a; Horvath et al. 2003; Campoy et al. 2012). This phase is followed by a quiescence phase (i.e. ecodormancy) controlled by environmental factors and sensitive to warm i.e. forcing temperatures (Kramer 1994b) (dormancy mechanisms reviewed in Lang 1987). Warmer temperatures in early spring affect flushing by shortening the quiescence phase. By contrast, in temperate regions, warmer temperatures during winter may lead to insufficient

chilling for the full release of endodormancy and therefore delay or prevent dormancy release (Wareing 1953; Sarvas 1972; Cannell and Smith 1986; Murray et al. 1989). Thus, warmer temperatures may therefore lead to a nonlinear advance in tree leaf unfolding phenology in the future (Chuine et al. 2010; Fu et al. 2012a; Laube et al. 2013), especially for species with high chilling requirements (Murray et al. 1989; Polgar and Primack 2011) or at the southern limit of their distribution range (Dantec et al. 2014). Delayed leaf unfolding due to insufficient chilling temperatures has recently been demonstrated in fruit trees (Honjo 2007; Elloumi et al. 2013; Luedeling et al. 2013) and observed in meadow and steppe vegetation (Yu et al. 2010). However, a large gap remains in our knowledge concerning the range and optimum for chilling temperatures and the complex interplay between chilling and heat requirement implied in the timing of leaf unfolding of forest trees (Shirazi 2003; Cooke et al. 2012). To date, no studies accurately determined the optimum temperature for dormancy release in forest tree species.

Models predicting the timing of budburst of trees are now widely used to predict the consequences of a global warming on tree phenology (Hänninen 1991; Hänninen et al. 1993; Kramer 1994a; Hänninen 1995; Kramer 1995). To date, most simulations have forecasted an advance in the timing of leaf unfolding for temperate tree species in the near future (Morin et al. 2009; Vitasse et al. 2011). Two classes of process-based models predicting the date of budburst have been developed for the simulation of spring phenological phases: models considering only the action of forcing temperatures (single-phase models) (Cannell and Smith 1983; Hunter and Lechowicz 1992), and models considering also the action of chilling temperatures involved in the break of endodormancy during winter (two-phase models)

(Landsberg 1974; Sarvas 1974; Murray et al. 1989; Hänninen 1990b; Kramer 1994b). For single-phase models, it is implicitly assumed that buds have been sufficiently chilled, i.e. bud dormancy was fully released before the starting date of forcing accumulation. Budburst thus occurs when a certain amount of forcing has been reached, from a certain date. Two-phase models assume that the date from which forcing can accumulate is posterior or equal to the date of dormancy release itself determined by the day when a critical amount of chilling is reached (Cannell and Smith 1983; Chuine et al. 2000; Hänninen and Kramer 2007). Models described in the literature vary mostly in the response functions to chilling or forcing temperature (reviewed in Chuine et al. 2000). Interestingly, several studies demonstrated that the simpler single-phase models do perform as well as the two-phase models for fitting currently observed phenology (Hunter and Lechowicz 1992 for northern hardwood trees; Linkosalo et al. 2006 for common boreal tree species) and in some cases outperformed them (Linkosalo et al. 2006; Linkosalo et al. 2008 for birch, birch cherry and rowan in central Finland; Fu et al. 2012b for four tree species in Belgium). This suggests that, under current conditions, the amount of chilling may be always sufficient to fully release bud dormancy before active forcing temperature, so that dormancy release date has no impact on bud break date in most situations (Vitasse et al. 2011). However, some recent studies pointed out a better performance of the two-phase models, especially for late-flushing species (Morin et al. 2009; Thompson and Clark 2008; Vitasse et al. 2011). Chilling requirements will increasingly need to be taken into account in tree budburst models in the next decades with rising winter temperatures and could alter the performance of single-phase models (Linkosalo et al. 2008; Thompson and Clark 2008).

This could be especially true for populations located at the current rear-edge of species' distribution (Vitasse et al. 2011). Thus, accurately predicting the date of dormancy release has become one of the major issue to increase the accuracy of projections of budburst date in the next century (Heide 1993b; Arora et al. 2003; Granhus et al. 2009).

In order to provide more accurate budburst scenarios, we tested how integrating the dormancy break date into phenological models could affect predictions. Sessile oak, for which temperature was shown as the major driver of budburst (Laube et al. 2013), was used as a model species. Populations growing at low, medium and high elevations, thus experiencing contrasted climate (especially winter) conditions, were used. We first performed a dormancy monitoring experiment in growth chamber to estimate dormancy release dates and fit phenological models predicting dormancy break and budburst dates. We then simulated dormancy break and budburst dates over the 21st century at low and high elevations using a climate change scenario. The objectives of this study were (1) to determine dormancy break date of sessile oak populations, (2) to assess whether the integration of information on the dormancy break date in budburst date models improve their predictions under current conditions, (3) to demonstrate the importance of the range of effective chilling temperatures and the chilling accumulation function in budburst modelling and (4) to compare the dormancy break and budburst dates forecasted by models adjusted with and without information on dormancy release in contrasted climate conditions along the 21st century (low vs. high elevations).

Methodology

Study sites

Observations and experiments took place in three naturally established sessile oak (*Quercus petraea* L.) populations, at low (387 m asl) and high (1235 m asl) elevations in the Pyrenees in southern France and at intermediate elevation (682 m asl) in the Massif Central in the center of France (see Table 1). In the Pyrenees, sessile oaks are at the southern limit of their distribution range. Pyrenees are characterized by a temperate oceanic climate whereas Massif Central is characterized by a temperate continental climate.

Meteorological data

Air temperature was recorded with data loggers (HOBO Pro RH/Temp, Onset Computer Corporation, Bourne, MA) protected by a white plastic shelter to prevent exposure to rain or direct sunlight. At each Pyrenean site, sensors were installed at 1.5 m above the ground in an open area within the studied population. Data were recorded hourly, from 1 January 2010 to 31 December 2011. In the Massif Central, the sensor was installed on a building roof (3.5 m above the ground) at about 200 m from the population studied. Data were recorded every two hours from 1 January 2010 to 31 December 2011. At each site, we calculated the daily mean temperature.

Budburst monitoring *in situ*

The timing of budburst was monitored *in situ* in the three sessile oak populations in 2011 (see Table 1). Bud development was monitored at 10-day intervals in each population, from March to June, on 25, 5 and 28 individuals at low, intermediate and high elevation respectively. Observations were made with binoculars (magnifying power: x10), about 15 m away from trees. The date of budburst

was defined for each tree as the day when the first leaves emerged in 50% of the buds (Vitasse et al. 2009a). The date was estimated, for each selected tree, by linear regression with time between two measurement dates. Finally, for each population, the date of budburst (BB) was calculated as the mean of the estimated dates for the sampled individuals.

Dormancy monitoring in controlled conditions and estimation of dormancy break date

Dormancy release monitoring followed the classical one-node cutting test (Rageau 1978; Champagnat 1989; Balandier et al. 1993). The monitoring was conducted on the three sessile oak populations. Five and ten trees that were monitored for budburst *in situ* were also monitored for bud break in the Massif Central and Pyrenees populations respectively. The dormancy release monitoring was conducted separately in the laboratories of INRA Clermont-Ferrand for the Massif Central population, and INRA Bordeaux-Pierroton for the Pyrenees populations. At intervals of about two weeks, from mid-October 2010 until mid-April 2011 (12, 13 and 9 campaigns, in the Pyrenees at low and high elevations and in the Massif Central, respectively), twigs with numerous buds were sampled from each selected tree in each population, at about 10 m height, with a pole pruner (or from higher up, with a shotgun). The twigs were immediately placed in cooling boxes, in which they were transported to the laboratory. In the laboratory, twigs were cut into 5 cm-long pieces, each bearing a single bud. Five and seven buds were monitored per individual in Bordeaux and Clermont-Ferrand, respectively. Cuttings were shown to be a good proxy for adult trees, for the assessment of phenology (Vitasse and Basler 2014). For non-apical buds, the top of the stem segments

Table 1 Description of the sessile oak populations.

Site	Elev (m asl)	Coordinates	Pheno_tree	Dorm_tree
Pyrenees	387	43°07'N, 00°32'W	25	10
Massif Central	682	45°42'N, 02°58'E	5	5
Pyrenees	1235	42°47'N, 00°01'E	28	10

We show regional site (site), elevation (elev, in m asl), geographical coordinates (coordinates), number of trees monitored for phenology *in situ* in 2011 (pheno_tree) and number of trees monitored for the dormancy monitoring in 2010-2011 (dorm_tree).

were covered with wax. No significant difference in timing of budburst was observed between non-apical and apical buds (Bonhomme M, unpublished results). Segments were planted in rockwool and then in an aluminum tray filled with tap water and a piece of charcoal to purify the water. They were then placed in a growth chamber under long-day conditions (16h, 100 and 230 $\mu\text{mol}_{\text{photon}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in Clermont-Ferrand and Bordeaux, respectively), at a warm temperature (25°C) and an air humidity of 70%. Bud development was monitored at two- to three-day intervals until mid-May, and the date at which first leaves started to emerge from buds was recorded. We thus calculated a date of budburst per individual and then a mean date of budburst per sampling date (BB). We also calculated the mean time to budburst (MTB, in days) in growth chamber per individual and then per sampling campaign. The higher the MTB, the deeper the dormancy.

MTB was plotted according to the sampling date, for the three sessile oak populations (Fig. 1). The dynamics of the MTB can be related to the different phases of endodormancy: 1) endodormancy induction is characterized by an increase in MTB up to a maximum, 2) endodormancy release is characterized by a decrease in MTB and finally 3) the ecodormancy phase is characterized by a stable MTB (plateau) even with chilling still accumulating. The date of dormancy break (DB) was defined as the date when dormancy was released and buds entered into quiescence (=ecodormancy). The quiescence phase may not be

easy to distinguish when temperatures are warm right after dormancy release. Indeed, forcing temperatures were thenceforth accumulated by buds *in situ* so MTB in growth chamber did not show a typical plateau and continued to decrease with successive samplings. The decision criterion was therefore the first break in the decreasing slope of dormancy release.

Process-based phenological models

We tested 36 different process-based phenological models for budburst dates and four models for dormancy break dates. Budburst was modelled using either 4 different one-phase models or 32 different two-phase models (Chuine et al. 2013).

The single-phase model assumes that dormancy break always occurs before temperature become active on bud growth (Chuine et al. 2013), and predict that bud break occurs (t_b) when the state of development ($S_{f,t}$) sum of the daily rates of development ($R_{f,t}$) reaches the critical value F^* :

$$S_{f,t_f} = \sum_{t_0}^{t_f} R_{f,t} = F^* \quad (\text{Eq. 1})$$

The two-phase models consider both the endodormancy and the ecodormancy phase, and were based on the Parallel model (Landsberg 1974) and the Sequential model (Richardson et al. 1974). In the Sequential model, the phase of bud growth follows dormancy break and chilling temperature

has no longer effect during this phase, while the Parallel model assumes that the ecodormancy phase can start before the end of the endodormancy phase.

The general description of the Sequential model is:

$$S_{f,t_f} = \sum_{t_1}^{t_f} R_{f,t} = F^* \quad (\text{Eq. 2})$$

$$t_l \text{ is such that } S_{c,t_1} = \sum_{t_0}^{t_1} R_{c,t} = C^* \quad (\text{Eq. 3})$$

C^* and F^* represent the chilling and the forcing requirements to achieve dormancy break and budburst respectively. S_f , S_c , R_f and R_c are the states (S) and the rates (R) of development of the bud during the ecodormancy (f standing for forcing) phase and the endodormancy phase (c standing for chilling) respectively. The Parallel model has the same structure except that F^* is no more a parameter but is deduced from the total amount of chilling (S_c) received up to a defined date (t_c) which is a parameter:

Originally, the Parallel and the Sequential models have been described with a triangular type reaction norm to temperature for the endodormancy phase and a sigmoid type reaction norm to temperature for the ecodormancy phase (Landsberg 1974; Richardson et al. 1974). In this study, we tested several response functions to temperature for the endodormancy phase (i.e. $R_{c,t}$) : the triangular function (Hänninen 1990a), the smoothed Utah function (Bonhomme et al. 2010), the inverse of the Richardson function (Richardson et al. 1974) and the inverse of the Growing Degree Days function (Réaumur 1735). For the ecodormancy phase we tested the original sigmoidal function (Hänninen 1990b), the Growing Degree Days function (first described by Réaumur in 1735), the Richardson function (Richardson et al. 1974) and the Wang function (Wang and Engel 1998).

Model parameterization

We fitted the phenological models with the Phenology Modeling Platform software PMP 5.5 (<http://www.cefe.cnrs.fr/biodiversite-flux-et-changements-globaux/pmp>) (Chuine et al. 2013). This software enables to create and fit a phenological model with phenological data and meteorological data and also run simulations using a parameterized phenological model. Model optimization is achieved using the least square method and the simulated annealing algorithm of Metropolis (1953).

Models were parameterized using different sets of phenological data:

- the dates of budburst recorded in the growth chambers for each sampling dates (34 dates),
- the dates of budburst recorded *in situ* (3 dates),
- the dormancy break dates estimated with the dormancy monitoring experiment (3 dates).

According to the model, all or part of the phenological dataset was used as input variables. For the sequential models, we could only use the dates of budburst in the growth chamber from the samplings which occurred after the estimated dormancy break dates, and the dates of budburst *in situ*. For all models, the beginning of the chilling accumulation phase was fixed to either September 1 or October 1. Single-phase (ecodormancy) and two-phase models were fitted with or without the dormancy break date included as a fixed parameter.

Model evaluation

Model's performance was characterized by several indices.

The model efficiency (internal validity)

The quality of the model was estimated by the model efficiency (*EFF*) (Nash and Sutcliffe 1970) displayed by the PMP software. For each model, we selected the parameters of the repetition with the best efficiency.

$$EFF = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - P_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O}_i)^2}$$

with O_i the observed dates, P_i the simulated dates and n the number of data.

The *EFF* statistics range between $-\infty$ and $+1$, yielding $+1$ for a perfect fit, 0 for a quality of fit equivalent to the null model (overall mean) and a negative value for worse prediction than the null model.

We first selected the two best single-phase models using either the chilling and forcing phases, based on their efficiency. For the two-phase models, we retained models with efficiency superior to 0.97 with the same response functions and date for the beginning of chilling accumulation than those selected in the single-phase models (see Table 2).

Cross validation (external validity)

We compared the external validity of the models retained according to the *EFF* statistics. We compared the performance of these models in predicting budburst date at 14 sites located along two Pyrenean elevation gradients, from 131 to 1630 m asl, in 2007, 2009, 2010 and 2011 (see Vitasse et al. 2009c, Table 1; excluding data used in the fitting phase) using the Root Mean Square Error (*RMSE*, in days).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Oex_i - Pex_i)^2}{n}}$$

with Oex_i the observed dates, Pex_i the simulated dates and n the number of data.

The model with the lowest *RMSE* is the best predictor.

Forecasting of dormancy break and budburst dates along the 21st century

Prospective simulations of the leaf phenological events were performed using temperature simulated by the General Circulation model developed by Météo France, ARPEGE (Déqué et al. 1998) under the A1B IPCC scenario (IPCC, 2007). The original ARPEGE grid has a 60 km spatial step and a 1 day time resolution. A statistical downscaling method provided temperature data on a 8 km grid (Boé et al. 2006). These meteorological data were corrected by Vitasse et al. (2011) for the observation stands of oak phenology in the Pyrenees (see Vitasse et al. 2009c). For a given phenological station, they selected the ARPEGE grid points located less than 5km from the station. A lapse rate of $0.43^{\circ}\text{C}/100\text{m}$ of elevation was applied to correct temperature for elevation differences between the ARPEGE points and the observations stands, based on the measured thermal gradient across the elevation gradient (Vitasse et al. 2009c). Reconstructed minimum and maximum temperature time series were computed as the mean of the daily data over all retained ARPEGE points, weighted by the inverse of the distance to the phenological stand (Delpierre et al. 2009). Using the models considered as the more relevant in the previous phase, we simulated dormancy break and budburst dates from 1952 to 2098 in two Pyrenean stations, at the lowest (131 m asl; $43^{\circ}45'\text{N}$, $00^{\circ}13'\text{W}$) and highest (1630 m asl; $42^{\circ}52'\text{N}$, $00^{\circ}07'\text{E}$) stations monitored.

The meteorological model simulated a winter (Oct 1st to Jan 31st and Feb 10th at low and high elevation respectively) mean temperature increase from 8.7 to

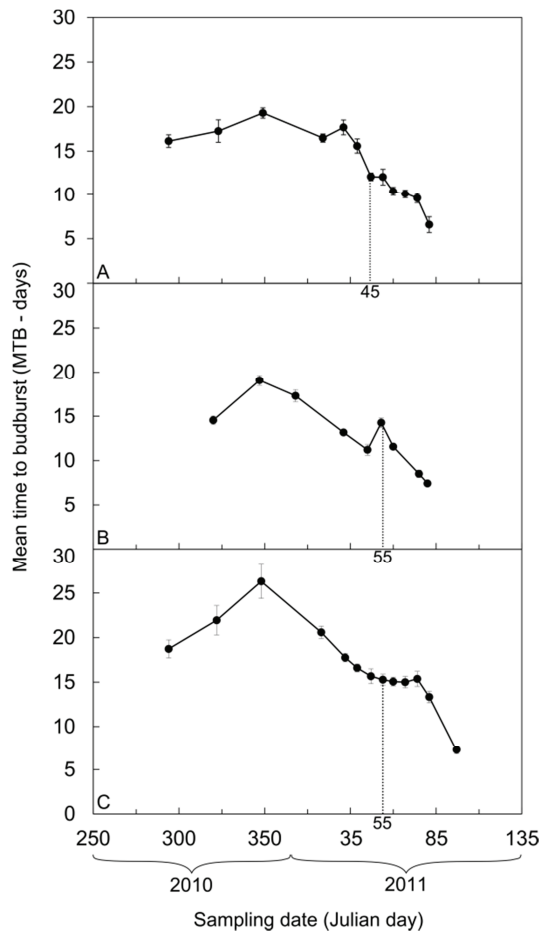


Figure 1. Determination of the dormancy break date. Relationship between the Mean Time to Budburst (mean $\pm$ standard deviation) in the growth chamber and the sampling date, for sessile oak cuttings sampled on 12, 9 and 13 different dates at low elevation (387 m asl) in the Pyrenees (A), medium elevation (682 m asl) in the Massif Central (B), and high elevation (1235 m asl) in the Pyrenees (C), respectively. Sampling dates are represented by dates in Julian day added together from mid-October 2010 until mid-April 2011. Three phases of dormancy were observed, more or less differentiated depending of the population studied: 1) entry into endodormancy, reflected by an increase in MTB to a maximum, 2) endodormancy release, as demonstrated by a decrease in MTB and 3) the ecodormancy phase, in which successive samplings (i.e. an increase in chilling) did not cause further decrease in MTB. The date of Dormancy Break (DB) corresponds to the date when endodormancy was released and buds entered into ecodormancy. We show the estimated dormancy break dates.

10.8°C at low elevation and from 2.3°C to 4.8°C at high elevation between 1952-1982 and 2068-2098, and an early spring (February 1st to April 1st and June 1st at low and high elevation respectively) mean temperature increase from 7.6°C to 10.5°C at low elevation and from 5.1°C to 8.4°C at high elevation.

Results

Timing of dormancy break

At high elevation, the three phases of dormancy were well distinguishable (Fig. 1). The dormancy break date was estimated on February 24th (Julian day 55), at the beginning of the plateau. The rapid decline in MTB at the last dates was due to bud growth *in situ* before sampling because of warm temperatures. At low and intermediate elevations, the plateau was not clearly distinguishable, because of warm temperatures occurring right after dormancy release. We estimated each dormancy break date at the first break in the decreasing slope of dormancy release. The dormancy break dates were assessed on the 14th (Julian day 45) and 24th of February at low and intermediate elevations, respectively.

Models performance and selection

We retained 23 phenological models according to the *EFF* values (Table 2). The two response functions to chilling temperatures represented in these models were the smoothed Utah and the triangular functions, and the two response functions to forcing temperatures were the Wang and the sigmoidal functions.

The two single-phase models with only a forcing phase starting on the dormancy break date had the lowest RMSE, with less than 7 days. Sequential

Table 2 Main features of the models selected according to their efficiency *EFF* (ranked by decreasing *RMSE*). The models retained for simulations in the future periods are indicated in bold.

	Model	Fitting	Functions	<i>EFF</i>	<i>RMSE</i>	<i>C*</i>	<i>F*</i>	Parameters estimates (chilling)	Parameters estimates (forcing)	<i>k</i>	<i>n</i>
1*	SP eco	Oct 1	DB	Tri	1.00	55.9		$T_{min}=2.0, T_{opt}=5.0, T_{max}=15.0$		4	3
2*	SP eco	Oct 1	SU		0.95	113.6		$T_{m1}=-8.7, T_{opt}=29.4, T_{n2}=49.8, min=-0.3$		5	3
3	SP eco	DB	Sig	0.98	6.01		13.0		a=-0.3, b=13.3	3	20
4	SP eco	DB	Wan	0.98	6.51		8.3		$T_{min}=-11.6, T_{opt}=22.1, T_{max}=26.4$	4	20
5	SEQ	Oct 1 / DB	SU + Sig	0.97	6.64	123.9	13.2	$T_{m1}=-7.6, T_{opt}=16.7, T_{n2}=20, min=-1$	a=-0.3, b=12.9	8	20
6	SEQ	Oct 1 / DB	Tri + Wan	0.98	7.12	111.4	13.3	$T_{min}=-37.1, T_{opt}=17.5, T_{max}=20$	$T_{min}=-1.6, T_{opt}=24.4, T_{max}=34.8$	8	20
7	SEQ	Oct 1	SU + Sig	0.98	7.20	118.1	14.0	$T_{m1}=-9.0, T_{opt}=0.5, T_{n2}=26.3, min=-0.9$	a=-0.4, b=12.9	8	20
8	SEQ	Oct 1	SU + Wan	0.98	7.31	120.7	12.7	$T_{m1}=-35.6, T_{opt}=23.8, T_{n2}=38.9, min=-0.8$	$T_{min}=-38.1, T_{opt}=22.5, T_{max}=27.1$	9	20
9	SP eco	Jan 1	Sig	0.99	7.88		14.9	$T_{m1}=-8.7, T_{opt}=29.4, T_{n2}=49.8, min=-0.3$	a=-0.2, b=19.1	3	32
10	SEQ	Oct 1	Tri + Sig	0.97	8.00	94.7	14.0	$T_{min}=-29.9, T_{opt}=3.8, T_{max}=20.4$	a=-0.4, b=12.6	7	20
11	SEQ	Oct 1 / DB	SU + Sig	0.97	8.14	113.6	13.0	$T_{m1}=-8.7, T_{opt}=29.4, T_{n2}=49.8, min=-0.3$	a=-0.3, b=13.3	8	20
12	SEQ	Oct 1 / DB	Tri + Sig	0.94	8.20	55.9	13.0	$T_{min}=2.0, T_{opt}=5.0, T_{max}=15.0$	a=-0.3, b=13.3	7	20
13	SEQ	Oct 1 / DB	Tri + Sig	0.97	8.25	100.9	13.5	$T_{min}=-38.6, T_{opt}=23.8, T_{max}=42.3$	a=-0.3, b=13.2	7	20
14	SEQ	Oct 1 / DB	SU + Wan	0.97	8.32	112.2	12.6	$T_{m1}=-8.1, T_{opt}=30, T_{n2}=44.4, min=-0.05$	$T_{min}=2.9, T_{opt}=30, T_{max}=47.5$	9	20
15	SEQ	Oct 1	Tri + Wan	0.98	9.17	102.2	7.3	$T_{min}=-19.3, T_{opt}=14.7, T_{max}=26.3$	$T_{min}=-16.3, T_{opt}=22.2, T_{max}=26$	8	20
16	PAR	Oct 1 / DB	SU + Sig	0.99	35.42	124.2		$T_{m1}=-8.0, T_{opt}=17.4, T_{n2}=35.8, min=-0.9$	a=-0.4, b=13.9	8	37
17	PAR	Oct 1	SU + Wan	1.00	37.54	21.0		$T_{m1}=-40, T_{opt}=4.3, T_{n2}=34.0, min=-0.7$	$T_{min}=-2.8, T_{opt}=22.4, T_{max}=28.3$	9	37
18	PAR	Oct 1	Tri + Sig	0.99	43.73	24.2		$T_{min}=3.8, T_{opt}=24.4, T_{max}=48.5$	a=-40, b=11.6	7	37
19	PAR	Oct 1 / DB	Tri + Sig	0.99	59.47	112.3		$T_{min}=-37.1, T_{opt}=17.2, T_{max}=49.0$	a=-40, b=11.7	7	37
20	PAR	Oct 1	Tri + Wan	0.99	64.35	26.5		$T_{min}=1.8, T_{opt}=26.5, T_{max}=41.4$	$T_{min}=9.1, T_{opt}=21.2, T_{max}=25.6$	8	37
21	PAR	Oct 1	SU + Sig	0.99	73.85	16.3		$T_{m1}=-22.6, T_{opt}=26.4, T_{n2}=30.3, min=-0.1$	a=-40, b=11.7	8	37
22	PAR	Oct 1 / DB	SU + Wan	0.99	90.37	120.7		$T_{m1}=-8.0, T_{opt}=20.5, T_{n2}=30.5, min=-0.8$	$T_{min}=8.0, T_{opt}=21.6, T_{max}=25.4$	9	37
23	PAR	Oct 1 / DB	Tri + Wan	0.99	92.35	111.1		$T_{min}=-37.0, T_{opt}=17.8, T_{max}=46.3$	$T_{min}=9.2, T_{opt}=21.2, T_{max}=25.5$	8	37

Model: SP, single-phase model, for the eco- or endodormancy phase; SEQ, sequential; PAR, parallel. Fitting: starting date of the chilling phase / starting date of the forcing phase. Functions: chilling phase + forcing phase. *EFF*, *RMSE*, rate of chilling (*C**), rate of forcing (*F**) and parameters of the chilling and forcing phases. *k*: number of fitted parameters. *n*: number of data used to fit the model. * Some parameters were tested as fixed before the run simulations so that *k* was lower than *n*.

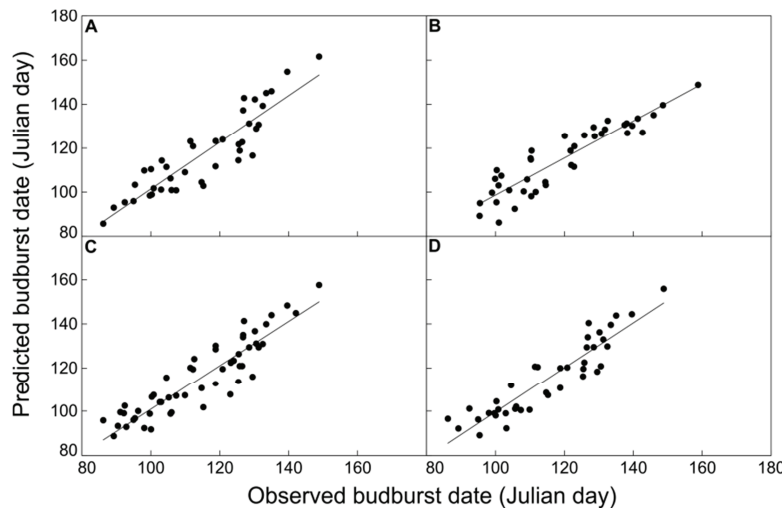


Figure 2. External validity of models. Relationship between the predicted budburst dates and the observed budburst dates, in 14 sites located along two Pyrenean elevation gradients, from 131 to 1630 m asl, in 2007, 2009, 2010 and 2011, for four models. **A:** model_DB; $y=1.0627x - 4.8764$, $R^2=0.81$, $RMSE=8.20$, $P<0.0001$. **B:** model_noDB; $y=0.843x + 14.367$, $R^2=0.84$, $RMSE=8.00$, $P<0.0001$. **C:** model_forc; $y=1.0058x + 0.3226$, $R^2=0.80$, $RMSE=7.88$, $P<0.0001$. **D:** model_SU; $y=1.0212x - 2.5059$, $R^2=0.85$, $RMSE=6.64$, $P<0.0001$.

models had low *RMSE* values (7.8 days on average) whereas parallel models had very high *RMSE* (62.1 days on average). We did not systematically observe an ameliorative effect of including the dormancy break date in models.

Using the fitted parameters, we plotted the response functions to chilling and forcing temperatures of the 23 models. The response functions to temperature appeared unrealistic in many models (models 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14 and 15 for the sequential models), with high values of optimal temperature to cumulate chilling ($\geq 14.7^\circ\text{C}$) or forcing ($> 46.1^\circ\text{C}$) units, or a very large range of highly active chilling temperatures until 18°C (see the parameters in Table 2).

Considering the *EFF*, the *RMSE*, the response functions to temperature (type and parameters) and the integration or not of the dormancy break date, we finally selected four models to perform simulations in the 21st century, as follows:

1. model_DB (previously referred to as number 12): sequential two-phase model, fitted with fixing DB, with a triangular response function to chilling temperatures and a sigmoidal response function to forcing temperatures; this model had the best *RMSE* among the models defined with fixing DB.

2. model_noDB (previously referred to as number 10): model with the same characteristics as model_DB, but fitted without fixing DB; this model has one of the best *RMSE* among the models fitted without fixing DB.
3. model_forc (previously referred to as number 9): classical one-phase model (ref), with a sigmoidal response function to forcing temperatures from the 1st of January.
4. model_SU (previously referred to as number 5): sequential two-phase model, fitted with fixing DB, with a smoothed Utah response function to chilling temperatures and a sigmoidal response function to forcing temperatures ; this model is an interesting case because it had low *RMSE* but with unrealistic range of active chilling temperatures (unrealistic model for prospective simulations).

Plots of the predicted vs. observed budburst dates simulated by these four models were showed in Figure 2, and the curves of the response functions to chilling and forcing temperatures were showed in Figure 3. The parameters of the functions were presented in Table 2. The response functions are described in the Supporting information.

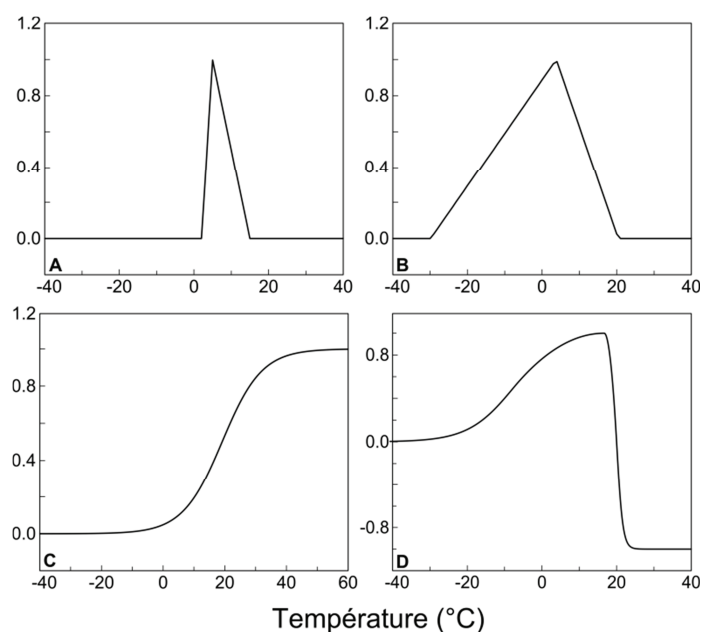


Figure 3. Shape of various response functions. Triangular response function to chilling temperatures of model_DB (A), triangular response function to chilling temperatures of model_noDB (B), sigmoidal response function of model_forc (C) and chilling response function of model_SU (D). Standard units according to temperature (°C).

Prospections of dormancy break dates

Trends in dormancy break dates from 1952 to 2098 greatly varied with the different models and in relation to elevation (Fig. 4C and 4D, Fig. 5C and 5D). Overall, timing of dormancy break was unchanged or delayed at low elevation and unchanged or advanced at high elevation. At low elevation, model_SU simulated a relatively unchanged dormancy break date, around the 15th of February. Model_DB and model_noDB predicted quite similar trends, with a rather stable phase from 1952 to nowadays and then an increasingly delayed dormancy break date. However, the two models differed in their predicted dates by about 10 days all along the simulated period. From 1952 to 2098, DB was delayed from the 9th to the 26th of February with model_DB and from the 19th to the 2nd of March with model_noDB. At high elevation, model_noDB and model_SU simulated a relatively unchanged dormancy break date, but with more than a month of difference between each other (around the 22nd of January and the 27th of February, respectively). Model_DB simulated a strongly advanced dormancy break date from 1952 to 2098 (from the 24rd of April to the 13th of

March); dormancy break date was however unchanged if not slightly delayed from the 2080s. Differences in dormancy break date predictions may range up to 100 days between the models at this elevation.

Projections of budburst dates

Overall, simulations of the timing of budburst showed a decreasing trend from the 1950s to 2100 whatever the model and at both elevations (Fig. 4A and 4B, Fig. 5A and 5B). On average, budburst timing was advanced by 26 days, i.e. 1.8 days per decade (from the 24th of April in 1952 to the 29th of March in 2098) at low elevation and by 53 days, i.e. 3.6 days per decade (from the 3rd of July in 1952 to the 11th of May in 2098) at high elevation. However, two models (model_forc and model_SU) predicted a decreasing trend of budburst date all over the period (with some slowdown in the 2080s) while with the two others (model_DB and model_noDB) the trend was reversed from the 2050s, with increasing dates observed in the last part of the simulation period. Until this different evolution in the 2050s, model_DB was very similar to model_forc and model_SU. Model_noDB

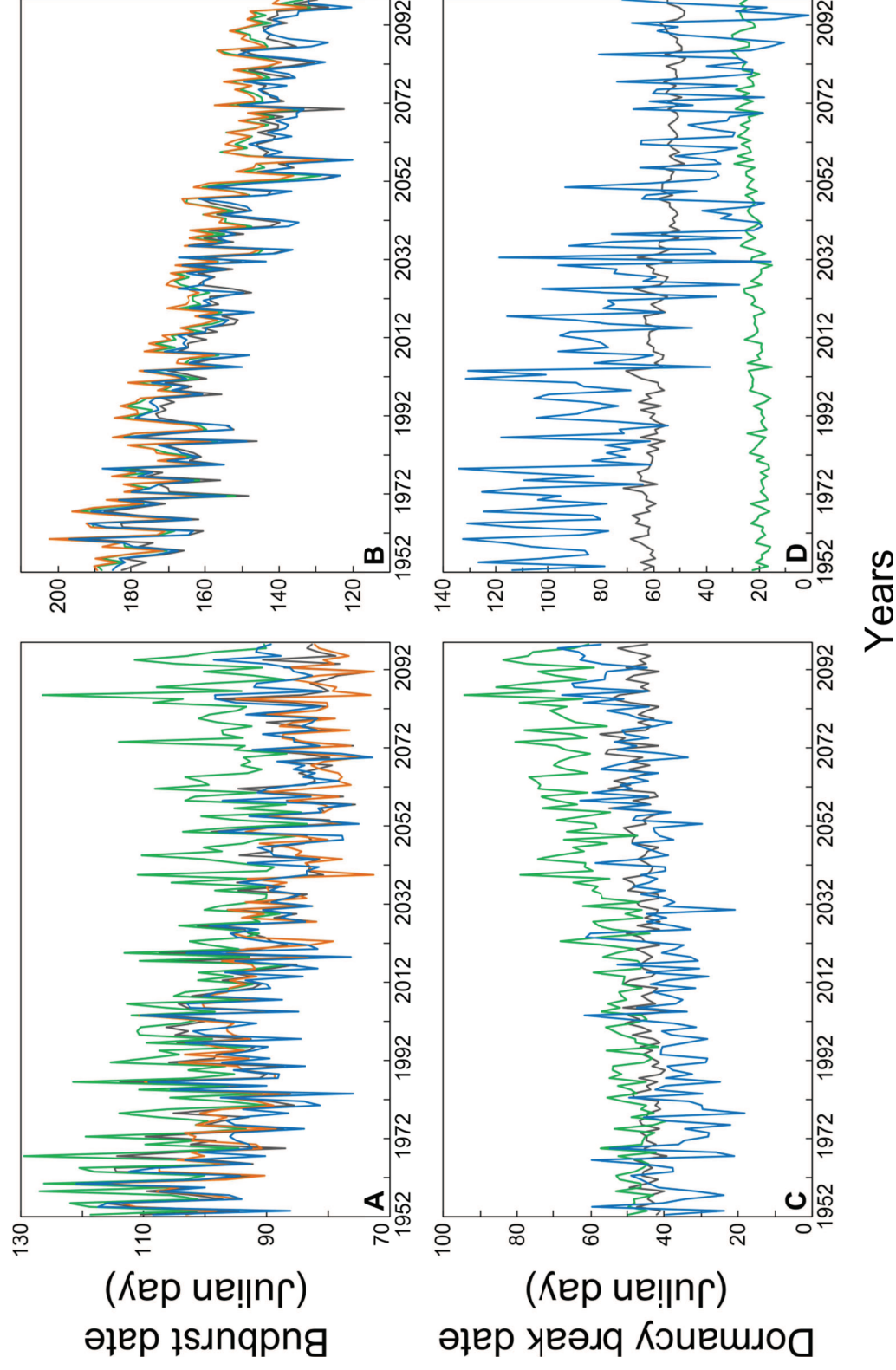


Figure 4. Budburst date (A and B) and dormancy break date (C and D) simulations from 1952 to 2098. On the left side we show simulations at low elevation (131 m asl; 43°45'N, 00°13'W) and on the right side simulations at high elevation (1630 m asl; 42°52'N, 00°07'E) in the Pyrenees. Temperatures were simulated by a General Circulation model developed by Météo France (ARPEGE) under the A1B IPCC scenario. Orange line: model_forc; blue line: model_noDB; green line: model_DB; gray line: model_SU. More precisions concerning the models are given in the article.

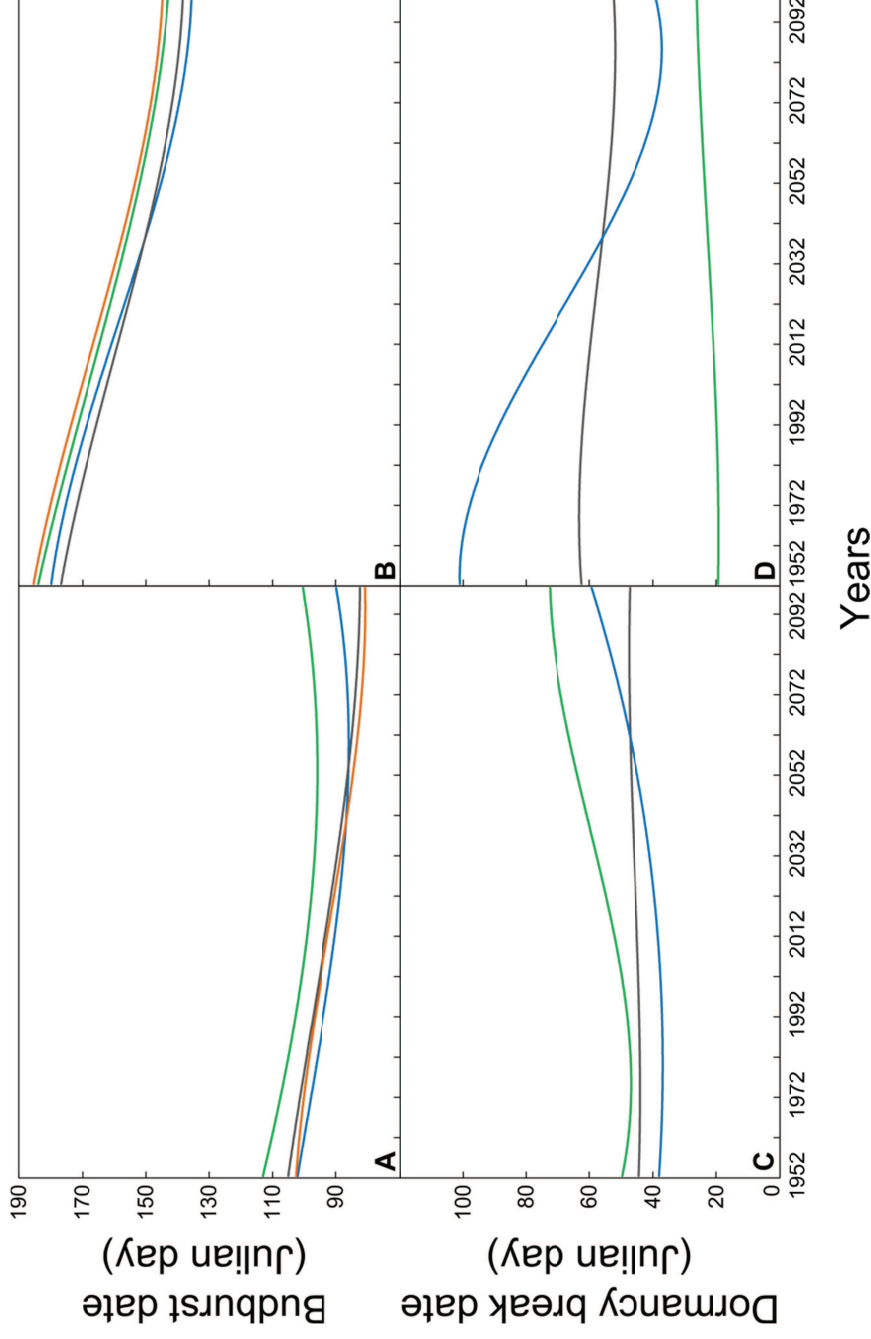


Figure 5. Polynomial regressions of the budburst date (A and B) and dormancy break date (C and D) simulations from 1952 to 2098. On the left side we show the simulations at low elevation (131 m asl; 43°45'N, 00°13'W) and on the right side simulations at high elevation (1630 m asl; 42°52'N, 00°07'E) in the Pyrenees. **A:** model_forc: $y = 1E-05x^3 - 0.0021x^2 - 0.0792x + 102.77$, $R^2 = 0.62$; model_noDB: $y = 8E-06x^3 - 0.0004x^2 - 0.2073x + 102.47$, $R^2 = 0.32$; model_SU: $y = 4E-06x^3 + 0.0009x^2 - 0.2979x + 113.29$, $R^2 = 0.26$; model_force: $y = 6E-06x^3 - 0.0007x^2 - 0.1741x + 105.34$, $R^2 = 0.52$. **B:** model_forc: $y = 1E-05x^3 - 0.0021x^2 - 0.2296x + 185.64$, $R^2 = 0.75$; model_noDB: $y = 2E-05x^3 - 0.0037x^2 - 0.1605x + 180.04$, $R^2 = 0.74$; model_SU: $y = 7E-07x^3 + 0.0015x^2 - 0.0855x + 38.168$, $R^2 = 0.39$; model_force: $y = 9E-06x^3 - 0.0014x^2 - 0.2742x + 184.2$, $R^2 = 0.73$; model_DB: $y = 1E-05x^3 - 0.0021x^2 - 0.2184x + 177$, $R^2 = 0.71$. **C:** model_DB: $y = 7E-07x^3 + 0.0015x^2 - 0.0855x + 38.168$, $R^2 = 0.39$; model_noDB: $y = -0.0014x^2 - 0.2742x + 184.2$, $R^2 = 0.67$; model_SU: $y = -5E-06x^3 + 0.0012x^2 - 0.0463x + 44.491$, $R^2 = 0.14$. **D:** model_DB: $y = 6E-05x^3 - 0.0117x^2 + 0.066x + 100.99$, $R^2 = 0.53$; model_noDB: $y = -4E-06x^3 + 0.0011x^2 - 0.0267x + 19.389$, $R^2 = 0.49$; model_SU: $y = 1E-05x^3 - 0.0032x^2 + 0.099x + 62.299$, $R^2 = 0.63$. Orange line: model_forc; blue line: model_DB; green line: model_noDB; grey line: model_SU. More precisions concerning the models are given in the article.

showed a similar budburst trend as model_DB but with a 10-days lag on average. At high elevation, the continuous advance in the budburst timing was quite parallel for the four models – despite highly different simulated dormancy break dates. Model_noDB and model_forc were very similar, with 7-days lag on average compared to model_SU. Thus, at low elevation the duration of the forcing phase (i.e. the difference in days between the budburst and dormancy break dates) was halved from 1952 to 2098 (from 69 ± 0.4 to 33 ± 4.2 days) – for the three models which simulated DB. At high elevation, the duration of the forcing phase remained stable with model_DB (around 89 days), decreased from about 45 and 55 days with model_SU and model_noDB, respectively.

Discussion

Both single-phase and two-phase sequential models with various chilling response functions were able to predict budburst dates in oak populations for the current period with the same accuracy. The integration of the dormancy break date did not systematically improve budburst simulations over the current period. For the second part of the 21st century, our simulations suggested that dormancy break date will probably be delayed at low elevation and advanced at high elevation with warming climate. Overall, our results showed an advance in the timing of budburst at low and high elevations over the 21st century, with a stronger trend at high elevation. However, simulations differed according to the model, particularly at low elevation from the 2050s: the timing of budburst was either predicted to continue to advance (with the single-phase model or the two-phase (smoothed Utah) model) or be delayed (with the two-phase (triangular) models, fitted with or without dormancy break date). This emphasizes the

importance of an accurate chilling sub-model and the need for improvement by integrating a more realistic chilling phase based on physiological processes.

Selecting the best model to accurately predict flushing timing

Our results showed that single-phase models did perform as well as sequential models with various chilling response functions for fitting currently observed budburst dates in oak populations. However, budburst simulations highly differed between single- and two-phase (triangular) models at the end of the century at low elevation, because of a negative impact of the warmer winter temperatures on dormancy release. This suggests that chilling temperatures are likely not a limiting factor for budburst in oak under current climate conditions, even at the southern limit of the species distribution range, but will become increasingly critical in the future. Although the four best models, as regards to *RMSE* for budburst, were fitted with the dormancy break date, integrating the dormancy break date as a fixed parameter in models did not systematically improved the predictions. It is also interesting to note that the parallel models were far less efficient than the sequential model in simulating current budburst dates. It is often observed that the empirical models predict better than more sophisticated models when there are uncertainties about the mechanisms (Makowski & Wierzbicki 2003). To date, knowledge is not sufficient to rule in favor of one or the other type of models (sequential vs. parallel) experimentally. All this emphasizes the need for investigations on the physiological processes underlying the dormancy release for future predictions. Nevertheless, a good two-phase model (i.e. with high efficiency, low *RMSE* and realistic range of active chilling

temperatures) defined with fixing the dormancy break date surely simulated more realistic budburst scenarios for the future than a single-phase model.

Impact of climate change on dormancy release

Our simulations with the two-phase (triangular) models showed that, for the next decades, the dormancy break date will be delayed at low elevation and advanced (especially with the model fitted with dormancy break date) at high elevation. These opposite trends may be explained by the much contrasted climates at low and high elevation. Thereby, at the end of the century, predicted daily average winter temperatures will be closer to the optimal temperature to cumulate chilling (estimated around 5°C by the models) at high elevation, whereas they will move away at low elevation. The high inter annual variability in dormancy break dates simulated by the two-phase model (triangular function with dormancy break date) may be related to the high sensitivity of the chilling response function (+0.3 chilling units for a 1°C increase) in the range of early winter temperatures observed at low elevation (2.3 – 4.8°C).

On the other hand, the constant dormancy break date simulated by the two-phase (smoothed Utah) model may be explained by the outputs of the smoothed Utah function, which showed a large range of effective temperatures to cumulate chilling. Effective chilling temperatures are assumed to be below 10°C, with an optimum range of 2-7°C for most species (Coville 1920; Doorenbos 1953; Nienstaedt 1966; Cannell 1989; Battey 2000). It did not seem coherent to suggest that the optimal temperature to cumulate chilling may be around 16.7°C, as predicted by the two-phase (smoothed Utah) model. The difference between the two-phase models used here (triangular vs. smoothed Utah) clearly illustrated the

importance of a well-fitted chilling phase, and the need to better understand and fit dormancy. The optimal temperature predicted by the triangular model including dormancy break date seems the more accurate and therefore the more relevant to simulate dormancy break date evolution. Nevertheless, these two models were reliable to simulate dormancy break date over the current period at low elevation, and first efforts must be done on the improvement of the experimental methods used to estimate the dormancy break timing. Interestingly, the two-phase (triangular) model fitted without the dormancy break date was also quite good to simulate the present timing of dormancy release.

On the role of chilling temperatures in the timing of budburst

Here we focused on the sequential two-phase (triangular) model fitted with dormancy break date, because it seemed to be the more relevant model to simulate the evolution in the timing of budburst over the 21st century. From the model simulations at low elevation, it seemed that, until the 2060s, dormancy release occurred before the coming of warm temperatures. Chill was therefore not limiting in the sense that it did not limit the forcing accumulation, and the date of budburst advanced with the earliness of warm temperatures. From the 2060s, dormancy release occurred after the coming of warm temperatures. Then chill became the limiting factor by delaying the start of forcing accumulation, and subsequently the budburst timing. Although temperature was warmer, the faster accumulation of forcing temperature did not counterbalance the delay in dormancy break timing. At high elevation, the timing of budburst advanced in parallel to the advance in the timing of dormancy release. The strong advance of the latter may

counteract the increase in temperatures and expose quiescent buds to quite constant temperatures from 1952 to 2098.

Other factors to consider for improving budburst modeling

The timing of flushing exhibits large inter (Oleksyn et al. 1998; Conover et al. 2009; Vitasse et al. 2009b; Alberto et al. 2011) and intra-population differences (Baliuckas et al. 2005; Kremer et al. 2010; Alberto et al. 2010; Salmela et al. 2013). Phenotypic variation in leaf spring phenology relies on both phenotypic plasticity (Kramer 1995; Vitasse et al. 2010) and genetic variation (Ducousso et al. 1996; Jensen and Hansen 2008). Dantec et al. (2014) demonstrated that genetic variation in leaf unfolding timing between and within sessile oak populations was probably due to differences in heat requirement rather than differences in chilling requirement. Here, the models did not take this variation into consideration because the critical sum of units to complete the chilling and forcing phases was equal at both elevations. This may explain that models well simulated present budburst date at low elevation (± 2 days) but not at high elevation (+ 25 days on average) (Fig. 4). Although fitted on oak populations from different elevations, these models seemed more suited to low elevation populations. This mismatch in high elevation populations highlights the local adaptation observed along the altitudinal gradient (Vitasse et al. 2009b). Differentiation of tree phenology within and between populations remains a part of phenology modeling that has not been extensively studied. Beyond its interest for evolutionary biology, its study for phenology modeling is necessary to assess the conditions of application of the models for natural populations (Chuine et al. 1999). Long

series of dormancy break and budburst dates are needed to fit phenological models at this fine scale. Moreover, with climate change buds may fall later in dormancy in autumn over the 21st century, which was not taken into account here. Indeed, a trend towards delayed leaf senescence was observed for deciduous trees since the 1950s (+4.8 days over the period of 1959–1993 in Menzel and Fabian 1999). However, as a result of the lack of experimental evidence regarding involved factors, no consensus can be found in the literature concerning the formulation of leaf senescence models (Chuine et al. 2003; Schaber and Badeck 2003). However, Delpierre et al. (2009) presented a more accurate modelling at the stand scale for *Fagus sylvatica* L., *Quercus petraea* L. and *Q. robur* L. When used as a prospective tool, the model predicts a trend toward significantly delayed leaf colouring occurrence for the period of 1951–2099. This may accentuate the delay in dormancy break date over the 21st century.

Acknowledgments

We thank Jean-Marc Louvet for field assistance. Cécile Dantec benefitted of a doctoral scholarship from the INRA department of Ecology of Forests, Grasslands and Freshwater and the Région Aquitaine (“Phénologie et Stratégies Temporelles” project).

References

- Alberto F, Niort J, Derory J, Lepais O, Vitalis R, Galop D, Kremer A (2010) Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Mol Ecol* 19:2626–2639
- Alberto F, Bouffier L, Louvet JM, Lamy JB, Delzon S, Kremer A (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural

- populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 24:1442–1454
- Arora R, Rowland LJ, Tanino K (2003) Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. *HortScience* 38:911–921
- Balandier P, Gendraud M, Rageau R, Bonhomme M, Richard JP, Parisot E (1993) Bud break delay on single node cuttings and bud capacity for nucleotide accumulation as parameters for endo- and paradormancy in peach trees in a tropical climate. *Sci Hortic-Amsterdam* 55:249–261
- Baliuckas V, Lagerstrom T, Norell L, Ersson G (2005) Genetic variation among and within populations in Swedish species of *Sorbus aucuparia* L. and *Prunus padus* L. assessed in a nursery trial. *Silvae Genet* 54:1–8
- Batley NH (2000) Aspects of seasonality. *J Exp Bot* 51:1769–1780
- Bennie J, Kubin E, Wiltshire A, Huntley B, Baxter R (2010) Predicting spatial and temporal patterns of bud-burst and spring frost risk in north-west Europe: the implications of local adaptation to climate. *Global Change Biol* 16:1503–1514
- Boé J, Terray L, Habets F, Martin E (2006) A simple statistical–dynamical downscaling scheme based on weather types and conditional resampling. *J Geophys Res-Atmos* 111 (D23)
- Bonhomme M, Rageau R, Lacoite A (2010) Optimization of endodormancy release models using series of endodormancy release data collected in France. *Acta Hort* 872:51–60
- Borchert R (1999) Climatic periodicity, phenology, and cambium activity in tropical dry forest trees. *IAWA J* 20:239–247
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J (2012) Temperature effect on dormancy release in apricot when applied in different dormant stages. *Acta Hortic* 966:155–161
- Cannell MGR, Smith RI (1983) Thermal time, chill days and predictions of budburst in *Picea Sitchensis*. *J Appl Ecol* 20:951–963
- Cannell MGR (1989) Chilling, thermal time and the data of flowering of trees. In: Wright CJ (ed) *Manipulation of Fruiting*. London: Butterworths, pp 99–113
- Cannell MGR (1997) Spring phenology of trees and frost avoidance. *Weather* 52:46–52
- Cannell MGR, Smith RI (1986) Climatic warming, spring budburst and frost damage on trees. *J Appl Ecol* 23:177–191
- Champagnat P (1989) Rest and activity in vegetative buds of trees. *Ann Sci For* 46:9s–26s
- Chmielewski FM, Rotzer T (2001) Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agr Forest Meteorol* 108:101–112
- Chuine I, Cour P, Rousseau DD (1999) Selecting model to predict the timing of flowering of temperate trees: implications for tree phenology modelling. *Plant Cell Environ* 22:1–13
- Chuine I, Belmonte J, Mignot A (2000) A modelling analysis of the genetic variation of phenology between tree populations. *J Ecol* 88:561–570
- Chuine I, Kramer K, Hänninen H (2003) *Plant development models, phenology: an integrative environmental science*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 555
- Chuine I, Morin X, Bugmann H (2010) Warming, photoperiods and tree phenology. *Science* 329:277–278
- Chuine I, Garcia de Cortazar Atauri I, Kramer K, Hänninen H (2013) *Plant Development Models*. In: *Phenology: an integrative environmental science* (ed Schwarz MD). Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 275–293

- Conover DO, Duffy TA, Hice LA (2009) The covariance between genetic and environmental influences across ecological gradients: reassessing the evolutionary significance of countergradient and cogradient variation. *Ann N Y Acad Sci* 1168:100–129
- Cooke JEK, Eriksson ME, Junttila O (2012) The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ* 35:1707–1728
- Coville FC (1920) The influence of cold in stimulating the growth of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 6:434–435
- Dantec CF, Vitasse Y, Bonhomme M, Louvet JM, Kremer A, Delzon S (2014) Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range. *Int J Biometeorol* doi: 10.1007/s00484-014-0787-7
- Delpierre N, Dufrene E., Soudani K, Ulrich E, Cecchini S, Boe J, Francois C (2009). Modelling interannual and spatial variability of leaf senescence for three deciduous tree species in France. *Agr Forest Meteorol* 149:938–948
- Déqué, M., Marquet, P., Jones, R.G., 1998. Simulation of climate change over Europe using a global variable resolution general circulation model. *Clim Dynam* 14:173–189
- Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann Sci For* 46:631s–647s
- Doorenbos J (1953) Review of the literature on dormancy in buds of woody plants. *Medelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland* 53:1–24
- Ducousso A, Guyon JP, Kremer A (1996) Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). *Ann Sci For* 53:775–782
- Elloumi O, Ghrab M, Kessentini H, Ben Mimoun M (2013) Chilling accumulation effects on performance of pistachio trees cv. Mateur in dry and warm area climate. *Sci Hort* 159:80–87
- Fenner M (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspect Plant Ecol* 1:78–91
- Fu YH, Campioli M, Deckmyn G, Janssens IA (2012a) The impact of winter and spring temperatures on temperate tree budburst dates: results from an experimental climate manipulation. *PLoS One* 7:e47324
- Fu YH, Campioli M, Van Oijen M, Deckmyn G, Janssens IA (2012b) Bayesian comparison of six different temperature-based budburst models for four temperate tree species. *Ecol Model* 230:92–100
- Granhus A, Floistad IS, Sogaard G (2009) Bud burst timing in *Picea abies* seedlings as affected by temperature during dormancy induction and mild spells during chilling. *Tree Physiol* 29:497–503
- Hänninen (1990a) Modeling dormancy release in trees from cool and temperate regions. In: Dixon RK, Meldahl RS, Ruark GA, Warren WG (eds) *Process modeling of forest growth responses to environmental stress*. Timber Press, Portland, pp 159–165
- Hänninen H (1990b) Modelling bud dormancy release in trees from cool and temperate regions. *Acta Forest Fenn* 213:1–47
- Hänninen H (1991) Does climatic warming increase the risk of frost damage in northern trees? *Plant Cell Environ* 14:449–454
- Hänninen H (1995) Effects of climatic change on trees from cool and temperate regions: an ecophysiological approach to modelling of budburst phenology. *Can J Bot* 73:183–199
- Hänninen H, Kellomäki S, Laitinen K, Pajari B, Repo T (1993) Effect of increased winter

- temperature on the onset of height growth of Scots pine: a field test of a phenological model. *Silva Fenn* 27:251–257
- Hänninen H, Kramer K (2007) A framework for modelling the annual cycle of trees in boreal and temperate regions. *Silva Fenn* 41:167–205
- Heide OM (1993a) Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days. *Physiol Plantarum* 89:187–191
- Heide OM (1993b) Daylength and thermal time responses of budburst during dormancy release in some northern deciduous trees. *Physiol Plantarum* 88:531–540
- Honjo H (2007) Effects of global warming on dormancy and flowering behavior of temperate fruit crops in Japan. *Hortic Res* 6:1–5
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci* 8:534–540
- Hunter AF, Lechowicz MJ (1992) Predicting the timing of budburst in temperate trees. *J Appl Ecol* 29:597–604
- Jensen JS, Hansen J (2008) Geographical variation in phenology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur* L. oak grown in a greenhouse. *Scand J Forest Res* 23:179–188
- Karlsson PS, Bylund H, Neuvonen S, Heino S, Tjus M (2003) Climatic response of budburst in the mountain birch at two areas in northern Fennoscandia and possible responses to global change. *Ecography* 26:617–625
- Kramer K (1994a) A modelling analysis of the effects of climatic warming on the probability of spring frost damage to tree species in The Netherlands and Germany. *Plant Cell Environ* 17:367–377
- Kramer K (1994b) Selecting a model to predict the onset of growth of *Fagus sylvatica*. *Journal of Applied Ecology* 31:172–181
- Kramer K (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell Environ* 18:93–104
- Kremer A, Le Corre V, Petit R, Ducousso A (2010) Historical and contemporary dynamics of adaptive differentiation in European oaks. In: DeWoody JA, Bickham JW, Michler CH, Nichols KM, Rhodes Jr. OE, Woeste KE (eds) *Molecular approaches in natural resource conservation and management*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 101–122
- Kobayashi KD, Fuchigami LH, English MJ (1982) Modelling temperature requirements for rest development in *Cornus sericea*. *JASHS* 107:914–918
- Landsberg JJ (1974) Apple fruit bud development and growth; analysis and an empirical model. *Ann Bot* 38:1013–1023
- Lang GA (1987) Dormancy – a new universal terminology. *Hortscience* 22:817–820
- Laube J, Sparks TH, Estrella N, Höflers J, Ankerst DP, Menzel A (2013) Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Global Change Biol* doi: 10.1111/gcb.12360
- Linkosalo T, Hakkinen R, Hänninen H (2006) Models of the spring phenology of boreal and temperate trees: is there something missing? *Tree Physiol* 26:1165–1172
- Linkosalo T, Lappalainen HK, Hari P (2008) A comparison of phenological models of leaf bud burst and flowering of boreal trees using independent observations. *Tree Physiol* 28:1873–1882
- Luedeling E, Guo L, Dai J, Leslie C, Blanke MM (2013) Differential responses of trees to temperature variation during the chilling and forcing phases. *Agric For Meteorol* 181:33–42

- Makowski M, Wierzbicki AP (2003) Modeling knowledge: model-Based decision support and soft computations. In: Yu X, Kacprzyk J (eds) Applied decision support with soft computing. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-60
- Menzel A, Fabian P (1999) Growing season extended in Europe. *Nature* 397, 659
- Menzel A, Estrella N, Fabian P (2001) Spatial and temporal variability of the phenological seasons in Germany from 1951 to 1996. *Glob Change Biol* 7:657–666
- Menzel A, Sparks TH, Estrella N, Koch E, Aasa A, Ahas R, Alm-Kubler K, Bissolli P, Braslavska O, Briede A, Chmielewski FM, Crepinsek Z *et al.* (2006). European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Glob Change Biol* 12:1969–1976
- Morin X, Viner D, Chuine I (2008) Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. *J Ecol* 96:784–794
- Morin X, Lechowicz MJ, Augspurger C, O'Keefe J, Viner D, Chuine I (2009) Leaf phenology in 22 North American tree species during the 21st century. *Global Change Biol* 15:961–975
- Murray MB, Cannell MGR, Smith RI (1989) Date of budburst of fifteen tree species in Britain following climatic warming. *J Appl Ecol* 26:693–700
- Nash JE, Sutcliffe JV (1970) River flow forecasting through conceptual models part I. A discussion of principles. *J Hydrol* 10:282–290
- Nienstaedt H (1966) Dormancy and dormancy release in white spruce. *Forest Sci* 12:374–384
- Oleksyn J, Modrzyński J, Tjoelker MG, Zytowskiak R, Reich PB, Karolewski P (1998) Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Funct Ecol* 12:573–590
- Penuelas J, Filella I, Comas P (2002) Changed plant and animal life cycles from 1952 to 2000 in the Mediterranean region. *Glob Change Biol* 8:531–544
- Polgar CA, Primack RB (2011) Leaf-out phenology of temperate woody plants: from trees to ecosystems. *New Phytol* 191:926–941
- Rageau (1978) Croissance et débourrement des bourgeons végétatifs de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) au cours d'un test classique de dormance. *CR Acad Sci Paris, Ser D* 287:1119–1122
- Rathcke, B, Lacey EP (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annu Rev Ecol Syst* 16:179–214
- Richardson EA, Seeley SD, Walker DR (1974) A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *Hortscience* 9:331–332
- Richardson AD, Bailey AS, Denny EG, Martin CW, O'Keefe J (2006) Phenology of a northern hardwood forest canopy. *Global Change Biol* 12:1174–1188
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421:57–60
- Salmela MJ, Cavers S, Cottrell JE, Iason GR, Ennos RA (2013) Spring phenology shows genetic variation among and within populations in seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Scottish Highlands. *Plant Ecol Divers* 6:523–536
- Sarvas R (1972) Investigations on annual cycle of development of forest trees. Active period. *Commun Inst For Fenn* 76:1–110
- Sarvas R (1974) Investigations on the annual cycle of development of forest trees. Autumn dormancy and winter dormancy.

- Communicationes Instituti Forestalis Fenniae 84:101
- Schaber J, Badeck FW (2003) Physiology-based phenology models for forest tree species in Germany. *Int J Biometeorol* 47:193–201
- Shirazi AM (2003) Standardizing methods for evaluating the chilling requirements to break dormancy in seeds and buds (including geophytes): introduction to the workshop. Special insert in *HortScience* 38(3)
- Thompson R, Clark RM (2008) Is spring starting earlier? *Holocene* 18:95–104
- Vitasse Y, Delzon S, Dufrêne E, Pontailier JY, Louvet JM, Kremer A, Michalet R (2009a) Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: Do within-species populations exhibit similar responses? *Agr Forest Meteorol* 149:735–744
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A (2009b) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can J For Res* 39:1259–1269
- Vitasse Y, Porté AJ, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2009c) Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia* 161:187–198
- Vitasse Y, Bresson CC, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2010) Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Funct Ecol* 24:1211–1218
- Vitasse Y, François C, Delpierre N, Dufrêne E, Kremer A, Chuine I, Delzon S (2011) Assessing the effects of climate change on the phenology of European temperate trees. *Agr Forest Meteorol* 151:969–980
- Vitasse Y, Basler D (2014) Is the use of cuttings a good proxy to explore phenological responses of temperate forests in warming and photoperiod experiments? *Tree Physiol* 34:174–183
- Vegis A (1964) Dormancy in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 15:185–224
- Wang E, Engel T (1998) Simulation of phenological development of wheat crops. *Agr Syst* 58:1–24
- Wareing PF (1953) Growth studies in woody species. V. Photoperiodism in dormant buds of *Fagus sylvatica* L. *Physiol Planta* 6:692–706
- Yu H, Luedeling E, Xu J (2010) Winter and spring warming result in delayed spring phenology on the Tibetan Plateau. *PNAS* 107:22151–22156

Supporting information

Description of the response functions to temperature used in the 23 retained model according to their efficiency (*EFF*). With T_d the daily mean temperature.

Response functions used to describe the endodormancy phase

Triangular

This function was first introduced by Hänninen (1990a). It has three parameters, T_{min} , T_{opt} , T_{max} .

$$f_{Triangular}(T_d) = \begin{cases} 0 & \text{if } T_d \ll T_{min} \\ \frac{T_d - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} & \text{if } T_{min} < T_d < T_{opt} \\ \frac{T_d - T_{max}}{T_{opt} - T_{max}} & \text{if } T_{opt} < T_d < T_{max} \\ 0 & \text{if } T_d \gg T_{max} \end{cases} \quad (\text{Eq. 1})$$

Smoothed Utah

This function was first introduced by Bonhomme et al. (2010) and is a smoothed version of the Utah function proposed by Richardson et al. (1974). This function assumes that chilling can only occur over a range of temperatures, and has four parameters: T_{m1} , T_{opt} , T_{n2} and min . Negative chilling values can be accumulated on warm days, thus increasing the amount of cold that has to be reached.

T_{opt} defines the optimal mean daily temperature, for which one chilling unit is accumulated every day.

T_{m1} defines the sharpness of the decrease in cold efficiency for bud endodormancy. The lower T_{m1} , the slower this decrease.

T_{n2} defines the mid-response, i.e. the temperature (above T_{opt}) which has half the efficiency of T_{opt} to induce endodormancy.

min defines how negative the impact of too high temperatures can be. When $min=0$, high temperatures have no negative impact on endodormancy release; when $min=-1$, the negative impact of a too warm day equals the positive effect of a day at T_{opt} .

$$f_{SmoothedUtah}(T_d) = \begin{cases} \frac{1}{1+e^{-\frac{T_d-T_{m1}}{T_{opt}-T_{m1}}}} \text{ if } T_d > T_{m1} \\ \frac{0.5(T_d-T_{opt})^2}{(T_{m1}-T_{opt})^2} \text{ if } T_{m1} < T_d < T_{opt} \\ 1 - (1 - \min) \frac{(T_d-T_{opt})^2}{2(T_{n2}-T_{opt})^2} \text{ if } T_{opt} < T_d < T_{n2} \\ \min + \frac{1-\min}{1+e^{-\frac{T_{n2}-T_d}{T_{n2}-T_{opt}}}} \text{ if } T_{n2} < T_d \end{cases} \quad (\text{Eq. 2})$$

Response functions used to describe the ecodormancy phase

Sigmoid

This function was first introduced by Hänninen (1990b). It has two parameters: a and b .

a defines the sharpness of the response; values away from zero induce a sharper response curve.

b is the mid-response temperature.

$$f_{Sigmoid}(T_d) = \frac{1}{1+e^{a(T_d-b)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Wang

This function was first defined by Wang & Engel (1998). It has an optimum and is not symmetric. It pertains to the family of the beta functions. It has three parameters T_{opt} , T_{min} and T_{max} .

$$f_{Wang} = \text{Max} \left[\left(2(T_d - T_{min})\alpha(T_{opt} - T_{min})\alpha - \frac{(T_d - T_{min})^{2\alpha}}{(T_{opt} - T_{min})^{2\alpha}} \right), 0 \right] \quad (\text{Eq. 4})$$

With $\alpha = \ln(2)/\ln\left(\frac{T_{max}-T_{min}}{T_{opt}-T_{min}}\right)$

CHAPITRE IV

Avoidance of spring frost and disease through phenological variations in oak populations along elevation gradients

Cécile F. Dantec, Hugo Ducasse, Xavier Capdevielle, Olivier Fabreguettes, Sylvain Delzon and Marie-Laure Desprez Loustau

Submitted to PLOS ONE



Abstract

The timing of tree flushing follows strong phenotypic and genetic clines across environmental gradients. It may be seen as an adaptive response to abiotic (avoidance of spring frost and maximizing growing season length) and biotic (avoidance of pest and disease) stresses. However, few studies have investigated the combined effects of both types of stresses. We assessed exposure to both abiotic (spring frost) and biotic (powdery mildew) factors within and between sessile oak populations along elevation gradients, during the flushing period. For each population and phenological phenotype (early- vs. late-flushing trees), we quantified safety margins, as a measure of the temporal avoidance of abiotic and biotic stress exposure by trees. The spring frost and disease safety margins of oak populations varied considerably as a function of elevation and tree phenological phenotype. For both stresses, safety margins tended to decrease with increasing elevation, resulting in higher exposure to both stresses at high elevation. The safety margin for spring frost was mostly positive (i.e. avoidance), whereas the safety margin for powdery mildew was mostly negative (i.e. exposure), leading to infection. This suggests that natural selection for the avoidance of spring frost is stronger than selection to avoid disease exposure. Nevertheless, early-flushing trees at low elevations were able to avoid disease, but were potentially at risk of late frost, whereas late-flushing trees avoided frost but not powdery mildew. The combination of frost and disease pressures may thus contribute to the maintenance of high levels of phenological diversity in oak populations growing at low elevation. Finally, oak phenology is more sensitive to temperature than powdery mildew phenology, which suggests that climate change will affect the phenological (a)synchrony between host and parasite, both within and between populations growing along environmental gradients.

Key words: phenology, flushing, defense, avoidance, spring frost, powdery mildew, synchrony

Introduction

The timing of spring life-history events is crucial to the fitness of trees in regions with seasons [1], [2]. In particular, the timing of flushing determines growing season length and is, thus, a major determinant of growth [3], [4] and survival [5]. Many phenological studies essentially address the question: “Why now, rather than earlier or later?” [1], particularly in the context of climate change [6], [7]. Phenological events in trees are seen largely as a mean by which the tree adapts to environmental stress, enabling it to persist within a local temporal niche, in seasonal environments [8]. The timing of flushing follows strong geographic patterns of variation associated with elevation, latitude or longitude [9], [10], [11]. Moreover, the timing of flushing may differ considerably between trees from the same population [12], [13], [14]. Phenotypic variation in leaf phenology in spring is dependent on phenotypic plasticity [15], [16], a developmental process operating at individual level and making it possible for a single genotype to give rise to different phenotypes in response to both abiotic and biotic variations in the environment [17], [18]. Genetic variation is also involved [19], [20], at the individual and/or population level, and this variation is maintained by heredity [21], [22], [23]. Evolutionary processes, such as epigenetic mechanisms, gene flow [24], [25], assortative mating [26], and natural selection mediated by environmental factors [27] all give rise to genetic variation.

The timing of flushing is widely considered to reflect an evolutionary trade-off in response to two opposing abiotic forces: adjustment to the likelihood of frost occurrence, to decrease the risk of frost damage to actively growing parts of the plant, and adjustment to the duration of the growing

season, to maximize carbon assimilation and biomass production [28], [29], [30]. However, the timing of flushing in temperate trees may also be seen as an adaptive response to biotic interactions, which may be mutualistic or antagonistic [1], [8], [31], [32]. Interactions with pollinators, herbivores or pathogens may modulate or negate patterns of selection controlled by the physical environment [22], [33], [34], [35]. Moreover, a major difference between abiotic and biotic constraints is that biotic agents, such as insects and pathogens, can adapt to the host traits involved in interactions, including phenology. Co-evolutionary processes would therefore be expected to lead to phenological synchrony between parasites and their hosts [36], [37].

The relative contributions of biotic and abiotic selective forces to phenology may depend on local conditions, particularly along environmental gradients [8], [38]. At high latitudes or elevations, strong directional selection due to freezing temperatures is expected to occur [38], [39]. Conversely, pest and disease may exert a lower pressure, due to host density and climatic factors being less favorable for the development of large insect and pathogen populations than at lower latitudes or elevations [40], [41]. Biotic and abiotic selective forces frequently have opposite effects on local populations, because the main physical constraints linked to low temperatures act upstream from flushing, whereas interactions with insects and pathogens exert their effects after flushing has occurred. Most investigations to date have dealt with the relationship of either biotic or abiotic factors to phenology (but see [42]). There is, therefore, a need for experimental investigations considering both types of factors simultaneously [8], [22].

We aimed to quantify differences in exposure to both abiotic (spring frost) and biotic (powdery mildew) factors within and between populations of sessile oak (*Quercus petraea* L.), during the period of flushing, along elevation gradients. Previous studies along the same transects in the Pyrenees showed considerable variability in flushing phenotype between populations [43], [44], due to both phenotypic plasticity [16] and genetic population differentiation [39], [45]. Despite local adaptation along environmental gradients, considerable phenotypic variation for leaf flushing was observed within populations, associated with the maintenance of genetic diversity for this trait at local scale [24]. This local genetic differentiation for flushing was shown to decrease with increasing elevation [24]. We estimated safety margins, to assess the temporal avoidance of abiotic and biotic stress exposure by trees. We tested the hypothesis that safety margins remain positive (i.e. stress avoidance) and constant along the elevation gradient if populations are locally adapted to their environment. We then determined whether exposure to spring frosts and powdery mildew differed within populations, as a function of variations in individual tree phenology. We tested the hypothesis that powdery mildew and spring frost stresses favor opposite phenological phenotypes, consistent with the maintenance of genetic diversity at local scale. Finally, we assessed whether different levels of exposure to powdery mildew had a noticeable effect on tree infection rates.

Materials and methods

No specific permits were required for the described study sites. The sites were owned by the Office National des Forêts (ONF) and were not subjected to

any protection scheme. This work did not involve any endangered or protected species or area.

Model system

Sessile oak is a broad-leaved deciduous tree species occurring over most of Europe and of high environmental, cultural and economic value. The timing of oak flushing depends mostly on temperature [32], [43], [46]. Powdery mildew is one of the most common fungal diseases of oaks in Europe [47]. Powdery mildew fungi are obligate biotroph parasites, infecting photosynthetic organs [40]. The disease is caused by a complex of several closely related species: *Erysiphe alphitoides*, *E. hypophylla*, *E. quercicola* and *Phyllactinia guttata*, with *E. alphitoides* currently highly predominant but probably of exotic origin [47], [48]. Oaks display ontogenic resistance to powdery mildew: only young expanding leaves are susceptible to the disease [50]. Like oaks, the fungus is affected by seasonality. Powdery mildews may overwinter as mycelium, in buds infected during the previous season (flagshoot) or by forming chasmothecia (dormancy organs), which are responsible for producing the spores that form the primary inoculum in spring [40]. Infection results in the production of a mycelium, which produces huge numbers of spores at the leaf surface that constitute the secondary inoculum, with subsequent infection cycles during the course of the season resulting in a build-up of fungal populations. Foliar infection causes a decrease in net photosynthesis and a more general change in metabolism, which may affect tree growth and survival, especially for seedlings [49], [51].

Study area

Table 1 Description of the oak populations studied along the elevation gradients in the Pyrenees

Valley	Site	Elev (m asl)	Coordinates	Pheno_ tree	Spor_ filter	Spor_ biol	Inf	Pheno_ seedling	Frost
Gave	Laveyron	150	43°45'N, 00°13'W	10-28	8	1	8	60-80	7
	Ibos	400	43°07'N, 00°32'W	10-25	8		8	60	7
	Adé	450	43°08'N, 00°00'W	10-34		1			6
	Pierrefitte	650	42°56'N, 00°03'W	10-22					6
	Chèze	800	42°55'N, 00°02'W	10-25	8	1	8		7
	Bourdalats	1100	42°54'N, 00°06'W	10-29					7
	Gèdre Bas	1250	42°47'N, 00°01'E	10-28	8	1	8		7
	Gèdre Haut	1350	42°47'N, 00°02'E	10-27					7
	Péguère	1650	42°52'N, 00°07'E	10-27	8	1	8		4
Ossau	Josbaig	250	43°15'N, 00°44'W	10-26			8		5
	Bager	400	43°07'N, 00°32'W	18			8		
	Le Hourcq	850	42°54'N, 00°26'W	10-22			8		5
	Gabas	1200	42°53'N, 00°25'W	10-34			8		6
	Artouste	1600	42°53'N, 00°24'W	11-15			8		7

We show elevation (elev, rounded to the nearest 50 m asl), geographic coordinates (coordinates), minimum-maximum number of trees monitored per year for phenology over seven years (pheno_tree – we selected the first and last quartiles to represent the early- and late-flushing trees respectively, per population and per year, for both budburst and leaf unfolding dates), number of trees studied for spore dispersal (by filter trapping in this study over two years (spor_filter) or by biological trapping in a previous study [41] also over two years (spor_biol)), number of trees studied for the scoring of infection (inf), number of seedlings studied for phenology (pheno_seedling – one enclosed plot with one filter trap for 20 seedlings) and number of years studied for spring frost calculations (frost, years).

The study was carried out in two valleys of the Pyrenees in southern France (from 43°15'N, 00°44'W to 42°52'N, 00°07'E), as previously described [44]. A first transect was set up in the Gave valley (Hautes Pyrénées) and a second was established in the Ossau valley (Pyrénées Atlantiques) (Table 1). These two valleys, located 30 km apart, are parallel and display an increase in elevation from north to south. This region is characterized by a temperate oceanic climate, with a mean annual temperature of 12.4°C (1931–2011) at low elevation (Lourdes – 43°06'18''N, 00°03'42''W, Météo France) (see Table 2 for meteorological details). Mean annual temperatures decrease linearly with elevation, by about 0.43°C for every 100 m increase in elevation (mean from

2005–2011). In total, 14 natural established oak populations on south-facing slopes were monitored for the different experiments, from 131 to 1630 m above sea level, in hill and mountain vegetation belts (see Table 1). The range of elevation extended over 1499 m in the Gave valley and 1355 m in the Ossau valley. We used the terms “low-elevation” (< 500 m asl), “medium-elevation” (500-1000 m asl) and “high-elevation” (> 1000 m asl) to describe populations.

Meteorological measurements

Air temperature was recorded with data loggers (HOBO Pro RH/Temp, Onset Computer Corporation, Bourne, MA) at each study site (14

sites). All sensors were intercalibrated in the laboratory before installation. At each site, sensors were installed 1.5 m above the ground in an open area close to the studied population (10 to 100 m away from the plot, at the same elevation). Sensors were protected by a white plastic shelter, to prevent exposure to rain or direct sunlight. Data were recorded hourly, from 1 January 2005 to 31 October 2012. Several weather stations suffered short periods of technical failure. Years for which spring data were missing were not considered in the spring frost analyses.

Oak phenology monitoring

The timing of flushing was monitored along the two elevation gradients, for seven years (2005–2007 and 2009–2012) on adult trees and two years (2011–2012) on seedlings (Table 1). In each of the 14 populations, 10 to 34 dominant adult trees of similar height were monitored. The mean distance between studied trees within a population was 109 m in the Gave valley and 50 m in the Ossau valley. Trees were also selected for their phenology (first assessed in 2005), with the aim of capturing the widest possible variation (i.e. earliest and latest trees) for each population. We monitored 60 to 80 natural seedlings (20–30 cm high) protected in enclosed plots of 20 seedlings in the two low-elevation populations in the Gave valley. Bud development was monitored at 10-day intervals, in each population, from March to June. Observations were made by one or two trained observers with binoculars (magnifying power: x10), about 15 m away from adult trees. At each date, the proportion of buds at a given phenological stage was assessed for each adult tree [43]. We considered two successive stages of interest in terms of frost and disease damage: budburst and leaf unfolding. The date of budburst was defined as the day on which

50% of the tree buds had burst and the first leaves had started to emerge (first stage of low freezing resistance [52]). The date of leaf unfolding was defined as the date on which the first leaves of 50% of the buds had unfolded (beginning of the period of high susceptibility to powdery mildew [50]). For seedlings, we considered only the stage of the apical bud (i.e. budburst was the date on which the apical bud burst and its first leaves began to emerge and leaf unfolding was the date on which the first leaf of the apical bud was unfolded). The dates of the two stages were estimated, for each selected adult tree and seedling, by linear regression between two measurement campaigns. Finally, for each population, budburst and leaf unfolding dates were calculated as the means for the adult trees sampled. We selected the first and last quartiles as representative of the early- and late-flushing trees, respectively, per population and per year, for both budburst and leaf unfolding dates. We determined the length of the growing season by monitoring the timing of leaf senescence (i.e. the time point at which 50% of the leaves of the tree had changed color or fallen) similarly along the two gradients, from September to December.

Powdery mildew phenology monitoring

Phenological observations focused on spore release in spring in five Gave valley populations (see Table 1). The presence of spores was assessed by trapping, followed by molecular detection by specific PCR in 2011–2012. In each oak stand (see Table 1), eight traps were placed in the canopy of trees, at a height of about 10 m above ground level. Possible variation in fungal phenology linked to tree phenology was captured by selecting four early- and four late-flushing trees (based on 2005–2007 and 2009–2010 assessments), dispersed throughout the stand. One trap was also placed in

Table 2 Meteorological details at low (Lourdes) and high (Artigues) elevation in the Pyrenees, over a period of 50 years (1931-2011 at Lourdes, 1959-2013 at Artigues) and during the study (2005-2011) (Météo France).

	T _{mean} winter (°C)		Spring frost events (<i>n</i>)		Last spring frost event	
	Over 50 years	2005-2011	Over 50 years	2005-2011	Over 50 years	2005-2011
Lourdes	7.0	7.9	5	4	April 2	March 14
Artigues	2.3	2.5	11	7	May 9	May 6

Lourdes: 43°06'18"N, 00°03'42"W, 400 m asl; Artigues: 42°55'42"N, 00°12'18"E, 1200 m asl. We show winter mean temperature (T_{mean} winter, °C), number of frost events from March to May at Lourdes and from April to June at Artigues (spring frost events, *n*) and date of the last spring frost event (last spring frost event).

each enclosed plot of seedlings used for phenology monitoring. Spores were collected passively on Whatman® filter paper (24 cm in diameter) [53], [54] placed on a horizontal wooden support hanging in the oak canopy or fixed to a 50 cm tall wooden stake in the enclosed plot. Filters were sprayed with Tris-EDTA buffer (dilution 4X, pH=8) before exposure, to improve trapping capacity and spore preservation [55]. Filters were changed at regular intervals (15 days on average), from March to September in 2011, and from March to July in 2012. At the end of the exposure period, filters were individually placed in paper bags and brought back to the laboratory. Upon arrival, each filter was dried at ambient air temperature and then individually placed in a plastic bag and stored at -80°C until further processing. The spores were washed off the filters, by dispensing 40 ml of Tris-EDTA buffer warmed at 65°C into each plastic bag [53], [54]. A spore suspension was generated by backward and forward movements and friction. This suspension was poured into a Falcon® 50 ml tube (washings from 1 filter per tube). Tubes were stored at -20°C. We concentrated the spores on a support that could be used for DNA extraction, by filtering them with a filtration pump (Combisart® Systems from Sartorius Stedim Biotech). For each tube, the spores were filtered on a 47 mm-diameter sterile nitrocellulose membrane with 0.45 µm-diameter pores (Sartorius Stedim Biotech), a diameter smaller than that of the spores. The

membranes were cut into two equal halves with a scalpel, and each half was placed in a 2 ml Eppendorf® tube with two 2 mm-diameter steel beads. The samples were lyophilized and shaken for 2 minutes, at 30 Hz, in a Qiagen Tissue Lyser®. DNA was then extracted with a kit, used according to the manufacturer's instructions (Invisorb® Spin Plant Mini Kit from Invitek). For the amplification of specific fragments targeting *E. alphitoides*, *E. quercicola* and *E. hypophylla*, the oligonucleotide primers ery-F (5' CTC AGT CGT GGC ATC TGC T 3', [49]) and o-micro-rev (5' CGC CTC CAG CCG AAA CC 3', [55]), binding to the ITS1 region of rDNA, were used for PCR. For each sample we used, 1.5 µl of pure and 1:10-diluted DNA extracts (to dilute out potential PCR inhibitors) for PCR. A mixture of the following components was added to each DNA extract, for a final volume of 20 µl: 13.55 µl of distilled water, 2 µl of 10x PCR buffer (Life Technologies, Karlsruhe, Germany), 1.2 µl of 25 mM MgCl₂, 0.8 µl of dNTP, 0.4 µl of each primer and 0.15 µl of *Taq* DNA polymerase (Life Technologies, Karlsruhe, Germany). PCR was performed over 45 cycles (30 s at 94°C, 40 s at 55°C, 50 s at 72°C) preceded by a primary denaturation phase (3 minutes at 94°C) and followed by a terminal elongation phase (7 minutes at 72°C). The presence or absence of DNA was determined by agarose gel electrophoresis (2% polyacrylamide gel, migration for 25 minutes at 100 V). We selected two samples of PCR products per

tree, from 2011 and 2012, which were sequenced with the same oligonucleotide primers, by the Sanger method (dye-terminators), on an Applied Biosystems® 3730 sequencer (Life Technologies, Karlsruhe, Germany).

Powdery mildew spores were considered to be present in a given trap for a given exposure period if at least one of the four PCR tests (2 membranes x 2 dilutions) was positive. The date of trapping was defined as the date in the middle of the filter exposure period. For each tree, the beginning of the sporulation period was defined as the first date of spore detection. For several traps, we were unable to determine this date because some filters were absent or destroyed due to poor weather conditions.

Safety margins

Safety margins were calculated at tree level for the early- and late-flushing individuals in each population and year, for the biotic (powdery mildew safety margin, SM_{pm}) and abiotic (spring frost safety margin, SM_{sf}) stresses, as follows:

$$SM_{sf} = D_{bb} - D_{lsf}$$

where D_{bb} is the budburst date of a given tree (Julian days) and D_{lsf} is the date (in Julian days) of the last spring frost event (i.e. daily minimum temperature below 0°C) of the tree site. The spring frost safety margins were calculated for 13 populations along the Gave and Ossau gradients, from 2005 to 2012 (see Table 1 for details).

$$SM_{pm} = D_{sp} - (D_{lu} + 20)$$

where D_{sp} is the date on which powdery mildew sporulation began (Julian days), defined for each site and year as the date for which spores were

trapped in at least 75% of the traps placed in adult trees (as determined by observation or interpolation between two exposure campaigns), and D_{lu} is the leaf unfolding date (Julian days) plus 20 days, to account for the period of susceptibility of young leaves to powdery mildew ([50] and personal observations). Powdery mildew safety margins were calculated for six populations along the Gave gradient, in 2006-2007 and 2001-2012 (see Table 1 for details and [41] for additional data for powdery mildew sporulation dates in 2006-2007).

A positive safety margin therefore indicates a high probability of the biotic or abiotic stress concerned being avoided by the trees, whereas a negative safety margin indicates a high probability of exposure to the stress concerned. Finally, a safety window was estimated as the difference in days between the date of the beginning of powdery mildew sporulation (D_{sp}) and the date of the last spring frost event (D_{lsf}).

Assessment of powdery mildew infection

Powdery mildew infection was assessed at the end of July, in five populations in the Gave valley (2011 and 2012) and five populations in the Ossau valley (2012) (see Table 1). For the Gave valley populations, we monitored the same trees and seedlings as were used for spore trapping. For the Ossau valley populations, we monitored four early- and four late-flushing adult trees (based on 2005-2007 and 2009-2011 assessments). For each studied oak, we collected a single twig from each of the four cardinal points (North, South, East and West) in the canopy, at a height of about 10 m, with a pole pruner, when possible. Two leaves were randomly chosen from the first growth cycle on each shoot (second flushes were quite rare). The infection of each leaf was assessed by eye, by trained observers,

as the percentage of the leaf area covered by mycelium. A magnifying glass was used to facilitate this assessment if necessary. The percentage infection per tree was calculated as the mean infection level of the eight leaves. For the seedlings, infection was estimated as the percentage of the leaf area covered by mycelium, for the whole plant.

Statistical analyses

We used a general linear model to test the effects of elevation, phenological phenotype (early- vs. late-flushing) and their interaction on frost and powdery mildew safety margins (for both seedlings and adult trees) (PROC GLM, SAS). For adult trees, infection was also analyzed, with a general linear model, after data log transformation, with phenological phenotype, elevation, valley x year interaction, valley x year x elevation interaction and phenological phenotype x elevation interaction as effects. We carried out a Tukey test to compare mean infection values between sites. For seedlings, infection was analyzed as a binary variable (0: uninfected; 1: infected, due to the small number of seedlings infected, with low levels of damage), with a logistic model, with phenological phenotype, elevation x year interaction and elevation x year x phenological phenotype interaction as effects (PROC LOGISTIC, SAS). If interaction with phenological phenotype was found to be significant in infection and safety margin models, separate analyses were carried out by site. We investigated whether safety margin was a good predictor of damage (i.e. infection), by carrying out a general linear model analysis, by site, for both seedlings and adult trees. The distribution of residuals was analyzed by Q-Q plots, the plotting of a distribution histogram, skewness, kurtosis and Shapiro-Wilk tests (PROC UNIVARIATE, SAS) and by

comparisons of predicted vs. observed data plots, to check the validity of the models. The correlation between leaf unfolding and the start of powdery mildew sporulation dates within populations was analyzed by calculating a Pearson's correlation coefficient from the centered-reduced values per tree (mean and standard deviation calculated for each site and year) (PROC CORRELATION, SAS). For comparisons of sporulation start dates between seedlings and trees, we used a general linear model per year and per elevation. All statistical analyses were performed with SAS 9.2 software (SAS Institute Inc. 2011).

Results

Phenological variations within and between populations

The dates of budburst and leaf unfolding were strongly correlated (slope=1.009, $r^2=0.99$, $P<0.0001$), with a mean of four days between the two dates. The mean dates of leaf unfolding and sporulation at population level were significantly and positively correlated with elevation (Table 3; see Fig. 1, for example). However, the pattern of change in phenology with elevation differed considerably between oak and powdery mildew: oak had a much stronger response to elevation (leaf unfolding delayed by 3.3 days per 100 m increase in elevation) than powdery mildew (0.6 days.100m⁻¹) (Table 3). The length of the growing season was significantly negatively correlated with elevation (-4.5 days.100m⁻¹) (Table 3).

At low elevation, leaf unfolding occurred a mean of five days later in seedlings than in adult trees. The variability of leaf unfolding phenology for seedlings was almost as high as that for trees (mean of 26 days between the seedlings unfolding their

Table 3 Linear regressions between the timing of leaf unfolding, the timing of sporulation, growing season length (GSL), spring frost (SM_{sf}) and powdery mildew (SM_{pm}) safety margins, and elevation.

	Leaf unfolding	Sporulation	GSL	SM_{sf}	SM_{pm}
Slope	0.033	0.0063	-0.045	-0.018	-0.024
Range	93 – 142	110 – 117	150 – 215	-10 – 17	-44 – -6
r^2	0.85	0.27	0.80	0.44	0.98
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

We show the slope, the p -value (P), the coefficient of regression (r^2) of the linear regression and the range between the lowest and the highest elevations (in Julian days for leaf unfolding and sporulation; in days for GSL and safety margins). The timing of leaf unfolding and growing season length were monitored in 14 populations in seven years (2005-2007; 2009-2012), the timing of sporulation and SM_{pm} were assessed in six populations in four years (2006, 2007, 2011 and 2012), and SM_{sf} was calculated for 13 populations over a period of seven years (2005-2012) (see Table 1 for details).

leaves earliest and last). For adult trees, the timing of leaf unfolding showed greater year-to-year fluctuations at high elevation than at low elevation (individual standard deviation = 9.2 and 5.8 on average, respectively; $y=0.87x^{0.33}$, $r^2=0.42$, $P<0.0001$) (Fig. S1). This difference was not related to greater differences between winter and spring temperatures at high elevation than at low elevation (mean standard deviation = 1.0 ± 0.06 , from the beginning of February to the end of May in 2004-2012).

Frost and powdery mildew exposure along the elevation gradient

Safety margins for both spring frost and powdery mildew decreased significantly with increasing elevation (Table 3) (Fig. 2). However, this pattern was more pronounced for powdery mildew safety margins. For both stresses, the same negative trend was observed for both early- and late-flushing individuals (Fig. 2). In adult trees, budburst generally occurred well after the last spring frost event, whatever the elevation (see Fig. 1 as an example). The spring frost safety margin was positive for 72% of the tree-per-year observations. Negative spring frost safety margins were observed mostly above 1300 m asl (Fig. 2). By contrast, the

powdery mildew safety margin was mostly negative, in all populations (Fig. 2). The powdery mildew safety margin was positive for only 8% of trees, these trees being located at low elevation. Safety margins varied considerably between trees within a population, for both powdery mildew and spring frost stresses ($P<0.0001$ and $P=0.015$ for phenology x elevation interaction, respectively) (Fig. 2). Moreover, the duration of the safety window decreased significantly with increasing elevation, from 29 days to -13 days on average (slope=-0.033, $r^2=0.50$, $P<0.0001$ — data not shown, but see Fig. 1, as an example).

Frost and powdery mildew exposure within populations

A large variation in the date of first spore detection was observed between the traps on different adult trees within sites in a single year, particularly at low elevations in 2012 (Fig. 3). However, powdery mildew phenology was not correlated with oak phenology within populations (Pearson correlation=0.023, $P=0.85$) (Fig. 3). Sporulation was detected earlier (about one month) in seedling traps than in adult tree traps at 150 m asl in 2012 ($P=0.0051$), but no difference was observed in 2011 ($P=0.85$) neither at 400 m asl in 2012 ($P=0.27$).

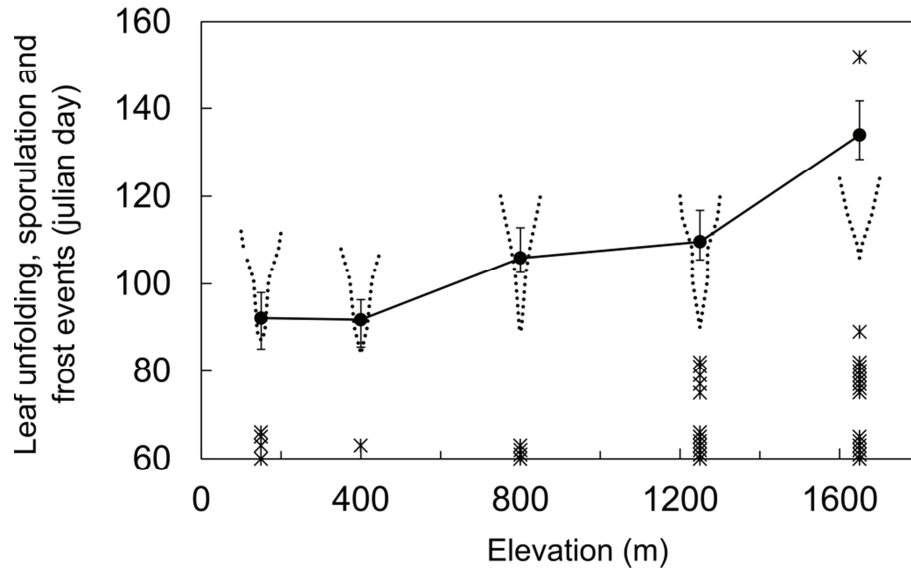


Figure 1. Synchrony between spring frost events, powdery mildew sporulation and oak phenology. We show the mean date of sessile oak leaf unfolding (error bars representing the difference between the first and the last dates of leaf unfolding), dates of spring frost events (negative daily minimum temperature) and the beginning of the powdery mildew sporulation period (funnels) at five sites along the Gave elevation gradient in 2011. The funnels start on the date at which the first spores were trapped on a tree within a population. The width of the funnels then represents the numbers of spores in the oak populations, based on a semi-quantitative method and PCR results. The funnels stop when spore levels peak, these levels then remaining constant for the rest of the season. Stars: spring frost events; open circles: leaf unfolding.

Only *E. alphitoides* was detected in all the samples studied, on the basis of its ITS sequence.

The powdery mildew safety margin was 15 days longer, on average, for early-flushing adult trees than for late-flushing adult trees ($P < 0.0001$) (Fig. 2). However, only early-flushing trees at low elevation had a positive or weakly negative SM_{pm} , enabling them to avoid powdery mildew spores (Fig. 1 and Fig. 2). Overall, the powdery mildew safety margin was positive for 15% of the early-flushing trees vs. only 2% of the late-flushing trees. Conversely, the spring frost safety margin was shorter, by 11 days on average, for early-flushing trees than for late-flushing trees ($P < 0.0001$) (Fig. 2). The difference was significant for all populations ($P < 0.05$) other than those at 850 m and 1600 m ($P = 0.31$ and 0.29 , respectively). The spring frost safety margin tended to be negative from 1030 m upwards for early-flushing trees, and from 1510

m upwards for late-flushing trees (Fig. 2). The spring frost safety margin was positive for 66% of the early-flushing trees vs. 78% of the late-flushing trees. The spring frost safety margin was also positive for both early- and late-flushing seedlings ($SM_{sf} = 27$ days and 49 days, on average, at 150 m and 400 m, respectively), whereas the powdery mildew safety margin was negative ($SM_{pm} = -9$ days and -18 days on average, at 150 m and 400 m asl, respectively). As for adult trees, powdery mildew safety margins were higher for early-flushing seedlings than late-flushing seedlings ($P < 0.0001$), whereas the opposite pattern was observed for spring frosts ($P < 0.0001$) (Fig. S2).

Powdery mildew infection

Infection levels at 200 m asl were lower (3% of the leaf area infected on average) than those at higher elevations, 13% on average (Fig. 4; significant

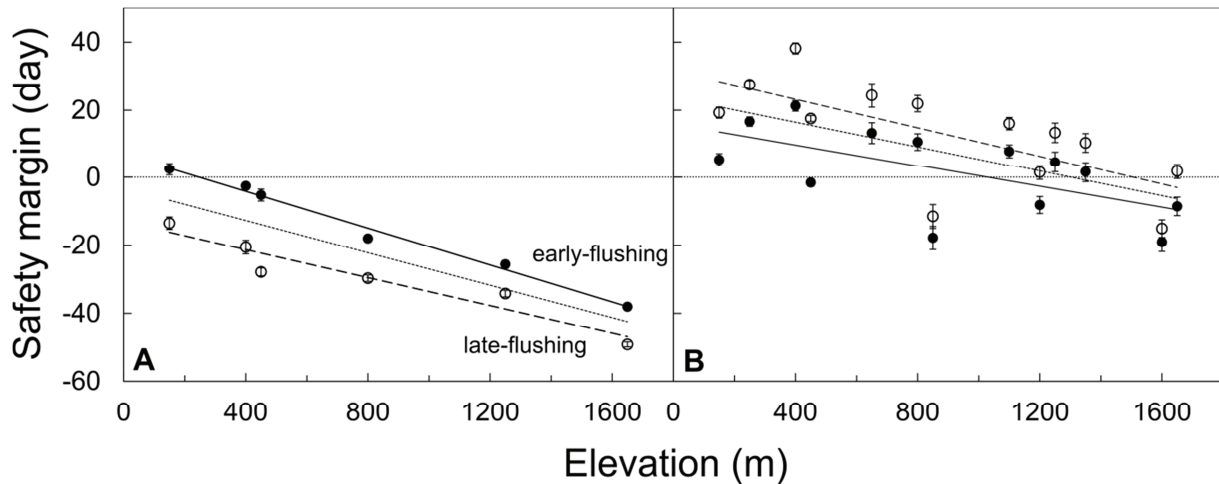


Figure 2. Variation of powdery mildew (A) and spring frost (B) safety margins in oak populations as a function of elevation. Safety margins were calculated for early- and late-flushing sessile oak trees (mean $\pm$ SEM). Powdery mildew safety margins were calculated for six oak populations along the Gave gradient, in 2006-2007 and 2011-2012; see Table 1 for details (early-flushing: slope=-0.027, $r^2=0.99$, $P<0.0001$; late-flushing: slope=-0.021, $r^2=0.92$, $P<0.0001$). Spring frost safety margins were calculated for 13 populations along the Gave and the Ossau gradients, from 2005 to 2012; see Table 1 for details (early-flushing: slope=-0.015, $r^2=0.38$, $P<0.0001$; late-flushing: slope=-0.021, $r^2=0.48$, $P<0.0001$). Closed circles: early-flushing trees; open circles: late-flushing trees; solid line: early-flushing trees; dashed line: late-flushing trees; dotted line: average of early- and late-flushing trees.

difference between 200 m and higher elevations in Tukey tests). A year $\times$ valley interaction effect on infection was found ($P<0.0001$), but there was no effect of a valley $\times$ year $\times$ elevation interaction ($P=0.17$). At low elevations, late-flushing trees were much more heavily infected than early-flushing trees ($P=0.004$ and $P=0.0001$ at 200 and 400 m asl, respectively), whereas at medium and high elevations, infection levels were similar on early- and late-flushing trees ($P=0.43$, $P=0.88$ and $P=0.22$ at 800, 1200 and 1600 m asl, respectively) (Fig. 4). Significant effects of phenology, elevation and elevation $\times$ phenology interaction on infection were detected ($P<0.0001$, $P<0.0001$ and $P=0.0054$, respectively). Infection was strongly related to safety margin at low elevations ($P=0.0001$ and $P=0.0095$ at 150 and 400 m asl, respectively), whereas no correlation was demonstrated at medium and high elevations ($P=0.70$, $P=0.52$ and $P=0.77$ at 800, 1250 and 1650 m, respectively). Infection levels were much lower on seedlings than on adult trees (1.3% and 11% of the leaf area

infected, respectively). At both elevations, a larger number of individuals were infected among late-flushing seedlings than among early-flushing seedlings (55% versus 17% at 150 m, 33% versus 17% at 400m), but this difference was significant only at 150 m ($P=0.013$ and $P=0.38$ at 150 and 400 m, respectively) (Fig. S3). No effect of elevation $\times$ year and elevation $\times$ year $\times$ phenology interactions on seedling infection was detected ($P=0.68$ and $P=0.53$, respectively). Seedling infection levels were correlated with safety margin at 150 m, but not at 400 m ($P=0.0039$ and $P=0.30$, respectively).

Discussion

Our study is one of the first to assess simultaneously the interactions of exposure to abiotic and biotic stresses with tree phenology. One striking result of this study was the considerable variation of spring frost and disease safety margins between oak populations as a function of elevation and within populations as a function of the phenological phenotype of trees (early- vs. late

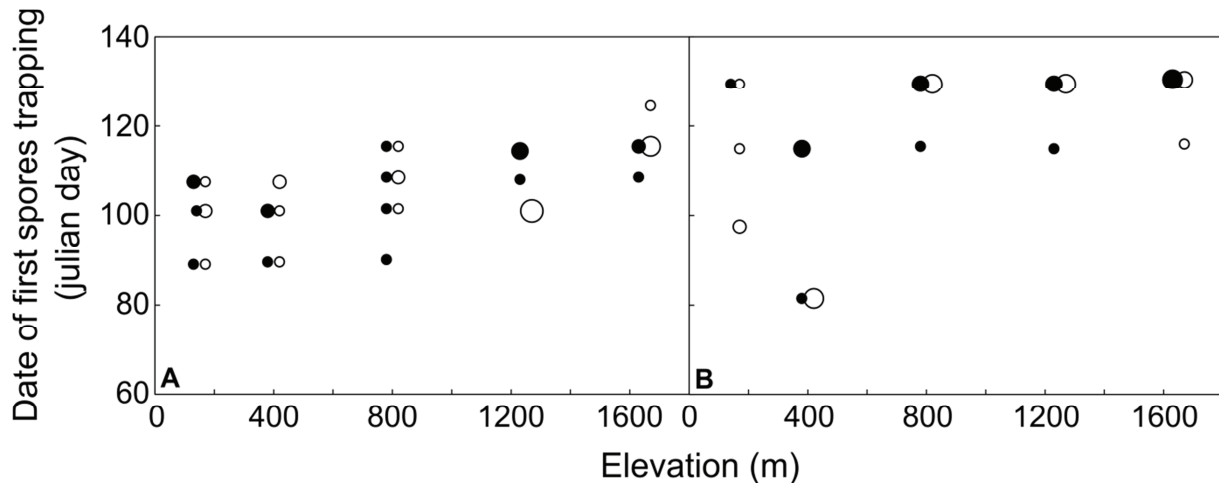


Figure 3. Comparison of the timing of powdery mildew sporulation between oak phenological phenotypes. The dates on which the first powdery mildew spores were trapped are shown for early- and late-flushing sessile oak trees, as a function of elevation. Trapping was monitored in five oak populations along the Gave elevation gradient in 2011 (*a*) and 2012 (*b*). The size of the dots is proportional to the number of trees for which the first spores were trapped on the day concerned (from one to four trees). Closed circles: early-flushing trees; open circles: late-flushing trees.

-flushing). Spring frost safety margins were generally positive, indicating an avoidance of spring frost in most situations. By contrast, most trees were exposed to and, indeed, infected by powdery mildew. This suggests that the local adaptation of oaks for spring frost avoidance is better than that for disease avoidance. For both stresses, safety margins tended to decrease along the elevation gradient, resulting in higher levels of stress exposure at high elevation. At low elevation, early-flushing trees were able to avoid disease but were potentially at risk of spring frost damage, whereas late-flushing trees avoided frost but not powdery mildew. No such contrasts in exposure were observed at high elevations. These findings may account for the high intrapopulation diversity observed at low elevation and its decline with increasing elevation [24].

Variation in abiotic and biotic stress avoidance along the elevation gradient

The observed phenological patterns may be interpreted from an evolutionary perspective. The positive nature of the spring frost safety margin for

most trees along the elevation gradients is consistent with an effect of past natural selection to avoid spring frost damage. In particular, it would explain the genetic variation of flushing timing along elevation gradients observed in previous studies (as discussed in [52], [56]). However, selection to avoid late spring frosts would not have been fully effective at higher elevations, because negative safety margins were observed, particularly for early-flushing trees. This situation may result from a balance between strong constraints affecting the timing of flushing in opposite ways. Budburst is related to tree fitness in two ways: it establishes the length of the growing season [3], [4] and it is strongly correlated with the timing of flowering ([57], Delzon S. personal observations). At high latitude or elevation, fitness is more strongly correlated with the ability of fruit to ripen fully rather than with the probability of survival [5], [58]. This favors early flowering and, thus, early budburst, possibly at the expense of spring frost damage. The oak populations at 1600 m were almost at the tree line for this species [59], [60], [61], i.e. the edge of the habitat in which these trees can thrive. The growing season was found to be short at such elevations. The presence of strong

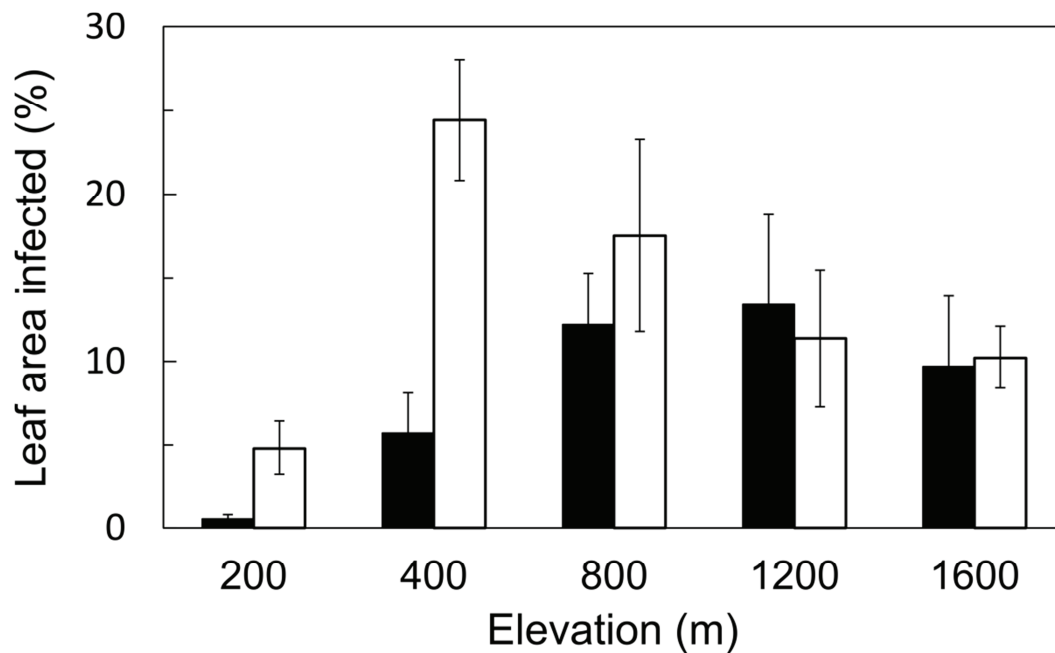


Figure 4. Differences in the percentage leaf area infected with powdery mildew between early- and late-flushing oak trees. Infection was monitored in five sessile oak populations along the Gave gradient (2011-2012) and five sessile oak populations along the Ossau gradient (2012) (mean percentage $\pm$ SEM). Percentages by elevation correspond to the sites of both valleys at this elevation $\pm$ 50 m. Black bars: early-flushing trees, white bars: late-flushing trees.

constraints on the timing of flushing at high elevation is consistent with the minimal variation in early spring phenology between trees in a given year (expressing genetic variation). However, trees displayed a high degree of plasticity, as demonstrated by the high year-to-year fluctuations in the timing of flushing. This is consistent with the predictions of Pau *et al.* [8] that trees at high elevations, which put out leaves in harsh physical conditions, are likely to be more sensitive to climate (temperature) cues.

Unlike late frost safety margins, safety margins for powdery mildew were mostly negative, indicating an absence of avoidance. Most trees were indeed infected, but infection levels remained moderate. This may explain the lesser importance of disease pressure than of late frost damage as a potential selective factor. The elevation cline in the timing of oak flushing determined by abiotic pressures thus mechanically led to exposure to powdery mildew. Indeed, the relationship between spring phenology

and elevation differed significantly between the parasite and its host, with the parasite being much less responsive than its host. Consequently, oak populations were increasingly exposed to powdery mildew with increasing elevation. However, both tree characteristics (lower height, foliage densities) and environmental conditions (shorter growing season, lower temperatures) become increasingly unfavorable to powdery mildew development with increasing elevation [40], probably accounting for the absence of a large increase in infection at elevations above 400 m asl.

Variation of stress avoidance within populations

At low elevations, phenological differences between trees resulted in contrasting exposures to biotic and abiotic stresses. Both early- and late-flushing trees were likely to avoid spring frosts, although 24% of the early-flushing trees were nevertheless exposed to frost. However, only early-flushing trees avoided powdery mildew exposure.

Our observations suggest that the “spore cloud” reached all the trees at a given site at about the same time. No spatial effects on the variation in the first spore trapping results obtained within a site were observed (spatial analysis, performed with Arcgis 10.2 software; data not shown). Moreover, we found no difference in the timing of spore trapping as a function of host tree phenology. This suggests that no local phenological adaptation of powdery mildew populations occurred in response to variation within oak populations, by contrast to reports of the local adaptation of powdery mildew strains, at tree level, in terms of their ability to infect trees [62], [63]. A lack of local adaptation of powdery mildew to achieve phenological synchrony with its host has already been reported over a larger spatial scale [41]. This contrasts with findings for other antagonistic interactions with oaks (e.g. for caterpillars), for which adaptive demes have been observed at very fine spatial scales [36]. Early- and late-flushing trees were thus exposed to different powdery mildew pressures (spore concentrations) during the flushing period, in populations growing at low elevation. This resulted in higher levels of infection in late-flushing trees than in early-flushing trees. At low elevation, biotic (powdery mildew) and abiotic (spring frost) stresses therefore favored opposite phenological phenotypes. Such opposite selection forces may have contributed to the maintenance of local diversity in the timing of oak flushing observed at low elevation. The large difference between the last spring frost date and the sporulation date (i.e. the safety window) at low elevation makes it possible for oak populations to maintain this diversity, with early-flushing trees avoiding powdery mildew disease (and possibly damage due to other defoliators) and having a longer growing season, and late-flushing trees being more likely to survive late spring frost events [2], [45]. Selection to avoid

powdery mildew may also be stronger at low elevation, where environmental conditions are more favorable to disease development and spring frosts occur more rarely.

At low elevation, seedlings displayed the same trends as adult trees, with early-flushing seedlings being at an advantage with respect to powdery mildew, and late-flushing seedlings being at an advantage with respect to spring frosts. It was important to check this aspect because selection pressures on tree species are strongest during the juvenile stage. Seedlings were nevertheless little infected in our conditions, probably due to the less favorable environmental conditions for powdery mildew encountered in the understorey [51].

Avoidance of versus resistance to biotic and abiotic stresses

Organisms have adapted by evolving various mechanisms of defense (*sensu lato*) to any abiotic or biotic stress with which they may be faced. If total avoidance is not possible or effective, organisms can limit the deleterious effects of the random events to which they are exposed by resistance. Resistance involves two processes: resistance *sensu stricto*, which limits the level of damage, and tolerance, which reduces the negative consequences of damage for fitness [64], [65]. During winter, leaf tissues enclosed within buds remain frost hardy, but freezing resistance gradually decreases until flushing [52], [56]. Young leaves are then particularly vulnerable to frost and disease, with their high concentrations of water and nitrogen in addition to their low levels of toughness (i.e. no physical resistance against frost or disease) [56], [66], [67].

The avoidance of spring frost by late flushing may be a major adaptive process along the elevation gradient, and the principal component of frost defense [30]. Spring frost damage decreases leaf area, affecting the energy and carbon budget of trees during refoliation and potentially decreases the length of the growing season [38], [68], [69]. Trees have optimized the timing of budburst in relation to the probability of frost in spring, by developing complex mechanisms of chilling/thermal time requirement and photoperiod [46], [56], [70]. By delaying flushing, trees maintain their winter frost resistance for as long as possible, relative to adjustments of growing season length. Late flushing may be particularly critical if frost resistance is low. Indeed, Lenz *et al.* [52] found a negative correlation between flushing date and freezing resistance in several tree species, with *Q. petraea* among the least resistant during bud burst and leaf unfolding. In this species, a frost avoidance strategy may therefore prevail over resistance.

There have been far fewer studies of the adaptive avoidance of pathogens in trees (but see [35]). This situation also contrasts with the large number of observations relating to insect herbivory. Aide [71] demonstrated that earlier leaf production (during the dry season) may be an important seasonal defense mechanism protecting young leaves against herbivores. Moreover, Tikkanen and Julkunen-Tiitto [34] demonstrated that high levels of phenological variation in leaf production at the population level may limit the colonization of neighboring trees by dispersing insect larvae. Conversely, simultaneous leaf emergence may be an effective defense strategy if leaf biomass production exceeds the consumption capacity of herbivorous insects [72]. Avoidance may be a key component of plant defense strategies, but

resistance and tolerance mechanisms are generally thought to play a critical role in the adaptation of plants to pathogens [37], [73], [74], [75]. Mechanisms of resistance and tolerance to powdery mildews have been well documented [40], [76]. Unlike frost events, biotic stresses usually occur in a more diffuse manner, in a tree population or tree canopy. This facilitates the implementation of induced resistance, which is commonly used by sessile organisms to defend themselves against diseases or pests, particularly in the absence of physical resistance mechanisms [77], [78]. Resistance usually occurs at a certain cost to the plant [79], [80], [81], but induced resistance may nevertheless be a less costly strategy than constitutive resistance, because it is expressed only in the presence of the biotic stressor [82], [83]. Thus, at low elevation (where environmental conditions are highly favorable to the fungus), oak defenses against powdery mildew may be based on both avoidance and resistance. At higher elevations and lower disease avoidance levels, oak resistance to powdery mildew would be sufficient to ensure that infection rates remained moderate, due to less favorable environmental conditions for pathogen populations. Moreover, Alcazar *et al.* [84] have shown that temperature interacts with host resistance signaling systems; resistance may therefore be more effective at higher elevations.

Implications in a context of climate change

Local patterns of adaptation resulting from past selection processes may not be adequate in the face of rapid changes in environmental conditions. Climate change is causing many trees to flush earlier in spring, exposing them to new stresses [85]. Several studies have found that this major advance in the date of leaf unfolding may increase the frequency of spring frost damage [15], [68] in

Northern and Eastern Europe], [86]. However, some studies have indicated that spring frost risk is declining with climate change, because the date of the last frost is advancing more rapidly than flushing dates [68 in Western Europe], [87], [88]. This pattern may also be accentuated if the timing of flushing does not advance because chilling requirements remain unmet [46], [89], [90]. Climate change will also alter the phenological relationships between interacting species, because responses to climate change may differ between species [91], [92], as shown here for powdery mildew and oak. There may also be an impact on the frequencies of pest outbreaks and the sporulation and colonization success of fungal pathogens (reviewed in [27]). Given the complexity of climatic effects on the exposure of trees to biotic and abiotic stresses, process-based models of tree and fungus phenology (including chilling and thermal requirements) will be required to explore outputs in the future, using local climate scenarios.

Acknowledgments

We thank Dominique Piou for valuable comments on the study and Jean-Marc Louvet for field assistance. Sequencing was performed at the Genomic and Sequencing Facility of Bordeaux (grants from the *Conseil Régional d'Aquitaine* no. 20030304002FA and 20040305003FA and from the European Union, FEDER no. 2003227 and from *Investissements d'avenir, Convention attributive d'aide* No.ANR-10-EQPX-16-01).

Fundings sources

Cécile Dantec benefitted of a doctoral scholarship from the INRA department of Ecology of Forests, Grasslands and Freshwater and the Région Aquitaine (“Phénologie et Stratégies Temporelles”

project). The ANR MeCC 13-ADAP-0006-03 “Mechanisms of adaptation to Climate Change: how will phenotypic plasticity, microevolution and migration affect forest trees phenology?” also supported this work.

References

1. Fenner M (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspect Plant Ecol* 1:78–91
2. Bennie J, Kubin E, Wiltshire A, Huntley B, Baxter R (2010) Predicting spatial and temporal patterns of bud-burst and spring frost risk in north-west Europe: the implications of local adaptation to climate. *Global Change Biol* 16:1503–1514
3. Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann Sci For* 46:631s–647s
4. Borchert R (1999) Climatic periodicity, phenology, and cambium activity in tropical dry forest trees. *IAWA J* 20:239–247
5. Morin X, Viner D, Chuine I (2008) Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. *J Ecol* 96:784–794
6. Chmielewski FM, Rötter T (2001) Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agr Forest Meteorol* 108:101–112
7. Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421:37–42
8. Pau S, Wolkovich EM, Cook BI, Davies TJ, Kraft NJB, Bolmgren K, Betancourt JL, Cleland EE (2011) Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. *Global Change Biol* 17:3633–3643
9. Oleksyn J, Modrzynski J, Tjoelker MG, Zytowskiak R, Reich PB, Karolewski P (1998) Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common

- garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Funct Ecol* 12:573–590
10. Conover DO, Duffy TA, Hice LA (2009) The covariance between genetic and environmental influences across ecological gradients: reassessing the evolutionary significance of countergradient and cogradient variation. *Ann N Y Acad Sci* 1168:100–129
 11. Kremer A, Potts BM, Delzon S (2014) Genetic divergence in forest trees: understanding the consequences of climate change. *Funct Ecol* 28:22–36
 12. Baliuckas V, Lagerstrom T, Norell L, Ersson G (2005) Genetic variation among and within populations in Swedish species of *Sorbus aucuparia* L. and *Prunus padus* L. assessed in a nursery trial. *Silvae Genet* 54:1–8
 13. Kremer A, Le Corre V, Petit R, Ducousso A (2010) Historical and contemporary dynamics of adaptive differentiation in European oaks. In: DeWoody JA, Bickham JW, Michler CH, Nichols KM, Rhodes Jr. OE, Woeste KE (eds) *Molecular approaches in natural resource conservation and management*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 101–122
 14. Salmela MJ, Cavers S, Cottrell JE, Iason GR, Ennos RA (2013) Spring phenology shows genetic variation among and within populations in seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Scottish Highlands. *Plant Ecol Divers* 6:523–536
 15. Kramer K (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell Environ* 18:93–104
 16. Vitasse Y, Bresson CC, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2010) Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Funct Ecol* 24:1211–1218
 17. Fordyce JA (2006) The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 209:2377–2383
 18. Whitman DW, Agrawal AA (2009) What is phenotypic plasticity and why it is important? In: Whitman DW and Ananthakrishnan TN (eds) *Phenotypic plasticity of insects*. Science Publishers, pp 1–63
 19. Ducousso A, Guyon JP, Kremer A (1996) Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). *Ann Sci For* 53:775–782
 20. Jensen JS, Hansen J (2008) Geographical variation in phenology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur* L. oak grown in a greenhouse. *Scand J Forest Res* 23:179–188
 21. Wagner GP, Booth G, Bagheri-Chaichian H (1997) A population genetic theory of canalization. *Evolution* 51:329–347
 22. Elzinga JA, Atlan A, Biere A, Gigord L, Weis AE, Bernasconi G (2007) Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends Ecol Evol* doi:10.1016/j.tree.2007.05.006
 23. Donnelly A, Caffarra A, Kelleher CT, O'Neill BF, Diskin E, Pletsers A, Proctor H, Stirnemann R, O'Halloran J, Peñuelas J, Hodkinson TR, Sparks TH (2012) Surviving in a warmer world: environmental and genetic responses. *Clim Res* 53:245–262
 24. Alberto F, Niot J, Derory J, Lepais O, Vitalis R, Galop D, Kremer A (2010) Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Mol Ecol* 19:2626–2639
 25. Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, Guillaume F, Bohrer G, Nathan R, Bridle JR, Gomulkiewicz R, Klein EK, Ritland K, Kupanen A, Gerber S, Schueler S (2012)

- Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecol Lett* 15:378–392
26. Soularue JP, Kremer A (2012) Assortative mating and gene flow generate clinal phenological variations in trees. *BMC Evol Biol* 12:79–92
 27. Lindner M, Maroschek M, Netherer S, Kremer A, Barbati A, Garcia-Gonzalo J, Seidl R, Delzon S, Corona P, Kolström M, Lexer MJ, Marchetti M (2010) Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecol Manag* 259:698–709
 28. Lockhart JA (1983) Optimum growth initiation time for shoot buds of deciduous plants in a temperate climate. *Oecologia* 60:34–37
 29. Leinonen I, Hänninen H (2002) Adaptation of the timing of bud burst of Norway spruce to temperate and boreal climates. *Silva Fenn* 36:695–701
 30. Gomory D, Paule L (2011) Trade-off between height growth and spring flushing in common beech (*Fagus sylvatica* L.). *Ann For Sci* 68:975–984
 31. Rathcke B, Lacey EP (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Ann Rev Ecol Syst* 16:179–214
 32. Polgar CA, Primack RB (2011) Leaf-out phenology of temperate woody plants: from trees to ecosystems. *New Phytol* 191:926–941
 33. Pilson D (2000) Herbivory and natural selection on flowering phenology in wild sunflower, *Helianthus annuus*. *Oecologia* 122:72–82
 34. Tikkanen OP, Julkunen-Tiitto R (2003) Phenological variation as protection against defoliating insects: the case of *Quercus robur* and *Operophtera brumata*. *Oecologia* 136:244–251
 35. Ghelardini L, Santini A (2009) Avoidance by early flushing: a new perspective on Dutch elm disease research. *iForest* 2:143–153 [online: 2009-07-30 URL: <http://www.sisef.it/iforest/show.php?id=508>]
 36. van Asch M, Visser ME (2007) Phenology of forest caterpillars and their host trees: the importance of synchrony. *Annu Rev Entomol* 52:37–55
 37. Combes C (2001) Les associations du vivant: l'art d'être parasite. Flammarion, Paris
 38. Agrawal AA, Conner JK, Stinchcombe JR (2004) Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol Lett* 7:1199–1208
 39. Alberto F, Bouffier L, Louvet JM, Lamy JB, Delzon S, Kremer A (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 24:1442–1454
 40. Glawe DA (2008) The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 46:27–51
 41. Desprez-Loustau ML, Vitasse Y, Delzon S, Capdevielle X, Marçais B, Kremer A (2010) Are plant pathogen populations adapted for encounter with their host? A case study of phenological synchrony between oak and an obligate fungal parasite along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 23:87–97
 42. Lobo JA, Quesada M, Stoner K, Fuch EJ, Herrerías-Diego Y, Rojas J, Saborío G (2003) Factors affecting phenological patterns of bombacaceous trees in seasonal forests in Costa Rica and Mexico. *Am J Bot* 90:1054–1063
 43. Vitasse Y, Delzon S, Dufrêne E, Pontailleur JY, Louvet JM, Kremer A, Michalet R (2009) Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: Do within-species populations

- exhibit similar responses? *Agr Forest Meteorol* 149:735–744
44. Vitasse Y, Porté AJ, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2009) Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia* 161:187–198
 45. Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A (2009) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can J For Res* 39:1259–1269
 46. Laube J, Sparks TH, Estrella N, Höflers J, Ankerst DP, Menzel A (2013) Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Global Change Biol* doi: 10.1111/gcb.12360
 47. Mougou A, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2008) New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *For Path* 38:275–287
 48. Mougou-Hamdane A, Giresse X, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2010) Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Ann For Sci* 67:212–220
 49. Hewitt HG, Ayres PG (1975) Changes in CO₂ and water vapour exchange rates in leaves of *Quercus robur* infected by *Microsphaera alphitoides* (powdery mildew). *Physiol Plant Pathol* 7:127–137
 50. Edwards MC, Ayres PG (1982) Seasonal changes in resistance of *Quercus petraea* (sessile oak) leaves to *Microsphaera alphitoides*. *T Brit Mycol Soc* 78: 569–571
 51. Marçais B, Desprez-Loustau ML (2014) European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Ann For Sci* doi: 10.1007/s13595-012-0252-x
 52. Lenz A, Hoch G, Vitasse Y, Körner C (2013) European deciduous trees exhibit similar safety margins against damage by spring freeze events along elevational gradients. *New Phytol* doi: 10.1111/nph.12452
 53. Garbelotto M, Smith T, Schweigkofler W (2008) Variation in rates of spore deposition of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, over a 12-month-period at two locations in Northern California. *Phytopathology* 98:137–143
 54. Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M (2004) Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* 70:3512–3520
 55. Heuser T, Zimmer W (2002) Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 209:295–299
 56. Cannell MGR (1997) Spring phenology of trees and frost avoidance. *Weather* 52:46–52
 57. Franjic J, Sever K, Bogdan S, Skorvc Z, Krstonosic D, Aleskovic I (2011) Phenological asynchronization as a restrictive factor of efficient pollination in clonal seed orchards of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Croat J For Eng* 31:141–156
 58. Morin X, Augspurger C, Chuine I (2007) Process-based modeling of species' distributions: What limits temperate tree species' range boundaries? *Ecology* 88:2280–2291
 59. Vitasse Y, Hoch G, Randin CF, Lenz A, Kollas C, Körner C (2012) Tree recruitment of European tree species at their current upper elevational limits in the Swiss Alps. *J Biogeogr* 39:1439–1449

60. Aubert S (2001) Limite supérieure de la forêt, climat et anthropisation: dynamique tardiglaciaire et holocène de la végétation dans la vallée du Marcadau (Hautes-Pyrénées, France). Thèse de doctorat, Université Toulouse III, pp. 365
61. Belet JM (2001) Variations tardiglaciaires et Holocène de la limite supérieure de la forêt dans les Pyrénées centrales: exemple du vallon d'Estibère (Hautes Pyrénées, France). Thèse de doctorat, Université Toulouse III, pp. 241
62. Roslin T, Laine AL, Gripenberg S (2007) Spatial population structure in an obligate plant pathogen colonizing oak *Quercus robur*. *Funct Ecol* 21:1168–1177
63. Desprez-Loustau ML, Feau N, Mougou-Hamdane A, Dutech C (2011) Interspecific and intraspecific diversity in oak powdery mildews in Europe: coevolution history and adaptation to their hosts. *Mycoscience* 52:165–173
64. Koskela T, Puustinen S, Salonen V, Mutikainen P (2002) Resistance and tolerance in a host plant-holoparasitic plant interaction: genetic variation and costs. *Evolution* 56:899–908
65. Horns F, Hood ME (2012) The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecol Evol* 2:1705–1711
66. Coley PD, Kursar TA (1996) Anti-herbivore defenses of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeoffs. In: Mulkey SS, Chazdon R, Smith AP (eds) *Tropical forest plant ecophysiology*. Springer, Berlin, pp 305–337
67. Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335
68. Schwartz MD, Ahas R, Aasa A (2006) Onset of spring starting earlier across the Northern Hemisphere. *Global Change Biol* 12:343–351
69. Augspurger CK (2011) Frost damage and its cascading negative effects on *Aesculus glabra*. *Plant Ecol* 212:1193–1203
70. Basler D, Körner C (2012) Photoperiod sensitivity of bud burst in 14 temperate forest tree species. *Agr Forest Meteorol* 165:73–81
71. Aide TM (1992) Dry season leaf production: an escape from herbivory. *Biotropica* 24:532–537
72. Lamarre GPA, Mendoza I, Fine PVA, Baraloto C (2014) Leaf synchrony and insect herbivory among tropical tree habitat specialists. *Plant Ecol* doi: 10.1007/s11258-013-0290-y
73. Rausher MD (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411:857:864
74. Burdon JJ (1987) *Diseases and plant population biology*. Cambridge University Press, Cambridge
75. Bell AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol* 32:21–81
76. Desprez-Loustau ML, Saint-Jean G, Barrès B, Dantec CF, Dutech C (2014) A biotroph parasite changes growth patterns in its host tree: host tolerance response and potential manipulation of host physiology by the parasite. *Ann For Sci* doi: 10.1007/s13595-014-0364-6
77. Verhagen BWM, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2006) Induced disease resistance signaling in plants. In: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Global Science Books, pp 334–343
78. Kempel A, Schädler M, Chrobock T, Fischer M, van Kleunen M (2011) Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. *Proc. Natl Acad Sci USA* 108:5685–5689
79. Burdon JJ, Thrall PH (2003) The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biol* 4:227

80. Paul-Victor C, Züst T, Rees M, Kliebenstein DJ, Turnbull LA (2010) A new method for measuring relative growth rate can uncover the costs of defensive compounds in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 187:1102–1111
81. van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5602–5607
82. Agrawal AA, Karban R (1999) Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In: Tollrian R and Harvell CD (eds) *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press, Princeton, pp 45–61
83. Agrawal AA (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* 80:1713–1723
84. Alcázar R, Parker JE (2011) The impact of temperature on balancing immune responsiveness and growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 16:667–675
85. Forrest J, Thomson JD (2010) Consequences of variation in flowering time within and among individuals of *Mertensia Fusiformis* (Boraginaceae), an early spring wildflower. *Am J Bot* 97:38–48
86. Hänninen H (2006) Climate warming and the risk of frost damage to boreal forest trees: identification of critical ecophysiological traits. *Tree Physiol* 26:889–898
87. Anandhi A, Zion MS, Gowda PH, Pierson DC, Lounsbury D, Frei A (2013) Past and future changes in frost day indices in the Catskill Mountain region of New York. *Hydrol Process* 27:3094–3104
88. Ge Q, Wang H, Dai J (2013) Shifts in spring phenophases, frost events and frost risk for woody plants in temperate China. *Clim Res* 57:249–258
89. Fu YH, Campioli M, Deckmyn G, Janssens IA (2012) The impact of winter and spring temperatures on temperate tree budburst dates: results from an experimental climate manipulation. *PLoS One* 7: e47324
90. Dantec CF, Vitasse Y, Bonhomme M, Louvet JM, Kremer A, Delzon S (2014) Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range. *Int J Biometeorol* doi: 10.1007/s00484-014-0787-7
91. Both C, van Asch M, Bijlsma RG, van den Burg AB, Visser ME (2009) Climate change and unequal phenological changes across four trophic levels: constraints or adaptations? *J Anim Ecol* 78:73–83
92. Singer MC, Parmesan C (2010) Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy? *Phil Trans R Soc B* 365:3161–3176

Supporting figures

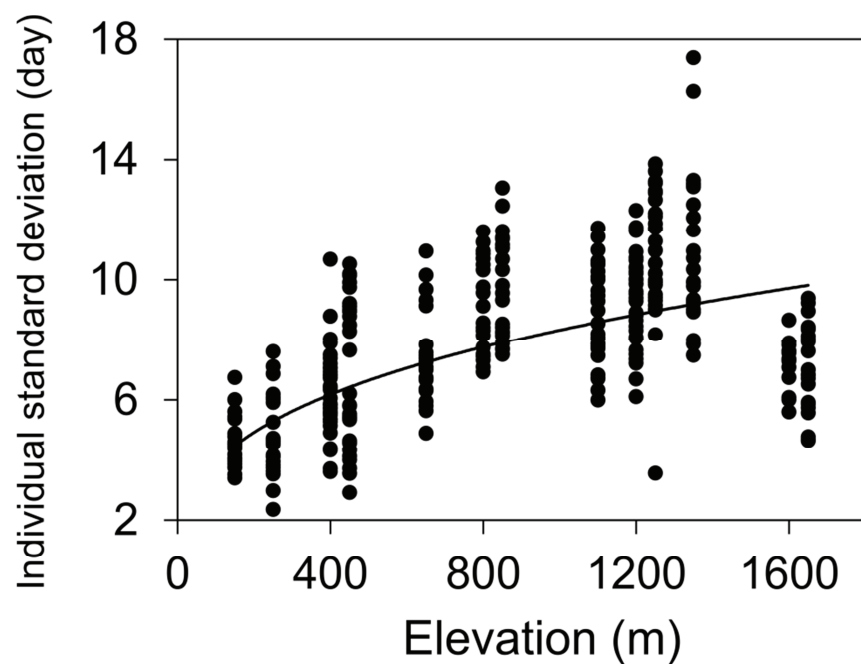


Figure S1. Year-to-year fluctuations of spring phenology in oak populations along the elevation gradients.

The individual standard deviation for the timing of leaf unfolding in 13 sessile oak populations of the Gave and Ossau gradients is shown for the 2005-2007 and 2009-2012 periods ($y=0.87x^{0.33}$, $r^2=0.42$, $P<0.0001$).

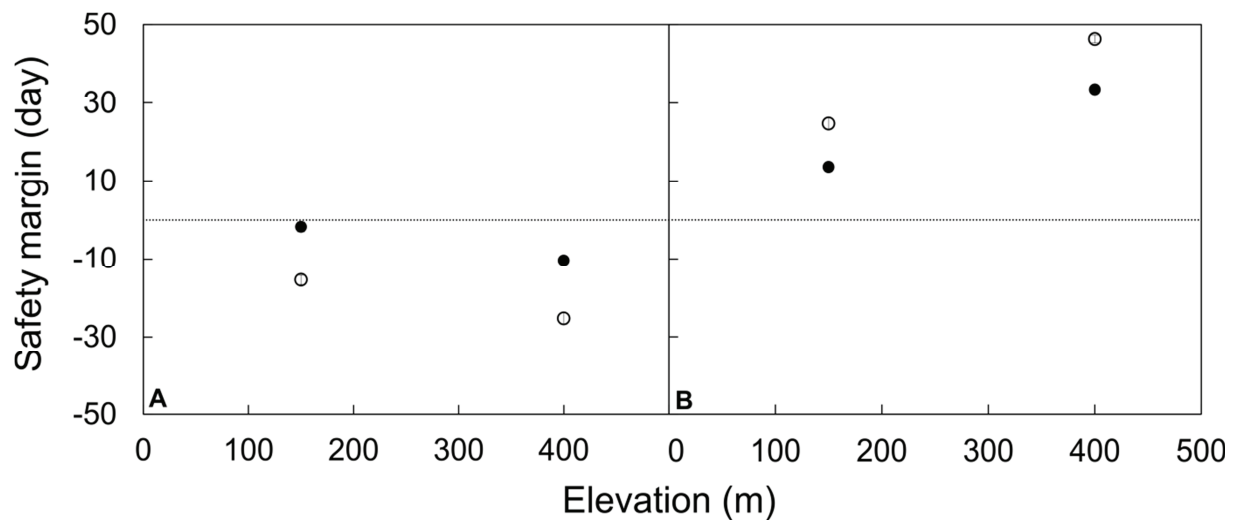


Figure S2. Powdery mildew (A) and spring frost (B) safety margins of early- and late-flushing oak seedlings. Safety margins were calculated for seedlings grown at 150 m in 2011-2012 and at 400 m in 2012, on the Gave gradient (mean $\pm$ SEM); see Table 1 for details. Closed circles: early-flushing seedlings; open circles: late-flushing seedlings.

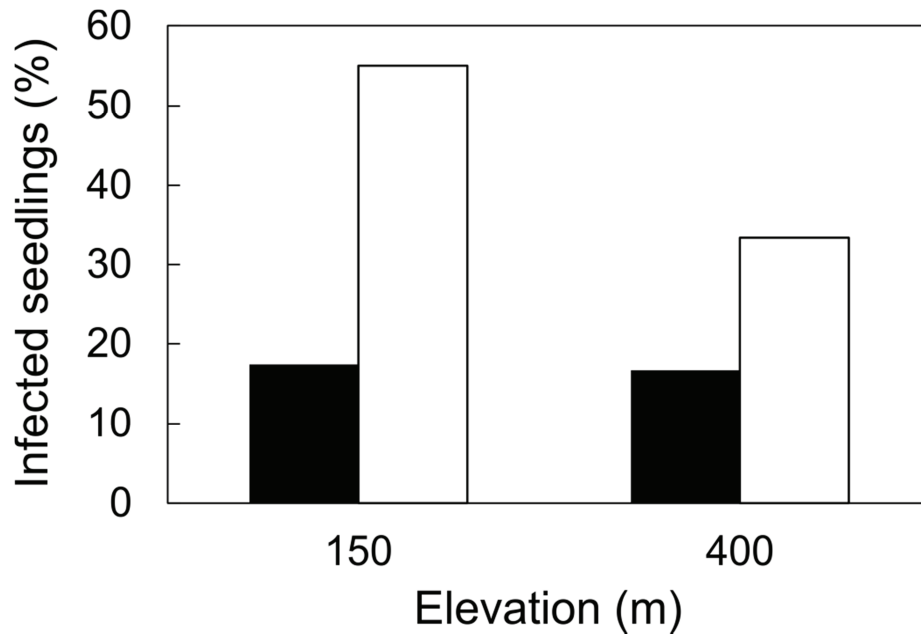


Figure S3. Differences in powdery mildew infection between early- and late-flushing oak seedlings. We show the percentage of individuals infected, by phenological phenotype. Infection was assessed at an elevation of 150 m in 2011-2012 and at 400 m in 2012, on the Gave gradient; see Table 1 for details. Black bars: early-flushing seedlings; white bars: late-flushing seedlings.

CHAPITRE V

A biotroph parasite changes growth patterns in its host tree: host tolerance response and potentiel manipulation of host physiology by the parasite

Marie-Laure Desprez-Loustau, Gilles Saint-Jean, Benoît Barrès, Cécile F. Dantec and Cyril Dutech

Annals of forest Science (2014) doi: 10.1007/s13595-014-0364-6



Oak powdery mildew changes growth patterns in its host tree: host tolerance response and potential manipulation of host physiology by the parasite

Marie-Laure Desprez-Loustau · Gilles Saint-Jean ·
Benoît Barrès · Cécile Françoise Dantec · Cyril Dutech

Received: 8 October 2013 / Accepted: 26 January 2014
© INRA and Springer-Verlag France 2014

Abstract

- **Context** Parasites can induce strong effects on their host's growth, not only as a result of host resource exploitation (growth loss) but also with a potential adaptive value for host (tolerance response) and themselves (increased transmission).
- **Aims** We assessed these three types of phenotypic changes in oak seedlings infected by powdery mildew.
- **Methods** A manipulative field experiment with three levels of parasite inoculum was designed in order to tease apart infection from genetic effects on oak growth. Seedlings were monitored during 3 years for height growth, phenology and infection.
- **Results** Powdery mildew infection induced both significant growth loss and qualitative changes in plant architecture. The

most striking and unexpected change was increased growth polycyclism in infected seedlings. This benefitted both the host as a form of compensation for infection-caused height loss, and the pathogen, by increasing sporulation.

• **Conclusion** The study highlights the effect of parasites in the expression of plant phenotypic traits, such as phenology and ultimately tree architecture. Both host tolerance and parasitic manipulation may be involved in the observed changes in growth patterns. These results suggest a complex interplay between development and defence in trees and emphasize the need to better assess tolerance mechanisms when considering the defence strategies of trees against pathogens.

Keywords Tolerance · Phenology · Polycyclism · Rhythmic growth · Powdery mildew · Oak

Handling Editor: Erwin Dreyer

Contribution of the co-authors MLD-L: conceived the experiment and performed data analysis.

MLD-L and GS-J: ran the experiment and collected the data.

MLD-L, BB, CDa and CDu: interpreted data and wrote the paper.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13595-014-0364-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M.-L. Desprez-Loustau (✉) · G. Saint-Jean · B. Barrès ·
C. F. Dantec · C. Dutech
BIOGECO UMR 1202, INRA, 69 route d'Arcachon, 33610 Cestas,
France
e-mail: loustau@bordeaux.inra.fr

M.-L. Desprez-Loustau · G. Saint-Jean · B. Barrès · C. F. Dantec ·
C. Dutech
BIOGECO UMR 1202, Univ. Bordeaux, 351 Cours de la Libération,
33400 Talence, France

Present Address:

B. Barrès
Metapopulation Research Group, University of Helsinki,
00014 Helsinki, Finland

1 Introduction

Trees have to cope with many pathogens during their lifetime. Pathogen impact may be especially important in natural regenerations where high density of seedlings favours disease transmission (Augspurger 1984; Packer and Clay 2000). Pathogens derive their nutrition from their host trees and cause damage to invaded tissues and organs, thus finally reducing host fitness (Gilbert 2002). However, changes induced by pathogens or parasites in their hosts also include phenotypic changes affecting a variety of traits, such as morphology, phenology and timing of reproduction (Michalakakis 2007; Pagan et al. 2008). When alterations in plant life-history traits mitigate negative effects of damage, either by phenotypic plasticity or genetic adaptation, these changes can be viewed as a host defence strategy (Pagan et al. 2008). The tolerance concept was defined by evolutionary biologists as referring to host traits that do not reduce or eliminate infection, but that

reduce or compensate its fitness consequences (Roy and Kirchner 2000). Tolerance has been suggested to play an important role in the evolution of plant-parasite interactions in natural populations (Roy and Kirchner 2000). It has been well documented in plant-herbivore interactions (Fornoni 2011; Baucom and de Roode 2011). However, it has received modest attention so far in plant pathology, including for trees, compared to the resistance component of the plant defence strategy, i.e. the ability to prevent infection (e.g. Dangl et al. 2013; Kovalchuk et al. 2013).

Parasites may also benefit from infection-induced modifications of their hosts. The concept of host manipulation by parasites was first used in animal-parasite studies. Aberrant, even suicidal, behaviour of infected hosts strongly suggested that parasites have the potential to alter a broad range of phenotypic traits in their hosts to their own benefit, in particular by increasing their transmission (Poulin 2010). In the absence of “plant behaviour,” this concept has been understandably much less used for plant—than for animal—parasite systems, although it was extended to deal with changes in plant developmental patterns (Shykoff and Kaltz 1998; Montarry et al. 2007).

Here, we focus on oak powdery mildew which is an interesting biological model both for its environmental significance and for characteristics of the host-pathogen interaction. The disease, caused by a complex of fungal species, especially *Erysiphe alphitoides* (Griffon and Maubl.) U. Braun and S. Takam. and *Erysiphe quercicola* U. Braun and S. Takam., occurs all over Europe on deciduous oaks (especially *Quercus robur* L.) (Mougou et al. 2008; Mougou-Hamdane et al. 2010). Severe foliar infection can lead to mortality in young seedlings and in mature trees when associated with other factors of decline (Marçais and Desprez-Loustau 2013). Powdery mildew fungi are biotrophic parasites that derive nutrients from the living cells of their hosts, thanks to highly specialized structures called haustoria. These structures are an active interface not only for nutrient uptake but also for the export of fungal factors, such as effectors, allowing the parasite to take control of host metabolism to its own profit (Panstruga and Dodds 2009). The highly specialized relationships between biotrophic parasites and their hosts scale up to life cycles. This is particularly critical for foliar parasites of deciduous trees in temperate regions which need to adapt to host seasonality. The phenological synchrony in spring between oak and powdery mildew was shown to be an important factor explaining the severity of the disease (Marçais et al. 2009; Desprez-Loustau et al. 2010). However, both fungus and tree exhibit a polycyclic development within a season. Primary infections can give rise to secondary infections and so forth, resulting in a potentially exponential increase of the fungal population. Reciprocally, *Q. robur* presents a rhythmic growth (also called polycyclism) expressed as several flushes of shoot growth within one growing season, especially in the

young age (Barnola et al. 1990; Collet et al. 1997). The interplay between oak growth patterns and susceptibility to the disease (Edwards and Ayres 1982) may therefore determine both host and parasite performances.

The objective of our study was to assess disease-induced phenotypic changes in oak seedlings including not only expected negative effects on fitness but also modifications with potential adaptive value for the tree and the pathogen. We addressed the specific following questions: (i) How much is height growth, considered as a good proxy of fitness (Sage et al. 2011), affected by infection in oak seedlings? (ii) Are there infection-induced qualitative changes in oak growth, especially in the timing of flushes within and between years? (iii) Do alterations in tree growth patterns benefit the plant and/or the pathogen?

2 Materials and methods

2.1 Plant material

Ideally, assessing the effect of infection on a variety of traits would require the comparison of the same genotypes under different infection levels, in order to separate effects of infection on a specific trait from inherent differences between genotypes for that trait, which would favour or prevent infection (Pan and Clay 2003; Baucom and de Roode 2011). In the absence of available vegetatively propagated oak clones, the genetic replicates assayed in the different infection environments were 15 half-sib families, each represented by numerous individuals. Acorns were collected in the autumn of 2008 under 15 isolated mature *Q. robur* trees (i.e. with non-overlapping canopies with their neighbours) at Pierroton, Cestas (N 44° 44' 10.4"; W 0° 46' 29.5"). After emergence, all seedlings and putative maternal parent trees were genotyped using a set of nine microsatellite markers (Guichoux et al. 2011). A few seedlings harbouring alleles not found in their expected mother tree were discarded from the analyses.

2.2 Experimental design

The design was set up at the INRA experimental domain in Pierroton, in a clearing surrounded by pine trees (*Pinus pinaster* Ait.) and broadleaved species (especially *Q. robur*). The experimental site was fenced to prevent grazing by mammalian herbivores. Little damage from abiotic and biotic (fungi, insects) factors other than powdery mildew was observed throughout the experiment (estimated at less than 5 % of leaf surface area). The herbaceous plants growing between plots were removed by mowing, twice a year. Little weed development occurred within plots.

The design included nine unit plots corresponding to three levels of parasite exposure randomly distributed within three

spatial blocks. Plots were separated by a distance of 4 m. Acorns were sown on 21–27 April 2009 at a 10 cm×10 cm distance in each unit plot, in eight rows of 38 plants. Acorns from the different families were randomly distributed within and between plots, with 173 acorns per family on average (minimum=118; maximum=285). Each unit plot was surrounded by a guard row with acorns from a bulk provenance.

The three parasite levels were obtained as follows. The “low” parasite level was obtained by repeated fungicide applications. Myclobutanil was chosen for its efficacy against powdery mildew. It is one of the very few fungicides with an authorized usage for forest trees in France (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>). Contrary to some other triazole fungicides showing plant-growth regulator effects, it was not shown to have non-target effects on growth and drought tolerance in a few studied tree species (Rosenberg et al. 2003; Percival and Noviss 2008). In 2009, the first application was done on 22 June. Six applications were done during the whole season (weeks 25, 28, 30, 32, 35, 37). The same number of applications was done in 2010, starting on 1 June (weeks 22, 27, 30, 31, 34, 39—the low frequency at the beginning of the season was due to a rainy period). In order to achieve better control, the frequency of applications in early spring was increased in 2011 (first on 27 May, weeks 21, 23, 25, 27, 30, 31, 33, 35, 39). The “medium” parasite level corresponded to natural infection. The “high” level was obtained by providing extra-inoculum to the seedlings in the ad hoc plots. This was achieved by blowing spores from highly sporulating leaves above the seedlings, using a portable air compression device. Sporulating leaves were produced in the laboratory by inoculating young oak seedlings of a bulk provenance of *Q. robur* with inoculum originating from an initial population of local powdery mildew (naturally infected leaves collected in the summer of 2008 around the experimental site) which was maintained by successive re-inoculations until the spring of 2009 and thereafter. In order to obtain a homogeneous and targeted distribution of inoculum, a plastic tower was used as inoculation box and moved along the row. Inoculations were performed on 19 June 2009, 11 May and 24 June 2010, and 20 and 28 April 2011.

2.3 Monitoring of oak growth

A fine monitoring of seedlings was realised during the three growing seasons following sowing, i.e. in 2009, 2010 and 2011. Seedling emergence from acorns occurred mostly within a few weeks following sowing in April 2009, reaching 50 % for the whole design after 1 month. The emergence rate slightly increased thereafter, reaching 67 % at the end of the first growing season. We checked that no differences in the dynamics of seedling emergence occurred between plots that were subsequently subjected to different parasite exposure

levels. Each oak family was eventually represented by 37 ± 17 (mean±standard deviation) seedlings in each parasite exposure treatment.

Timing of growth flushes was monitored in 2010 and 2011. Phenology of budburst was monitored by weekly assessment in April–May (4–5 dates each year, between weeks 15 and 20 in 2010, 15 and 18 in 2011). At each date, a phenological score was given to each seedling using a 5-grade scale: 0=dormant bud; 1=leaves emerging from the bud scales; 2=leaves and shoots starting to develop; 3=leaves with final size but still tender and light green; and 4=fully developed leaves, dark green (assessed on the leading shoot). The annual budburst precocity index was calculated for each seedling as the mean phenological score over the different dates in a year. The occurrence of a second growth flush from the apical bud on the leading axis was noted on 15 June in 2010 and on 24 May in 2011. The occurrence of a third flush was noted on 20 June in 2011.

The total number of flushes (which can be determined a posteriori from morphological features) was assessed at the end of the growing season in all 3 years, as well as annual shoot elongation of the dominant terminal axis and plant height (Figure S1).

Changes in apical dominance were frequently observed during the 3-year monitoring of the seedlings. In the spring of 2010, budburst failure of apical buds, often associated with terminal shoot necrosis, was frequently observed and resulted in the development of a new leader shoot from a lower bud in affected seedlings. Apical bud mortality was recorded for each seedling as a binary variable (yes/no). Other changes in dominance were not recorded systematically, but an index of height growth efficiency (HGE) was defined to capture some part of this phenomenon. HGE was calculated as the ratio of height increment to terminal shoot elongation in the same year, as follows (Figure S1):

$$\text{HGE}_n = (\text{H}_n - \text{H}_{n-1}) / \text{L}_n,$$

with HGE_n =height growth efficiency in year n ; H_n =final height in year n ; H_{n-1} =final height in year $n-1$; and L_n =total leader shoot elongation in year n .

If a strict apical dominance is maintained, then annual height increment will be equal to leading shoot elongation and HGE will be equal to 1. In contrast, changes in leading axes, caused by apical mortality or other changes of apical dominance, will lead to HGE values lower than 1.

2.4 Infection assessments

Infection was assessed by trained observers as a percentage of leaf area covered by mycelium for the whole seedling.

Assessment of infection on the first flush, when leaves were fully developed and before the development of any second flush, was completed on 9 June 2009, 15 June 2010 and 24 May 2011. The final assessment, taking into account all flushes, was on 15 October 2009, 29 September 2010 and 27 July 2011. Monitoring was stopped earlier in 2010 and even more in 2011 because of higher infection levels resulting in defoliation in the second flush.

The percentage of leaf area covered by mycelium is primarily a host-related measurement of infection. In order to obtain a parasite-related measurement of infection success, we calculated a correlate of spore production (SPOR) per seedling. Assuming a constant production of spores per unit of leaf area infected, the number of spores produced per seedling can be calculated as the product of the percentage of leaf infection by the total leaf area. Since total leaf area could not be measured for each seedling, we used seedling basal area (SBA), the cross-sectional area of the stem, as a correlate. The allometric relationship between stem basal area and whole-tree leaf area has long been recognized (McDowell et al. 2002). SPOR was then calculated as follows:

$$\text{SPOR} = \% \text{LAInf} \times \text{SBA},$$

assuming that $\text{SBA} = k \times \text{LA}$

with $\% \text{LAInf}$ = mean percentage of leaf area infected over 3 years (final assessments); SBA = seedling basal area, calculated from diameter measured at 2 cm above collar level in March 2011; LA = seedling leaf area; and k = (non-estimated) proportionality coefficient.

2.5 Statistical analyses

All statistical analyses were performed with SAS 9.2 software (SAS Institute Inc. 2011).

The response (dependent) variables of the models were first foliar infection (to check that exposure to different parasite levels indeed resulted in contrasting levels of infection) and then phenotypic variables related to oak growth and potentially affected by parasite exposure/infection: precocity index, shoot elongation, height, etc. The independent (explanatory) factors were block (3 levels), family (15 levels), parasite and its interaction with family. The parasite effect was first tested by including “exposure” as a categorical variable in the model, with three levels corresponding to the three treatments in the experimental design. Secondly, since infection was likely to vary within the same exposure level, the same models were ran with adding infection as a quantitative covariate (1 degree of freedom) and its interaction with family. The family-by-parasite (exposure and infection) interaction effect was included to test the generality of parasite effects across families. All factors were treated as fixed effects. Quantitative variables were analysed with a general linear model with the sum of

squares for a given effect calculated with all other variables included in the model (type III sum of squares). The distribution of residuals was analysed (by plots, summary statistics and tests with the univariate procedure of SAS) in order to check that it did not depart too far from the assumptions of normality and homogeneity of variances required for the validity of F tests. Due to the unbalanced design, least square means (predicted population margins) were computed for comparisons between levels of parasite exposure, with pairwise differences tested with a t test. All means referred to thereafter correspond to the marginal means. For the analysis of variables expressed as binary data, such as occurrence of a second flush or apical bud mortality, a logistic regression model was used and the effects of independent variables (block, family, parasite and interactions, as before) were tested with a Wald chi-square test. The odds ratios and their corresponding 95 % Wald confidence intervals were computed to compare the effects of different parasite levels. When the family-by-parasite effect was not significant, a single value of odds ratio for each comparison between parasite levels was computed across families by omitting the interaction in the model. The Akaike information criterion (AIC) was used for the comparison of models with or without infection included as a quantitative variable.

3 Results

3.1 Infection levels

The low-medium-high parasite exposures indeed resulted in different levels of powdery mildew infection (Table 1). Infection levels on the first flush were quite low on average, with less than 10 % leaf area infected, except in 2011 for the high level. An increasing trend of infection with parasite exposure was observed, from approximately 2 % of leaf area infected over the 3 years in the low level, to 5 % in the medium level and 11 % in the high level (Table 1). The parasite exposure effect was significant in 2010 and 2011 ($F_{2,1611} = 13.69$ and $F_{2,1605} = 614.00$; $P < 0.0001$), discriminating the three levels from each other (the effect was not significant in 2009 as expected since fungicide applications and inoculations had not yet started at the time of the first flush). Final (maximal) infection remained low in the low treatment (12 %) and was quite high in the medium and high treatments (31 and 40 % on average over the 3 years, respectively) (Table 1). Differences were highly significant for final infection in all 3 years, discriminating the three levels of parasite exposure ($F_{2,1614} = 53.59$; $F_{2,1600} = 258.65$; and $F_{2,1599} = 1471.89$ respectively in 2009, 2010 and 2011— $P < 0.0001$). A significant family effect was observed for all assessments but no significant interaction of family-by-parasite level was observed in 2009 and 2010. The significant interactions in 2011 for both

Table 1 Percentage of leaf area infected in the low-medium-high parasite treatments

Parasite treatment	Early season infection (first flush) ^a	Final infection (all flushes) ^b
Low (L)	<i>1.7 (4.0–0.7–0.5)</i>	<i>12.4 (14.1–18.6–4.5)</i>
Medium (M)	<i>4.8 (3.4–1.4–9.7)</i>	<i>31.2 (23.1–30.5–39.9)</i>
High (H)	<i>10.7 (3.7–2.4–26.1)</i>	<i>39.9 (25.9–35.8–57.9)</i>

Figures in italics are the marginal means over 3 years (2009–2010–2011)

^a Assessed on 9 June, 17 May and 4 May in 2009, 2010 and 2011, respectively

^b Assessed on 15 October 2009, 29 September 2010 and 27 July 2011

early and late infection were linked to differences in the intensity (slope) of the increasing trend of infection from low to medium and high, but the ranking of families was highly conserved (not shown).

3.2 Effects of parasite exposure/infection on shoot elongation and height

Parasite level had a significant effect on growth as soon as the first year (Fig. 1): the height loss at the end of 2009 in medium and high parasite exposures were 14 % on average when compared to low (adjusted mean height=16.3 cm in low; 14.0 cm in medium; and 14.0 cm in high) ($F_{2,1618}=21.69$; $P<0.0001$).

Growth was increasingly affected in 2010 and 2011. Annual shoot elongation (including all flushes) was decreased in the medium parasite exposure compared to low by 23 % in 2010 (14.8 vs. 19.3 cm) and 34 % in 2011 (7.9 vs. 11.8 cm). Relative decreases in the high parasite exposure were 28 % in 2010 (14.0 cm) and 20 % in 2011 (9.5 cm) ($F_{2,1603}=54.30$; $P<0.0001$ in 2010; $F_{2,1598}=43.07$; $P<0.0001$ in 2011).

Height increments were even more affected by parasite level than shoot elongation. Height increment loss in

comparison to the low parasite exposure reached 29 and 38 % in 2010 and 43 and 36 % in 2011, in the medium and high levels, respectively. The corresponding height growth efficiencies (HGE) decreased with increasing parasite level: HGE=0.78–0.69–0.65 in 2010, 0.88–0.65–0.66 in 2011, for the low-medium-high levels, respectively ($F_{2,1601}=14.33$, $P<0.0001$ in 2010; $F_{2,1597}=19.85$, $P<0.0001$ in 2011).

Finally, height loss after 3 years was 26 % for the medium parasite exposure compared to the low level (31.2 vs. 42.5 cm) (Fig. 1). Height was only very slightly more affected in the high parasite level (–28 %, 30.5 cm). The parasite level effect was highly significant ($F_{2,1599}=116.56$; $P<0.0001$) and discriminated the low from the medium and high levels but medium and high were not statistically different. The family effect was highly significant ($F_{2,1599}=13.90$; $P<0.0001$) but the same effect of decreasing height with increasing parasite exposure/infection was observed for all families (Fig. 2), as expressed by the non-significant family-by-parasite exposure interaction ($F_{28,1599}=1.09$; $P=0.3421$). When infection (mean of final infection in 2009, 2010 and 2011) was added as a covariate, parasite exposure and family effects remained significant in addition to the infection effect ($F_{1,1584}=12.89$; $P=0.003$). Neither parasite-by-family nor infection-by-family interactions were significant ($F_{28,1584}=1.05$, $P=0.4001$ and $F_{14,1584}=1.34$, $P=0.1768$, respectively).

3.3 Precocity of spring budburst and apical bud mortality during winter

Budburst was slightly earlier in seedlings exposed to high parasite levels, in 2010 and 2011. Precocity indices were 1.87, 1.87 and 1.93 in 2010 and 2.36, 2.43 and 2.50 in 2011, for the low, medium and high treatments, respectively. The effect of parasite level was only significant in 2011 (2010, $F_{2,1612}=2.91$, $P=0.0547$; 2011, $F_{2,1605}=18.54$, $P<0.0001$). The family effect was highly significant in both years

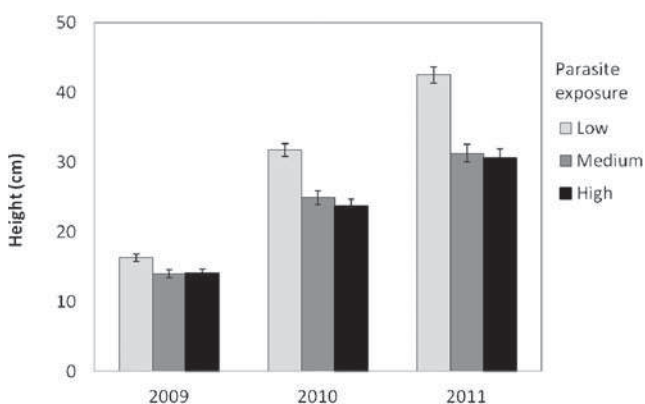


Fig. 1 Marginal means (with confidence intervals at 95 %) of seedling height at the end of the 2009, 2010 and 2011 growing seasons for three levels of oak powdery mildew exposure

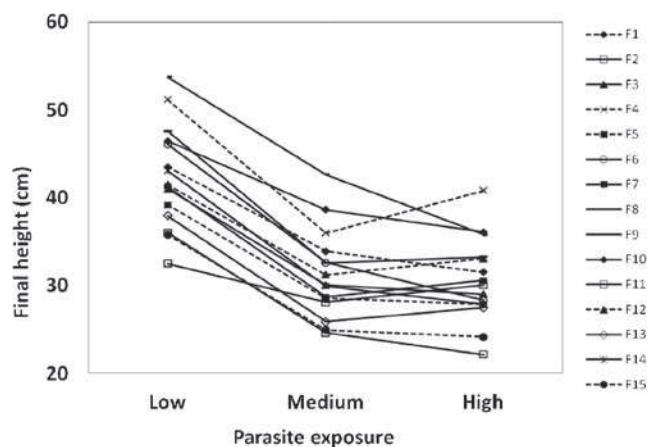


Fig. 2 Marginal means of seedling height at the end of the 2009, 2010 and 2011 growing seasons for 15 oak families exposed to three levels of powdery mildew

($F_{14,1612}=60.50$ and $F_{14,1605}=68.71$; $P<0.0001$). Earlier budburst in higher levels of parasite exposure was observed for 13 out of 15 families in 2011. The interaction of parasite level and family was statistically significant ($F_{28,1605}=1.77$; $P<0.0079$), mainly showing differences in the intensity of the response (not shown). No effect of the infection covariate (final infection in the preceding year) nor of its interaction with family were significant in both years.

A high frequency of budburst failure on the terminal shoot was observed in the spring of 2010. Apical bud mortality during winter affected almost one third of all seedlings in the low (33 %) and medium (32 %) parasite levels; the frequency was even higher (43 %) in the high level. The logistic regression showed a significant effect of block, family and parasite level, with no significant parasite-by-family interaction on the occurrence of apical bud mortality. Only the high parasite level was differentiated from the two others with odds ratio estimates of 1.60 (confidence interval=1.24–2.07) and 1.61 (1.24–2.10) for high against low and high against medium, respectively, corresponding to a relative increase of 60 % in the odds of apical mortality between the high and the low and medium parasite exposure levels. The model was slightly improved (AIC reduced from 2,044 to 1,884) by adding an infection effect (final infection in the preceding year, i.e. 2009). The infection effect had an odds ratio of 1.04 (confidence interval=1.033–1.047), indicating a 4 % increase in the odds of apical mortality for each 1 % increase in the percentage of infection, in addition to the effects included in parasite exposure level (odds ratio for high against low and high against medium maintained at values greater than 1, 1.03 and 1.53, respectively).

3.4 Timing and number of growth flushes

In 2010, no difference in the timing of the second flush could be detected between treatments. On 15 June, a very high proportion of nearly 90 % seedlings had started their second flush in the low, medium and high parasite treatments. In contrast, a second flush occurred much earlier in the high parasite level in 2011 than in the low and medium levels. On 24 May, a second flush was visible in 80 % of seedlings in the high level as opposed to only 45 and 31 % of seedlings in the medium and low levels, respectively. The logistic model for the occurrence of the second flush on 24 May 2011 showed a significant effect of parasite level, in addition to family and block effects, with no significant parasite-by-family interaction (Table 2). The parasite level effect was maintained, and odds ratio estimates were little affected when the budburst precocity index was added as an additional explaining variable. Very high odds ratio estimates were obtained when comparing parasite levels. A nearly twofold increase in the odds of having the second flush was observed for seedlings exposed to the medium parasite level compared to those in the

low level. Odds increased to fivefold for the high vs. medium parasite level comparison (Table 2). Adding infection on the first flush as an explaining variable, in addition to parasite exposure, did not affect the results. Similarly, at the June assessment in 2011, 13 % of seedlings in the high parasite level had a third flush compared to almost none (0.6 and 0.2 %) in the medium and low levels, respectively. Finally, at the end of the season, an increasing number of flushes were observed from the low to the medium and high parasite levels, with adjusted means of 2.85, 3.04 and 3.17 in 2010 and 2.07, 2.34 and 2.64 in 2011, for the low, medium and high parasite levels, respectively. Both logistic models for the probability of a third flush assessed in October 2010 or in October 2011 showed a significant effect of parasite level, in addition to the block and family effects, with no significant parasite-by-family interaction (Table 3). The parasite level effect remained highly significant, and the odds ratio estimates were little affected when lengths of the first and second flushes and precocity of budburst were added as additional explaining variables to the simplest model (not shown). Odds ratio estimates were very high for the parasite exposure effect, especially in 2011, with an estimate of 13.2 for the high vs. low level (Table 3). Adding infection as an explaining variable only marginally improved the model and slightly affected the results (not shown).

After 3 years, seedlings in the low parasite exposure had produced 7.2 shoot flushes on average, 7.5 in the medium exposure and 8.0 in the high parasite level (Fig. 3). The parasite level effect was highly significant ($F_{2,1556}=63.68$; $P<0.0001$) and so was the family effect ($F_{14,1556}=8.5$; $P<0.0001$). No significant family-by-parasite interaction was observed ($F_{28,1556}=1.29$; $P=0.0797$) (Fig. 3). When mean infection (final assessment) over the 3 years was added as a covariate, the effect was highly significant ($F_{1,1541}=30.72$; $P<0.0001$) in addition to all previous significant effects, but the infection-by-family interaction was not ($F_{14,1541}=0.93$; $P=0.5254$).

3.5 Relationship between oak growth polycyclism and host and parasite performances

Within each parasite level, a general positive relationship was observed between the number of growth flushes and height at the end of the three growing seasons (Fig. 4). Comparisons across parasite levels could only be made at seven and eight flushes, where all families were represented (11 ± 6 seedlings per family, parasite level and number of flushes). In order to assess the potential benefit of one additional flush in infected plants, we compared differences in heights, adjusted to family and block, between the low and high parasite levels either at seven flushes for both levels (giving 41.4 and 26.6 cm, respectively) or at seven flushes for low and eight flushes for high (41.4 and 31.4 cm, respectively) (Fig. 4). We considered

Table 2 Results of the logistic model of occurrence of a second flush on 24 May 2011. The precocity index refers to the first flush and was calculated as the mean phenological score of leaf phenology assessed at four dates from 12 April to 4 May

Effect	Model without precocity index		Model with precocity index	
	Wald chi-square (probability)	Odds ratio estimates (confidence interval)	Wald chi-square (probability)	Odds ratio estimates (confidence interval)
Parasite level	251.2 (<0.0001)		227.5 (<0.0001)	
Medium vs. low		1.9 (1.5–2.5)		1.8 (1.4–2.3)
High vs. medium		5.3 (4.0–7.0)		5.1 (3.8–6.8)
High vs. low		10.0 (7.5–13.4)		9.1 (6.8–12.2)
Block	14.7 (0.0006)	0.6–0.7–0.9	12.0 (0.0025)	0.6–0.7–0.8
(2 <i>df</i> , 3 comparisons)				
Family	102.5 (<0.0001)	0.1–1.0–6.5	93.9 (<0.0001)	0.1–0.9–6.4
(14 <i>df</i> , 105 comparisons) ^a				
Precocity index			22.6 (<0.0001)	2.7 (1.7–3.5)

^a Only the minimum, median and maximum values of the 105 odds ratio estimates are given

that the former difference gave an estimate of theoretical height loss caused by infection without growth compensation provided by one additional flush, while the latter was close to actual loss taking into account compensatory growth. The additional flush was then estimated to provide a 34.2 % compensation of theoretical height loss over the 3 years.

However, additional flushing was not beneficial in all years. The frequency of apical bud mortality observed in the early spring of 2010 increased significantly with the number of growth flushes during the 2009 growing season (Fig. 5; significant Wald test for the number of flushes introduced as a covariate in the logistic regression of apical bud mortality with block, family, and parasite factors—not shown). The mortality rate almost doubled, from approximately 0.3 to 0.6, between seedlings with two or three flushes (representing together 92 % of all plants), whatever the parasite exposure (Fig. 5—no significant interaction between parasite exposure and number of flushes).

On the other hand, polycyclism was also positively related to powdery mildew performance, estimated by spore production (SPOR), in all three parasite levels (Fig. 6; significant effect for the number of flushes introduced as a covariate in the linear model of SPOR with block, family and parasite factors; no significant interaction with parasite exposure—not shown). One additional flush was associated with a significant increase in SPOR, e.g. +39, +20 and +15 % between seven and eight flushes, for the low, medium and high parasite levels, respectively.

4 Discussion

4.1 Demonstration of infection effects on seedling phenotypes

Important differences in growth, both quantitative and qualitative, were observed in oak seedlings exposed to different

Table 3 Logistic model of the occurrence of a third flush in 2010 and 2011

	2010		2011	
	Wald test (probability)	Odds ratio estimate (confidence interval)	Wald test (probability)	Odds ratio estimate (confidence interval)
Block	12.6 (0.0018)	0.6–0.7–0.8	281.3 (<0.0001)	0.4–0.5–0.7
(2 <i>df</i> , 3 comparisons)				
Family	32.2 (0.0037)	0.2–0.8–4.4	42.1 (0.0001)	0.2–1.1–6.1
(14 <i>df</i> , 105 comparisons) ^a				
Parasite level	40.4 (<0.0001)		51.0 (<0.0001)	
Medium vs. low		1.7 (1.2–2.4)		4.6 (3.4–6.2)
High vs. medium		1.7 (1.3–2.3)		2.9 (2.2–3.7)
High vs. low		2.8 (2.0–3.9)		13.2 (9.7–17.8)

^a Only the minimum, median and maximum values of the 105 odds ratio estimates are given

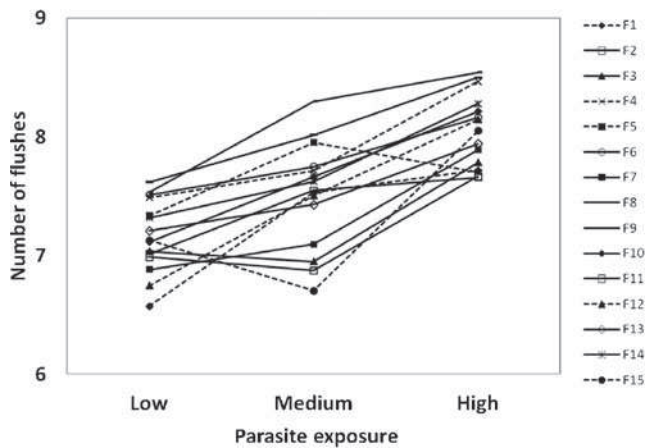


Fig. 3 Marginal means of the total number of flushes per seedling during the 2009, 2010 and 2011 growing seasons for 15 oak families exposed to three levels of powdery mildew

powdery mildew pressures. These are very likely a result of infection, and not simple correlates, since the same genetic entities were compared under the three parasite exposures, in order to decouple infection effects from genetic effects. The only way to achieve a low parasite level in the field was to protect seedlings by using fungicides. Non-target effects of myclobutanil, e.g. on ectomycorrhizal fungi, cannot be discarded (Desprez-Loustau et al. 1992). However, the fact that most studied variables were affected not only between the low (i.e. fungicide treated) and medium parasite levels but also between medium and high strongly suggests that changes in the host can be explained by increased parasite burden. Significant differences between families were observed for most studied variables, reflecting differences in resistance/susceptibility to infection and in initial vigour. However, interactions between the family effect and the parasite effect were in most cases not significant. Most observed changes may therefore be considered as a general response to infection in different genetic backgrounds of *Q. robur*.

4.2 Negative effects of infection on seedling height growth

The most expected change related to infection was growth reduction, affecting current shoot elongation and ultimately

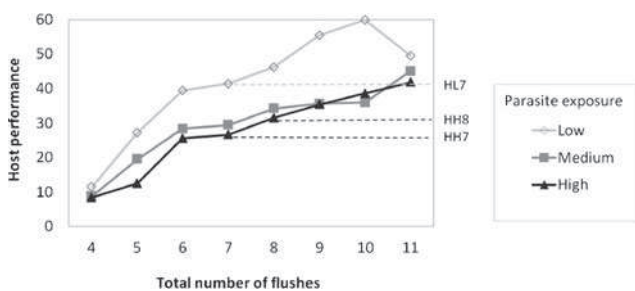


Fig. 4 Relationship between polycyclism (total number of flushes over 3 years) and host performance in the three parasite exposure levels. Height (in centimetres) was used as a proxy of plant performance

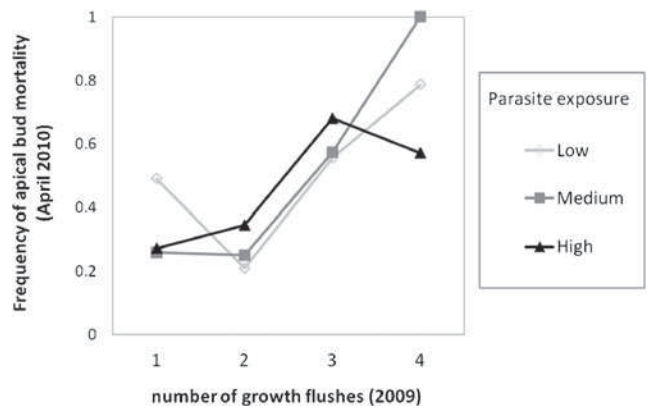


Fig. 5 Relationship between number of flushes in 2009 and apical bud mortality observed in the early spring of 2010 in the three parasite exposure levels

plant height. Since its first recorded outbreaks in Europe in the early twentieth century, powdery mildew has been considered as a major factor potentially limiting the success of oak regenerations, by strongly affecting seedling growth and ultimately survival (Jarvis 1964; Marçais and Desprez-Loustau 2013). However, quantitative estimates of these effects are rare (Pap et al. 2012). Our results showed a sharp decrease in height (−26 %) from low to medium parasite level, almost proportional to the percentage of leaf area infected (12 and 31 %, respectively). Increasing infection from the medium to high exposure (resulting in 40 % final leaf area infected) had no further visible effect. Very low mortality (less than 1 %—data not shown) was observed within the time frame of the study, which could not be related to powdery mildew infection. This may be explained by much more favourable conditions in our experimental site than in a natural regeneration, probably due to the low herbaceous (and between seedling) competition and protection against grazing.

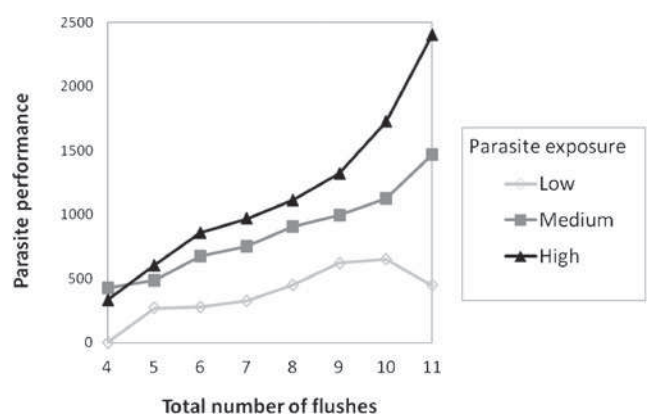


Fig. 6 Relationship between polycyclism (total number of flushes over 3 years) and parasite performance in the three parasite exposure levels. Parasite performance was assessed by a correlate of spore production (SPOR) calculated as the product of the mean percentage of leaf area infected per seedling over the 3 years (%LAInf) by the seedling basal area (SBA) in the spring of 2011, used as a correlate of leaf area (SPOR=%LAInf×SBA)

4.3 Infection-related changes in growth patterns

A striking result of our study is the alteration in growth flush patterns in the different parasite environments. High (and to a lesser degree, medium) parasite exposure was associated with an accelerated shoot flushing both between and within years. This was expressed as slightly earlier budburst, followed by earlier second flushing (not only as a consequence of earlier budburst but with an amplified effect of parasite exposure), and ultimately higher number of shoot flushes at the end of the season, compared to the low parasite exposure. Polycyclism in trees has usually been associated with high resource availability and plant vigour (Collet et al. 1997; Collin et al. 1996). The production of the second flush was shown to be a strong carbon sink, supported by recently assimilated photosynthates from first-flush source leaf tissues (Harmer 1992; Lockhart et al. 2003). It was therefore unexpected to observe more polycyclism in seedlings experiencing a biotic stress characterized by the consumption of host photosynthates by the parasite (Hewitt and Ayres 1976; Hajji et al. 2009). A positive effect of parasite infection on tree growth polycyclism has not been previously described for oak powdery mildew, or for any other disease, to our knowledge. Mizumachi et al. (2006) reported an increased probability of subsequent flushes as a result of insect leaf damage on the parent shoot growth unit, which may be similar to what we observed. However, polycyclism differs from the regenerative or compensatory growth reported in most studies dealing with herbivores. Contrary to powdery mildew infection, which does not induce leaf loss (at least in the first flush—cf. Marçais and Desprez-Loustau 2013), herbivory damage is often mostly characterized by tissue loss. In most cases, new growth in response to leaf tissue loss is based on increased lateral branching caused by a release of apical dominance and the activation of dormant meristems (Gruntman and Novoplansky 2011). Nevertheless, increased branching following herbivory damage was suggested to be an adaptive plastic response of the plant to internal and environmental signals, and not simply a passive outcome of damage (Gruntman and Novoplansky 2011). Direct effects of infection through internal signals linked to the host-pathogen interaction are also strongly suggested in our experimental conditions. An alternative hypothesis for lower polycyclism in the low parasite level could involve increased resource competition between seedlings, especially in 2011. However, crowns were not yet overlapping. Moreover, shoot elongation in 2011 was higher in the low compared to the high parasite level for both the first and second flushes (3.4 vs. 2.1 cm and 7.9 vs. 6.0 cm, respectively). Competition-mediated stress in the low parasite level is thus unlikely, and the direct effect of infection on growth patterns (polycyclism) remains the most probable explanation of observed changes.

4.4 Host tolerance response or manipulation of host physiology by the parasite?

Phenotypic changes in infected hosts have often been categorized in three distinct phenomena, according to their origin and consequences: secondary outcomes of infection with no adaptive value, host adaptations that reduce the detrimental consequences of infection and parasitic adaptations that facilitate transmission (Shykoff and Kaltz 1998). Decreased oak growth is likely a direct consequence of nutrient uptake by the parasite. Conversely, other changes observed in growth patterns, especially increased polycyclism, are not expected to be a passive outcome of infection since a reverse pattern would be predicted. Polycyclism has often been observed as a plastic response to high resource availability (Collet et al. 1997). Acquisition of host resources by the parasite should theoretically decrease the carbon source of currently growing shoots and thus the probability of an additional flush. Increased polycyclism might then be viewed as an infection-induced active response, either as part of a tolerance response from infected seedlings or as a manipulation by the parasite. The origin (molecular, biochemical and physiological mechanisms) of the changes observed in infected plants was out of the scope of our experiment. However, it is known that the intra-cellular haustorium of powdery mildew is an active interface allowing actively regulated exchanges of molecules between host and parasite in both directions (Panstruga and Dodds 2009). With regard to the adaptive value of the changes, either for plant or pathogen, our results suggest that the benefit of polycyclism could be shared between the two partners, since both plant and pathogen fitness-related variables increased with an increasing number of annual growth flushes. From the plant's perspective, polycyclism was positively related with height, as previously observed (Collet et al. 1997). It might therefore enhance seedling competitive ability, especially through improved light interception and overtopping of neighbours (Sage et al. 2011). Increased polycyclism in the high parasite exposure provided a partial compensation to parasite damage by limiting height loss and can then be viewed as a tolerance mechanism of trees to infection. Interestingly, all 15 families showed very similar responses of height and number of flushes to the different levels of parasite exposure/infection (as expressed by non-significant parasite-by-family interactions). The norm of reaction of plant fitness over a range of infection levels is often used to estimate plant tolerance (Baucom and de Roode 2011). Our results therefore suggest low variation across families (thus likely low genetic variation) for tolerance, although families were different in resistance *sensu stricto* (expressed as a significant effect of family on infection). These findings are consistent with the theoretical prediction that resistance traits tend to be polymorphic while tolerance traits tend to be fixed within populations (Roy and Kirchner 2000). However, increasing the number of flushes in a season is costly and may

not be beneficial for the plant on a longer term. Analyses of apical bud mortality in early 2010 strongly suggested that increased polycyclism exposed seedlings to greater winter damage. The low overwintering viability of second flushes, especially in interaction with powdery mildew infection, had already been reported (Harmer 1992). This was explained by lower cold hardiness (Anekonda et al. 1998; Marçais and Desprez-Loustau 2013). The net benefit of additional flushes for the tree will then depend on environmental factors, especially winter temperatures. Furthermore, recurrent flushing provides a longer availability of receptive tissues for the parasite as the season progresses, at a time when powdery mildew inoculum has built up from initial infections on the first flush. Unlike new flushing in response to herbivory, which may be a mean to produce functional leaves that will escape the enemy, here the second and subsequent flushes are exposed to increasing propagule pressure due to the polycyclic life cycle of the pathogen. Shoots of the second and subsequent flushes have been repeatedly reported as more severely infected than the first flush shoots (Harmer 1992; Marçais and Desprez-Loustau 2013). We indeed observed a positive relationship between number of shoot flushes and spore production per seedling. Increased polycyclism thus provided an amplification of the fungus population, probably leading to a higher probability of survival in the following year, and thus improved parasite fitness.

Finally, our study highlights that the effect of parasites in the expression of plant phenotypic traits, such as phenology and ultimately plant architecture, may well have been underestimated. Plastic traits such as phenology are commonly viewed as the expression of the interaction of plant genes with abiotic environment (Collet et al. 1997; Chuine and Cour 1999). Here, we show that deep alterations in oak phenotypes can occur in response to parasite exposure. These changes were likely, in part, the expression of a plant response providing a compensation for parasite-induced damage, hence tolerance to infection. This defence strategy has often been neglected in breeding programmes but tolerance traits might be an interesting component of durable disease control. However, our results show that the parasite exploited the host response by increasing its own performance (Lefevre et al. 2008). Finally, our findings are consistent with the increased recognition of the complex interplay between defence responses and plant development (Alcázar et al. 2011).

Acknowledgments The authors are very grateful to the Unité expérimentale Forêt Pierroton, UE 0570, INRA, especially Frédéric Bernier, Henri Bignalet and Luc Puzos for their important contribution to the installation and monitoring of the field experiment. This study benefitted from an ANR Grant ANR-07-GPLA-010, the REALTIME project, and was supported by INRA. Cécile Dantec had a PhD grant from INRA and the Aquitaine Region. Projet PHENOLOGIE : Phénologie et stratégies temporelles : adaptation des populations au changement climatique

Data availability Data will be made available upon request.

References

- Alcázar R, Reymond M, Schmitz G, de Meaux J (2011) Genetic and evolutionary perspectives on the interplay between plant immunity and development. *Curr Opin Plant Biol* 14:378–384
- Anekonda TS, Adams WT, Aitken SN (1998) Influence of second flushing on genetic assessment of cold hardiness in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var *menziesii* (Mirb.) Franco). *For Ecol Manag* 111:119–126
- Augsburger CK (1984) Seedling survival among tropical tree species: interactions of dispersal distance, light-gaps, and pathogens. *Ecology* 65:1705–1712
- Barnola P, Alatou D, Lacoite A, Lavarenne S (1990) Étude biologique et biochimique du déterminisme de la croissance rythmique du chêne pédonculé (*Quercus robur* L). Effets de l'ablation des feuilles. *Ann Sci For* 21:619–631
- Baucom RS, de Roode JC (2011) Ecological immunology and tolerance in plants and animals. *Funct Ecol* 25:18–28
- Chuine I, Cour P (1999) Climatic determinants of budburst seasonality in four temperate-zone tree species. *New Phytol* 143:339–349
- Collet C, Colin F, Bernier F (1997) Height growth, shoot elongation and branch development of young *Quercus petraea* grown under different levels of resource availability. *Ann Sci For* 54:65–81
- Collin P, Badot PM, Millet B (1996) Croissance rythmique et développement du chêne rouge d'Amérique, *Quercus rubra* L, cultivé en conditions contrôlées. *Ann Sci For* 53:1059–1069
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:746–751
- Desprez-Loustau ML, Dupuis F, Viguie A (1992) Evaluation of single applications of sterol-inhibiting fungicides for control of pine twisting rust. *Plant Dis* 76:376–382
- Desprez-Loustau ML, Vitasse Y, Delzon S, Capdevielle X, Marçais B, Kremer A (2010) Are plant pathogen populations adapted for encounter with their host? A case study of phenological synchrony between oak and an obligate fungal parasite along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 23:87–97
- Edwards MC, Ayres PG (1982) Seasonal changes in resistance of *Quercus petraea* (sessile oak) leaves to *Microspheera alphitoides*. *Trans Br Mycol Soc* 78:569–571
- Fomoni J (2011) Ecological and evolutionary implications of plant tolerance to herbivory. *Funct Ecol* 25:399–407
- Gilbert GS (2002) Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annu Rev Phytopathol* 40:13–43
- Gruntman M, Novoplansky A (2011) Ontogenetic contingency of tolerance mechanisms in response to apical damage. *Ann Bot* 108:965–973
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Léger P, Petit RJ (2011) Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Mol Ecol Resour* 11: 578–585
- Hajji M, Dreyer E, Marçais B (2009) Impact of *Erysiphe alphitoides* on transpiration and photosynthesis in *Quercus robur* leaves. *Eur J Plant Pathol* 125:63–72
- Harmer R (1992) The incidence of recurrent flushing and its effect on branch production in *Quercus petraea* (Matt) Liebl growing in southern England. *Ann Sci For* 49:589–597
- Hewitt HG, Ayres PG (1976) Effect of infection by *Microspheera alphitoides* (powdery mildew) on carbohydrate levels and translocation in seedlings of *Quercus robur*. *New Phytol* 77:379–390
- Jarvis PG (1964) The adaptability to light intensity of seedlings of *Quercus petraea*. *J Ecol* 52:545–571
- Kovalchuk A, Keriö S, Oghenekaro AO, Jaber E, Raffaello T, Asiegbu FO (2013) Antimicrobial defenses and resistance in forest trees: challenges and perspectives in a genomic era. *Annu Rev Phytopathol* 51:221–244

- Lefevre T, Roche B, Poulin R, Hurd H, Renaud F, Thomas F (2008) Exploiting host compensatory responses: the ‘must’ of manipulation? *Trends Parasitol* 24:435–439
- Lockhart BR, Hodges JD, Gardiner ES, Ezell AW (2003) Photosynthate distribution patterns in cherrybark oak seedling sprouts. *Tree Physiol* 23:1137–1146
- Marçais B, Desprez-Loustau ML (2013) European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Ann Sci For*. doi:10.1007/s13595-012-0252-x
- Marçais B, Kavkova M, Desprez-Loustau ML (2009) Phenotypic variation in phenology of ascospore production between European populations of oak powdery mildew. *Ann Sci For* 66:814
- McDowell N, Barnard H, Bond BJ, Hinckley T, Hubbard RM, Ishii H, Köstner B, Magnani F, Marshall JD, Meinzer FC et al (2002) The relationship between tree height and leaf area:sapwood area ratio. *Oecologia* 132:12–20
- Mizumachi E, Mori A, Osawa N, Akiyama R, Tokuchi N (2006) Shoot development and extension of *Quercus serrata* saplings in responses to insect damages and nutrient conditions. *Ann Bot* 98:219–226
- Montarry J, Corbière R, Andrivon D (2007) Is there a trade-off between aggressiveness and over-winter survival in *Phytophthora infestans*? *Funct Ecol* 21:603–610
- Mougou A, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2008) New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *For Pathol* 38:275–287
- Mougou-Hamdane A, Giresse X, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2010) Spatial distribution of genetically differentiated groups of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Ann Sci For* 7:212
- Packer A, Clay K (2000) Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature* 404:278–281
- Pagan I, Alonso-Blanco C, Garcia-Arenal F (2008) Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Pathog* 4:e1000124
- Pan JJ, Clay K (2003) Infection by the systemic fungus *Epichloe glyceriae* alters clonal growth of its grass host, *Glyceria striata*. *Proc R Soc Lond B* 270:1585–1591
- Panstruga R, Dodds PN (2009) Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* 324:748–750
- Pap P, Rankovic B, Masirevic S (2012) Significance and need of powdery mildew control (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl. in the process of regeneration of the pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in the Ravni Srem area. *Period Biol* 114:91–102
- Percival GC, Noviss K (2008) Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). *Tree Physiol* 28:1685–1692
- Poulin R (2010) Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. In: Brockmann HJ (ed) *Advances in the study of behavior*, vol 41. Academic, Burlington, pp 151–186
- Rosenberg DA, Robinson TL, Schupp JR, Engle-Ahlers CA, Meyer FW (2003) Effect of sterol-demethylation inhibiting fungicides on apple fruit set, fruit size, total yield, and gross returns. *Hortscience* 38:601–604
- Roy BA, Kirchner JW (2000) Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution* 54:51–63
- Sage RD, Koenig WD, McLaughlin BC (2011) Fitness consequences of seed size in the valley oak *Quercus lobata* Née (Fagaceae). *Ann Sci For* 68:477–484
- SAS Institute Inc (2011) SAS® 9.3 guide to software updates. SAS, Cary
- Shykoff JA, Kaltz O (1998) Phenotypic changes in host plants diseased by *Microbotryum violaceum*: parasite manipulation, side effects and trade-offs. *Int J Plant Sci* 159:236–243

CHAPITRE VI

Synthèse et discussion autour des principaux résultats, questions soulevées et perspectives



1. PRESSION EXERCÉE PAR LES TEMPÉRATURES DE <i>CHILLING</i> ET DE <i>FORCING</i> SUR LE DEBOURREMENT	136
1. APPROCHE EXPERIMENTALE DES BESOINS EN TEMPÉRATURES DE <i>CHILLING</i> ET DE <i>FORCING</i> POUR LE DEBOURREMENT AUX NIVEAUX INTRA ET INTER POPULATIONS	137
2. MODELISATION	139
2. EXPOSITION DU CHENE AUX CONTRAINTES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES	142
1. VARIATIONS INTER POPULATIONS DE L'EXPOSITION AUX CONTRAINTES	143
2. VARIATIONS DE L'EXPOSITION AUX CONTRAINTES AU SEIN DES POPULATIONS	144
3. RELATIONS COMPLEXES ENTRE TEMPÉRATURES ET EVITEMENT DES GELS TARDIFS	145
4. SYNCHRONISATION PHENOLOGIQUE HOTE/PARASITE	146
3. QUAND L'OÏDIUM MODIFIE LA PHENOLOGIE DE LA CROISSANCE DU CHENE	148
1. AUGMENTATION DU POLYCYCLISME ET EXPOSITION AUX GELS	148
2. PHENOTYPE ETENDU	150
4. ROLE DES INTERACTIONS ENTRE LES FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES DANS L'INTENSITE DES DEGATS	150
5. BILAN	152

QUESTIONS SOULEVÉES ET PERSPECTIVES

1. LA PHENOLOGIE : DES MECANISMES SOUS-JACENTS PEU CONNUS	154
1. LA DORMANCE DU CHENE	154
Détermination de la date de levée de dormance	154
Manque de <i>chilling</i> : besoin supérieur en <i>forcing</i> ou cumul différé ?	155
2. LA SENSIBILITE PHENOLOGIQUE (ONTOGENIQUE) A L'OÏDIUM	157
3. FACTEURS DU CLIMAT IMPLIQUES DANS LA PHENOLOGIE DE L'OÏDIUM	158
2. PRESSIONS DE SELECTION PASSEES ET FUTURES SUR LA PHENOLOGIE DU CHENE	159
1. PHENOLOGIE ET FITNESS	159
2. PRESSIONS DE SELECTION PASSEES : MODELISATION DES RISQUES A <i>POSTERIORI</i>	161
3. CHANGEMENT CLIMATIQUE ET PRESSIONS DE SELECTION FUTURES	162

SYNTHÈSE ET DISCUSSION AUTOUR DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

1. Pression exercée par les températures de *chilling* et de *forcing* sur le débourrement¹

L'un des objectifs de ma thèse consistait à mieux caractériser les températures de *chilling* et de *forcing* (variabilité, besoins) nécessaires au débourrement foliaire. Tout d'abord, nous avons montré que la variation génétique observée pour la phénologie du débourrement entre et au sein des populations de chêne est probablement due à des différences de besoins en températures de *forcing* (i.e. « chaudes ») plutôt qu'à des différences de besoins en températures de *chilling* (i.e. « froides ») (**Chapitre 2**). De plus, le chêne est très sensible aux températures printanières : il présente une avancée du débourrement de 6.5 jours par degré d'augmentation de température, comparé à seulement 2.8 jours chez le hêtre. Ensuite, nos résultats suggèrent que les températures de *chilling* ne sont probablement pas un facteur limitant du débourrement du chêne sous les conditions climatiques actuelles, même si les conditions ne semblent pas optimales en basse altitude. Actuellement, les modèles à une phase (*forcing* uniquement) et à deux phases (*chilling* et *forcing*) sont donc tous deux capables d'estimer avec précision les dates de débourrement (**Chapitre 3**). L'intégration de la date de levée de dormance dans les modèles n'améliore pas de manière franche les simulations actuelles, mais cela nous permet certainement de simuler des scénarios futurs plus réalistes. Enfin, d'après nos observations et nos sorties de modèles, les populations en marge sud de leur aire de répartition (basse altitude) pourraient être limitées par leur besoins en froid à partir des années 2050. Ceci a déjà été observé en 2007, en raison d'un hiver exceptionnellement chaud, où le manque de *chilling* a probablement retardé le débourrement du chêne, même en haute altitude. Globalement, les simulations montrent une avancée du débourrement au 21^{ème} siècle, de 1.8 jours par décennie en basse altitude et de 3.6 jours par décennie en haute altitude. Cependant, en basse altitude, avec un modèle à deux phases bien paramétré (i.e. montrant une bonne efficacité, une bonne performance en validation croisée et des températures

¹ Les résultats concernant le hêtre ne seront pas abordés ici.

de cumul de *chilling* réalistes), les simulations montrent un retard du débourrement à partir des années 2050. L'avancée de la phénologie du débourrement avec le réchauffement climatique sera donc probablement moins prononcée que prévue, au moins dans les situations où le froid est limitant.

1. Approche expérimentale des besoins en températures de *chilling* et de *forcing* pour le débourrement aux niveaux intra et inter populations

Lors du suivi de la dormance en chambre climatique, nous avons observé les trois phases de dormance pour la population de chêne de haute altitude : l'entrée en endodormance, la levée d'endodormance, et la phase d'écodormance, pendant laquelle la quantité de températures de forcing cumulées ne varie pas avec une quantité croissante de températures de *chilling* reçues, l'endodormance étant supposée levée. Cette dernière phase, de quiescence, n'a pas été facile à distinguer pour la population de basse altitude. Nous avons cependant pu observer que pour une même quantité de *chilling* reçu, les populations de haute altitude ont eu besoin de plus de jours de *forcing* pour débourrer que les populations de basse altitude, pendant toute la durée de l'expérimentation. De même, au sein des populations de basse altitude, les individus tardifs ont eu besoin de plus de jours de *forcing* que les individus précoces. De plus, les populations de basse et haute altitude semblent avoir des besoins en froid très proches pour lever la dormance. Ainsi, la différenciation génétique entre et au sein des populations de chêne peut être associée à une différence de besoin en températures de *forcing*. Ceci peut expliquer la variation *cogradient* observée en tests de provenance chez le chêne (Vitasse et al 2009a ; Alberto et al. 2011) (**Figure 1**) : les populations de haute altitude débourreraient plus tard à cause de plus fortes exigences en températures de *forcing* (et non de *chilling*). Charrier et al. (2011), ainsi que Mauget & Germain (1980), ont également observé une plus grande exigence en températures de *forcing* après une même quantité de *chilling* reçue pour les génotypes tardifs de noyers. La variation *cogradient* est moins rencontrée dans la littérature que la variation *countergradient*, qui est par exemple observée chez le hêtre (Worall 1983 ; Chmura and Rozkowski 2002 ; Gomory & Paule 2011 ; Acevedo-Rodriguez et al. 2006). D'après nos résultats, il semblerait que les différences observées *in situ* et le *countergradient* observés en test de provenance chez le hêtre entre les populations soit dues à des différences de

besoins en températures de *chilling* pour lever la dormance plutôt qu'en températures de *forcing*, qui semblent bas en basse et haute altitudes. Cependant, ces résultats demandent à être confirmés par une expérimentation plus détaillée avec des variations contrôlées de températures de *chilling* pour les deux populations.

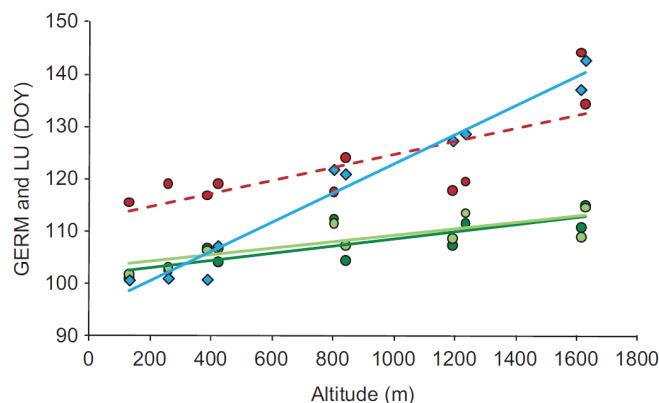


Figure 1. Variations altitudinales pour la germination et le débourrement du chêne dans les Pyrénées, *in situ* et en tests de provenance. Chaque point représente la date moyenne de germination et de débourrement de la provenance en fonction de l'altitude du site d'origine de la provenance. Rouge foncé, germination ; vert foncé, débourrement dans le test de provenance de Pierroton (44°44'N, 00°46'O) ; vert clair, débourrement dans le test de provenance de Toulence (44°34'N, 00°16'O) ; bleu clair, débourrement *in situ* mesuré en 2007 (année de récolte des glands). Les régressions linéaires sont représentées aux couleurs correspondantes par des tirets ($P < 0.05$) ou une ligne ($P < 0.01$) (Alberto et al. 2011).

Toutefois, les différences entre les populations ou les individus pourraient également être dues à des différences de sensibilité aux températures de *chilling* et/ou *forcing*. A notre connaissance, ces différences de sensibilité potentielles entre populations n'ont jamais été testées. Les populations de haute altitude pourraient avoir un seuil de température inférieur pour l'accumulation du chaud, ou les populations de basse altitude pourraient aussi avoir des gammes plus larges de températures efficaces pour cumuler le *chilling*. De plus, le débourrement peut aussi être contrôlé par la photopériode chez certaines espèces, une photopériode longue pouvant avoir un rôle similaire à celui joué par de fortes quantités de *chilling* reçues ou interagissant avec la quantité de températures de *forcing* nécessaires au débourrement (Polgar & Primack 2011 ; Basler & Körner 2012 ; Laube et al. 2013 ; Vitasse & Basler 2013). Cependant, Laube et al. (2013) ont confirmé expérimentalement que la photopériode n'intervient pas dans la dormance du chêne, *Q. robur* et *Q. rubra* y étant insensibles, et *Q. bicolor* y répondant faiblement.

De plus, à l'aide du suivi de la phénologie *in situ*, nous avons calculé la quantité de températures de *chilling* reçue par les arbres entre le 1^{er} Novembre et le débourrement, et de températures de *forcing* reçue entre le 1^{er} Janvier et le débourrement, pour les différentes populations de chêne entre 2005 et 2012. Ainsi, en haute altitude, nous avons observé qu'à partir d'un certain seuil de *chilling* reçu, les besoins en chaud ne semblent pas modifiés. Les populations de basse et moyenne altitudes ne semblent cependant jamais exposées à des températures de *chilling* permettant de lever la dormance de façon optimale. Cependant, nous n'observons pas de débourrement erratique à ces altitudes, et le débourrement a lieu dans une période cohérente au printemps. Le froid ne semble réellement limitant que pour des années à hiver particulièrement chaud comme 2007. De nombreuses études ont fait état d'une avancée de la date de débourrement chez les arbres tempérés avec l'augmentation actuelle des températures (Root et al 2003 ; Menzel et al. 2006 ; Richardson et al. 2006 ; Vitasse et al. 2009b). Cependant, le débourrement pourra être retardé ou inchangé à cause d'un manque en températures de *chilling* (Chuine et al. 2010 ; Fu et al. 2012a ; Laube et al. 2013), comme ce qui a certainement été observé en 2007.

Ces observations et expérimentations confirment l'importance des températures de *chilling* dans la phénologie du débourrement foliaire. Ce type d'expérimentation est donc nécessaire pour l'amélioration des modèles de débourrement, d'une part car ces résultats mettent le doigt sur les différences génétiques pour les besoins entre les populations, et d'autre part car cela nous permet de déterminer une date de levée de dormance permettant de mieux définir la phase liée aux températures de *chilling*.

2. Modélisation

Afin d'étudier plus précisément l'influence de la phase de *chilling*, nous avons analysé les simulations de modèles de débourrement à une phase et à deux phases, séquentiels ou alternatifs, variant de par leurs fonctions de réponses aux températures de *chilling* et de *forcing*, paramétrés avec la date de levée de dormance ou non (**Chapitre 3**). L'intégration de la date de levée de dormance dans les modèles de

débourrement n'a pas été effectuée jusqu'à présent, faute de jeux de données suffisants (NB une étude-sœur de la nôtre est également en cours sur les arbres fruitiers, encadrée par Isabelle Chuine, CEFE Montpellier). Nos résultats montrent que plusieurs modèles, que ce soit à une phase ou séquentiels à deux phases, sont capables d'estimer précisément les dates de débourrement des populations de chêne sur la période actuelle. On observe souvent que les modèles empiriques (comme le modèle à une phase sans *chilling*) prédisent aussi bien voire mieux que des modèles plus sophistiqués (comme le modèle à deux phases) lorsque l'on a beaucoup d'incertitudes sur les mécanismes (Makowski & Wierzbicki 2003). Nous avons ainsi pu observer que l'intégration de la date de levée de dormance n'améliore pas systématiquement les simulations actuelles. Cela peut être lié au manque de connaissances concernant les mécanismes sous-jacents de la dormance, et à un manque de précision concernant la détermination de la date de levée de dormance. Ceci suggère également qu'actuellement, les températures de *chilling* ne sont probablement pas un facteur limitant le débourrement.

Nous avons ensuite prédit les dates de débourrement futures à l'aide de quatre modèles que nous avons paramétrés, tous les quatre performants en ce qui concerne la qualité de leur ajustement actuel, mais pouvant différer par la pertinence de leur fonction de réponse aux températures de *chilling* : deux modèles séquentiels à deux phases paramétrés avec la date de levée de dormance, l'un présentant une fonction de réponse aux températures de *chilling* « réaliste » et l'autre non, un modèle séquentiel à deux phases paramétré sans la date de levée de dormance, avec une fonction de réponse aux températures de *chilling* « réaliste », et un modèle à une phase classique cumulant les températures de *forcing* à partir du 1^{er} janvier (**Chapitre 3**). Les simulations de ces quatre modèles sont assez proches en haute altitude mais diffèrent en basse altitude. A l'heure des connaissances actuelles sur la dormance (rôle des températures froides et chaudes, gamme de températures efficaces), le modèle séquentiel à deux phases paramétré avec la date de levée de dormance et présentant une fonction de réponse aux températures de *chilling* avec une gamme de températures efficaces entre 2°C et 15°C, et une température optimale de cumul égale à 5°C, est le modèle le plus pertinent. Les scénarios d'évolution de la date de levée de dormance et du débourrement avec le réchauffement climatique au cours du 21^{ème} siècle simulé par ce modèle sont donc les plus probables. Pour les décennies à venir, la

date de levée de dormance sera donc probablement retardée en basse altitude et avancée en haute altitude. Ces tendances opposées peuvent être simplement expliquées par les climats très contrastés entre basse et haute altitude. De ce fait, avec le réchauffement climatique, en haute altitude on se rapproche des températures optimales de cumul de *chilling*, alors qu'on s'en éloigne en basse altitude. En basse altitude, on observe une avancée de la date de débourrement jusqu'à dans les années 2050, puis celle-ci est retardée (contrairement à ce que prédit le modèle à une phase). Ceci peut être expliqué par le fait que, jusqu'à dans les années 2050, la levée de dormance a lieu avant l'arrivée des températures chaudes, donc le *chilling* n'est pas limitant dans le sens où il ne limite pas l'accumulation de chaud. Ainsi, la date de débourrement avance avec la précocité des températures chaudes. Le manque de froid deviendrait ensuite un facteur limitant lorsqu'il retarde le début de l'accumulation des températures de *forcing*, et par conséquent la date de débourrement. Bien que les températures soient plus chaudes, l'accumulation plus rapide des températures de *forcing* ne parvient pas à contrebalancer le retard de la date de levée de dormance. En haute altitude, on observe une avancée de la date de débourrement jusqu'à la fin du siècle, mais un ralentissement à partir des années 2080 (contrairement aux autres modèles). Nos résultats soulignent l'importance d'une phase de *chilling* bien paramétrée, à la vue des sorties de simulations futures très différentes du modèle à deux phases paramétré avec la date de levée de dormance mais présentant une gamme non réaliste de températures de *chilling* efficaces. Il est donc hautement nécessaire d'améliorer la connaissance des processus biologiques qui sous-tendent la phase de *chilling* pour les prédictions futures.

Il est intéressant de noter que les quatre modèles simulent très bien la date de débournement actuelle à basse altitude (± 2 jours) mais pas à haute altitude (+25 jours en moyenne). Bien que paramétrés sur des jeux de données de basse, intermédiaire et haute altitudes, nos modèles semblent plus adaptés aux populations de basse altitude. La date de débournement présente de fortes variations inter et intra population. Nous avons démontré que la variation génétique dans la date de débournement entre et au sein des populations de chêne sessile est probablement due à des différences de besoins en températures de forcing (**Chapitre 2**). Nous n'avons pas pris cela en considération dans nos modèles. Cette inadéquation pour les populations de haute altitude pourrait s'expliquer par la différenciation

génétique observée le long du gradient altitudinal (Vitasse et al. 2009a ; Alberto et al. 2010 ; Alberto et al. 2011), et pourrait avoir une répercussion sur les prédictions établies en haute altitude au cours du 21^{ème} siècle.

2. Exposition du chêne aux contraintes biotiques et abiotiques

Notre étude est l'une des premières à évaluer simultanément l'interaction entre l'exposition aux contraintes abiotiques et biotiques et la phénologie des arbres (**Chapitre 4**). Un résultat frappant de cette étude est la variation considérable des « marges de sécurité » vis-à-vis des gels tardifs et de l'oïdium entre les populations de chêne en fonction de l'altitude, et au sein des populations en fonction du phénotype phénologique des arbres (précoce vs. tardif). En effet, dans l'hypothèse d'une adaptation locale optimale, nous aurions pu nous attendre à une marge de sécurité positive (i.e. évitement) constante dans toutes les situations (Cannell & Smith 1985 ; Ghelardini & Santini 2009 ; Delzon & Cochard 2014). Notre étude montre que la marge de sécurité vis-à-vis des gels tardifs est généralement positive, alors que la marge de sécurité vis-à-vis de l'oïdium est généralement négative (i.e. exposition), ceci entraînant l'infection. Ceci suggère une meilleure adaptation des chênes pour éviter les gels tardifs que pour éviter la maladie. Pour les deux contraintes, les marges de sécurité tendent à diminuer avec l'élévation en altitude, résultant en une plus forte exposition en haute altitude. Cependant, en basse altitude les arbres précoces sont capables d'éviter la maladie, mais sont potentiellement exposés aux gels tardifs, alors que les arbres tardifs évitent le gel mais pas l'oïdium. Ces contrastes d'exposition entre précoces et tardifs ne sont pas observés à haute altitude, la variation phénologique étant beaucoup plus faible et les individus tous exposés pareillement aux contraintes. La combinaison des pressions liées au gel et à l'oïdium pourrait ainsi contribuer au maintien de hauts niveaux de diversité phénologique au sein des populations de basse altitude (Alberto et al. 2011).

1. Variations inter populations de l'exposition aux contraintes

La marge de sécurité vis-à-vis des gels tardifs est positive pour 72% des observations par arbre et année. L'évitement des gels tardifs via un débourrement tardif semble donc être un processus adaptatif majeur le long du gradient résultant de l'effet d'une sélection naturelle passée. En retardant le débourrement, les arbres maintiennent leur résistance au froid le plus longtemps possible. Chez le chêne, la résistance au froid au moment du débourrement est particulièrement faible, comparé à d'autres espèces forestières (Lenz et al. 2013). Chez cette espèce, l'évitement via un retard de débourrement semble donc prévaloir sur la résistance au froid. De plus, le cline *cogradient* observé en tests de provenance pour le débourrement du chêne entre les populations de différentes altitudes (Vitasse et al. 2009a ; Alberto et al. 2010 ; Alberto et al. 2011) semble indiquer que l'évitement des gels soit un processus adaptatif plus important pour les chênes que la maximisation de la longueur de la saison de végétation. Cette adaptation ayant de plus eu lieu malgré les très faibles distances géographiques qui séparent les populations, ceci suggère une forte sélection directionnelle inter populationnelle. Cependant, la sélection pour éviter les gels tardifs n'aura pas été pleinement efficace au-dessus de 1300m (1030m pour les arbres précoces et 1510m pour les arbres tardifs), altitude à partir de laquelle la marge de sécurité vis-à-vis des gels tardifs tend à être négative. Cette situation résulte certainement d'une contrainte physique supplémentaire liée à la maturation des fruits (Morin et al. 2007 ; Morin et al. 2008).

Contrairement aux marges de sécurité vis-à-vis des gels tardifs, la marge de sécurité vis-à-vis de l'oïdium est positive pour seulement 8% des arbres (principalement des précoces en basse altitude), indiquant une absence d'évitement de la maladie. La plupart des arbres sont effectivement infectés, mais les niveaux d'infection restent modérés. Ceci suggère que, contrairement aux gels, la résistance est prépondérante sur l'évitement dans l'interaction des chênes avec l'oïdium. De plus, la faible infection même en haute altitude où l'exposition est plus grande pourrait être expliquée par les caractéristiques des arbres (hauteur plus faible, densité du feuillage moins importante) et les conditions environnementales (saison de végétation plus courte, plus faibles températures), de plus en plus

défavorables au développement de l'oïdium avec l'élévation en altitude (Glawe 2008). La pression de la maladie apparaît donc de bien moindre importance par rapport à celle des gels tardifs en tant que facteur de sélection potentiel sur la phénologie du débourrement, particulièrement en haute altitude. En basse altitude, la sélection pour éviter l'oïdium est certainement plus forte car les conditions environnementales sont plus favorables au développement de la maladie et les gels tardifs sont plus rares.

2. Variations de l'exposition aux contraintes au sein des populations

Aux basses altitudes, 24 % des arbres précoces sont exposés aux gels tardifs. A l'inverse, 15% des arbres précoces vs. 2% des arbres tardifs échappent à l'oïdium (marge de sécurité positive). On observe effectivement un plus fort niveau d'infection chez les arbres tardifs que chez les arbres précoces. Nos résultats confirment l'hypothèse que les pressions biotiques (oïdium) et abiotiques (gels tardifs) favorisent des phénotypes phénologiques opposés en basse altitude, favorisant ainsi le maintien d'une diversité génétique pour la phénologie du débourrement. Une façon évidente de survivre et de se reproduire dans un environnement à risque est de répartir le risque afin qu'un échec ne soit pas nuisible de manière décisive, particulièrement à l'échelle d'une population (Cohen 1966). Ceci correspond à la stratégie de minimisation des risques, ou *bet-hedging*. L'étude de cette stratégie implique de spécifier dans quel environnement une stratégie est évaluée, et quelles sont les stratégies comparées (Ripa et al. 2010). Ici, tout se passe comme si on observait un compromis au niveau de la population entre l'exploitation de conditions environnementales favorables et l'évitement de la maladie. La grande différence entre la date du dernier gel et la date de sporulation (i.e. la fenêtre de sécurité) à basse altitude permet aux populations de chêne de maintenir cette diversité, avec des arbres précoces évitant la maladie de l'oïdium (et peut-être les dégâts dus à d'autres défoliateurs) et ayant une longue saison de végétation, et des arbres tardifs plus susceptibles de survivre aux événements de gels tardifs (Vitasse et al. 2009a ; Bennie et al. 2010).

Les spores d'oïdium ont été détectées environ un mois plus tôt dans les pièges placés au sein des enclos de semis à 150 m en 2012 par rapport aux pièges placés dans la canopée d'arbres adultes, mais aucune différence n'a été observée en 2011, ni à 400 m en 2012. Il est donc difficile de conclure à une différence de timing dans l'apparition des spores et donc des périodes d'exposition entre semis et arbres adultes. Nos observations montrent que, comme pour les arbres adultes, les semis précoces sont plus avantagés par rapport à l'oïdium que les tardifs, et inversement par rapport aux gels tardifs. Il était important de vérifier cet aspect car les pressions de sélection dans les populations d'arbres sont les plus fortes pendant le stade juvénile. Les semis sont cependant moins infectés dans notre étude, peut-être à cause des conditions moins favorables à l'oïdium dans le sous-bois forestier (Marçais & Desprez-Loustau 2014). De plus, nos résultats d'infection ne concernent que la première pousse, or les semis font un grand nombre de pousses successives et ces dernières sont fortement infectées.

3. Relations complexes entre températures et évitement des gels tardifs

Nous avons vu que l'évitement des gels tardifs via un débourrement tardif semble être un processus adaptatif majeur le long du gradient résultant de l'effet d'une sélection naturelle passée. Cependant, les arbres ne « mesurent » pas directement l'occurrence des températures extrêmes, mais il semble qu'ils aient développé des mécanismes complexes liés aux températures de *chilling* et de *forcing* (et à la photopériode pour certaines espèces) pour optimiser le début du développement des bourgeons par rapport à la probabilité de gels tardifs au printemps (Cannell 1997 ; Körner & Basler 2010 ; Polgar & Primack 2011 ; Basler & Körner 2012). L'évolution peut agir en « réglant » l'efficacité des températures froides dans la levée de dormance, la date de départ et la durée de l'action des températures froides, le taux de croissance maximale à des températures chaudes, et ainsi de suite (Cannell 1997). Le fait que l'on observe des individus tardifs qui débourrent bien plus tard que les derniers gels tous les ans, au détriment de la durée de la saison de végétation, laisse réellement penser à un évitement des gels tardifs au printemps. Il semble que les différences de débourrement entre basse

altitude et haute altitude et entre précoces et tardifs soient liés à des différences de besoins en chaud. Il pourrait donc y avoir un premier contrôle par les températures de *chilling* pour échapper aux températures gélives de l'hiver, puis un second contrôle par températures de *forcing* pour éviter les gels de printemps. Il est par contre plus complexe d'imaginer l'interaction de signaux biotiques avec des signaux tels que les besoins en température. Il est plus probable que les facteurs biotiques n'aient qu'un effet de sélection de phénotypes déjà existants.

4. Synchronisation phénologique hôte/parasite

Un résultat intéressant de nos observations est que seule l'espèce *Erysiphe alphitoides* a été détectée dans les échantillons analysés. Bien que cette espèce soit la plus observée sur le territoire (Mougou-Hamdane et al. 2010), il est tout de même étonnant de n'avoir pas du tout observé *E. quercicola*, d'autant plus que des pousses-drapeaux (typiques de cette espèce – Feau et al. 2012) ont été observées sur certains sites en 2011, notamment à Laveyron (131m). De plus, l'observation de chasmothèces à l'automne 2010 (récoltés sur des feuilles mortes) nous avait permis de noter la présence de *Phyllactinia* sp (les chasmothèces des deux genres se distinguant morphologiquement). *Phyllactinia* sp pourrait être une espèce indigène beaucoup moins compétitive (et donc trouvée à très faible fréquence) que l'espèce invasive *E. alphitoides* (Mougou et al. 2008 ; Mougou-Hamdane et al. 2010 ; Desprez-Loustau ML, communication personnelle).

Combes (2001) définit la relation hôte/parasite comme une course aux armements empêchant/favorisant la rencontre et/ou la compatibilité entre les deux organismes. La synchronisation phénologique entre le débourrement du chêne et la production des ascospores (constituant l'inoculum primaire) est un facteur important expliquant la sévérité de la maladie sur chêne (Marçais et al. 2009 ; Desprez-Loustau et al. 2010 ; Marçais & Desprez-Loustau 2014). Marçais et al. (2009) ont toutefois observé un manque d'adaptation locale du champignon pour la phénologie : les populations d'*E. alphitoides* européennes ne sont pas différenciées génétiquement pour le timing de production d'ascospores et ne semblent donc pas localement adaptées à la phénologie de leur hôte. Nous

retrouvons également ce manque de synchronisation à l'échelle du gradient. En basse altitude certains arbres précoces échappent à l'oïdium, et en haute altitude il y a beaucoup de pertes de spores en début de saison car les spores ne rencontrent pas de support biologique. La synchronisation est la meilleure à altitude intermédiaire. Ceci résulte de sensibilités à la température très différentes entre chêne et oïdium et donc à des variations de « rencontre » le long du gradient : le débourrement du chêne est retardé de 3.3 jours / 100 m d'augmentation en altitude alors que l'émission des spores d'oïdium seulement de 0.6 jours.100m⁻¹. Ainsi, les deux espèces présentent des clines phénologiques différents le long du gradient altitudinal. A l'échelle de la population, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la date de débourrement de l'arbre et la date d'émission des spores au sein de cet arbre. Ceci suggère qu'il n'y a pas d'adaptation locale des populations d'oïdium en réponse à la variation phénologique au sein des populations de chêne, par opposition avec les dèmes adaptatifs trouvés chez certains insectes herbivores (van Asch & Visser 2007).

Cependant, l'infection est fortement corrélée à la marge de sécurité (et donc à l'exposition ou probabilité de rencontre) aux basses altitudes : les arbres tardifs (plus exposés) sont plus fortement infectés que les arbres précoces (moins exposés). L'infection sévère par l'oïdium de chênes au débourrement tardif a été mentionnée comme étant l'un des facteurs incitateurs du déclin qui a eu lieu en forêt de Vierzon (centre de la France) en 2001-2010 (Marçais & Desprez-Loustau 2014). Nous ne retrouvons pas cette relation aux altitudes plus élevées, où aucune corrélation entre l'infection et la durée d'exposition aux spores n'a été démontrée, et où la plus forte exposition par rapport aux populations de basse altitude n'amène pas à une plus forte infection. Cependant, ceci est probablement à mettre en lien avec les facteurs environnementaux qui deviennent moins favorables au développement de larges populations de pathogènes avec l'altitude (diminution de la densité de l'hôte, facteurs climatiques).

Ainsi, la synchronisation phénologique entre le pathogène et son hôte semble bien influencer sur le développement de la maladie dans un environnement favorable donné, mais elle ne semble pas critique pour le développement du champignon, contrairement à ce qui se passe pour certains herbivores. Ceci

est peut-être dû au nombre très important de spores émises (comparé au nombre d'œufs d'insectes), à leur facilité de dispersion et à leur production continue au cours de la saison.

3. Quand l'oïdium modifie la phénologie de la croissance du chêne

Les estimations quantitatives des effets des maladies sur la croissance des plantes sont fréquentes dans le cas des plantes cultivées (impact sur le rendement) mais plus rare pour les arbres forestiers. Nos résultats (**Chapitre 5**) montrent une diminution nette de la hauteur des semis de chêne suite à l'infection par l'oïdium, presque proportionnelle au pourcentage de surface foliaire infectée. Un résultat marquant et plus inattendu de cette étude est l'augmentation du polycyclisme au cours de la saison de végétation des semis suite à l'infection. Ces changements sont probablement, d'une part, l'expression de la réponse de la plante fournissant une compensation aux dégâts induits par le parasite, c'est-à-dire une tolérance à l'infection. Toutefois, l'augmentation du polycyclisme n'est pas toujours avantageuse. Une plus forte mortalité apicale est observée au printemps suivant chez les chênes possédant un grand nombre de pousses (i.e. plus infectés), car ces bourgeons n'ont pas le temps de mettre en place une résistance efficace aux gels d'hiver. De plus, un débourrement légèrement plus précoce est observé chez les individus exposés à un fort niveau d'inoculum ; ces bourgeons sont donc par la suite plus exposés aux gels de printemps. Enfin, nos résultats montrent que le parasite exploite aussi la réponse de l'hôte (polycyclisme) en augmentant ses propres performances.

1. Augmentation du polycyclisme et exposition aux gels

Le niveau d'infection a un effet négatif sur la croissance : la perte de hauteur après 3 ans est de 26% et 28% pour les niveaux intermédiaire et fort par rapport au niveau faible. La diminution de la croissance en hauteur du chêne peut être considérée comme une conséquence directe du détournement de nutriments par le parasite. Par ailleurs, un nombre croissant de pousses a été observé du faible au moyen et fort niveaux d'inoculum au cours des différentes saisons de végétation étudiées. Au bout des 3 ans, les semis ont produit 7.2, 7.5 et 8 pousses en moyenne dans les niveaux faible, intermédiaire et

fort d'inoculum. Le polycyclisme chez les arbres a souvent été associé avec une forte disponibilité en ressources et une forte vigueur des plantes (Collet et al. 1997 ; Collin et al. 1996). Il a été montré que la production d'une seconde pousse représente une forte utilisation du carbone (fort puits de carbone), soutenue par l'assimilation récente de photosynthétats par les tissus foliaires de la première pousse (Harmer 1992 ; Lockhart et al. 2003). Il était donc inattendu d'observer du polycyclisme chez des semis en situation de stress biotique, caractérisée par la consommation des photosynthétats de l'hôte par le parasite (Hewitt & Ayres 1976 ; Hajji et al. 2009). A notre connaissance, un effet positif de l'infection par le parasite sur le polycyclisme n'avait jamais été décrit antérieurement pour l'oïdium du chêne, ou pour toute autre maladie.

Le polycyclisme est positivement corrélé avec la hauteur, comme précédemment observé (Collet et al. 1997). Nous avons pu estimer qu'une pousse supplémentaire permet de compenser 34.2% de la perte théorique de hauteur liée à l'infection au cours des 3 années. L'augmentation du polycyclisme peut alors être vue comme un mécanisme de tolérance à l'infection par les arbres. Cela pourrait donc améliorer la compétitivité des semis, plus particulièrement grâce à une meilleure interception de la lumière et un surpassement des voisins (Sage et al. 2011). Cependant, la fréquence de la mortalité apicale au début du printemps augmente significativement avec le nombre de pousses produites au cours de la saison de végétation antérieure (quel que soit le niveau d'inoculum). La mortalité apicale des bourgeons durant l'hiver affecte un tiers des semis pour les niveaux d'inoculum faible et moyen ; la fréquence est encore plus forte au niveau d'inoculum fort (43% de mortalité apicale). Ceci correspond à une augmentation de la probabilité de mortalité du bourgeon apical de 4% pour une augmentation de 1% en pourcentage de surface foliaire infectée. La faible capacité des secondes pousses à passer l'hiver, particulièrement en interaction avec l'oïdium, a déjà été reportée (Harmer 1992). Ceci s'expliquerait par des changements physiologiques liés à l'infection, menant à une diminution de la résistance au froid (Ducomet 1913 ; Woodward et al. 1929 ; Foex 1941 ; Anekonda et al. 1998 ; Marçais & Desprez-Loustau 2014). Le bénéfice net de pousses supplémentaires pour l'arbre dépend donc des facteurs environnementaux, spécialement les températures hivernales. De plus, le

débourrement est légèrement avancé chez les semis exposés fortement à l'oïdium, les exposant à des risques plus importants de gels tardifs.

2. Phénotype étendu

Richard Dawkins a établi le concept de phénotype étendu en 1982 ; il considère que le phénotype ne doit pas être limité à des processus biologiques mais étendu pour inclure tous les effets des gènes, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur d'un individu. Par exemple, les barrages de castors peuvent être considérés comme une composante de leur phénotype étendu. Selon cette conception, les effets des gènes d'un individu peuvent également avoir des effets sur l'autre individu, comme dans le cas des interactions hôtes/parasites (Lambrechts et al. 2006), le phénotype modifié de l'hôte pouvant être vu comme un phénotype étendu du parasite. En appliquant ce concept, on pourrait voir ici le polycyclisme du chêne comme le phénotype étendu de l'oïdium, contrôlé à la fois par les gènes de l'hôte et du parasite et affectant la fitness aussi bien de l'hôte que du parasite. En effet, il a été reporté à plusieurs reprises que les feuilles de la deuxième pousse et des suivantes sont plus sévèrement infectées que les feuilles de la première pousse (Harmer 1992 ; Marçais & Desprez-Loustau 2014). Ces pousses récurrentes fournissent une disponibilité plus longue en tissus réceptifs pour le parasite au cours de la saison, à un moment où l'inoculum d'oïdium s'est construit à partir d'infections primaires sur les premières pousses (pression de propagule croissante). Nous avons en effet observé une relation positive entre le nombre de pousses et la production de spores par semis. Un polycyclisme croissant permet ainsi une amplification de la population fongique, menant probablement à une plus forte probabilité de survie l'année suivante, améliorant ainsi la fitness du parasite.

4. Rôle des interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques dans l'intensité des dégâts

En raison de l'évitement important, peu de dégâts liés aux gels tardifs ont été observés lors des suivis de phénologie sur nos populations. Des dégâts faibles ont été notés en 2007 sur la population de 1631 m en vallée des Gaves et en 2013 sur la population de 1194 m en vallée d'Ossau (**Figure 2**). Nous

n'avons pas observé d'épidémies majeures récurrentes d'oïdium dans les populations étudiées, bien que le champignon soit présent d'une année sur l'autre. Lors de notre étude, nous avons observé en moyenne 11% de surface foliaire infectée (première pousse), ce qui est relativement peu important (**Figure 2**). L'oïdium seul peut provoquer une défoliation entière, mais cela est rare. La mort d'un arbre est le plus souvent due à un effet combiné de différents facteurs (Gibbs & Greig 1997 ; Thomas et al. 2002). Il s'agit souvent d'une défoliation primaire (par les insectes, les champignons, les gelées de printemps, la sécheresse d'été), suivie d'attaques mortelles par des agents pathogènes opportunistes qui envahissent les arbres affaiblis (Wargo 1996). La combinaison d'une grave défoliation par les insectes durant au moins deux années consécutives et d'un événement climatique extrême est l'assemblage de facteurs le plus souvent impliqué dans le déclin des chênes (études de modélisation, Thomas et al. 2002). Le Département de Santé des Forêts (DSF) réalise un suivi de la santé des forêts à travers un réseau important de correspondants-observateurs sur tout le territoire français. Ainsi, dans la base de données du DSF, il est mis en évidence que 33.4% des observations d'oïdium ont été faites sur des arbres qui avaient perdu leur pousse de printemps par défoliation d'insecte ou gels tardifs (Marçais & Desprez-Loustau 2014). Delatour (1983) a montré que l'émergence d'*E. alphitoides* en Europe en 1907 a dramatiquement amplifié l'impact négatif des défoliations d'insectes. D'après une étude en cours sur les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) présentes dans la phyllosphère du chêne, les Erysiphaceae, dont principalement *E. alphitoides*, font partie des espèces les plus représentées (séquences retrouvées sur 95% des arbres, représentant 12% des séquences lues) (Boris Jakuschkin, communication personnelle). Les Mycosphaerellaceae seraient aussi fortement représentées. Ainsi, l'oïdium est certainement une contrainte importante de la vie du chêne. Dans les déclins plus récents liés à l'oïdium, l'interaction avec la défoliation par les insectes a été moins fréquemment invoquée, à l'avantage d'autres facteurs tels que la sécheresse et les pathogènes des racines (Marçais & Desprez-Loustau 2014). Les événements climatiques extrêmes (tempêtes, sécheresses extrêmes, gels extrêmes...) restent cependant la principale cause de dépérissements dans les populations d'arbres. Ces événements ont eu tendance à augmenter au cours des dernières décennies avec le changement climatique.



Figure 2. Feuilles d'arbre adulte infectées par l'oïdium (première et deuxième pousses) (à gauche) et jeunes feuilles ayant subi des dégâts de gel tardif (à droite). Photographies : Xavier Capdevielle (à gauche), Jean-Marc Louvet (à droite).

5. Bilan

Nous avons montré que les besoins en températures de *forcing* varient entre les populations et les individus chez le chêne, ceci représentant certainement une adaptation permettant d'éviter les gels tardifs au printemps. Le débourrement, qui présente une forte diversité phénologique intra et inter populations, est soumis à de nombreuses pressions environnementales. Jump et al. (2009) ont montré que des fluctuations importantes des pressions de sélection (temporelles et spatiales) en conditions naturelles peuvent contribuer aux forts niveaux de diversité génétique observés. Nos résultats suggèrent que l'évitement des gels tardifs, très souvent reconnus comme facteurs importants sur le timing du débourrement, a un rôle important dans les patrons de diversité phénologique observés le long du gradient (**Figure 3**). La pression de l'oïdium (ou d'autres défoliateurs de début de saison, comme la processionnaire du chêne *Thaumetopoea processionea*) en basse altitude pourrait d'autre part contribuer à expliquer le maintien de la diversité phénologique observée (**Figure 3**).

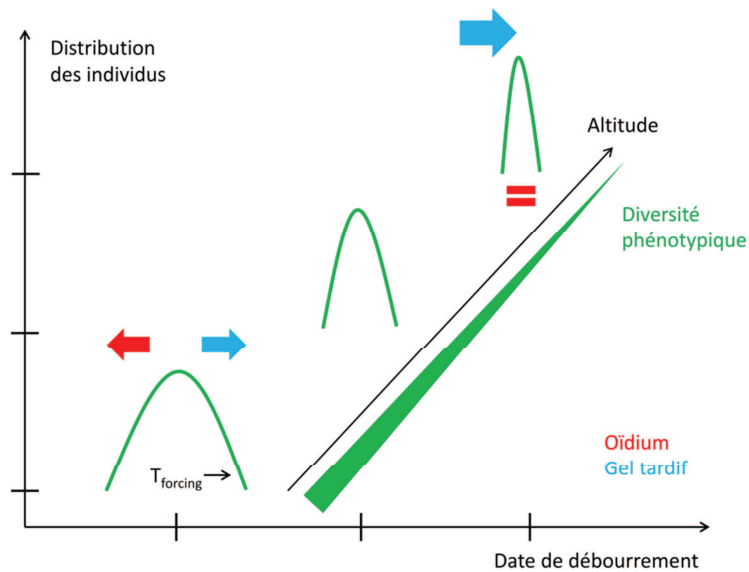


Figure 3. Rôle des pressions de sélection dans le maintien de la diversité phénotypique du débournement du chêne en basse altitude, et dans la différenciation génétique observée le long du gradient altitudinal.

Les risques d'exposition à l'oïdium vont certainement être modifiés avec le changement climatique, de par des sensibilités à la température différentes entre le champignon et son hôte. En ce qui concerne les gels tardifs, cela va dépendre des avancées respectives de la date du dernier gel et du débournement, ce dernier allant de plus être probablement retardé au milieu du siècle (**Figure 4**).

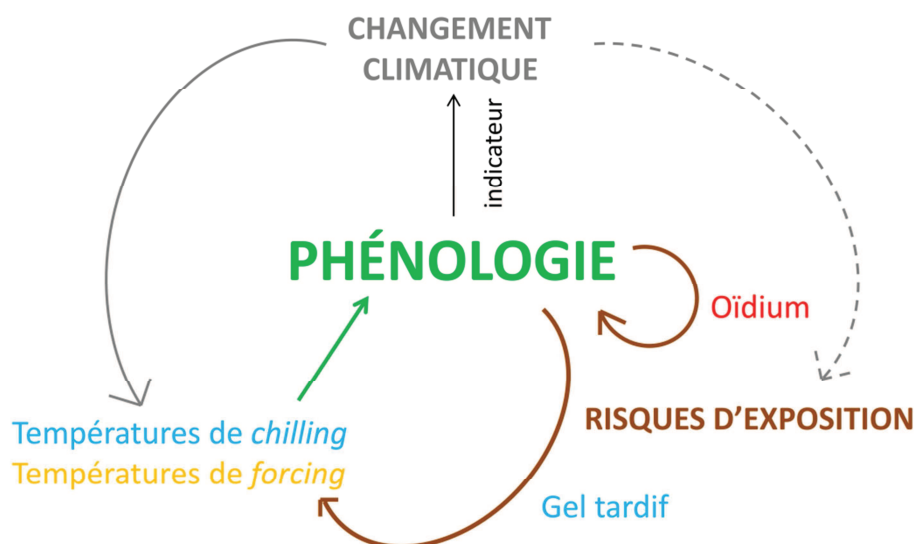


Figure 4. Interactions entre la phénologie du débournement de l'arbre et les facteurs environnementaux abiotiques (gel tardif, températures) et biotiques (oïdium) au sein et entre les populations de chêne, soumis au changement climatique.

QUESTIONS SOULEVÉES ET PERSPECTIVES

1. La phénologie : des mécanismes sous-jacents peu connus

1. La dormance du chêne

Détermination de la date de levée de dormance

La méthode de « boutures de nœuds isolés » que nous avons utilisée ici est une méthode communément utilisée pour étudier la dormance des bourgeons « en temps réel » (par rapport aux arbres en conditions naturelles). Cette méthode donne une bonne vision globale de l'évolution de la dormance. On visualise nettement les différences de besoins en températures de *forcing* entre les populations de basse et haute altitudes. Cependant, la dernière phase de dormance (i.e. l'écodormance ou quiescence), n'est pas toujours facile à distinguer. Il peut alors être difficile d'évaluer avec certitude la date de levée de dormance, et donc la quantité de *chilling* nécessaire pour la levée de dormance. Il est tout de même intéressant de noter que l'on observe une augmentation du taux de débourrement en chambre climatique une fois la dormance levée, ce qui permet d'affiner l'estimation de la date de levée de dormance (avec une erreur de ± 10 jours). D'après nos observations, il semble que les quantités de *chilling* à cumuler pour lever la dormance soient proches entre les populations de chêne de basse et haute altitudes, la quantité semblant toutefois un peu plus importante à haute altitude. Cependant, les *chilling days*, largement utilisés dans les études phénologiques pour comparer les espèces, sont une estimation simple pour décrire le processus physiologique très complexe qu'est la levée de dormance, et les besoins en températures de *chilling* doivent donc être interprétés avec précaution.

Cette méthode de suivi peut être couplée à la méthode dite de « froid forcé ». Cette méthode consiste à récolter un grand nombre de rameaux pendant la période supposée de maximum d'endodormance des bourgeons (aux alentours de la mi-novembre chez le chêne), de les mettre en chambre froide (4°C), puis de placer régulièrement des séries de bourgeons en chambre climatique, après qu'ils aient reçu des quantités de températures de *chilling* croissantes. On peut alors estimer la durée moyenne « seuil » de températures de *forcing* (en jours ou en degrés-jours) nécessaire au bourgeon pour débourrer,

lorsque l'action de froid supplémentaire ne diminue pas la durée moyenne de débourrement, en conditions de chambre climatique. Cette durée « seuil » peut ensuite être reportée sur les courbes de suivi de la dormance du test de « boutures de nœuds isolés » classique. Nous avons réalisé cette expérimentation pour nos deux populations mais en raison de problèmes de régulation de la température en chambre froide, l'expérimentation n'a pas abouti. La combinaison de ces deux méthodes permet certainement une détermination plus précise de la date de levée de dormance. Pour améliorer l'estimation de la date de levée de dormance, il faudrait réaliser cette expérimentation plusieurs années de suite. De plus, il faudrait la réaliser pour différentes populations, car cette durée « seuil » devrait *a priori* être différente entre les populations sachant que celles-ci peuvent présenter (comme ici) des besoins en température de *forcing* différents. Cependant, ces deux méthodes sont très coûteuses en matériel biologique (les arbres étudiés se retrouvent dépourvus d'un grand nombre de rameaux et bourgeons) et en temps (échantillonnage sur le terrain, création des boutures, suivi en chambre climatique).

Tout ceci souligne la nécessité de recherches supplémentaires sur les mécanismes physiologiques de la levée de dormance, les interactions entre les besoins en températures de *chilling* et de *forcing* chez les espèces d'arbres forestiers, et les relations entre la génétique et l'environnement. L'absence de températures froides durant l'hiver 2013-2014 permettra peut-être d'affiner nos observations...

Manque de *chilling* : besoin supérieur en *forcing* ou cumul différé ?

Notre travail soulève le problème du « timing » des périodes de cumul des températures de *chilling* et de *forcing*, en l'absence de connaissances claires sur les processus biologiques expliquant en quoi le froid influe pour lever la dormance. En effet, un « retard » de débourrement par manque de températures de *chilling* peut s'expliquer de deux façons : 1) en supposant un cumul séquentiel des températures : la dormance est levée mais tardivement, donc le début du cumul des températures de *forcing* a lieu plus tard et le débourrement en est retardé, ou 2) en supposant un cumul simultané des températures pendant la période aux alentours de la levée de dormance: la dormance n'est jamais

totale levée, mais en contrepartie un cumul plus important de températures de *forcing* permet le débourrement, qui en est tout de même retardé.

Lors de l'année 2007, les arbres ont reçu moins de froid entre le 1^{er} Novembre et la date de débourrement que les autres années quelle que soit l'altitude, mais ont reçu plus de chaud entre le 1^{er} Janvier et ce même débourrement. Le débourrement n'a pourtant pas été avancé cette année-là malgré les températures printanières plus élevées et ceci pourrait être expliqué par les deux hypothèses émises précédemment. Notre travail de modélisation a mis en évidence que les modèles de type séquentiel présentaient de bien meilleurs ajustements que les modèles de type parallèle, pour nos jeux de données actuels. Cependant, nous ne pouvons pas justifier des processus biologiques par la pertinence d'un modèle (point discuté dans Makowski & Wierzbicki 2003). Dans une revue sur les signaux régulant la dormance des bourgeons végétatifs, Chao et al. (2007) montrent qu'une longue exposition au froid induit l'expression de protéines VIN3 (*vernalization intensive*), qui bloquent l'expression de protéines DAM (*dormancy affecting madsbox*) maintenant la dormance, et permettent ainsi la croissance. Cependant, nous savons qu'en conditions tempérées, la croissance des bourgeons n'a pas souvent lieu immédiatement après la levée d'endodormance car des températures chaudes sont nécessaires pour lever l'écodormance. Les mécanismes impliqués dans le maintien de l'écodormance sont inconnus, bien qu'un rôle de l'acide abscissique soit suspecté (Horvath et al. 2003). Ces processus ne prennent donc pas en compte une possible influence des températures de *forcing* dans la transition entre l'endo- et l'écodormance.

Ainsi, à ce jour, les connaissances biologiques ne sont pas suffisantes pour trancher en faveur de l'un ou l'autre des processus (action séquentielle vs. simultanée des températures de *chilling* et de *forcing*). Il serait intéressant de réaliser des études sur les signaux et les mécanismes sous-jacents à la transition entre les périodes de dormance (sensible aux températures froides) et de quiescence (sensible aux températures froides) des bourgeons.

2. La sensibilité phénologique (ontogénique) à l'oïdium

Pour estimer les marges de sécurité, nous avons considéré que les feuilles de chênes étaient sensibles à l'oïdium pendant une durée de 20 jours après leur émergence. Ceci correspond à des données de la littérature (Edwards and Ayres 1982) et des observations personnelles (Desprez-Loustau ML & Capdevielle X). Toutefois, il est probable que cette durée puisse varier en fonction de facteurs climatiques, et ne soit donc pas constante entre années et sites. Une étude a été réalisée sur le même gradient altitudinal que celui utilisé pour suivre la saison de végétation des arbres par proxidtection (UMR ISPA). Dans ce cadre, la phénologie foliaire a été suivie pendant la saison de végétation complète pour huit populations de la vallée des Gaves (de 131 à 1630 m), sur un à six arbres matures, pendant 3 ans (2010-2012). Pour chacun de ces individus, nous avons alors pu calculer la durée d'une période de sensibilité à l'oïdium définie par la différence en jours entre le débourrement (au stade 4) et le stade « feuille vert foncé ». Nous avons trouvé un effet de l'altitude ($P < 0.0001$), de l'année ($P = 0.0001$) et de l'interaction entre l'altitude et l'année ($P < 0.0001$) sur cette durée de sensibilité, avec 42 ± 6 jours pour les populations situées en-dessous de 500 m d'altitude et 26 ± 6 jours au-dessus de 500m, pour une moyenne de 31 jours (modèle polynomial, $R^2 = 0.60$) (**Figure 4**). Cette durée semble aussi varier selon la phénologie de l'individu (précoce vs. tardif), mais il est difficile de conclure sur ce point vu le peu d'individus suivis. Cependant, la seule utilisation des stades phénologiques observés est une approximation grossière pour décrire finement la sensibilité des feuilles à l'oïdium, car l'activité du parasite dépend fortement de l'activité photosynthétique de son hôte. Merry et al. (2013) ont démontré, chez la vigne, que le maximum de sévérité de l'oïdium coïncide probablement avec la transition puits-source de l'allocation des carbohydrates au sein des feuilles. Il serait intéressant de réaliser des études chez le chêne de la capacité d'infection par l'oïdium en fonction de l'évolution de la feuille, du débourrement jusqu'à la maturité, afin de mieux préciser les déterminants de la période de sensibilité au parasite.

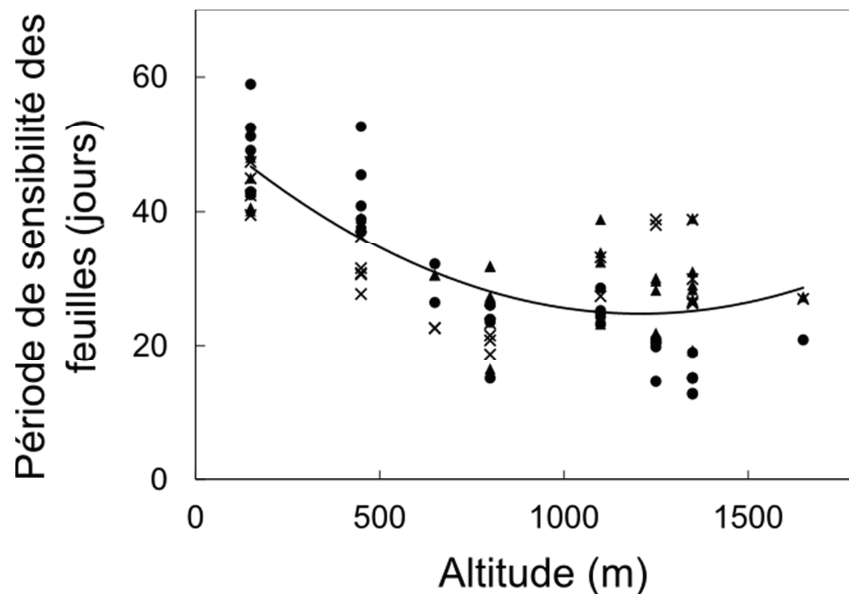


Figure 4. Durée de la période de sensibilité des feuilles de chêne (jours), déterminée selon l'observation des stades phénologiques (débourrement – feuille vert foncé), en fonction de l'altitude. Croix, 2010 ; triangle, 2011 ; rond, 2012.

3. Facteurs du climat impliqués dans la phénologie de l'oïdium

On en sait peu sur les facteurs environnementaux impliqués dans la phénologie des champignons pathogènes des plantes et sur la façon dont le contrôle environnemental de la phénologie change entre les populations d'une même espèce (Lehman & Oudemans 2000 ; Scherm et al. 2001). van Asch & Visser (2007) montrent que les herbivores utilisent des signaux environnementaux principalement pour se synchroniser avec la phénologie de leur hôte. Les deux signaux les plus importants sont la photopériode et la température, qui déterminent le début et/ou la fin de la période de dormance chez la plupart des plantes en milieu tempéré et des insectes (passant l'hiver en dormance). Ils s'interrogent sur le fait de savoir si les insectes et les pathogènes utilisent les mêmes signaux que leurs hôtes, c'est-à-dire, si les parasites se nourrissant/développant sur des plantes sensibles à la photopériode sont aussi sensibles à la photopériode et les parasites se nourrissant/développant sur des arbres utilisant le *chilling* utilisent aussi le *chilling* (van Asch & Visser 2007). Chez l'oïdium, d'après nos observations le long du gradient altitudinal il semble qu'il y ait un contrôle important de l'émission des spores d'oïdium par la température, comme pour le chêne, même si la pente de réponse est plus faible (voir

aussi Desprez-Loustau et al. 2010). De plus, les températures de l'hiver semblent aussi être un facteur important dans l'épidémiologie de l'oïdium du chêne. En effet, une étude de la distribution spatiotemporelle de l'oïdium a montré que la meilleure variable explicative de la sévérité de la maladie en fin de saison était paradoxalement les températures de Janvier-Février-Mars (Marçais & Desprez-Loustau 2014). Plus précisément, les trois pics d'épidémie de 1990, 1997 et 2001 semblent associés à des températures hivernales élevées. Les mécanismes en jeu restent à déterminer. Cela ne semble pas être lié à une meilleure synchronisation (Marçais B, étude en cours). Les températures hivernales pourraient avoir un effet important sur la survie du champignon (Jarvis et al. 2002). Il serait intéressant d'approfondir les études à ce sujet, en particulier la sensibilité de l'oïdium aux températures froides au sein des bourgeons, ainsi que le rôle des températures froides et chaudes dans la sortie de dormance des chasmothèces (organes de dormance), via par exemple des expériences de privation de froid ou d'exposition à des gradients de température chaude. Enfin, il serait aussi intéressant d'étudier le rôle de la photopériode dans la phénologie de l'oïdium. Ces informations nous permettraient de mieux comprendre la synchronisation phénologique entre le parasite et son hôte.

2. Pressions de sélection passées et futures sur la phénologie du chêne

1. Phénologie et fitness

La phénologie printanière joue un rôle important dans la fitness (Rathcke & Lacey 1985 ; Reekie & Bazzaz 1987 ; Kozlowski 1992). La date de débourrement détermine la longueur de la saison de végétation, i.e. la longueur de la période d'assimilation du carbone via la photosynthèse, et contribue ainsi à la croissance du cambium (Borchert 1999 ; Menzel & Fabian 1999) et à la survie des individus (Morin et al. 2008). La date de floraison, quant à elle, affecte le succès de la maturation des fruits et la viabilité de la descendance (Pigott & Huntley 1981 ; Galloway 2002 ; Lacey et al. 2003). Le temps nécessaire à la maturation des fruits dépend des conditions environnementales, telles que la température après la période de floraison, et de la taille des graines, dont la capacité à germer diminue drastiquement si un certain poids n'est pas atteint (Leadem 1985 ; Pitel & Wang 1989). L'assimilation

de carbone contribue donc à la fitness compétitive liée à la croissance mais aussi à la reproduction (Dickson 1989). Peu d'études ont cependant examiné les liens entre ces deux traits phénologiques, mais la date de floraison (et donc de maturation des fruits) est probablement liée au début de la saison de croissance chez les espèces herbacées vivaces de forêt tempérée (Dahlgren et al. 2007 ; Sola & Ehrlén 2007) et la plupart des espèces d'arbres tempérées (Franjic et al. 2011 ; Chuine I, résultats non publiés ; Delzon S, observations personnelles). Sola & Ehrlén (2007) ont montré que le début de la croissance végétative chez *Lathyrus vernus* est positivement corrélé avec le début de la floraison, mais aussi que la floraison modifie la période optimale de développement végétatif.

La phénologie végétative reflète donc également la sélection sur la phénologie florale et inversement. Ce lien implique qu'un trait particulier associé à la phénologie ne devrait pas être interprété comme le résultat de pressions de sélections agissant uniquement sur cet aspect de la phénologie (Diggle 1999). Dahlgren et al. (2007) montrent que la période de floraison des herbacées de forêts tempérées est contrainte par plusieurs facteurs environnementaux agissant indirectement par des effets sur la période de débourrement. Comme pour ce dernier, de nombreux facteurs biotiques et abiotiques influencent la phénologie florale, tels que le climat, la date de floraison des différents individus pour les espèces à pollinisation croisée, les pollinisateurs, les herbivores, les disséminateurs ou encore les prédateurs des graines (e.g. Augspurger 1981 ; Marquis 1988 ; Brody 1997 ; Pilson 2000). La phénologie d'une espèce de plante résulte donc de la sélection naturelle pour maximiser la période de croissance et la reproduction et diminuer les risques de gels sur les organes végétatifs et reproducteurs (Chuine 2010). Ainsi, les pressions de sélection sur la phénologie foliaire peuvent être directes, ou indirectes via les pressions de sélection sur la phénologie florale. On pourrait alors s'attendre à ne pas toujours observer une phénologie foliaire optimale au sein d'une population si les pressions de sélection agissant sur les phénologies foliaire et florale ne vont pas dans la même direction (Chuine 2010). A haute latitude ou altitude, la fitness semble plus fortement corrélée avec la capacité de maturation des fruits qu'avec la probabilité de survie (Morin et al. 2007 ; Morin et al. 2008). Ceci favoriserait donc une floraison précoce (relativement par rapport aux températures froides de ces régions), et ainsi un débourrement précoce, possiblement aux dépens des dégâts de gels tardifs sur les bourgeons végétatifs, et

expliquerait l'adaptation moins importante pour l'évitement des gels tardifs observée ici en haute altitude.

Il serait intéressant d'étudier plus finement la relation entre les phénologies foliaire et florale chez les chênes, et d'étudier les pressions de sélection sur la phénologie de la floraison et leur possible rôle sur la phénologie du débourrement sur les populations le long du gradient altitudinal. Une expérimentation est actuellement en cours au sein de l'unité dans le but de comparer les caractéristiques de la production de glands (quantité, qualité) entre différentes populations le long du gradient altitudinal. Il serait également intéressant de comparer la croissance des arbres le long du gradient, et d'étudier ces mêmes caractéristiques (production de glands, croissance) entre les individus précoces et tardifs.

2. Pressions de sélection passées : modélisation des risques *a posteriori*

Nos résultats confirment le maintien d'une forte diversité phénotypique du débourrement au sein des populations à basse altitude, qui pourrait s'expliquer par des pressions de sélection divergente liées aux facteurs biotiques et abiotiques. En parallèle, la différenciation des populations le long du gradient s'expliquerait par une sélection directionnelle opérant en faveur d'un débourrement retardé avec l'augmentation d'altitude, ceci semblant être majoritairement dû à un évitement des gels tardifs. Il serait intéressant de conduire l'étude sur un nombre plus important d'années (principalement en ce qui concerne les gels tardifs) pour pouvoir confirmer l'avantage relatif des phénotypes précoces ou tardifs par rapport à l'exposition aux contraintes environnementales.

Une autre manière d'étudier cette question serait de réaliser une étude de modélisation des risques *a posteriori*, par exemple sur les 100 dernières années. Pour cela, il serait tout d'abord nécessaire de définir des modèles de débourrement du chêne à haute et basse altitudes et pour les différents phénotypes (précoce vs. tardif), afin de tenir compte de la différenciation génétique. Il faudrait donc définir quatre modèles si l'on veut évaluer précisément les risques passés d'exposition aux contraintes pour les individus précoces et tardifs le long de gradients altitudinaux. La poursuite des premiers

travaux de modélisation, ainsi que des données supplémentaires concernant les mécanismes de la levée de dormance, pourrait nous permettre de définir ces modèles. Ceci devra être couplé à des données météorologiques pour les populations de chêne étudiées depuis environ 100 ans. Nous avons commencé une collaboration à ce sujet avec l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL) en Suisse. L'obtention de ces données permettra de suivre l'évolution passée de l'exposition aux gels des individus précoces et tardifs le long du gradient altitudinal. Enfin, il faudrait utiliser un modèle phénologique de l'émission des spores d'oïdium, basé sur la température, dont les sorties pourraient être mises en parallèle des sorties du modèle de débourrement, afin d'évaluer le risque d'exposition à l'oïdium. Un premier modèle vient d'être mis en place par Benoît Marçais (INRA Nancy, UMR IAM) à l'aide de données sur la production d'ascospores par les chasmothèces d'*E. alphitoides*, collectées de 2004 à 2011 sur différents sites INRA (Avignon, Bordeaux, Orléans, Nancy, plus un site à Vagney, dans les Vosges ; en tout 28 combinaisons site x année). La non adaptation locale observée au niveau intra et inter populations nous autorise à utiliser ce modèle pour toutes les populations du gradient altitudinal.

3. Changement climatique et pressions de sélection futures

Nous avons discuté de l'impact du changement climatique sur le débourrement, à travers principalement le rôle des températures de *chilling*. Cependant, le changement climatique risque aussi d'affecter l'exposition des individus aux gels tardifs et à la maladie. Les études concernant l'occurrence du risque de gels tardifs avec le changement climatique sont assez contradictoires : certaines montrent que l'avancée majeure de la date de débourrement augmente la fréquence des dommages liés aux gels tardifs (Kramer 1995 ; Hänninen 2006), tandis que d'autres études montrent une diminution du risque de gel avec le changement climatique, la date du dernier gel avançant plus rapidement que la date de débourrement (Anandhi et al. 2013 ; Ge et al. 2013). Cependant, Schwartz et al. (2006) ont montré, à travers une étude mondiale, que ces configurations varient selon les longitudes et latitudes des régions étudiées. Il est donc difficile de prédire l'évolution de l'exposition des populations aux gels tardifs le long du gradient altitudinal. Nos sept années de données

météorologiques ne nous permettent pas de conclure sur une tendance de l'évolution des gels, cependant l'avancée prédite du débourrement est plus rapide en haute qu'en basse altitude. L'utilisation d'un modèle météorologique prédictif précis (à l'échelle de la population) pourrait nous aider à conclure à ce sujet, et un modèle *a posteriori* pourrait nous permettre de mieux comprendre l'évolution passée de la date du dernier gel aux différentes altitudes. Cependant, quelle que soit la variation de l'exposition, les bourgeons pourraient devenir moins résistants aux gels hivernaux et printaniers à cause d'une diminution de leur durcissement due à un retard de la sénescence et à des températures moins froides en hiver.

Plusieurs études ont montré des modifications des relations phénologiques entre les espèces en interaction avec le changement climatique, dues à leurs sensibilités différentes à la température (Both et al. 2009 ; Desprez-Loustau et al. 2010 ; Singer & Parmesan 2010). Nous avons montré que la phénologie du chêne est plus sensible à la température que la phénologie de l'oïdium. Ceci suggère donc que le changement climatique pourrait affecter l'(a)synchronie entre l'hôte et son parasite, à la fois entre et au sein des populations le long de gradients environnementaux. L'avancée du débourrement des arbres (au moins pendant un futur proche) devrait être plus rapide que l'avancée de l'émission des spores d'oïdium. Les arbres seraient alors moins exposés à la maladie. Toutefois, le développement de l'oïdium pendant la saison de végétation pourrait être favorisé par l'augmentation des températures. Une saison plus longue permettrait de réaliser plus de cycles d'infections secondaires. De plus, *E. alphitoides* est un champignon plutôt thermophile avec un optimum vers 25°C. L'impact du changement climatique sur l'interaction chêne-oïdium nécessiterait de mieux comprendre (et si possible modéliser) les relations oïdium – climat tout au long de la saison. De plus, les capacités adaptatives du chêne (plasticité phénotypique, forte diversité génétique – Vitasse et al. 2010 ; Alberto et al. 2011) pourraient permettre au chêne de faire face, dans une certaine mesure, aux nouvelles contraintes liées au changement climatique.

BIBLIOGRAPHIE



- Acevedo-Rodriguez R, Vargas-Hernandez JJ, Lopez-Upton J, Mendoza JV (2006) Effect of geographic origin and nutrition on shoot phenology of Mexican Douglas-Fir (*Pseudotsuga sp.*) seedlings. *Agrociencia* 40:125–137
- Agrawal AA (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* 80:1713–1723
- Agrawal AA, Karban R (1999) Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In: Tollrian R and Harvell CD (eds) *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press, Princeton, pp 45–61
- Agrawal AA, Conner JK, Stinchcombe JR (2004) Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol Lett* 7:1199–1208
- Ahas R, Aasa A, Menzel A, Fedotova VG, Scheifinger H (2002) Changes in European spring phenology. *Int J Climatol* 22:1727–1738
- Alberto F, Niort J, Derory J, Lepais O, Vitalis R, Galop D, Kremer A (2010) Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Mol Ecol* 19:2626–2639
- Alberto F, Bouffier L, Louvet JM, Lamy JB, Delzon S, Kremer A (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *J Evolution Biol* 24:1442–1454
- Anandhi A, Zion MS, Gowda PH, Pierson DC, Lounsbury D, Frei A (2013) Past and future changes in frost day indices in the Catskill Mountain region of New York. *Hydrol Process* 27:3094–3104
- Anderson JV, Chao WS, Horvath DP (2001) A current review on the regulation of dormancy in vegetative buds. *Weed Sci* 49:581–589
- Anekonda TS, Adams WT, Aitken SN (1998) Influence of second flushing on genetic assessment of cold hardiness in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco). *For Ecol Manag* 111:119–126
- Araki T (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr Opin Plant Biol* 4:63–68
- Augspurger CK (1981) Reproductive synchrony of a tropical shrub: experimental studies on effects of pollinators and seed predators on *Hybanthus prunifolius* (Violaceae). *Ecology* 62:775–778
- Augspurger CK (2011) Frost damage and its cascading negative effects on *Aesculus glabra*. *Plant Ecol* 212:1193–1203

- Balandier P, Gendraud M, Rageau R, Bonhomme M, Richard JP, Parisot E (1993) Bud break delay on single node cuttings and bud capacity for nucleotide accumulation as parameters for endo- and paradormancy in peach trees in a tropical climate. *Sci Hortic-Amsterdam* 55:249–261
- Baliuckas V, Lagerstrom T, Norell L, Ersson G (2005) Genetic variation among and within populations in Swedish species of *Sorbus aucuparia* L. and *Prunus padus* L. assessed in a nursery trial. *Silvae Genet* 54:1–8
- Barnola P, Alatou D, Lacointe A, Lavarenne S (1990) Étude biologique et biochimique du déterminisme de la croissance rythmique du chêne pédonculé (*Quercus robur* L). Effets de l'ablation des feuilles. *Ann Sci For* 21:619–631
- Basler D, Körner C (2012) Photoperiod sensitivity of bud burst in 14 temperate forest tree species. *Agr Forest Meteorol* 165:73–81
- Batley NH (2000) Aspects of seasonality. *J Exp Bot* 51:1769–1780
- Baucom RS, de Roode JC (2011) Ecological immunology and tolerance in plants and animals. *Func Ecol* 25:18–28
- Bell AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol* 32:21–81
- Beniston M (2009) Decadal-scale changes in the tails of probability distribution functions of climate variables in Switzerland. *Int J Climatol* 29:1362–1368
- Beniston M et al. (2007) Future extreme events in European climate: an exploration of regional climate model projections. *Climatic Change* 81:71–95
- Bennie J, Kubin E, Wiltshire A, Huntley B, Baxter R (2010) Predicting spatial and temporal patterns of bud-burst and spring frost risk in north-west Europe: the implications of local adaptation to climate. *Global Change Biol* 16:1503–1514
- Bennett JP (1949) Temperature and bud rest period. *Calif Agr* 4:9,12,14
- Berges L, Chevalier R, Dumas Y, Franc A, Gilbert JM (2005) Sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.) site index variations in relation to climate, topography and soil in even-aged high-forest stands in northern France. *Ann For Sci* 62:391–402
- Bernal M, Estiarte M, Peñuelas J (2011) Drought advances spring growth phenology of the Mediterranean shrub *Erica multiflora*. *Plant Biol* 13:252–257

- Bigras FJ, Ryypö A, Lindström A, Stattin E (2001) Cold acclimation and deacclimation of shoot and roots of conifer seedlings. In F.J. Bigras and S.J. Colombo (eds.). *Conifers cold hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 57–88
- Billington HL, Pelham J (1991) Genetic-variation in the date of budburst in Scottish birch populations – implications for climate change. *Func Ecol* 5:403–409
- Borchert R (1999) Climatic periodicity, phenology, and cambium activity in tropical dry forest trees. *IAWA J* 20:239–247
- Both C, van Asch M, Bijlsma RG, van den Burg AB, Visser ME (2009) Climate change and unequal phenological changes across four trophic levels: constraints or adaptations? *J Anim Ecol* 78:73–83
- Brody AK (1997) Effects of pollinators, herbivores, and seed predators on flowering phenology. *Ecology* 78:1624–1631
- Burdon JJ (1987) *Diseases and plant population biology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Burdon JJ, Thrall PH (2003) The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biol* 4:227
- Burg SP, Burg EA (1968) Ethylene formation in pea seedlings; Its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol* 43:1069–1074
- Bradshaw AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13:115–155
- Callahan HS, Pigliucci M, Schlichting CD (1997) Developmental phenotypic plasticity: Where ecology and evolution meet molecular biology. *Bioessays* 19:519–525
- Campbell RK, Sorensen FC (1973) Cold-acclimation in seedling Douglas-fir related to phenology and provenance. *Ecology* 54:1148–1151
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J (2012) Temperature effect on dormancy release in apricot when applied in different dormant stages. *Acta Hort* 966:155–161
- Cannell MGR (1989) Chilling, thermal time and the date of flowering of trees. In: Wright CJ (ed) *Manipulation of Fruiting*. London: Butterworths, pp 99–113
- Cannell MGR (1997) Spring phenology of trees and frost avoidance. *Weather* 52:46–52
- Cannell MGR, Smith RI (1983) Thermal time, chill days and predictions of budburst in *Picea Sitchensis*. *J Appl Ecol* 20:951–963
- Cannell MGR, Murray MB, Sheppard LJ (1985) Frost avoidance by selection for late budburst in *Picea Sitchensis*. *J Appl Ecol* 22:931–941

- Cavender-Bares J, Cortes P, Rambal S, Joffre R, Miles B, Rocheteau A (2005) Summer and winter sensitivity of leaves and xylem to minimum freezing temperatures: a comparison of co-occurring Mediterranean oaks that differ in leaf lifespan. *New Phytol* 168:597–611
- Champagnat P (1973) Quelques aspects des dormances chez les végétaux. *Bull. du Groupe d'Etude des Rythmes Biologiques* 4:47–59
- Champagnat P (1989) Rest and activity in vegetative buds of trees. *Ann Sci For* 46:9s–26s
- Chao WS, Foley ME, Horvath DP, Anderson JV (2007) Signals regulating dormancy in vegetative buds. *Int J Plant Dev Biol* 1:49–56
- Charrier G, Bonhomme M, Lacointe A, Améglio T (2011) Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control? *Int J Biometeorol* 55:763–774
- Chmielewski FM, Rötzer T (2001) Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agr Forest Meteorol* 108:101–112
- Chmura DJ, Rozkowski R (2002) Variability of beech provenances in spring and autumn phenology. *Silvaea Genet* 51:123–127
- Chouard P (1951) Dormance et inhibition des graines et des bourgeons. Préparation au forçage, thermopériodisme. Cours du CNAM, C.D.U. Paris, pp 125
- Christersson L (1978) The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus silvestris* and *Picea abies*. *Physiol Plantarum* 44:288–294
- Chuine I (2000) A unified model for tree phenology. *J Theor Biol* 707:337–347
- Chuine I (2010) Why does phenology drive species distribution? *Phil Trans R Soc B* 365:3149–3160
- Chuine I, Cour P, Rousseau DD (1998) Fitting models predicting dates of flowering of temperate-zone trees using simulated annealing. *Plant Cell Environ* 21:455–466
- Chuine I, Morin X, Bugmann H (2010) Warming, photoperiods and tree phenology. *Science* 329:277–278
- Chuine I, Garcia de Cortazar Atauri I, Kramer K, Hänninen H (2013) Plant Development Models. In: *Phenology: an integrative environmental science* (ed Schwarz MD). Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 275–293
- Cohen D (1966) Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *J Theoret Biol* 12:119–129
- Coley PD, Kursar TA (1996) Anti-herbivore defenses of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeoffs. In: Mulkey SS, Chazdon R, Smith AP (eds) *Tropical forest plant ecophysiology*. Springer, Berlin, pp 305–337

- Collet C, Colin F, Bernier F (1997) Height growth, shoot elongation and branch development of young *Quercus petraea* grown under different levels of resource availability. *Ann Sci For* 54:65–81
- Collin P, Badot PM, Millet B (1996) Croissance rythmique et développement du chêne rouge d'Amérique, *Quercus rubra* L, cultivé en conditions contrôlées. *Ann Sci For* 53:1059–1069
- Combes C (2001) Les associations du vivant: l'art d'être parasite. Flammarion, Paris
- Comps B, Letouzey J, Savoie JM (1987) Phénologie du couvert arborescent dans une chênaie-hêtraie d'Aquitaine. *Ann Sci For* 44:153–170
- Coville FC (1920) The influence of cold in stimulating the growth of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 6:434–435
- Craine JM, Wolkovich EM, Towne EG, Kembel SW (2011) Flowering phenology as a functional trait in a tallgrass prairie. *New Phytol* 193:673–682
- Dahlgren JP, von Zeipel H, Ehrlén J (2007) Variation in vegetative and flowering phenology in a forest herb caused by environmental heterogeneity. *A J Bot* 94:1570–1576
- Darbyshire R, Webb L, Goodwin I, Barlow EWR (2013) Evaluation of recent trends in Australian pome fruit spring phenology. *Int J Biometeorol* 57:409–421
- Defila C (2001) Change in growing periods in Switzerland? *Obst- und Weinbau* 137:553–555
- Defila C, Clot B (2001) Phytophenological trends in Switzerland. *Int J Biometeorol* 45:203–207
- Delatour C (1983) Oak declines in Europe (in French). *Rev For Franc* 35:265–282
- Della-Marta PM, Beniston M (2008) Summer heat waves in western Europe, their past change and future projections. *Advances in Global Change Research, Climate Variability and Extremes during the Past 100 Years* 33:235–250
- Delzon S, Cochard H (2014) Recent advances in tree hydraulics highlight the ecological significance of the hydraulic safety margin. *New Phytol* doi: 10.1111/nph.12798
- Déqué M, Marquet P, Jones RG (1998) Simulation of climate change over Europe using a global variable resolution general circulation model. *Clim Dynam* 14 :173–189
- Dereuddre J, Gazeau C (1992) Les végétaux et les très basses températures. In *Les végétaux et le froid* Ed. C. D. Hermann, Paris, pp 107–175
- Derory J, Léger P, Garcia V, Schaeffer J, Hauser MT, Salin F, Luschnig C, Plomion C Glössl J, Kremer A (2006) Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*) *New Phytol* 170:723–738

- Desprez-Loustau ML, Vitasse Y, Delzon S, Capdevielle X, Marçais B, Kremer A (2010) Are plant pathogen populations adapted for encounter with their host? A case study of phenological synchrony between oak and an obligate fungal parasite along an altitudinal gradient. *J Evol Biol* 23:87–97
- Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann Sci For* 46:631s–647s
- Diggle PK (1999) Heteroblasty and the evolution of flowering phenologies. I *J Plant Sci* 160:S123–S134
- Donnelly A, Caffarra A, Kelleher CT, O'Neill BF, Diskin E, Pletsers A, Proctor H, Stirnemann R, O'Halloran J, Peñuelas J, Hodkinson TR, Sparks TH (2012) Surviving in a warmer world: environmental and genetic responses. *Clim Res* 53:245–262
- Doorenbos J (1953) Review of the literature on dormancy in buds of woody plants. *Medelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland* 53:1–24
- Ducomet V (1913) Research on oak and chestnut diseases in Brittany (in French). *Ann Epiphyt* 1:87–105
- Ducouso A, Guyon JP, Kremer A (1996) Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). *Ann Sci For* 53:775–782
- Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, Changnon SA, Karl TR, Mearns LO (2000) Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science* 289:2068–2074
- Edwards MC, Ayres PG (1982) Seasonal changes in resistance of *Quercus petraea* (sessile oak) leaves to *Microsphaera alphitoides*. *T Brit Mycol Soc* 78: 569–571
- Elzinga JA, Atlan A, Biere A, Gigord L, Weis AE, Bernasconi G (2007) Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends Ecol Evol* doi:10.1016/j.tree.2007.05.006
- Falusi M, Calamassi R (2003) Dormancy of *Fagus sylvatica* L. buds III. Temperature and hormones in the evolution of dormancy in one-node cuttings. *Plant Biosystems* 137:185–191
- Feau N, Lauron-Moreau A, Piou D, Marçais B, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2012) Niche partitioning of the genetic lineages of the oak powdery mildew complex. *Fungal Ecol* 5:154–162
- Fenner M (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspect Plant Ecol* 1:78–91
- Fitter AH, Hay RKM (1987) Environmental physiology of plants. Academic Press, London, pp 423
- Foex ME (1941) Invasion of European oaks by the powdery mildew (in French). *Rev Eaux Forêts* 79:338–349
- Fontanel JL (1979) Etude des influences climatiques sur les potentialités de la production forestière. Mémoire – INRA de Champenoux – Centre National de Recherches Forestières
- Fordyce JA (2006) The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 209:2377–2383

- Franjic J, Sever K, Bogdan S, Skorvc Z, Krstonosic D, Aleskovic I (2011) Phenological asynchronization as a restrictive factor of efficient pollination in clonal seed orchards of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Croat J For Eng* 31:141–156
- Frelin C (2012) Adaptation et normes de réaction. In Jean-François Toussaint et al., L’homme peut-il s’adapter à lui-même ? Eds Quæ « Hors collection », pp 57-59
- Fu YH, Campioli M, Deckmyn G, Janssens IA (2012) The impact of winter and spring temperatures on temperate tree budburst dates: results from an experimental climate manipulation. *PLoS One* 7:e47324
- Galloway LF (2002) The effect of maternal phenology on offspring characters in the herbaceous plant *Campanula americana*. *J Ecol* 90:851–858
- Garbelotto M, Smith T, Schweigkofler W (2008) Variation in rates of spore deposition of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, over a 12-month-period at two locations in Northern California. *Phytopathology* 98:137–143
- Ge Q, Wang H, Dai J (2013) Shifts in spring phenophases, frost events and frost risk for woody plants in temperate China. *Clim Res* 57:249–258
- Gendraud M (1975) Contribution à l’étude du métabolisme des nucléosides di et triphosphates de tubercules de Topinambour cultivés *in vitro* en rapport avec leurs potentialités morphogénétiques. *Plant Sci Lett* 4:53–59
- Gendraud M (1977) Etude de quelques aspects du métabolisme des nucléotides des pousses de Topinambour en relation avec leurs potentialités morphogénétiques. *Physiol Vég* 15:121–132
- Ghelardini L, Santini A (2009) Avoidance by early flushing: a new perspective on Dutch elm disease research. *iForest* 2:143–153
- Gibbs JN, Greig JW (1997) Biotic and abiotic factors affecting the dying back of pedunculate oak *Quercus robur* L. *Forestry* 70, 4
- Glawe DA (2008) The powdery mildews: a review of the world’s most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 46:27–51
- Gomory D, Paule L (2011) Trade-off between height growth and spring flushing in common beech (*Fagus sylvatica* L.). *Ann For Sci* 68:975–984
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Léger, P., Petit, R.J. (2011) Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp). *Mol Ecol Resour* 11:578–585

- Hajji M, Dreyer E, Marçais B (2009) Impact of *Erysiphe alphitoides* on transpiration and photosynthesis in *Quercus robur* leaves. *Eur J Plant Pathol* 125:63–72
- Hampe A, Petit RJ (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett* 8:461–467
- Hänninen H (1990) Modelling bud dormancy release in trees from cool and temperate regions. *Acta For Fenn* 213:1–47
- Hänninen H (1995) Effects of climatic change on trees from cool and temperate regions: an ecophysiological approach to modelling of budburst phenology. *Can J Bot* 73:183–199
- Hänninen H (2006) Climate warming and the risk of frost damage to boreal forest trees: identification of critical ecophysiological traits. *Tree Physiol* 26:889–898
- Hänninen H, Kellomäki S, Laitinen K, Pajari B, Repo T (1993) Effect of increased winter temperature on the onset of height growth of Scots pine: a field test of a phenological model. *Silva Fenn* 27:251–257
- Hänninen H, Kramer K (2007) A framework for modelling the annual cycle of trees in boreal and temperate regions. *Silva Fenn* 41:167–205
- Harmer R (1992) The incidence of recurrent flushing and its effect on branch production in *Quercus petraea* (Matt) Liebl growing in southern England. *Ann Sci For* 49:589–597
- Heide OM (1993) Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days. *Physiol Plantarum* 89:187–191
- Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335
- Heuser T, Zimmer W (2002) Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 209:295–299
- Hewitt HG (1974) Conidial germination in *Microsphaera alphitoides*. *Trans Br Mycol Soc* 63:587–628
- Hewitt HG, Ayres PG (1975) Changes in CO₂ and water vapour exchange rates in leaves of *Quercus robur* infected by *Microsphaera alphitoides* (powdery mildew). *Physiol Plant Pathol* 7:127–137
- Hewitt HG, Ayres PG (1976) Effect of infection by *Microsphaera alphitoides* (powdery mildew) on carbohydrate levels and translocation in seedlings of *Quercus robur*. *New Phytol* 77:379–390
- Horns F, Hood ME (2012) The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecol Evol* 2:1705–1711
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci* 8:534–540

- Howe GT, Davis J, Frewen B, Saruul P, Jeknić Z, Bradshaw HD Jr, Chen THH (1999) Physiological and genetic approaches to studying endodormancy-related traits in *Populus*. *HortScience* 34:1174–1184
- Howe GT, Saruul P, Davis J, Chen THH (2000) Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F2 family of hybrid poplars. *Theor Appl Genet* 101:632–642
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC, Chen THH (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold daptation in forest trees. *C J Bot* 81:1247–1266
- Howe GT, Brunner AM (2005) An evolving approach to understanding plant adaptation. *New Phytol* 167:1–5
- Hunter AF, Lechowicz MJ (1992) Predicting the timing of budburst in temperate trees. *J Appl Ecol* 29:597–604
- Ibanez C, Kozarewa I, Johansson M, Ogren E, Rohde A, Eriksson ME (2010) Circadian clock components regulate entry and affect exit of seasonal dormancy as well as winter hardiness in *Populus* trees. *Plant Physiol* 153:1823–1833
- Jarvis WR, Gubler WD, Grove GG (2002) Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW (eds) *The powdery mildews. A comprehensive treatise*. APS Press, St. Paul, pp 169–199
- Jump AS, Marchant R, Peñuelas J (2009) Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends Plant Sci* 14:51–58
- Karlsson PS, Bylund H, Neuvonen S, Heino S, Tjus M (2003) Climatic response of budburst in the mountain birch at two areas in northern Fennoscandia and possible responses to global change. *Ecography* 26:617–625
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett* 7:1225–124
- Kingsolver JG, Pfennig DW (2007) Patterns and power of phenotypic selection in nature. *Bioscience* 57:561–571
- Koskela T, Puustinen S, Salonen V, Mutikainen P (2002) Resistance and tolerance in a host plant-holoparasitic plant interaction: genetic variation and costs. *Evolution* 56:899–908
- Körner C, Basler D (2010) Phenology under global warming. *Science* 327:1461–1462
- Kozłowski J (1992) Optimal allocation of resources to growth and reproduction: implications for age and size at maturity. *Trends Ecol Evol* 7:15–18
- Kramer K (1994) Selecting a model to predict the onset of growth of *Fagus sylvatica*. *Journal of Applied Ecology* 31:172–181

- Kramer K (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell Environ* 18:93–104
- Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, Guillaume F, Bohrer G, Nathan R, Bridle JR, Gomulkiewicz R, Klein EK, Ritland K, Kuparinen A, Gerber S, Schueler S (2012) Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecol Lett* 15:378–392
- Lacey EP, Roach DA, Herr D, Kincaid S, Perrot R (2003) Multigenerational effects of flowering and fruiting phenology in *Plantago lanceolata*. *Ecology* 84:2462–2475
- Lamarre GPA, Mendoza I, Fine PVA, Baraloto C (2014) Leaf synchrony and insect herbivory among tropical tree habitat specialists. *Plant Ecol* doi: 10.1007/s11258-013-0290-y
- Lambrechts L, Fellous S, Koella JC (2006) Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol* doi:10.1016/j.pt.2005.11.008
- Landsberg JJ (1974) Apple fruit bud development and growth; analysis and an empirical model. *Ann Bot* 38:1013–1023
- Lang GA (1987) Dormancy – a new universal terminology. *Hortscience* 22:817–820
- Lang GA (1994) Dormancy – the missing links: molecular studies and integration of regulatory plant and environmental interactions. *HortScience* 29:1255–1263
- Langlet O (1937) Studier över tallens fysiologiska variabilitet och dess samband med klimatet. *Medd Stat Skogsförs Anst* 9:421–470
- Larcher W (2005) Climatic constraints drive the evolution of low temperature resistance in woody plants. *J Agr Meteorol* 61:189–202
- Larcher W, Mair B (1968) Das kälteresistenzverhalten von *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* und *Fraxinus ornus* auf drei thermisch unterschiedlichen standorten. *Oecologia Plantarum* 3:255–270
- Laube J, Sparks TH, Estrella N, Höflers J, Ankerst DP, Menzel A (2013) Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Global Change Biol* doi: 10.1111/gcb.12360
- Lavarenne-Allary S (1965) Recherches sur la croissance des bourgeons de chêne et de quelques autres espèces ligneuses. *Ann Sci For* 22:1–203
- Leadem CL (1985) Seed dormancy in three *Pinus* species of the Inland MountainWest. In: Conifer tree seed in the Inland Mountain West Symposium, Missoula, MT, 5–6 August 1985. Gen Tech Rep INT-203, Ogden, UT: USDA Forest Service, pp 117–124

- Lebourgeois F, Differt J, Granier A, Bréda N, Ulrich E (2002) Premières observations phénologiques des peuplements du réseau national de suivi à long terme des écosystèmes forestiers (RENECOFOR). *Rev For Fr* 5:407–418
- Lebourgeois F, Pierrat JC, Perez V, Piedallu C, Cecchini S, Ulrich E (2008) Déterminisme de la phénologie des forêts tempérées françaises : étude sur les peuplements du réseau RENECOFOR. *Rev For Fr* 60:323–343
- Lehman JS, Oudemans PV (1997) Phenology of apothecium production in populations of *Monilinia vaccinii-corymbosi* from early- and late-maturing blueberry cultivars. *Phytopathology* 87: 218–223
- Leinonen I, Hänninen H (2002) Adaptation of the timing of bud burst of Norway spruce to temperate and boreal climates. *Silva Fenn* 36:695–701
- Lenz A, Hoch G, Vitasse Y, Körner C (2013) European deciduous trees exhibit similar safety margins against damage by spring freeze events along elevational gradients. *New Phytol* doi: 10.1111/nph.12452
- Lieberman D, Lieberman M (1984) The causes and consequences of synchronous flushing in a dry tropical forest. *Biotropica* 16:193–201
- Lindner M, Maroschek M, Netherer S, Kremer A, Barbati A, Garcia-Gonzalo J, Seidl R, Delzon S, Corona P, Kolström M, Lexer MJ, Marchetti M (2010) Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecol Manag* 259:698–709
- Linkosalo T, Hakkinen R, Hänninen H (2006) Models of the spring phenology of boreal and temperate trees: is there something missing? *Tree Physiol* 26:1165–1172
- Linkosalo T, Lappalainen HK, Hari P (2008) A comparison of phenological models of leaf bud burst and flowering of boreal trees using independent observations. *Tree Physiol* 28:1873–1882
- Lobo JA, Quesada M, Stoner K, Fuch EJ, Herrerías-Diego Y, Rojas J, Saborío G (2003) Factors affecting phenological patterns of bombacaceous trees in seasonal forests in Costa Rica and Mexico. *Am J Bot* 90:1054–1063
- Lockhart JA (1983) Optimum growth initiation time for shoot buds of deciduous plants in a temperate climate. *Oecologia* 60:34–37
- Lockhart BR, Hodges JD, Gardiner ES, Ezell AW (2003) Photosynthate distribution patterns in cherrybark oak seedling sprouts. *Tree Physiol* 23:1137–1146
- Lopez-Moreno JJ, Beniston M (2009) Daily precipitation intensity projected for the 21st century: seasonal changes over the Pyrenees. *Theoretical and Applied Climatology* 95:375–384

- Lowman MD, Heatwole, H (1992) Spatial and temporal variability in defoliation of Australian eucalypts. *Ecology* 73:129–142
- Luedeling E (2012) Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. *Sci Hort* 144:218–229
- Madlung A, Comai L (2004) The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* 94:481–495
- Makowski M, Wierzbicki AP (2003) Modeling knowledge: model-Based decision support and soft computations. In: Yu X, Kacprzyk J (eds) *Applied decision support with soft computing*. Springer-Verlag, Berlin, pp 3–60
- Malaisse F (1967) Contribution à l'étude des hêtraies d'Europe occidentale. Note 6 : aperçu climatologique et phénologique relatif aux hêtraies situées sur l'axe Ardennes belges - Provence. 14^{ème} Congrès IUFRO, Munich 1967, II, 21:325–334
- Marçais B, Kavkova M, Desprez-Loustau ML (2009) Phenotypic variation in phenology of ascospore production between European populations of oak powdery mildew. *Ann For Sci* 66:814
- Marçais B, Desprez-Loustau ML (2014) European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Ann For Sci* doi: 10.1007/s13595-012-0252-x
- Marquis RJ (1988) Phenological variation in the Neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. *Ecology* 69:1552–1565
- Matías L, Jump AS (2012) Interactions between growth, demography and biotic interactions in determining species range limits in a warming world: The case of *Pinus sylvestris*. *Forest Ecol Manag* 282:10–22
- Matyas C (1995) Climatic adaptation of trees: Rediscovering provenance tests. In XIV EUCARPIA Congress on Adaptation in Plant Breeding, Jyväskylä, Finland pp 45–54
- Mauget JC, Germain E (1980) Dormance et précocité de débourrement des bourgeons chez quelques cultivars de Noyer (*Juglans regia* L.). *CR Acad Sci Paris, Ser D* 290:135–138
- McGregor GR, Ferro CAT, Stephenson DB (2005) Projected changes in extreme weather and climate events in Europe. *Extreme Weather Events and Public Health Responses*, pp 13–23
- Menzel A, Fabian P (1999) Growing season extended in Europe. *Nature*, 397, 659
- Menzel A, Sparks TH, Estrella N et al. (2006) European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biol* 12:1969–1976

- Merry AM, Evans KJ, Corkrey R, Wilson SJ (2013) Coincidence of maximum severity of powdery mildew on grape leaves and the carbohydrate sink-to-source transition. *Plant Pathol* 62:842–850
- Morgenstern EK (1996) Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture. UBC Press, Vancouver
- Morin X, Augspurger C, Chuine I (2007) Process-based modeling of species' distributions: What limits temperate tree species' range boundaries? *Ecology* 88:2280–2291
- Morin X, Viner D, Chuine I (2008) Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. *J Ecol* 96:784–794
- Morin X, Lechowicz MJ, Augspurger C, O'Keefe J, Viner D, Chuine I (2009) Leaf phenology in 22 North American tree species during the 21st century. *Global Change Biol* 15:961–975
- Mougou A, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2008) New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *For Path* 38:275–287
- Mougou-Hamdane A, Giresse X, Dutech C, Desprez-Loustau ML (2010) Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Ann For Sci* 67:212–220
- Murali KS, Sukumar R (1993) Leaf flushing and herbivory in a tropical deciduous forest, southern India. *Oecologia* 94:114–119
- Murray MB, Cannell MGR, Smith RI (1989) Date of budburst of fifteen tree species in Britain following climatic warming. *J Appl Ecol* 26:693–700
- Myneni RB, Keeling CD, Tucker CJ, Asrar G, Nemani RR (1997) Increased plant growth in the northern high latitudes from 1981 to 1991. *Nature* 386:698–702
- Naor V, Kigel J, Ben-Thal Y, Ziv M (2008) Variation in endogenous gibberellins, abscisic acid, and carbohydrate content during the growth cycle of colored *Zantedeschia* spp., a tuberous geophyte. *Journal of Plant Growth Regulation* 27:211–220
- Nienstaedt H (1966) Dormancy and dormancy release in white spruce. *Forest Sci* 12:374–384
- Nooden EA, Weber DP (1978) Environmental and hormonal control of dormancy in terminal buds of plants. In: M. Clutter (ed.). *Dormancy and developmental arrest*. Academic, New York, pp 221–268
- Ofir M, Kigel J (1998) Abscisic acid involvement in the induction of summer-dormancy in *Poa bulbosa*, a grass geophyte. *Physiol Plantarum* 112:71–77
- Ollerton J, Lack AJ (1992) Flowering phenology: an example of relaxation of natural selection? *Tree* 7:274–276
- Oswald H (1969) Conditions forestières et potentialité de l'épicéa en Haute-Ardèche. *Ann Sci For* 26:183–224

- Pagán I, Alonso-Blanco C, García-Arenal F (2008) Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Pathog 4:e1000124
- Painter RH (1951) Insect resistance in crop plants. Wiley & Sons, New York
- Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. Nature 421:37–42
- Pau S, Wolkovich EM, Cook BI, Davies TJ, Kraft NJB, Bolmgren K, Betancourt JL, Cleland EE (2011) Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. Global Change Biol 17:3633–3643
- Paul-Victor C, Züst T, Rees M, Kliebenstein DJ, Turnbull LA (2010) A new method for measuring relative growth rate can uncover the costs of defensive compounds in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol 187:1102–1111
- Peñuelas J, Filella I, Comas P (2002) Changed plant and animal life cycles from 1952 to 2000 in the Mediterranean region. Glob Change Biol 8:531–544
- Perry TO, Wu WC (1960) Genetic variation in the winter chilling requirement for date of dormancy break for *Acer Rubrum*. Ecology 41:790–794
- Pigott CD, Huntley JP (1981) Factors controlling the distribution of *Tilia cordata* at the northern limits of its geographical range. III Nature and cause of seed sterility. New Phytol 87:817–839
- Pilson D (2000) Herbivory and natural selection on flowering phenology in wild sunflower, *Helianthus annuus*. Oecologia 122:72–82
- Pitel JA, Wang BSP (1989) Physiological and chemical treatments to improve germination of whitebark pine seeds. In: Whitebark pine ecosystem symposium: ecology and management of a high-mountain resource, Bozeman, MT, 29–31 March 1989. Gen Tech Rep INT-270, Ogden, UT: USDA Forest Service, pp 130–133
- Planton S, Deque M, Chauvin F, Terray L (2008) Expected impacts of climate change on extreme climate events. Comptes Rendus Geoscience 340:564–574
- Polgar CA, Primack RB (2011) Leaf-out phenology of temperate woody plants: from trees to ecosystems. New Phytol 191:926–941
- Pouget R (1963) Recherches physiologiques sur le repos végétatif de la vigne (*Vitis vinifera* L.): la dormance des bourgeons et le mécanisme de sa disparition. Ann Amélior Plantes 13:1–247

- Rageau (1978) Croissance et débourrement des bourgeons végétatifs de pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) au cours d'un test classique de dormance. CR Acad Sci Paris, Ser D 287:1119-1122
- Rapacz M (2002) Cold-deacclimation of oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) in response to fluctuating temperatures and photoperiod. Ann Bot 89:543–549
- Rathcke B, Lacey EP (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. Ann Rev Ecol Syst 16:179–214
- Rausher MD (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. Nature 411:857:864
- Repo T (1991) Rehardening potential of Scots pine seedlings during dehardening. Silva Fenn 25:13–21
- Reekee EG, Bazzaz FA (1987) Reproductive efforts in plants. Am Nat 129:876–919
- Richardson AD, Bailey AS, Denny EG, Martin CW, O'Keefe J (2006) Phenology of a northern hardwood forest canopy. Global Change Biol 12:1174–1188
- Ripa J, Olofsson H, Jonzén Niclas (2010) What is bet-hedging, really? Proc R Soc B doi: 10.1098/rspb.2009.2023
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. Nature 421:57–60
- Rousi M, Puseenius J (2005) Variations in phenology and growth of European white birch (*Betula pendula*) clones. Tree Physiol 25:201–210
- Ruiz D, Campoy JA, Egea J (2007) Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. Environ Exp Bot 61:254–263
- Sage RD, Koenig WD, McLaughlin BC (2011) Fitness consequences of seed size in the valley oak *Quercus lobata* Née (Fagaceae). Ann For Sci 68:477– 484
- Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Ecol. Stud. 62, Springer-Verlag, Berlin, pp 321
- Salmela MJ, Cavers S, Cottrell JE, Iason GR, Ennos RA (2013) Spring phenology shows genetic variation among and within populations in seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Scottish Highlands. Plant Ecol Divers 6:523–536
- Samish RM (1954) Dormancy in woody plants. Ann Rev Plant Physiol 5:183–204
- Sanz-Perez V, Castro-Diez P, Valladares F (2009) Differential and interactive effects of temperature and photoperiod on budburst and carbon reserves in two co-occurring Mediterranean oaks. Plant Biology 11:142–151

- Sarvas R (1974) Investigations on the annual cycle of development of forest trees. Autumn dormancy and winter dormancy. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 84:101
- Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knürr T (2007) Gene flow and local adaptation in forest trees. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:595–619
- Scheiner SM, Lyman RF (1989) The genetics of phenotypic plasticity. I. Heritability. *J Evol Biol* 2:95–107
- Scheiner SM, Lyman RF (1991) The genetics of phenotypic plasticity. II. Response to selection. *J Evol Biol* 4:23–50
- Scherm H, Savelle AT, Pusey LP (2001) Interactions between chill-hours and degree-days affect carpogenic germination in *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Phytopathology* 91:77–83
- Schlichting CD (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annu Rev Ecol Syst* 17:667–693
- Schlichting CD, Pigliucci M (1993) Control of Phenotypic Plasticity Via Regulatory Genes. *The American Naturalist* 142:366–370
- Schmid-Hempel P (2009) Parasites – the new frontier: celebrating Darwin 200. *Biol Lett* 5:625–627
- Schulze-Lefert P, Panstruga R (2003) Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Ann Rev Phytopath* 41:641–67
- Schumann GL (1991) Plant diseases: their biology and social impact. APS press, pp 397
- Schwartz MD (1999) Advancing to full bloom: planning phenological research for the 21st century. *Int J Biometeorol* 42:113–118
- Schwartz MD (2003) Phenology: an integrative environmental science. Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Schwartz MD, Reiter BE (2000) Changes in North America spring. *Int J Climatol* 20:929–932
- Schwartz MD, Ahas R, Aasa A (2006) Onset of spring starting earlier across the Northern Hemisphere. *Glob Chang Biol* 12:343–351
- Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M (2004) Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Appl Environ Microb* 70:3512–3520
- Scoville AG, Pfrender ME (2010) Phenotypic plasticity facilitates recurrent rapid adaptation to introduced predators. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:4260–4263
- Sherman WB, Soule J, Andrews CP (1977) Distribution of Florida peaches and nectarines in the tropics and subtropics. *Fruit Var J* 31:75–78

- Shimizu H, Maruoka M, Ichikawa N, Baruah AR, Uwatoko N, Sano Y, Onishi K (2010) Genetic control of phenotypic plasticity in Asian cultivated and wild rice in response to nutrient and density changes. *Genome* 53:211–23
- Shirazi AM (2003) Standardizing methods for evaluating the chilling requirements to break dormancy in seeds and buds (including geophytes): introduction to the workshop. *Special insert in HortScience* 38(3)
- Simms EL (2000) Defining tolerance as a norm of reaction. *Evol Ecol* 14:563–570
- Singer MC, Parmesan C (2010) Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy? *Phil Trans R Soc B* 365:3161–3176
- Sola AJ, Ehrlén J (2007) Vegetative phenology constrains the onset of flowering in the perennial herb *Lathyrus vernus*. *J Ecol* 95:208–216
- Soularue JP, Kremer A (2012) Assortative mating and gene flow generate clinal phenological variations in trees. *BMC Evol Biol* 12:79–92
- Sparks TH, Menzel A (2002) Observed changes in seasons: an overview. *Int J Climatology* 22:1715–1725
- Strauss SY, Agrawal AA (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol Evol* 14:179–185
- Sung DY, Kaplan F, Lee KJ, Guy CL (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci* 8:179–187
- Thomas FM, Blank R, Hartmann G (2002) Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For Path* 32:277–307
- Thompson R, Clark RM (2008) Is spring starting earlier? *Holocene* 18:95–104
- Thuiller W (2003) BIOMOD – optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change. *Global Change Biology* 9:1353–1362
- Tikkanen OP, Julkunen-Tiitto R (2003) Phenological variation as protection against defoliating insects: the case of *Quercus robur* and *Operophtera brumata*. *Oecologia* 136:244–251
- Till O (1956) Über die Frosthärte von Pflanzen sommergrüner Laubwälder. *Flora* 143:499–542
- Tranquillini W (1979) *Physiological Ecology of the Alpine Timberline*. Springer-Verlag, Berlin
- Tucker CJ, Slayback DA, Pinzon JE, Los SO, Myneni RB, Taylo MG (2001) Higher northern latitude normalized difference vegetation index and growing season trends from 1982 to 1999. *Int J Biometeor* 45:184–190

- van Asch M, Visser ME (2007) Phenology of forest caterpillars and their host trees: the importance of synchrony. *Annu Rev Entomol* 52:37–55
- van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5602–5607
- Vegis A (1964) Dormancy in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 15:185–221
- Via S (1987) Genetic constraints on the evolution of phenotypic plasticity. In: Loeschcke V (ed) Genetic constraints on adaptive evolution. Springer-Verlag, Berlin
- Via S, Lande R (1985) Genotype–environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39:505–522
- Via S, Gomulkiewicz R, De Jong G, Scheiner SM, Schlichting CD, Van Tienderen PH (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Tree* 10:212–217
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A (2009a) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can J For Res* 39:1259–1269
- Vitasse Y, Delzon S, Dufrêne E, Pontailier JY, Louvet JM, Kremer A, Michalet R (2009b) Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: Do within-species populations exhibit similar responses? *Agr Forest Meteorol* 149:735–744
- Vitasse Y, Porté AJ, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2009c) Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia* 161:187–198
- Vitasse Y, Bresson CC, Kremer A, Michalet R, Delzon S (2010) Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Funct Ecol* 24:1211–1218
- Vitasse Y, François C, Delpierre N, Dufrêne E, Kremer A, Chuine I, Delzon S (2011) Assessing the effects of climate change on the phenology of European temperate trees. *Agr Forest Meteorol* 151:969–980
- Vitasse Y, Basler D (2013) What role for photoperiod in the bud burst phenology of European beech. *Eur J Forest Res* 132:1–8
- Vitasse Y, Basler D (2014) Is the use of cuttings a good proxy to explore phenological responses of temperate forests in warming and photoperiod experiments? *Tree Physiol* 34:174–183
- Wagner GP, Booth G, Bagheri-Chaichian H (1997) A population genetic theory of canalization. *Evolution* 51:329–347

- Wairegi LWI, van Asten PJA, Tenywa MM, Bekunda MA (2010) Abiotic constraints override biotic constraints in East African highland banana systems. *Field Crop Res* 117:146–153
- Wargo PM (1996) Consequences of environmental stress on oak: predisposition to pathogens. *Ann Sci For* 53:359-368
- Weiser CJ (1970) Cold resistance and acclimation in woody plants. In *Cold hardiness, dormancy and freeze protection of fruit crops* Ed. L.R.P., Pullman, Washington, (USA), pp 403–410
- Welling A, Palva ET (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum* 127:167–181
- Whitman DW, Agrawal AA (2009) What is phenotypic plasticity and why it is important? In: Whitman DW and Ananthakrishnan TN (eds) *Phenotypic plasticity of insects*. Science Publishers, pp 1–63
- Wolfe J, Bryant G (2001) Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *Int J Refrig* 24:438–450
- Woodward RC, Waldie JSL, Steven HM (1929) Oak mildew and its control in forest nurseries. *Forestry* 3:38–56
- Worrall J (1983) Temperature - bud-burst relationships in amabilis and subalpine fir provenance tests replicated at different elevations. *Silvae Genetica* 32:203–209
- Zaehle S et al. (2007) Projected changes in terrestrial carbon storage in Europe under climate and land-use change, 1990-2100. *Ecosystems* 10:380–401
- Ziegler P, Kandler O (1980) Tonoplast stability as a critical factor in frost injury and hardening of spruce (*Picea abies* L.) needles. *Pflanzenphysiologie* 99:393–410
- Zhou LM, Tucker CJ, Kaufmann RK, Slayback D, Shabanov NV, Myneni RB (2001) Variations in northern vegetation activity inferred from satellite data of vegetation index during 1981 to 1999. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 106:20069–20083

ANNEXE

De nouvelles maladies menacent nos forêts

Desprez-Loustau Marie-Laure et Dantec Cécile

Sud-Ouest Nature (2013) n° 159



SUD-OUEST *nature*

Revue Trimestrielle de la SEPANSO

N° 159

Ces nouvelles maladies
qui menacent nos forêts...



N° 159 - Mai 2013 - 5 €

De nouvelles maladies

menacent nos forêts

Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU
et Cécile DANTEC
INRA

Vers une meilleure sensibilisation et participation du public

A lors que les progrès considérables de la médecine au cours du XX^{ème} siècle pouvaient laisser croire que toutes les maladies infectieuses étaient bien connues sinon maîtrisées, l'épidémie de SIDA à la fin des années 1980, puis l'apparition du SRAS et de la grippe H5N1 ont brusquement rappelé les hommes à plus de modestie devant leurs ennemis de longue date : les microbes. Ainsi s'est développé le concept de "maladie émergente". Si le concept est récent, la réalité est plus ancienne : la rougeole, introduite par les conquistadors en Amérique du Sud, fut en son temps une maladie émergente pour les populations amérindiennes. Le concept de maladie émergente a depuis été utilisé également pour les animaux et les plantes, domestiqués (élevages, cultures) ou en populations naturelles. Une maladie émergente est ainsi définie comme une nouvelle infection se développant dans une population donnée, soit qu'il s'agisse d'une maladie totalement nouvelle, soit qu'elle affecte une nouvelle population ou espèce ou qu'elle ait brutalement beaucoup augmenté en sévérité.

Quelques exemples d'épidémies en milieu naturel

Plusieurs épidémies dévastatrices ont affecté brutalement les arbres forestiers au cours des derniers siècles ou décennies :

- ◆ Les châtaigneraies d'Europe et d'Amérique du Nord, par exemple, ont été affectées successivement au cours du XX^{ème} siècle par deux maladies jusqu'alors inconnues, "l'encre" (causée par des organismes du genre *Phytophthora*) puis "le chancre" (causé par le champignon *Cryphonectria parasitica*). Le châtaignier, autrefois espèce dominante des forêts de l'Est des USA, a été décimé sur plusieurs centaines de milliers de km² et ne subsiste plus qu'à l'état d'arbuste. En Europe, ces deux maladies ont eu un impact moins catastrophique pour différentes raisons (moindre sensibilité du châtaignier européen, climat, régulation naturelle de *C. parasitica* par un virus) mais constituent toujours un facteur critique orientant la sylviculture et l'arboriculture. Les châtaigniers sont confrontés depuis quelques années à une nouvelle épidémie causée par une petite guêpe (*Dryocosmus kuriphilus* ou cynips ⁽¹⁾ du châtaignier), se manifestant par des galles à l'origine de mortalités de rameaux et éventuellement de l'arbre.
- ◆ La graphiose de l'orme (causée par les champignons *Ophiostoma ulmi* et *O. novo-ulmi*) est un autre exemple de maladie brusquement apparue au cours du XX^{ème} siècle qui a pratiquement éliminé tous les ormes dans une grande partie de l'Europe et en Amérique du Nord, en deux vagues épidémiques successives.
- ◆ Toutes les maladies émergentes n'ont pas forcément des effets aussi néfastes conduisant à l'extinction des popu-

lations hôtes. L'oïdium du chêne (se manifestant par un feutrage blanc à la surface des feuilles correspondant au mycélium et aux spores du champignon *Erysiphe alphitoides*) fait maintenant partie du paysage et ne compromet la survie des chênes que dans des situations particulières. Pourtant il s'agit d'une maladie ayant émergé au début du XX^{ème} siècle et qui à l'époque avait beaucoup inquiété les forestiers. Dans ce cas, il semble que des mécanismes de régulation au sein de l'écosystème (sélection des semis les plus résistants, existence d'hyperparasites s'attaquant au pathogène introduit), associés à des changements de pratiques sylvicoles (taillis remplacés par des futaies) aient permis de maintenir la maladie à un niveau modéré.

Les maladies émergentes récentes les plus préoccupantes pour les arbres forestiers en Europe sont la chalarose du frêne et la maladie du nématode du pin :

- ◆ La chalarose (causée par le champignon *Chalara fraxinea*) est apparue au début des années 1990 en Pologne et se caractérise par des flétrissements de pousses, conduisant à la mortalité des arbres. Depuis les premières mentions, l'extension de la maladie a été très rapide et elle affecte maintenant un grand nombre de pays européens. En France la maladie a été détectée pour la première fois en 2008 en Haute-Saône ; plus de 30 départements, situés dans le Nord et l'Est du pays, sont maintenant touchés ⁽²⁾.
- ◆ Le nématode du pin (ver parasite, *Bursaphelenchus xylophilus*) constitue une menace très sérieuse pour les peuplements de pins, en particulier la forêt landaise. Après une émergence en Asie dans les années 1980 ayant causé des dégâts très importants en Chine et au

Japon, le nématode est à nos portes, avec plusieurs foyers identifiés au Portugal.

Les espèces animales sauvages sont également affectées par des maladies émergentes. Ainsi, une nouvelle maladie affectant les amphibiens, la Chytridiomycose (causée par le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*), a été décrite depuis 1999 et s'est répandue dans le monde entier. Des mortalités massives ont été observées au sein de certaines populations, comme dans le cas des crapauds accoucheurs dans les Pyrénées.

Quelles sont les causes de ces maladies émergentes ?

Si les "nouvelles maladies" ont toujours existé, ce qui fait l'originalité de la période actuelle et qui a conduit au concept de "maladie émergente", aussi bien pour les populations humaines, animales que végétales, est l'accélération du phénomène. Ainsi dans le cas des forêts françaises, la fréquence moyenne d'apparition de nouvelle maladie entre 1824 et 1976 était de l'ordre de une tous les 11 ans ; cette fréquence a été doublée depuis 1976 (avec 7 émergences en 35 ans). Comment expliquer l'apparition de plus en plus rapide de nouvelles maladies ? Plusieurs analyses scientifiques rétrospectives pointent deux causes majeures d'émergence de maladies : le transfert d'agents pathogènes d'une région (continent) à une autre et les changements environnementaux, le plus souvent associés à des activités humaines :

- ◆ L'introduction de parasites exotiques est de loin la cause la plus fréquente d'émergence de maladies en milieu naturel. Les maladies émergentes sont ainsi une facette des invasions biologiques. Les exemples cités plus hauts illustrent bien : les trois parasites émergents du châtaignier, *Phytophthora*, *Cryphonectria* et *Dryocosmus*, sont tous d'origine asiatique et ont été introduits en Europe et en Amérique du Nord avec le commerce de plants. Très souvent, l'origine exotique est très fortement suggérée (par l'absence préalable et les études génétiques des organismes pathogènes impliqués), mais la région d'origine des parasites reste inconnue. Il en va ainsi des agents de la chalarose du frêne et de la chytridiomycose des amphibiens. L'augmentation récente et rapide des maladies émergentes s'explique ainsi grandement par l'accélération des échanges au niveau mondial, qui facilite le transport des pathogènes via leurs hôtes (plants, bois, animaux de compagnie, etc...).

Pourquoi les parasites exotiques s'avèrent-ils aussi dommageables ?

D'abord, il faut noter que nous ne voyons justement que ceux ayant les effets les plus sévères. Dans le cas des invasions biologiques (les agents pathogènes pouvant être considérés comme un cas particulier), on estime généralement que seulement une très petite fraction des organismes exotiques introduits devient effective-

ment envahissante, la plupart échouant à s'établir et se répandre dans un nouveau milieu. Dans le cas des agents pathogènes, il faut ainsi souvent franchir une "barrière d'hôte" (si l'espèce hôte d'origine n'est pas présente dans la région où ils sont introduits). Toutefois, les pathogènes introduits ont l'avantage d'être mis au contact de populations hôtes dites naïves, c'est-à-dire n'ayant pas eu la chance de développer des résistances par co-évolution avec ces organismes. L'exemple du châtaignier est là encore illustratif : les trois agents pathogènes qui ont décimé les châtaigniers en Europe et en Amérique sont tous issus d'Asie où ils ont co-évolué avec d'autres espèces de châtaigniers qui, elles, sont résistantes (et d'ailleurs utilisées pour cela dans les programmes de création variétale pour les vergers). Ainsi, les maladies émergentes sont souvent causées par des organismes pathogènes issus d'espèces hôtes apparentées. Dans d'autres cas, les transferts de pathogènes par les activités humaines aboutissent à des combinaisons inédites et potentiellement virulentes, en favorisant des hybridations entre espèces qui n'auraient pas eu l'occasion de se rencontrer en conditions naturelles. Ainsi les aulnes sont affectés depuis deux décennies en Europe par une espèce hybride de *Phytophthora*, non décrite jusqu'alors.

- ◆ Enfin, certaines émergences peuvent être favorisées par des changements affectant l'environnement, souvent modifié par les activités humaines. Les dépérissements de pins à *Sphaeropsis sapinea* ont explosé en Europe depuis les années 1980 alors que le champignon causal était décrit depuis très longtemps mais non associé à des dommages. Dans ce cas, l'émergence semble due à une combinaison de facteurs : extension des reboisements de *Pinus laricio* (espèce très sensible), réchauffement climatique favorisant le pathogène (plutôt thermophile), fréquence des sécheresses (seuls les arbres stressés développent la maladie), transport de plants contaminés (les plantations étant beaucoup plus affectées que les peuplements naturels ; en particulier les pins laricio sont indemnes dans les peuplements naturels de Corse).

Photo : Colette GOUANELLE

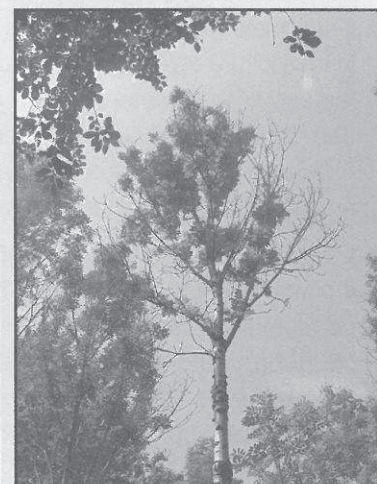
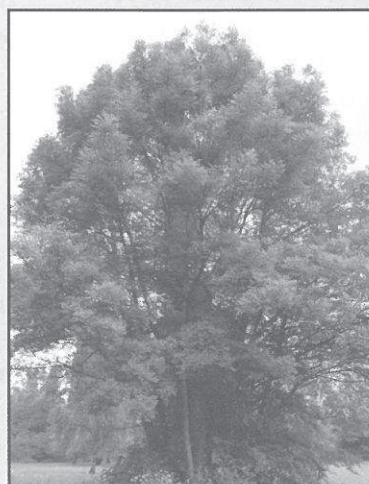
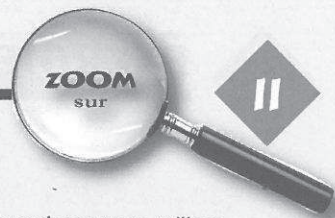


Photo : Dominique PTOU

▲ A droite, un frêne atteint de chalarose (à gauche, un frêne sain)



Que faire pour limiter l'impact des nouvelles maladies ?

Plus encore que dans le cas des maladies affectant les élevages ou les plantes cultivées, la prévention apparaît comme l'approche à privilégier dans le contrôle des maladies émergentes en milieu naturel : une fois détectée, il est souvent très difficile de trouver des moyens curatifs pour une maladie affectant des populations sauvages. Les mesures préventives peuvent/doivent être prises à plusieurs niveaux :

- ◆ La réglementation européenne concernant les échanges commerciaux prend insuffisamment ou mal en compte les risques liés à l'introduction de parasites exotiques. Les réglementations de quarantaine par exemple, reposant sur des listes d'organismes nuisibles, supposent que les organismes sont identifiés alors que les émergences récentes ont souvent été causées par des agents pathogènes précédemment non décrits. Des recherches en cours reposant sur l'analyse du risque et utilisant des méthodes modernes pour tracer les épidémies (marqueurs génétiques, modélisation de la dissémination, analyse de réseaux) ont pour but d'identifier les points-clés et pourront permettre d'améliorer la réglementation et l'efficacité des contrôles. La détection précoce des invasions/foyers d'émergence fait également partie des mesures permettant une action précoce, donc potentiellement plus efficace. Les réseaux de surveillance, comme le Département Santé des Forêts, sont un maillon indispensable.
- ◆ Si les acteurs professionnels (législateurs, gestionnaires, chercheurs) ont bien sûr un rôle à jouer, le public est aussi un acteur majeur, encore insuffisamment sensibilisé en Europe et en France en particulier. Même si les échanges commerciaux intercontinentaux sont prépondérants dans la dispersion des pathogènes, les voyageurs peuvent également être impliqués par les marchandises qu'ils transportent. Ceux qui ont voyagé en Nouvelle-Zélande et Australie ont peut-être été surpris d'être menacés d'une lourde amende à leur arrivée s'ils avaient une pomme dans leur sac. Ces deux pays insulaires sont particulièrement impliqués dans la prévention des invasions biologiques, y compris d'agents pathogènes.
- ◆ A une plus petite échelle, le public peut également être un facteur involontaire de dispersion des agents pathogènes. Certains animaux "de compagnie" d'origine exotique peuvent être porteurs sains d'agents pathogènes auxquels les populations sauvages d'animaux apparentés peuvent être

très sensibles. La libération de ces animaux en milieu naturel peut ainsi favoriser le développement d'épidémies. Ainsi, la dispersion de la chytridiomycose des amphibiens aurait été favorisée dans certaines zones par l'introduction de grenouilles-taureaux. De même, le *Tamias* de Sibérie ⁽³⁾, autre "NAC" (nouvel animal de compagnie) s'étant établi dans plusieurs forêts de la région parisienne à partir d'animaux relâchés, est suspecté de jouer le rôle de réservoir pour *Borrelia burgdorferi* ⁽⁴⁾, l'agent responsable de la maladie de Lyme. Une meilleure sensibilisation du public à ces risques, par l'information et l'éducation, permettrait d'éviter certains comportements et une meilleure acceptation de mesures pouvant apparaître comme restrictives, dans l'équilibre entre liberté de circulation (des personnes et des marchandises) et gestion des risques biologiques.

Au-delà de cette sensibilisation, un engagement actif du public permettra une efficacité encore plus grande des mesures de prévention. La science participative ou science citoyenne est amenée à se développer largement grâce à l'utilisation de nouvelles technologies (internet, téléphones portables, systèmes d'information géographiques). Ainsi, le public pourra participer activement à la détection d'organismes invasifs ou virulents, offrant une aide très précieuse à la gestion et à la connaissance. ■

IMPACT DU NEMATODE DU PIN Des risques de pertes vertigineuses en Europe du Sud

Actuellement, la valeur cumulée des stocks de bois, pour le Portugal, l'Espagne, le sud de la France et l'Italie, sur une période de 22 ans (2008-2030), en supposant qu'aucune mesure réglementaire de contrôle n'intervienne, est estimée à 22 milliards d'euros.

Les modèles (*) permettant d'évaluer les impacts économiques des espèces invasives montrent que c'est au cours de la période 2014-2019 que la plus grande perte annuelle de stocks serait enregistrée, avec un pic de 3 milliards d'euros en 2016, puis des pertes annuelles qui se stabiliseraient ensuite dans une fourchette de 300 à 800 millions d'euros. Ces pertes se répercuteraient sur l'industrie du bois à raison de 218 millions d'euros en 2030 et sur les consommateurs à raison de 357 millions d'euros. Au final, la pénurie de bois pourrait engendrer des augmentations de son prix.

CG

(*) Framework for Modelling Economic Impacts of Invasive Species, Applied to Pine Wood Nematode in Europe Tarek Soliman¹, Monique C.M. Mourits^{1*}, Wopke van der Werf⁴, Geerten M. Hengeveld², Christelle Robinet³, Alfons G.J.M. Oude Lansink¹ (1 Business Economics, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2 Alterra, Wageningen UR, Wageningen, The Netherlands, 3 INRA, UR 633 Zoologie Forestière, Orléans, France, 4 Crop and Weed Ecology Group, Centre for Crop Systems Analysis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands).

(1) *Cynips* : petit insecte Hyménoptère qui pond dans les bourgeons et dont les larves provoquent la formation de galles. Il en existe de nombreuses espèces.

(2) Informations sur le site du Département Santé des Forêts : <http://agriculture.gouv.fr/departement-de-la-sante-des-forets>

(3) *Tamias* de Sibérie : petit mammifère rongeur de la famille de l'écureuil.

(4) *Borrelia burgdorferi* : bactérie responsable de la maladie de Lyme et véhiculée par les tiques.

Résumé : La phénologie du débourrement est un caractère majeur d'adaptation des arbres à leur environnement en milieu tempéré. Notre objectif a été de caractériser les contraintes biotiques (oïdium) et abiotiques (températures hivernales et printanières / gels tardifs) s'exerçant sur le débourrement afin d'expliquer les patrons de variation phénologique intra et inter populationnelle observés chez le chêne (*Quercus petraea*) le long d'un gradient altitudinal. Nous avons utilisé une approche combinant observations *in situ*, expérimentation, et modélisation. Nous avons mis en évidence que l'évitement des gels tardifs printaniers est un caractère adaptatif majeur le long du gradient altitudinal. La tardiveté du débourrement pourrait être due à des besoins plus importants en température de *forcing*. Par ailleurs, le champignon n'est pas adapté localement à la phénologie de son hôte et les individus et les populations sont alors inégalement exposés à la maladie. En montant en altitude, les chênes sont de plus en plus exposés au champignon, mais les facteurs environnementaux sont défavorables à une plus forte infection. A basse altitude, l'oïdium et les gels tardifs favorisent des phénotypes phénologiques opposés (respectivement précoces vs. tardifs) ; la combinaison des deux contraintes pourrait donc contribuer au maintien de la forte diversité phénologique observée. D'autre part, nous avons observé que l'infection par l'oïdium engendre une augmentation du polycyclisme chez les semis de chêne au cours de la saison de croissance, ce qui les rend moins résistants aux gels hivernaux. Nous montrons qu'il est important que les modèles phénologiques à visée prédictive intègrent la phase de *chilling* aboutissant à la levée de dormance. Le manque de *chilling* ne semble pas encore un facteur limitant, mais la tendance actuelle à un débourrement de plus en plus précoce sera probablement freinée voire inversée au milieu du siècle en basse altitude, dans la marge sud de distribution de *Q. petraea*.

Mots clés : débourrement, températures de *chilling* / *forcing*, gel tardif, maladie, oïdium, polycyclisme

Title: Characterization of biotic and abiotic constraints on oak spring phenology. Explaining observed diversity patterns and predicting future changes.

Abstract: Budburst phenology is a major adaptive trait of trees to the environment in temperate climate. Our aim was to characterize the biotic (powdery mildew) and abiotic (winter and spring temperatures / spring frost) constraints acting on budburst in view to explain the patterns of intra and inter populations' phenological variation observed in sessile oak (*Quercus petraea*) along an elevation gradient. We based our approach on *in situ* monitoring, experimentation and modeling. Our results highlight that the avoidance of late spring frosts is a major adaptive trait along the elevation gradient. The lateness in budburst might be due to higher requirements in forcing temperatures. Otherwise, the fungus is not locally adapted to its host phenology so oak individuals and populations are unequally exposed to the disease. With increasing elevation, oaks are more and more exposed to the fungus, but the environmental factors are unfavorable to higher infection. At low elevation, powdery mildew and late spring frosts favor opposite phenological phenotypes (early-flushing vs. late-flushing trees, respectively); the combination of the two pressures may thus contribute to the maintenance of the observed high phenological diversity. We also showed that powdery mildew infection induced an increased polycyclism during the growing season in oak seedlings, which made them less resistant to winter frosts. Predictive phenological models will have to include the chilling phase which conditions dormancy breaking. Although the lack of chilling is not yet a limiting factor, the current trend in increasingly advanced budburst will certainly be slowed or even reversed in the middle of the century at low elevation, in the southern margin of the distribution area of *Q. petraea*.

Keywords: budburst, chilling / forcing temperatures, spring frost, disease, powdery mildew, polycyclism

UMR 1202 BIOGECO

INRA, Campus Recherche & Innovation Forêt-Bois – 69, route d'Arcachon – F-33610 Cestas, France
Université de Bordeaux, Bâtiment B2 – Avenue des Facultés – F33400 Talence, France