

Diversité des réponses écophysiologiques et moléculaires pour un complexe de frênes européens (Fraxinus angustifolia Vahl et Fraxinus excelsior L. et leurs hybrides) face à la contrainte hydrique

Romain Joseph

▶ **To cite this version:**

Romain Joseph. Diversité des réponses écophysiologiques et moléculaires pour un complexe de frênes européens (Fraxinus angustifolia Vahl et Fraxinus excelsior L. et leurs hybrides) face à la contrainte hydrique. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0088 . tel-01136233

HAL Id: tel-01136233
https://pastel.hal.science/tel-01136233

Submitted on 26 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.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences agronomiques et de l'environnement

présentée et soutenue publiquement par

Romain JOSEPH

le 9 décembre 2013

Diversité des réponses écophysiologiques et moléculaires pour un complexe de frênes européens (*Fraxinus angustifolia* Vahl et *Fraxinus excelsior* L. et leurs hybrides) face à la contrainte hydrique.

Directeur de thèse : **Nathalie FRASCARIA-LACOSTE**
Co-encadrement de la thèse : **Claire DAMESIN**

Jury

M. Hervé COCHARD, Directeur de recherche, UMR A 547 PIAF, INRA Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. Marc VILLAR, Chargé de Recherche, UR 0558 AGPF, INRA Orléans	Rapporteur
M. Michel DRON, Professeur UPSUD, UMR 8618 IBP, UPSUD Orsay	Examinateur



AgroParisTech
Laboratoire ESE, UMR 8079, CNRS, Université Paris-Sud AgroParisTech
Bât. 360-362 Campus Orsay-Vallée, Voie de la faculté, 91 405 Orsay Cedex

Table des matières

Liste des abreviations utilisées……...…page 10

I) Contexte général des changements climatiques……..…….....….**page12**

I-a) Services écosystèmiques des forêts, menaces liées au changement climatique ……..……...page 16

I-b) La ressource eau et les écosystèmes forestiers : conséquences de la limitation de cette ressource……..……..……..……...…page 19

I-c) Stratégies des arbres forestiers à l'échelle individuelle en réponse à une contrainte hydrique…….page 23

I-d) Les événements d'hybridation et leurs implications dans un contexte de changement climatique……..…….....page 29

II) Problématique de notre étude…….....**page 34**

II-a) Introduction du modèle d'étude : le complexe d'espèce frêne : *F.excelsior*, *F.angustifolia* et les populations hybrides……..…….....……..page 34

II-b) Questionnement de la thèse et objectifs d'étude……..….page 41

III) Chapitre 1 : Réponse de populations de frênes communs, méditerranéens et hybrides à une faible contrainte hydrique : Approches écophysiologiques et génétique…….....**page 45**

III-a) Introduction chapitre 1……..…….....….page 46

III-b) Principaux résultats……..….page 49

III-c) Discussion chapitre 1……...……...……page 51

Article1: *Ash hybrid populations as a reservoir of adaptive variability: New insights from a combined genetic and ecophysiological approach*……...……...…….....page 57

IV) Chapitre 2 : Réponse de la conductivité hydraulique de populations de frênes à une forte contrainte hydrique.....**page 95**

IV-a) Introduction chapitre 2…….....….page 96

IV-b) Principaux résultats……..…….page 98

IV-c) Discussion chapitre 2…….....page 103

Article 2: *Is there population variability in vulnerability of leaf xylem to cavitation? A case study with ash (Oleaceae) populations?*.....page 106

V) Discussion-Perspectives……..……..…….….page 139

V-a) Caractérisation des populations de frênes étudiées avec ou sans contrainte hydrique……..page 139

V-b) Risque hydraulique des populations de frênes étudies……..….page 143

V-c) Généralisation sur les aspects de contrainte hydrique-limites des choix méthodologiques……...page 145

V-d) Aspects novateurs de notre étude…….page 147

V-e) Comportement et dynamique des espèces de frênes et leur hybrides dans une perspective de changement climatique……..……page 148

V-f) Perspectives méthodologiques……..page 150

V-g) Comportement et dynamique des frênes dans une perspective de changement climatique…….....page 154

V-h) Intérêt de l'hybridation pour la conservation……..……page 154

Conclusion…….……...….page 156

Références bibliographiques……..……...page 164

Résumé-abstract……..……..……..…...…**page 179**

Liste des tableaux, figures et encadrés

Figure 1 : Evolution de la concentration en CO_2 en ppm pour la période 2008-2013 mesurée à la station de Mauna Loa (Hawaï, États-Unis). ……..page 12

Figure 2.1 : Diagramme conceptuel montrant l'évolution des paramètres environnementaux température et précipitation……..page 15

Figure 2.2 : Diagramme théorique basé sur les relations entre intensité de la contrainte hydrique et la durée temporelle d'une contrainte hydrique……..page 17

Encadré 1 : *Réponse des arbres forestiers à la sécheresse à l'échelle individuelle*……...page 20

Figure 3 : Reseau biologique des cascades de réponses à la contrainte hydrique ..…….....page 23

Figure 4 : Exemple d'arbre phylogénétique de la section *Helianthus sp* basé sur des données ADN chloroplastiques et nucléaire montrant l'apparition de nouvellesespèce par hybridation…….....page 27

Encadré 2 : Définition des concepts utilisés…….page 28

Figure 5 : Exemple de ségrégation transgressive de caractères génétiques……...page 30

Figure 6.1 : Conditions pédologiques dans lesquelles sont rencontrées *F.excelsior* …….....page 33

Figure 6.2 : Conditions pédologiques dans lesquelles sont rencontrées *F.angustifolia* .....…page 34

Figure 7 : Photos de feuilles de frênes adultes recoltées le long de la Loire représentant les différences de morphologie foliaire…….page 36

Figure 8 : Carte de répartition des espèces de frênes européens. ……..page 37

Tableau 1 : Informations sur les populations utilisées lors de la premiere experimentation……..page 41

Figure 9 : Localisation et statut genetiquement determiné des populations de frênes échantillonées……..page 41

Tableau 2 : Informations sur les populations de frêne étudiées pour cette étude…….page 94

Figure 10 : Courbes montrant l'évolution du pourcentage de perte de conductivité mesuré sur petiole de frêne (PLC) en fonction du potentiel de base pour chaque population étudiée……..page 98

Annexes

Annexe 1 : Courbes *A*-PAR pour 3 populations de frêne : Saint Gobain (SGO : *F.excelsior*), Saint Dyé (SDYE : Hybride Loire) et La Mole (MOL : *F.angustifolia*)……..page 155

Annexe 2 : Données mesurées sur les graines de frênes cultivées in vitro……..page 158

Remerciements

L'art de présenter des remerciements est à mon sens toujours très délicat, il faut savoir les présenter de manière à ce qu'ils ne soient ni fonction du temps passé à échanger, ni fonction du degré d'implication dans le projet... autant essayer faire passer ce sentiment de gratitude de manière chronologique.

Un travail de thèse n'est pas grand-chose sans les gens / personnes qui l'ont élaboré(e), c'est pourquoi il me paraît important de remercier mes deux directrices de thèse !
Tout d'abord merci à Nathalie : Merci de m'avoir attendu plus d'une heure au début de cette aventure pendant que j'errais sur le campus à la recherche du bâtiment 630 (au lieu du 360, erreur de dyslexie !). Merci pour la préparation du concours de l'ED, et pour tout ton encadrement de thèse. Merci également pour le dépistage de la dyslexie. Les mots de soutien quand il y en a eu besoin, et les mots dur aussi quand il fallait se secouer. Merci !

Merci également à Claire, pour ta rigueur et tes capacités d'introspection. La formation à cet outil indispensable à l'écophysiologiste que je ne maitrisais pas : la chambre à pression !
Et pour les conseils sur les manips qui prennent l'eau en été, dommage quand on simule la sécheresse, malgré la triple épaisseur de sac plastique et le Terostat® (on aurait peut-être du essayer le joint en silicone ?). Merci pour avoir su prendre le temps d'écouter et de comprendre malgré ton emploi du temps chargé. Merci de m'avoir consacré du temps et de l'énergie à corriger mes erreurs, et les tableaux Excel par milliers !

Mes remerciements vont également à l'équipe Frêne du laboratoire ESE, même si elle ne porte plus ce nom. Juan, merci de m'avoir guidé sur les logiciels bien étranges que sont Gene mapper® et Structure, pour le fouillage données génétique, etc…toujours avec bonne humeur et merci pour tous tes conseils. Merci aussi pour toutes les réunions auxquelles tu as assisté et pour tous les sourires, même quand je n'avais plus le cœur à ça. Merci de m'avoir fait relativiser le travail de recherche. Merci aussi pour les bonnes bouteilles de vin, et ta connaissance encyclopédique des Cahors !

Christian, merci d'avoir mis au point la sylviculture de frêne en boite de Pétri ! Sans laquelle point de salut dans cette aventure *Frénétique* ! Désolé de ne pas avoir poussé plus loin l'aspect *in vitro* de ce travail ! Merci pour toutes tes connaissances et ta gentillesse de tous les instants. (Merci pour les recettes de cuisine et d'avoir été le fournisseur attitré en pâtisseries du laboratoire ☺ !). Merci à Jean Dufour pour l'échantillonnage des graines de frênes que nous avons utilisés.

Muriel, merci à toi pour tes apparitions au labo qui ont su me redonner le moral, et pour les bonnes discussions (stomates et Co.). Merci d'avoir relu une version « primitive » de ce manuscrit et d'y avoir apporté des corrections, et pour avoir fait ton *comming out* de dyslexique, ce qui m'a aidé à me sentir bien moins seul ! Damien pour m'avoir transmis le savoir frêne et phylogénique et pour les discussions sur le trajet de l'université Paris Sud ou au labo. Marta pour les quelques scripts de R échangés, qui règlent en 5 min ce que l'on met deux jour à essayer de solutionner. Paola, merci pour le coup de main, bref mais super utile lors de mes premières manips ! Et pour tous les autres services dont tu as pu me faire bénéficier (Quel veinard j'ai été !).

Un grand merci à Najat sans qui cette thèse n'aurait eu de génétique que le nom et où la génétique se serait arrêtée au stade de l'extraction d'ARN. Merci pour ta générosité et désolé de ne pas avoir eu l'énergie et le temps pour finaliser la partie qPCR de cette thèse.
Merci à Gwendal R. pour m'avoir ouvert les yeux sur le potentiel de mes données alors que je ne me noyais dans un océan de chiffres ! Merci pour ton intérêt pour ce travail, et pour toutes les révisions de données, les analyses statistiques que toi seul maitrise. Puisses-tu trouver un poste qui te convient et qui soit à la hauteur de tes mérites.

Il me paraitrait déraisonnable également de ne pas remercier mon comité de thèse :
Oliver Brendel merci d'avoir fait partie de mon comité de thèse, et pour ta rigueur d'écophysiologiste, merci de m'avoir orienté dans ce travail en m'évitant les voies sans issues. Hervé Cochard merci de m'avoir fait partager ta science de l'hydraulique (ou de la plomberie ?) et surtout pour la relecture dernière minute du manuscrit et pour tes avis éclairés !

Mes remerciements vont également à Amandine et Lionel, pour qui la serre du laboratoire n'a plus de secret. Merci d'avoir pris soin de mes plants de frênes en 2009, avant que je ne les sacrifie (hé hé hé … *rire machiavélique*).
Merci de m'avoir accueilli en catastrophe de nouveau, moi et mes plants de frênes, en ce pluvieux mois de juillet 2010, et d'avoir ainsi sauvé du naufrage/noyade une grande partie de ce travail.

Au rayon technique je dois également remercier les bricoleurs et bidouilleurs de l'extrême qui savent toujours tout réparer même avec de très faibles moyens. Jean-Louis merci d'avoir élaboré un coin expérimental en extérieur, qui au final a pris l'eau, mais c'est de la faute de la météo. Puisses-tu passer une douce retraite. Nicolas Moulonguet, merci d'avoir transformé une salle des frigos en bureau digne de ce nom (avec ordinateur, téléphone et ADSL !).

Toujours du côté technique mais pas que, un grand merci à Tété, merci d'être venu dans nos froides contrées pour me former sur cette machine infernale qu'est le Xyl'em®, ce qui m'a permis de former d'autres à mon tour…
Merci à Alodie, pour ta science des gels et tout ce qui touche de près ou de loin à l'électrophorèse.

Mes remerciements vont également à l'équipe écophysiologie du laboratoire ESE, avec laquelle j'ai manqué d'interaction physique (bureau au bâtiment 360) mais bien partagé des problèmes pratiques. Un immense merci à Chantal d'avoir à plusieurs reprise tenté d'extraire les protéines de ces %*$^*** de folioles de frênes, et pour ta bonne humeur quasi inaltérable. Merci pour toutes nos discussions et pour ta chaleur humaine. Gwendal L. pour les quelques visites pendant mon isolement en chambre de culture, puisque nous avons partagé le même compartiment de la serre, merci d'avoir brisé la monotonie du ronronnement du LiCor® par quelques phrases sympathiques et bienvenues.
À propos de LiCor®, un grand merci à Daniel pour m'avoir formé sur le couteau Suisse de l'écophysiologiste, le Licor® 6400. Également pour ton aide sur le logiciel SAS et pour les courbes A-PAR. Claire merci pour les quelques mots de soutient pendant les manips et merci de m'avoir rendu visite à Montpelier. Merci également à Nicolas pour les quelques discussions impromptues et sympathiques.
Merci aussi à Éric Dufrêne, qui n'a rien à voir avec le frêne, ni avec ce projet malgré son patronyme, mais avec qui j'ai bien échangé sur les abeilles !

N'oublions pas les forces vives du laboratoire : les doctorants ! Pour la partie écophysiologie du labo, merci au duo d'Alices (Alice M. et Alice D.) pour les bonnes discussions qui brisent l'isolement et la répétitivité du travail de recherche (Bonne chance Alice D. pour ta future reconversion en boulangère, et félicitations Alice M. pour ton poste !). Un merci également à Gabriel pour les quelques coups de mains et de matériel échangés quand nous nous croissions tôt le matin ou tard le soir près de la serre à surveiller nos expérimentations respectives. Merci également à Angélique pour ta bonne humeur, tes rires et une certaine nonchalance bienvenue !
Merci également à Joanès pour les quelques discussion lors des trajets en RER B et sur les thèses en général. Merci à Lydie pour ta bonne humeur et d'avoir passé du temps à écouter mes problèmes existentiels de doctorant aux frontières de 2 disciplines. Un salut à Elodie, la dernière arrivée dans l'équipe !

Hommage également aux doctorants généticiens ! Même si je n'ai pas pu échanger beaucoup avec vous scientifiquement parlant. Merci à Julien d'avoir pris le temps de prendre des nouvelles de mon état psychique et physique à une heure matinale (10h) ou je ne suis pas très bien réveillé.
Merci à Céline d'avoir écouté mes soucis lors de la phase terminale (i.e. la rédaction) et félicitation à la nouvelle docteure ! Merci à Yann pour les discussions lors des phases d'extraction d'ARN, et pour sa connaissance des moindres recoins des salles de manips (où est-ce que j'ai rangé cette pipette multi-canaux ? Ils sont où les eppendorf® 2ml ?). Merci à Jonathan d'avoir partagé ta curiosité pour d'étranges bestioles venue du passé (les Shadocks !) et pour les discussions à leur sujet.

Merci également aux collègues partageurs de déjeuners à la cantine, Philippe, Juergen, et Martine pour les discussions sérieuses ou moins, et pour m'avoir fait pratiquer l'anglais, souvent à 12h. Merci à Lucie, pour ta bonne humeur inaltérable et ton sourire quel que soit la météo où mon humeur à moi. Pour nos discussions philosophico-éthique sur le monde de la recherche et toutes les autres. Et désolé que mon orgueil de mâle mal placé m'ait empêché de franchir le pas pour essayer le tricot ! Bonne continuation dans ta nouvelle voie !

Un merci à ma seule et unique stagiaire Djawida diablement efficace (que deviens-tu ?).

Je n'oublie pas également l'équipe de Paris 7, qui a encadré durant 3 ans mon monitorat. Cécile et Jean-Luc pour toute leur aide à la préparation des TP de L1 ainsi qu'a Danielle CLAIR (oui promis, je ne me tromperai plus entre ovaire *infère* et ovaire *supère* !). Mes remerciements également pour la partie enseignement lors de mon contrat d'ATER, à l'équipe enseignante de Paris Sud 11. Peter pour l'aide sur les TP d'écophysiologie, et pour la mauvaise grippe que nous avons dû partager… (et désolé d'avoir cassé le PAM 2000 lors de mes manips…). Ludwig, pour les TP sur la pédofaune, Emmanuelle pour les TP aux L2. Stéphane pour la supervision du module M1 METO.

Bien évidemment une thèse ne se fait pas sans soutien administratif (voire plus), mes chaleureux remerciements vont à l'équipe de l'ED ABIES. Qu'ils soient tous remerciés ici. Les dirigeants Cyril Kao et Irina Vassileva, pour avoir pris le temps de nous recevoir à plusieurs reprises et pour leur gestion exceptionnelle d'un cas exceptionnel. Merci également à Corine au secrétariat de l'ED.

Merci également aux secrétaires du laboratoire, Emmanuelle, Nathalie, ainsi qu'à Patricia et Michelle, pour m'avoir aidé dans mes obligations de représentant des non-permanents du laboratoire pendant 2 années. Ainsi que pour toutes les commandes. Et merci à Sandrine pour la gestion financière acrobatique (sans filet !) des contrats SAIC. Merci à la Fédération pour la Recherche sur la Biodiversité d'avoir financé ce projet FRENETIC.

Un grand merci à d'autres personnalités, qui ont gravité autour de moi ces quatre années sans avoir forcement de lien direct ou d'atomes crochus sur le plan scientifique. Jacqui merci pour les discussions culinaires et culturelles. Un pardon à Purificacíon et David pour cette invitation lâchement non-honorée à présenter mes travaux lors d'un lab meeting.

Un merci particulier à Beatrice Sauvageot, ma gourou d'orthophoniste (ouais Puissance dys !!!). Sans tes efforts et tes séances de rééducation cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Merci pour tes encouragements à de multiples reprises même quand le moral est au plus bas, ton implication sans failles, et pour ta générosité, merci de m'avoir aidé à reprendre confiance en moi et à remonter la pente, pour finalement arriver à aboutir à ce doctorat, cette thèse te doit beaucoup. Je n'oublierais pas ce que j'ai appris au cours de tes ateliers.

Merci à Odile Espié-Chevallier pour toute l'aide lors de la rédaction et les corrections sur ce manuscrit. Puisses-tu te rétablir rapidement !

Merci tout autant à ma maman d'avoir supporté l'absence de nouvelles de ma part et une humeur d'ours mal léché chronique en ces longs derniers mois. Une pensée pour ma sœur Cécile puisque nous sommes tous deux en phase d'accouchement, moi de ce manuscrit de thèse et toi d'un nouveau petit d'Homme : Sacha (je vous laisse juge de ce qui est le plus douloureux en la matière…). Merci à ceux ou celles que j'aurais pu éventuellement oublier.

Et enfin après cette longue litanie de remerciements, « *last but not least* » ma chère et tendre Anna, qui partage ma vie au quotidien et qui durant ces quatre longues années m'aura apporté toute son aide et son soutien (expérimentation de nuit et autres), qui a su supporter l'insupportable de la vie d'un thésard : mes fréquentes sautes d'humeur, mes phases dépressives, mes phases d'insomnies, mes phases d'ennui… et bien d'autres encore... Et pour toutes ces choses que je ne peux exprimer avec des mots, mais que toi seule sait décrypter dans mon regard ! Merci de m'avoir remonté, par ton amour, des abysses ou je me suis plongé. Et je te fais ici ma promesse solennelle (bien qu'un peu facile…) que cette thèse sera ma seule et unique thèse. J'ai hâte de vivre de nouveaux projets avec toi !

Avant propos

Cette étude financée par la FRB (Fondation Pour la Recherche sur la Biodiversité), projet FRENETIC, s'est déroulée au Laboratoire Ecologie Systèmatique et Evolution (UMR 8079 Université Paris Sud-CNRS-Agroparistech).

Le texte qui suit est composé de parties rédigées en français, suivies d'articles scientifiques rédigés en anglais qui leur correspondent.
Les parties en français proposent chacune une introduction, une presentation des principaux résultats et une discussion correspondant aux articles en anglais.
Les parties en anglais sont des articles scientifiques présentant le détail des approches employées et des travaux menés. Chaque article faisant l'objet d'un chapitre.

Ainsi, si les principaux résultats sont évoqués dans les parties en français, il sera cependant nécessaire au lecteur de se référer aux articles en anglais afin d'avoir des inofmations plus complètes.

« Un homme qui n'a jamais fait d'erreur n'a jamais innové. »

Albert Einstein.

« Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir... En d'autres termes... Plus ça rate et plus on a de chances que ça marche. »

Devise Shadok.

« L'intelligence, c'est important ! C'est le seul outil qui permet à l'homme de mesurer l'étendue de son malheur. »

Pierre Desproges

« Il y a deux choses infinies : l'univers et la betise humaine. Pour l'univers je n'en ai pas acquis la certitude absolue.»

Albert Einstein.

« La démocratie est la pire des dictatures, parce qu'elle est la dictature exercée par le plus grand nombre sur la minorité. »

Pierre Desproges

Liste des abreviations utilisées

$\delta^{13}C$: composition isotopique entre le carbonne 13 et le carbonne 12 (exprimée en ‰). Indicateur de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUEi).

ψ_{pd} : Potentiel hydrique foliaire de base

Ψ_x : Potentiel du xylème

A : Assimaltion exprimée en µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}

A_{max} : Assimilation maximale, en µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}

ABA : Acide Abcissique

AFLP : Amplified Fragment-Length Polymorphism, L'AFLP est une technique utilisée en biologie moleculaire.

AGP III : Angiosperm Phlogeny Group III, L'AGP III ou classification phylogénétique, est la troisième version de classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperms Phylogeny Group.

ARNm : ARN messager

cDNA : ADN complementaire synthèstisé a partir d'ARNm (ARN messager)

cDNA-AFLP : methodologie de biologie moleculaire

CO_2 : Dioxyde de Carbone

F_1 : En génétique un hybride F_1 est la première génération issue d'un croisement entre deux individus.

FAO : Food and Agriculture Organisation, organisation des Nations Unies (ONU) pour l'alimentation et l'agriculture

F_v / F_m : Ratio de la fluorescence chlorophylienne variable (Fv) sur la Fluoresecence maximale (Fm), utilisé comme un indicateur de l'efficience du photosystème II

FRAXIGEN : Projet de l'union européene sur la biologie des 3 espèces de frenes européens : *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus angustifolia* et *Fraxinus ornus*.

gs : Conductance stomatique en en mol H_20 m^{-2} s^{-1}

gs_{max} : Conductance stomatique maximale, en mol H_20 m^{-2} s^{-1}

HR ou RH : Humidité Relative en %

IPCC : Intergovernmental Panel on Climate Change, un organe intergouvernemental qui est ouvert à tous les pays membres de l'ONU et de l'OMM (Organisation météorologique mondiale) qui est chargé d'examiner et évaluer les informations scientifiques, techniques et socio-économiques les plus récentes qui aident à la compréhension du changement climatique.

J_{max} : vitesse maximale de transport d'électron dans les reactions de la photosynthèse

K_{init} : Conductivité initiale d'un morceau de xylème

K_{max} : Conductivité maximale d'un morceau de xylème

K_{leaf} : Conductivité foliaire

LMA : Leaf Mass Area, ou masse spécifique foliaire généralement exprimée en g m^{-2}

MPa : MegaPascal

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP) est un coenzyme d'oxydoréduction, source principale d'électrons utilisés dans les réactions biosynthétiques dans la cellule.

NPP : Net Primary Prodiction, production primaire nette d'un ecosystème, flux exprimé en masse de carbone assimilé par unité de temps

PAR : Photosynthétic Active Radiation, soit un rayonnement dont les longueurs d'onde s'étendent de 400 à 700 nm, utilisé par le feuillage vert des plantes lors de la photosynthèse exprimé en µmol.

PCR : Polymerase Chain Reaction, est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN ou d'ARN connue.

PCRq ou qPCR : PCR quantitative, ou PCR en temps réel

PPFD : Photosynthétic Photon Flux Density, flux de photon (habituellement en µmol) du PAR par m^{-2} et s^{-1}

PLC : Percentage of Loss Conductivity i.e. Pourcentage de perte de conductivité

ppm : unité de concentration, partie par million

R^2 : Coefficient de détermination

SNP : Single Nucleotide Polymorphism : variation (polymorphisme) d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes environ une paire de bases sur mille dans le génome humain

SSR : Single Sequence Repeat, Les marqueurs SSR sont des répétitions de séquences nucléotidiques courtes usuellement inférieures ou égales à 6 bases de longueur, qui varient en nombre dans le genome.

UV : Ultraviolets

V_{cmax} : Vitesse maximale de carboxylation

VPD : Vapour Pressure Deficit, deficit de vapeur d'eau de l'air

WUEi : Efficacité d'utilisation de l'eau intrinséque (Intrinsic Water Use Efficiency), ratio de l'assimilation et de la conductance exprimée en µmol CO_2 mol H_2O

$WUEi_{max}$: Efficacité d'utilisation de l'eau intrinséque maximale, calculé par le ratio A_{max} /gs_{max}

I) Contexte général des changements climatiques

Le 21ème siècle verra le globe terrestre connaître des changements climatiques profonds de nature anthropique. Ces changements sont sans précédent dans l'histoire géologique de par leur vitesse et leur intensité, à tel point que notre époque est qualifiée par certains scientifiques d' « anthropocène » (Crutzen & Stoermer, 2000, Steffen et al., 2011) en raison de l'empreinte globale de l'Homme (Wolfe et al., 2013). Les trois principales variables décrites dans la littérature, qui vont entraîner ces modifications climatiques, sont (i) une augmentation de la température moyenne globale, (ii) une augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique, le CO_2 étant un contributeur majeur de l'effet de serre (Dunn et al., 2002) et (iii) une modification des régimes de précipitations.

Pour la température, il est prévu une augmentation de + 2 à + 4°C pour l'Europe (valeur moyenne, IPCC 2007) à l'horizon 2100. La concentration en CO_2, qui est de 397 ppm actuellement (valeur moyenne juillet 2013, source : site internet NOAA, cf. Figure 1), pourrait atteindre des valeurs de plus de 600 ppm en 2100. Cette valeur de concentration en CO_2 sera atteinte si rien n'est fait pour en diminuer les émissions majoritairement d'origine anthropique (scénario A1 « Business as usual », IPCC 2007). Les régimes de précipitations seront également largement affectés dans le futur par une intensification de la circulation hydrogéologique globale (Huntington 2006). Cette accélération du cycle de l'eau sera à l' origine d'une augmentation de l'évaporation au niveau océanique, en lien direct avec l'accroissement des températures moyennes constatées au cours du 20ème siècle (IPCC, 2007). On peut donc s'attendre à des changements rapides de précipitations en quantité (mm / annuels), dans le temps (i.e. répartition durant l'année), en variabilité (fréquence d'épisodes pluvieux) et enfin en sévérité (i.e. intensité : mm/jour).

Ces trois variables climatiques (hausse des températures, augmentation de la concentration en CO_2 et précipitations) entraîneront par conséquent des modifications de la répartition des climats tels que nous les connaissons (IPCC, 2007). Les conséquences de ces modifications climatiques en cours sont déjà sensibles et observables. Une manifestation visible du changement climatique en cours s'observe dès à présent dans les décalages de phénologie d'espèces forestières (Gunderson et al., 2002, Way et al., 2010, Richardson et al., 2013).

Pour les climats tempérés européens, l'effet du changement climatique sera visible à travers deux prismes : (i) l'expansion des zones arides par diminution des précipitations estivales sur le sud de l'Europe (de - 20% à - 40% en 2100, scénario A1B, IPCC, 2007: scénario mixte entre sources d'énergie fossile et renouvelables, cf. Giorgi & Lionello 2008), (ii) une augmentation de la fréquence de la répétition des épisodes de sécheresse, comme ceux qui ont récemment affectés l'Europe (été 2003 et 2006 : Fischer et al., 2007, Kyselý et al., 2010).

Pour le climat méditerranéen, il est attendu une augmentation de la durée des sécheresses estivales par exacerbation des caractéristiques climatiques régionales (cf. IPCC 2007, Sheffield & Wood, 2007). Ce qui se traduira par une augmentation des valeurs des maximums de températures estivales de 4°C en moyenne, accompagnée d'un déficit moyen de cumul de précipitations de 150 mm (IPCC 2007). Plus précisément, il est localement attendu une diminution de - 40% des cumuls moyens de précipitations pour la période 2071-2100 (Scénario A1B IPCC 2007).

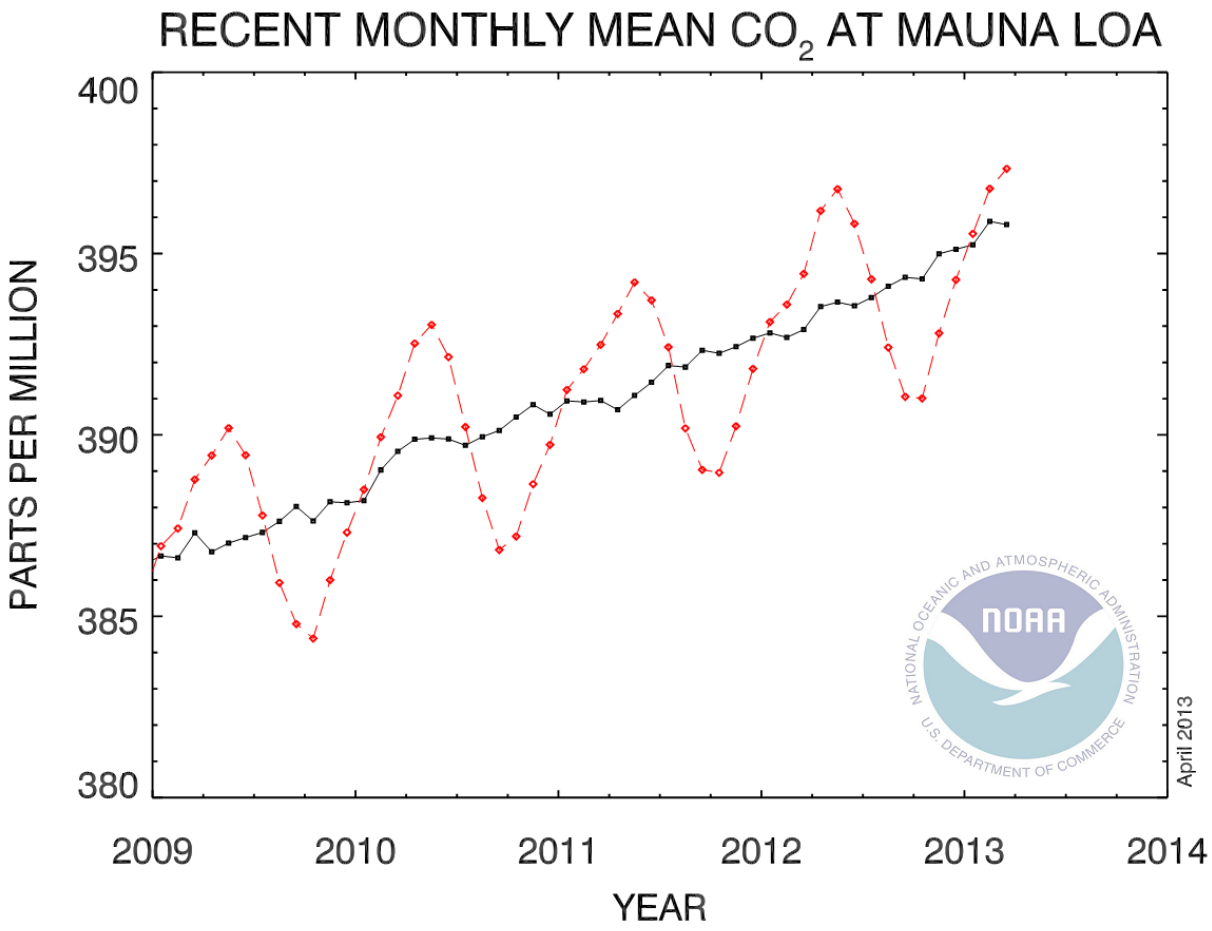
Le climat étant le principal déterminant de la végétation dans les grands biomes terrestres, le changement climatique entraîne *de facto,* une modification des régimes de contraintes (temporelles et spatiales) et donc de la végétation associée. Ces contraintes auxquelles doivent, et devront faire face, les organismes composant les écosystèmes terrestres représentent des défis adaptatifs sur une courte période temporelle (Hartmann et al., 2012). De plus les extrêmes climatiques sont appelés à augmenter concomitamment en intensité et en fréquence (Frich et al., 2002, IPCC 2007, Sterl et al., 2008, Briffa et al., 2009 cf. Figure 2). Décrire et prédire l'évolution des écosystèmes terrestres face aux modifications climatiques précédemment citées est l'un des enjeux les plus importants de notre époque (Thuiller et al. 2008).

Dans ce contexte préoccupant, et aux vues des stratégies proposées pour l'adaptation des écosystèmes au changement climatique (migration assistée par exemple), il apparaît plus que nécessaire d'entreprendre une caractérisation rigoureuse des conséquences de ces épisodes climatiques extrêmes sur les écosystèmes (Meehl et al., 2000, Meehl & Tebaldi 2004, Meehl et al., 2007, Leadley et al., 2010, Smith 2011). Les conséquences se posent de manière théorique en termes de vulnérabilité de l'écosystème, qui se définit par sa difficulté à faire face à une perturbation ou à un stress (White, 1974). Cette vulnérabilité de l'écosystème dépend de sa résistance (i.e. sa capacité à maintenir ses fonctions « essentielles » inchangées à la

perturbation ou au stress : Grimm et al., 1997). De plus, la résilience de l'écosystème, (i.e. sa capacité à retrouver son état initial après la perturbation ou le stress : Luers, 2005) est également à considérer dans la question de la vulnérabilité des écosystèmes. Par exemple, un écosystème peut être très résistant au stress, mais pas du tout résilient, et donc si le stress est trop fort ou trop long, il sera incapable de revenir à son état initial.

Enfin, les conséquences des changements climatiques sur l'écosystème se posent en termes d'adaptabilité via sa résilience/résistance et/ou celle de ses différents compartiments biologiques et/ou physiques, afin de maintenir les services écosystémiques associés (Millennium ecosystem assessment, 2005). Comprendre et caractériser les conséquences des changements climatiques futurs est d'autant plus crucial pour l'écosystème forestier qu'il est particulièrement sensible aux variations climatiques et que les services écosystèmiques associés à cet écosystème, ainsi que sa productivité est sévèrement limitée par des épisodes de sécheresse (Bréda et al., 2006).

Figure 1. Evolution de la concentration en CO_2 en ppm pour la période 2008-2013 mesure à la station de Mauna Loa (Hawaï, États-Unis). La courbe rouge représente la fraction molaire de CO_2 et la courbe noire les données corrigées en variations saisonnières.



I-a) Services écosystémiques des forêts : menaces liées au changement climatique.

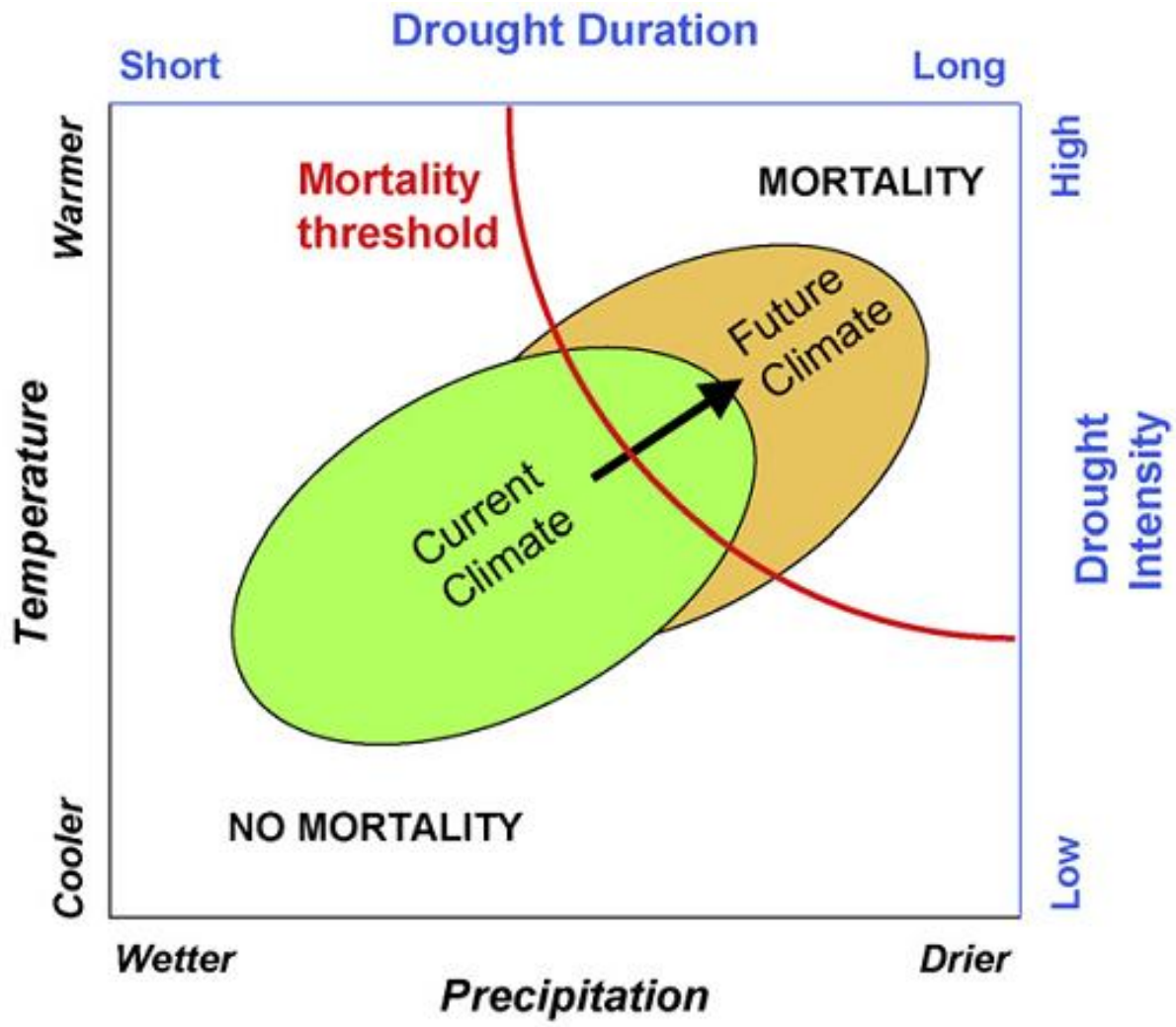
Les écosystèmes forestiers qui couvrent environ 30% de la surface terrestre (FAO, 2006), en incluant les savanes, sont en grande partie des abris et des réservoirs de biodiversité (Lumsden et al., 2005, Manning et al., 2006). Ils sont fournisseurs de services aussi bien marchands que non-marchands (Millennium ecosystem assessment, 2005). Les écosystèmes forestiers interviennent de manière non-négligeable dans le cycle global du carbone. En effet, la photosynthèse est le principal point de passage du CO_2 inorganique (i.e. minéral) vers le carbone organique qui constitue la biomasse végétale. Le flux de CO_2 qui passe ainsi dans le compartiment organique a été estimé à $1{,}48.10^9$ Tonne/an (maximum) sur des arbres âgés de 60 ans (Nilsson & Schopfhauser 1995). Ce CO_2 inorganique est intégré ainsi dans le cycle du vivant (Bonan 2008). De plus, les arbres contribuent au maintien et à la santé des sols ainsi qu'à la qualité des eaux des bassins versants (Neary et al., 2009). Si les facteurs abiotiques (tel que le climat) ont un impact sur le fonctionnement des écosystèmes, les espèces forestières peuvent également en rétroaction influencer les services écosystémiques. Une étude menée sur deux espèces forestières, et leurs hybrides F1[1] naturels respectifs (Fischer et al., 2004), a établi ce fait et a montré que la variabilité génétique des espèces arborées dominantes peut avoir une influence sur des processus écosystémiques comme la décomposition ou le cycle des nutriments.

Cependant, tous ces services rendus par les écosystèmes forestiers, (dans un fonctionnement « normal » de l'écosystème), sont menacés par des perturbations climatiques et notamment par des épisodes de sècheresse qui vont altérer le fonctionnement de ces écosystèmes. Une conséquence bien décrite de ces épisodes de sécheresse au niveau de l'écosystème est une baisse de productivité et de performance (Ciais et al., 2005, Bréda et al., 2006). Cette « inefficacité » est due à une fermeture stomatique pour maintenir l'état hydrique des plantes, ce qui induit une réduction de l'assimilation carbonée. À terme, la fermeture stomatique peut engendrer des risques de perte du service écosystèmique « puits de carbone » (Grant et al., 2006) et entraîner une mortalité individuelle ou massive des arbres (Hartmann et al., 2012). Ainsi, les dépérissements forestiers observés actuellement pourraient transformer les écosystèmes forestiers en « source » nette de CO_2 due à la respiration des arbres et du sol (exemple de la sécheresse de 2003 cf. Ciais et al., 2005).

[1] En génétique un hybride F1 est la première génération issue d'un croisement.

Enfin, les écosystèmes forestiers sont peu aptes à une résilience face à une contrainte environnementale rapide, car ils sont composés d'organismes ligneux à longue durée de vie, ce qui augmente leur temps de réponse.

Figure 2.1 : Diagramme conceptuel montrant l'évolution des paramètres environementaux : température et précipitation d'une part et évolution de l'intensité et des épisodes de sécheresse d'autre part . Dans le climat actuel, seule une partie de l'enveloppe des paramètres d'une espèce est soumise à des épisodes de mortalité (zone verte) alors que dans le climat futur cette proportion est beaucoup plus grande (zone orange) avec des risques de mortalité beaucoup plus élevés. Reproduit de Allen et al., 2009

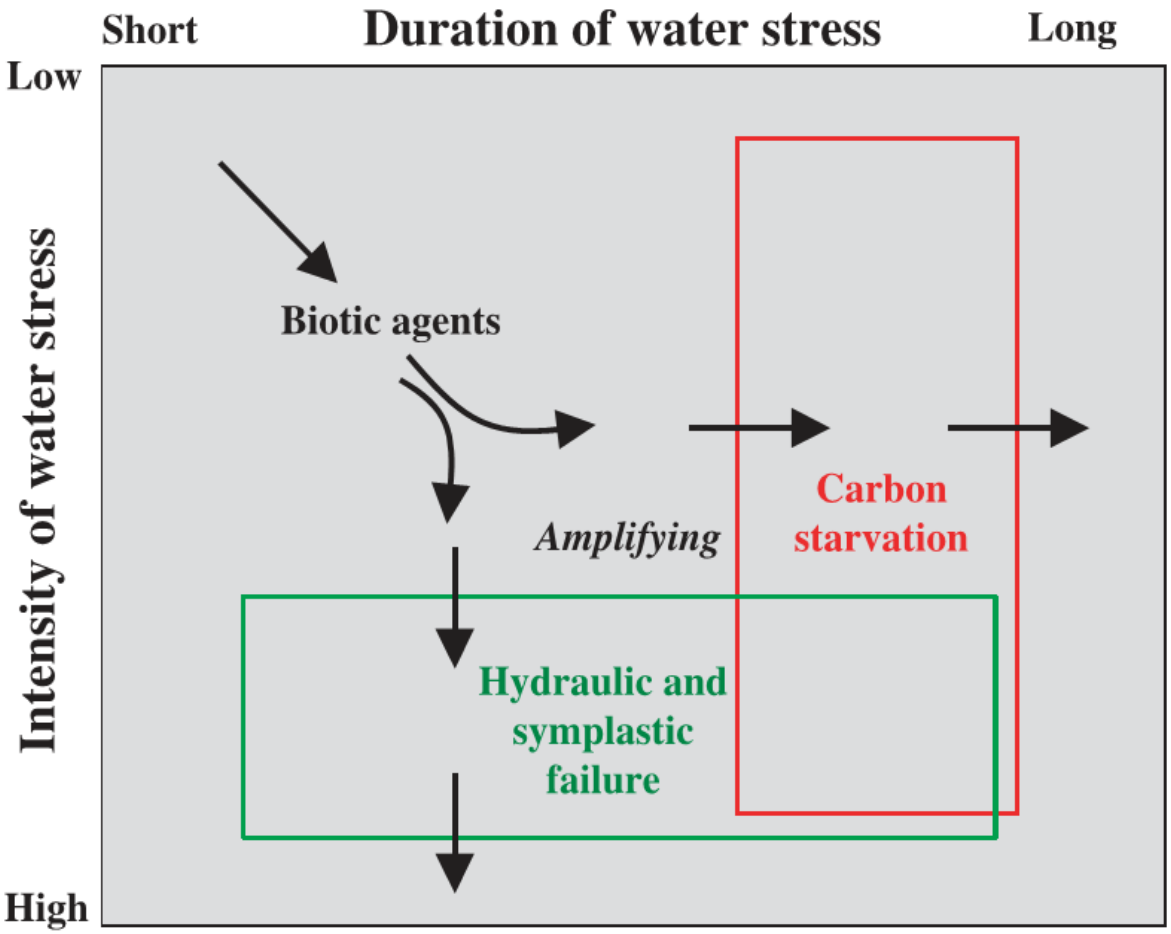


I-b) La ressource eau et les écosystèmes forestiers : conséquences de la limitation de cette ressource.

À l'échelle globale, la disponibilité en eau représente la principale limitation à la productivité primaire nette des écosystèmes forestiers (NPP) (Zhao & Running, 2010), cette limitation étant dominante ou co-dominante pour la majorité des biomes (Churkina & Running, 1998). L'eau des sols, accessible aux plantes terrestres, ne représentant que 0,27% de l'eau douce sur terre (Chapin et al., 2002). Du fait que ce compartiment (l'eau des sols) est en disponibilité limitée, et du grand besoin d'eau pour le fonctionnement des arbres, il en découle une vulnérabilité importante (i.e. risque de mortalité) des arbres à des épisodes de sécheresse, soit par famine carbonée soit par dysfonctionnement hydraulique (cf. Fig. 2.2).

La sécheresse est un phénomène météorologique et environnemental, défini comme une période sans précipitation, suffisamment longue pour que les réserves en eau du sol s'épuisent (Kramer 1980). Dans le concept de sécheresse, il convient cependant d'intégrer la typologie qui est un facteur très important à prendre en compte. Cette typologie d'épisodes de sécheresse peut être définie par deux principaux facteurs : l'intensité et la durée des événements de sécheresse (cf. Fig. 2.1). Ces deux facteurs vont déterminer quelles seront les réponses mises en œuvre par la plante et sa capacité de résilience que nous détaillerons dans le paragraphe I-c).

Figure 2.2 : Diagramme théorique basé sur les relations entre intensité de la contrainte hydrique (intensity of water stress) et la durée temporelle d'une contrainte hydrique (duration of water stress). La famine carbonée intervient quand la durée de la contrainte hydrique est suffisante pour réduire la photosynthèse suffisamment longtemps pour épuiser le stock de carbone pour la maintenant d'un métabolisme de base. De l'autre coté la défaillance hydraulique se manifeste si l'intensité de la contrainte hydrique est suffisante pour dépasser un seuil de dessiccation critique de la plante, avant que la famine carbonée ne se manifeste. Les agents biotiques, comme les insectes ou les pathogènes fongiques peuvent amplifier et/ou être amplifiés à la fois part la famine carboné et/ou le dysfonctionnement hydraulique. Reproduit de McDowell et al., 2008.



Plusieurs études et échelles allant de l'écosystème à l'individu ont été considérées pour évaluer les impacts des sécheresses sur les écosystèmes forestiers (Allen et al., 2009). Nous allons voir trois niveaux d'organisation décroissants pour lesquels les effets d'épisodes de sécheresse sur les écosystèmes forestiers ont été étudiés.

(i) À l'échelle du fonctionnement de la communauté et des écosystèmes, des expériences de manipulation de précipitations ont été menées (cf. par exemple des expériences menées en forêts méditerranéennes de chênes verts (*Quercus ilex*, L.) (Limousin et al., 2009, Misson et al., 2010). Cependant, la réponse à la contrainte hydrique observée en parcelles expérimentales dans un intervalle de temps limité, est parfois difficile à extrapoler à plus large échelle spatiale et temporelle. En effet les changements climatiques futurs et leurs interactions peuvent avoir des effets contradictoires sur les réponses de la végétation. Par exemple, l'augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique peut limiter les effets négatifs de la sécheresse en augmentant l'efficacité de l'utilisation d'eau.

(ii) À l'échelle de la population, plusieurs travaux ont souligné les effets d'épisodes de sécheresse, tel celui qu'a connu l'Europe en 2003 (Ciais et al., 2005, Bréda et al., 2006). Les mécanismes de réponse des arbres à la sécheresse demeurent cependant dans une large mesure imprévisibles à cette échelle (population), car lors d'un épisode de sécheresse, certains individus succombent alors que d'autres survivent pour un même niveau de contrainte hydrique et dans des conditions pédoclimatiques identiques (cf. McDowell et al., 2008). Ce résultat peut être expliqué par la composition génétique variable des individus composant les grandes aires de répartition des espèces forestières considérées (Hampe et al., 2005).

(iii) Enfin à l'échelle individuelle, des études entreprises sur des hybrides de peuplier (*Populus sp.*) montrent qu'il n'existe pas une réponse commune à tous les individus, mais plutôt une mosaïque de réponses (Wilkins et al., 2009). D'autres travaux interdisciplinaires, à cette même échelle individuelle, mais ayant pour objet d'étude des individus clonaux de peupliers, montrent que les effets de la sécheresse peuvent être réversibles (Bogeat-Triboulot et al., 2006). Il est également possible qu'ils dépendent de traits d'histoire de vie des clones testés (i.e. si les individus considérés ont connu des épisodes limitant en termes de disponibilité en eau (Raj et al., 2011).

Concernant la diversité des espèces forestières ayant à ce jour fait l'objet d'une étude face à une contrainte hydrique, les arbres modèles souvent étudiés sont le Pin (*Pinus sp*.) (Irvine et al., 1998, Thabeet et al., 2009, Thiel et al., 2012), le peuplier (*Populus sp.*) (Bogeat-Triboulot et al., 2006, Wilkins et al., 2009, Raj et al., 2011), le chêne (*Quercus sp*.) (Cavender-Bares & Bazzaz 2000) et le hêtre (*Fagus sp*.) (Herbette et al., 2010, Woertemann et al., 2011, Pluess et al., 2012).

De manière plus générale à l'échelle macroscopique, les effets de la sécheresse sur les plantes sont plutôt bien décrits car ils s'accompagnent de manifestations observables et quantifiables (diminution de la conductance stomatique, flétrissement des feuilles, etc…). Mais les mécanismes intrinsèques restent mal connus à une l'échelle plus fine (organe, cellules…), car ils mettent en œuvre de multiples voies métaboliques qui peuvent être antagonistes (Yordanov et al., 2000, Chaves 2002, Chaves et al., 2003, Rizhsky et al., 2004).

Dans ce contexte les espèces qui présentent une plasticité phénotypique importante et une forte variabilité génotypique devraient avoir des réponses variables à un même niveau de stress hydrique (Newton et al., 1991, Osakabe et al., 2011) et donc ces espèces présentant une forte variabilité phénotypique, devraient susciter un intérêt renouvelé. Cet intérêt résiderait dans l'existence de phénotypes résistants à une contrainte hydrique ou dans la possibilité d'une sélection variétale de provenance plus tolérante/résistante à la contrainte hydrique**.**

I-c) Stratégies des arbres forestiers à l'échelle individuelle en réponse à une contrainte hydrique :

À l'échelle individuelle, les organismes végétaux supérieurs ont un compromis permanant à réaliser entre (i) le risque de dessèchement en maintenant un certain niveau de transpiration malgré le déficit hydrique et (ii) le risque de pénurie en assimilats carbonés lorsque les stomates sont fermés pour diminuer les pertes en eau (Cowan & Farquhar, 1977). De manière triviale, on peut résumer ce dilemme crucial pour l'arbre, devant à chaque pas de temps faire un choix entre une stratégie de tolérance à la contrainte hydrique (« mourir de faim ») ou une stratégie d'évitement de cette contrainte (« mourir de soif ») (cf. Encadré 1).

Encadré 1 : Réponse des arbres forestiers à la sécheresse à l'échelle individuelle.

Étant donné que les flux d'eau dans les arbres sont principalement régulés par la fermeture stomatique, les arbres forestiers peuvent adopter deux principales stratégies pour répondre à un événement de sécheresse.

- **Tolérer** (Ouverture stomates) **:** Maintien des fonctions physiologiques et de la croissance, cellules moins sensibles à la déshydratation (osmorégulation).

  Risque ➔ Demande évaporatoire trop forte au niveau des feuilles ➔ Rupture de la colonne d'eau et embolie des vaisseaux de xylème ➔ Dysfonctionnement hydraulique, soit « Mourir de soif »

- **Éviter** (Fermeture stomates) : Limiter les pertes en eau, (fermeture des stomates, …) et/ou augmenter les entrées d'eau (surface racinaire et augmentation absorption), enracinement plus profond.

  Risque ➔ Arrêt apprivoisement en carbone➔ Famine carbonée, soit « Mourir de faim »

La famine carbonée ou le dysfonctionnement hydraulique peuvent avoir des dynamiques spatiales et temporelles très différentes en fonction de la durée et de l'intensité de la contrainte hydrique comme détaillé au § I-a) (cf. aussi Figure 2.2). En cas de contrainte hydrique sévère (forte intensité et durée courte), l'approvisionnement en eau par les racines s'épuise, la tension de la colonne de sève augmente, les tissus de transport de la sève brute (xylème chez les Angiospermes) peuvent perdre leurs propriétés mécaniques en se remplissant partiellement d'air et l'arbre risque le desséchement par embolie, c'est-à-dire que ses « réserves » en eau se sont épuisées plus vite que ses réserves en carbone (Tyree & Sperry, 1988, Tyree et al., 1994). L'arbre souffre alors de la sécheresse à cause d'une défaillance hydraulique (Fig. 2.2). Cette défaillance peut avoir quatre origines selon le type d'entrée d'air dans les vaisseaux de xylème (Tyree et al., 1994) : (i) entrée d'air par un pore au niveau de la paroi du vaisseau de xylème, (ii) néoformation d'une bulle d'air dans les vaisseaux de xylème, (iii) entrée par un déchirement hydrophobe au niveau de la paroi des vaisseaux de xylème et enfin (iv) adhésion d'une bulle d'air sur les parois des vaisseaux. À titre d'exemple, une étude récente estime que plus de 70% des arbres (Gymnospermes et Angiospermes) sont menacés de dysfonctionnement hydraulique de part une insuffisante marge de sécurité hydraulique[2] (Choat et al., 2012).

En cas de contrainte hydrique prolongée (intensité faible mais durée longue), la réduction de l'assimilation carbonée, provoquée par la régulation stomatique de la transpiration, peut conduire à une réduction de formation d'assimilats carbonés (glucose) de l'arbre. Alors que dans le même temps la consommation de ressources par le métabolisme est maintenue, via par éventuellement la fermentation pour maintenir un métabolisme de base (Bossel 1986, Martínez-Vilalta et al., 2002) provoquant *in fine* un épuisement carboné.

Ces deux altérations du fonctionnement de l'arbre en réponse à une contrainte hydrique, agissant à la fois de manière conjointe ou non, en fonction de la dynamique de la contrainte, (pour le détail métabolique voir Fig. 3 et Pinheiro & Chaves 2010) sont la cause probable des dépérissements forestiers et des événements de mortalité constatés actuellement (cf. Allen et al., 2009 et Figure 2.2). De plus ces dépérissements sont susceptibles d'être amplifiés par des

[2] Définie comme la différence entre le potentiel minimum atteint dans une plante, et un point de référence sur la courbe de vulnérabilité hydraulique de la plante considérée (e.g. P_{50} : pourcentage pour lequel 50% des vaisseaux de xylème sont cavités).

agents biotiques comme les insectes ou les pathogènes (Bréda et al., 2006, McDowell et al., 2008, Figure 2.2).

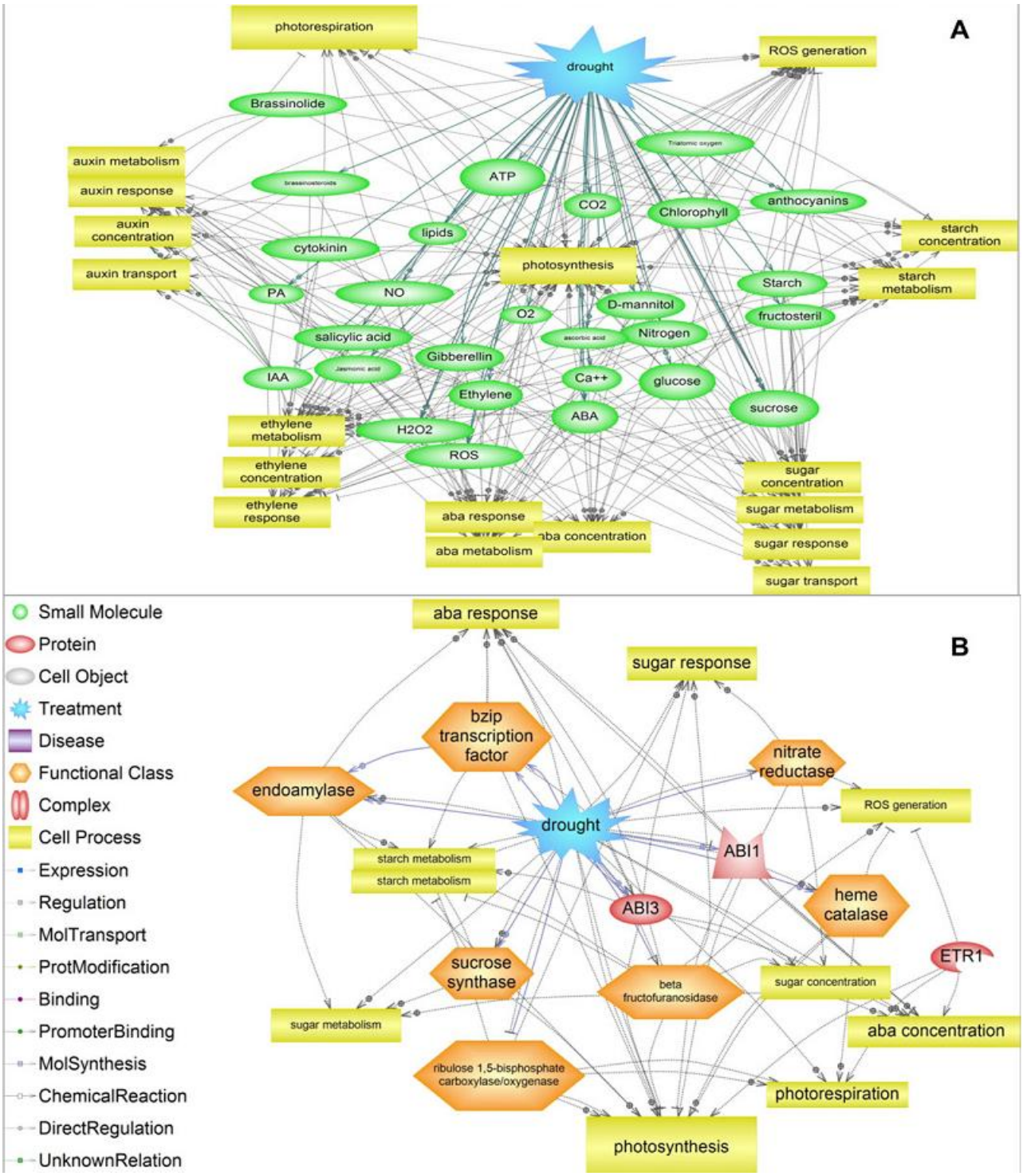
Enfin, ces risques sont d'autant plus accrus qu'ils peuvent engendrer une mortalité soudaine de l'organisme ou également passer inaperçus pendant plusieurs années avant de se manifester (e.g. Galiano et al., 2011 sur le Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.).

Outre la régulation de l'ouverture stomatique, qui constitue un moyen de régulation dynamique, réversible et rapide pour éviter la déshydratation à court terme (5 à 30 min selon le type fonctionnel de plante, Vico et al., 2011), une acclimatation physiologique peut se produire sur un pas de temps plus long (e.g. baisse de la sensibilté des stomates au déficit hydrique). La défaillance hydraulique en cas de contrainte hydrique sévère peut être évitée par une meilleure résistance à l'entrée d'air dans les tissus de transport de la sève.

D'autres ajustements physiologiques peuvent être, par exemple, une diminution de la surface foliaire ou une augmentation de la surface d'absorption racinaire (Sperry et al., 2002). L'épuisement carboné peut être évité par différents moyens. Par exemple, par une augmentation de l'efficience d'utilisation de l'eau (*WUEi*[3]), ou un décalage phénologique. Ces ajustements physiologiques permettent également un certain évitement de la période de contrainte hydrique et une permutation de l'allocation du carbone entre différents processus (croissance, reproduction, stockage).

[3] Ratio de l'assimilation carbonée sur la conductance stomatique

Figure 3 : Reseau bioloigique des cascades de reponses à la contrainte hydrique (*drought* en bleu). A) Schéma de connectivité du reseau de reponse à une contrainte hydrique avec les petites molecules. B) Schéma de connectivité avec les gènes et/ou protéines. Reproduit de (Pinherio & Chaves 2010).



À ces stratégies physiologiques rapidement mises en œuvre par les arbres pour faire face à des épisodes de sécheresse, qui se déploient sur une durée maximale de l'ordre de la durée de vie de l'organisme (i.e. acclimatation ou plasticité phénotypique), des stratégies évolutives sur un pas de temps plus long peuvent être mises en œuvre. Celles-ci sont la migration et l'adaptation (cf. Encadré 2). Elles peuvent également permettre un évitement de la contrainte environementale avec comme finalité une adaptation aux nouvelles contraintes imposés (Ghalambor et al., 2007, Kleunen van et al., 2007, Benito-Garzón et al., 2011). Cependant ces stratégies évolutives ne se révèleront pas nécessairement assez rapides compte tenu de la vitesse du changement attendu (Hartmann 2012, Zhu et al., 2012). Ces deux stratégies évolutives (migration et adaptation) sont clairement des illustrations de ce décalage entre la vitesse attendue de la contrainte hydrique et la mise en place de la réponse adaptative qui permettrait à l'organisme de survivre (Petit et al., 2006, Zhu et al., 2012).

De même, la survie des graines produites par les arbres sera probablement affectée par le changement climatique (e.g. : Mendoza et al., 2009). La plasticité phénotypique, elle est souvent un moyen privilegié, pour atténuer les effets du changement climatique mis en avant (Chevin et al., 2010, Matesanz et al., 2010). Des expériences chez le cèdre (*Cedrus sp.* Trew) ont prouvé qu'elle pouvait être mise en œuvre dans un temps court (Fallour-Rubio et al., 2009). Par ailleurs une autre étude, sur l'acclimatation du chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Leibl) et du hêtre (*Fagus sylvatica* L.) à la température (translocation en altitude), a montré une acclimatation à l'altitude de 6 degrés/jour sur des plants de 2 ans (Vitasse et al., 2010). Ces trois exemples isolés (cèdre, chêne et hêtre) ne suffisent cependant pas à une généralisation de ce qui peut être considéré comme un « effet Baldwin[4] » chez ces espèces d'arbres forestiers.

D'autres auteurs estiment *a contrario* que la plasticité phénotypique ne sera pas, à elle seule, suffisante, car elle est souvent non-maximisée et contrainte dans son expression par de multiples facteurs (liste non-exhaustive : coût génétique, allocation de ressource à la plasticité à un temps t, historique de plasticité déjà exprimé, décalage signal environnemental/réponse, contraintes développementales…cf. Valladares et al., 2007). Enfin, les facteurs

[4] L'effet Baldwin, du nom du professeur de psychologie Américain James Mark Baldwin (1861–1934), est un processus séquentiel dans lequel la plasticité phénotypique environnementale sert de relais à l'évolution adaptative (i.e. caractères génétiques transmissibles, Yeh & Price 2004, Crispo et al., 2007).

environnementaux qui sont contraignants pour les arbres forestiers sont souvent associés entre eux (e.g. lumière et températures élevées) et compliquent de ce fait les mesures d'expression de cette plasticité phénotypique.

Pour conclure au sujet de la plasticité phénotypique, les travaux menés renforcent l'importance de la prise en compte de la diversité génétique, dans les possibilités de réponses des espèces forestières au changement climatique. En effet cette diversité génétique pourrait se révéler être une « assurance » contre des dépérissements forestiers catastrophiques (Heschel & Paige 1995, Bijlsma & Loeschcke 2012).

I-d) Les événements d'hybridation et leurs implications dans un contexte de changement climatique.

L'hybridation interspécifique homoploïde[5] peut avoir plusieurs conséquences, incluant une augmentation de la diversité génétique, l'apparition ou le transfert d'adaptations génétiques, l'apparition de nouveaux écotypes (et espèces voir Fig. 4. ci-dessous) et le renforcement ou la rupture des barrières d'isolement reproducteur (i.e. dédifférenciation d'espèces) (Rieseberg 1997). Les zones hybrides sont des opportunités pour étudier les processus de divergences entre lignées aboutissant à la spéciation (Hewitt G.M., 1988, Harrison 1990). Ces zones hybrides peuvent donc être vues comme de véritables laboratoires d'un point de vue évolutif (Barton & Hewitt, 1985, 1989). La plupart des espèces forestières économiquement importantes connaissent, ou ont connu des événements d'hybridation au cours de leur histoire biologique, comme l'épicéa (*Picea sp.*) (Krutovskii et al., 1995), le pin (*Pinus sp.*) (Dungey 2001), le peuplier (*Populus sp.*) (Hamzeh et al., 2007, Lexer et al., 2007), le chêne (*Quercus sp.*) (De Dios et al., 2006, Burgarella et al., 2007) et le frêne (*Fraxinus sp.*) (Gérard et al., 2006, Fernandez-Manjarrés et al., 2006, Gérard et al., 2012).

[5] Hybridation par croisement de deux espèces sans augmentation du nombre de chromosomes, au contraire de l'hybridation polyploïde.

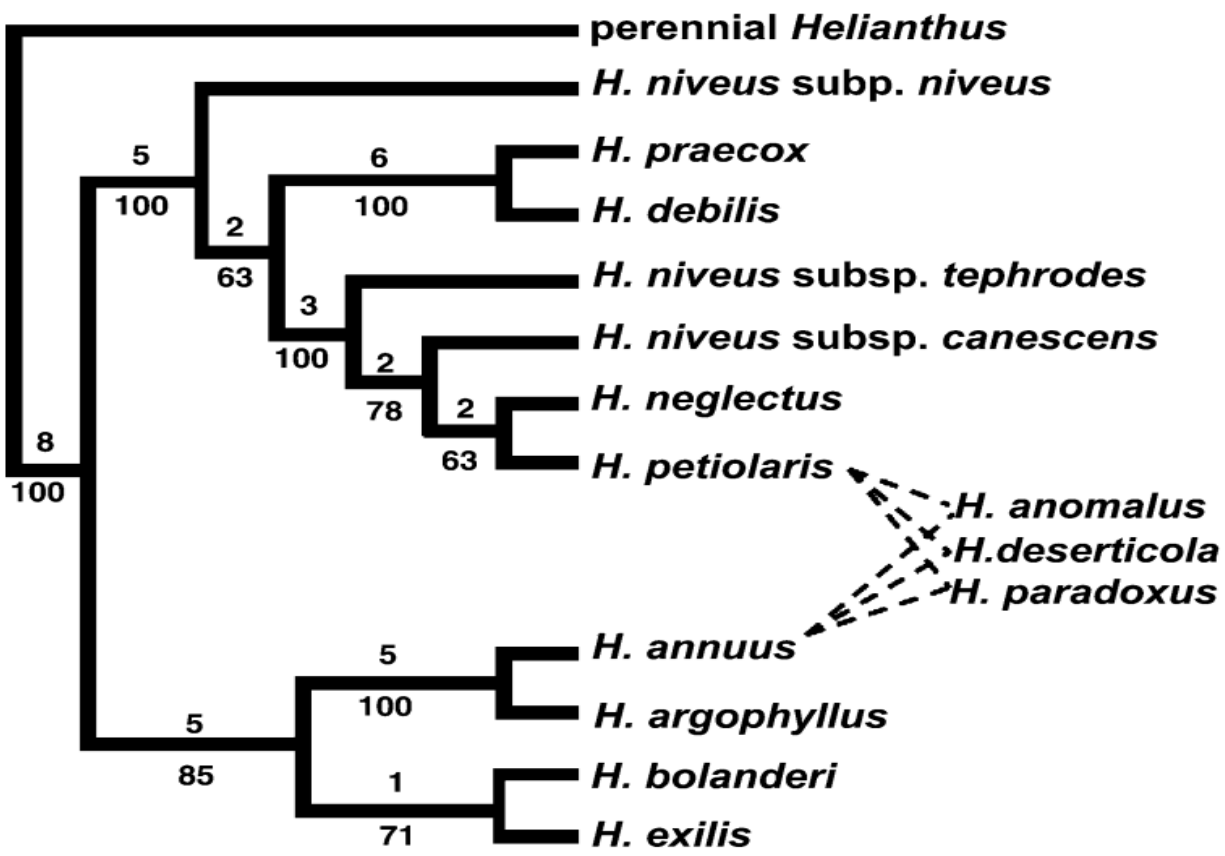


Figure 4. Exemple d'arbre phylogénétique de la section *Helianthus sp.* (genre du Tournesol) basé sur des données ADN chloroplastiques et nucléaires. Les chiffres au-dessus des branches représentent le nombre de mutations, le pourcentage de bootstrap (robustesse de la branche) est indiqué sous la branche. Les lignes en pointillées représente une spéciation homoploïde d'origine hybride (i.e. apparition d'une nouvelle espèce sans duplication du génome par hybridation de deux espèces). Reproduit de Gross & Rieseberg (2005) basé sur les données de Rieseberg (1991).

Ces événements périodiques ou récurrents d'introgression (cf. Encadré 2), peuvent fournir de nouveaux allèles et sont un facteur déterminant d'adaptation à de nouvelles conditions (Morjan & Rieseberg 2004). Cette introgression progressive peut avoir comme conséquence l'obtention d'individus ayant des phénotypes (cf. Encadré 2) plus étendus que ceux des espèces parentales, dus à des effets alléliques complémentaires (Lexer et al., 2004).

Encadré 2 : Définition des concepts utilisés.

Adaptation (Reeve HK et Shermann 1993) : Désigne à la fois un processus et sa finalité, nous définirons ici le processus, qui est la modification d'un caractère anatomique, d'un processus physiologique dans une population d'individus sous l'effet de la sélection. Le nouvel état de ce caractère améliorant la survie et le succès reproductif des individus qui en sont porteurs, il est nécessaire que ces modifications soient héritables.

Adaptation locale (William 1966) : Ici le sens d'adaptation sera la finalité du concept : l'adaptation locale inclut tous les changements génotypiques (et phénotypiques associés) résultant d'une sélection équilibrante en réponse à des pressions environnementales.

Acclimatation (Rickleffs 1990) : L'acclimatation est le fait, pour un organisme vivant, de répondre à un nouvel environnement. L'acclimatation se déroule sur une période au plus égale à la durée de vie de l'organisme (de quelques secondes à quelques jours, voire années pour les arbres), ce qui la différencie de l'adaptation.

Génotype (Johannsen 1911) : composition génétique d'un individu. Le génotype d'un individu est la composition allélique de tous les gènes d'un individu.

Migration (Henry & Gouyon 2003) : Passage d'individus d'une population à une autre, peut également être vue au niveau des gamètes et des gènes.

Phénotype (Johannsen 1911) : Le phénotype est l'état d'un caractère observable (caractère anatomique, morphologique, moléculaire, physiologique) chez un organisme vivant.

Plasticité phénotypique (Schmalhausen 1949) : La capacité d'un génotype donné d'exprimer différents phénotypes en fonction des conditions environnementales. En écophysiologie on parle également d'acclimatation (nécessite une contrainte).

Sélection (Darwin 1859) : La survie et la reproduction différentielles des phénotypes, notamment en fonction des effets environnementaux, se traduisant par l'accroissement de la fréquence des génotypes dans la population correspondant aux phénotypes sélectionnés.

Introgression (Rieseberg et al. 2000) : La propagation de gènes d'une espèce A dans le génome d'une espèce B par hybridation et backcrossing (reproduction avec ses parents).

Voire même des individus ayant des phénotypes extrêmes qui surpassent ceux des deux parents dont l'hybride provient, on parle alors de «ségrégation transgressive»[6] voir Figure 5 (Rieseberg 1999, Rieseberg et al., 2003).

Cette possibilité d'introgression interspécifique peut offrir une voie évolutive alternative et plus rapide que la spéciation allopatrique[7] (Ungerer et al., 1998), pour faire face à de nouveaux environnements, comme cela a été démontré dans une étude chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.) (Lexer et al., 2004). L'hybridation s'est également produite entre plusieurs espèces et sur de faibles échelles spatiales (i.e. île), ce qui était considéré comme très rare théoriquement (Papadopulos et al., 2013).

Les zones hybrides naturelles offrent également de formidables opportunités pour conduire des études d'expression différentielle, et peuvent permettre d'identifier des gènes et des loci à effets quantitatifs (Quantitative Trait Locus : QTL), impliqués dans les processus d'adaptation aux environnements nouveaux (Lexer et al., 2004). Les processus d'hybridation revêtent donc une importance accrue dans une perspective de changement climatique. Il est par conséquent intéressant d'étudier les réponses d'individus ou de populations hybrides d'espèces forestières face à un épisode de sécheresse. Néanmoins, de manière générale, la génération d'individus hybrides présente certains « faiblesses », car ils peuvent être associés à des valeurs sélectives (ou fitness) moindres. Ces individus hybrides peuvent ainsi voir leur viabilité et leur fertilité réduite par rapport aux individus parents dont ils sont issus (Rieseberg & Willis 2007), étant ainsi contre-sélectionnés dans leur milieu naturel, et donc conduisant certains auteurs à considérer l'hybridation, en tant que processus, comme une « voie sans issue évolutive » (Mayr, 1942, Barton 1979b, Arnold 1997, Seehausen 2004, Hey et al., 2005).

[6] Ségrégation transgressive : Phénomène spécifique à la ségrégation d'hybrides dans lesquels certains individus hybrides ont des valeurs phénotypiques qui excèdent les valeurs parentales, à la fois de manière positive ou négative

[7] Selon ce mode de spéciation, des populations initialement interfécondes évoluent en espèces distinctes car elles sont isolées géographiquement.

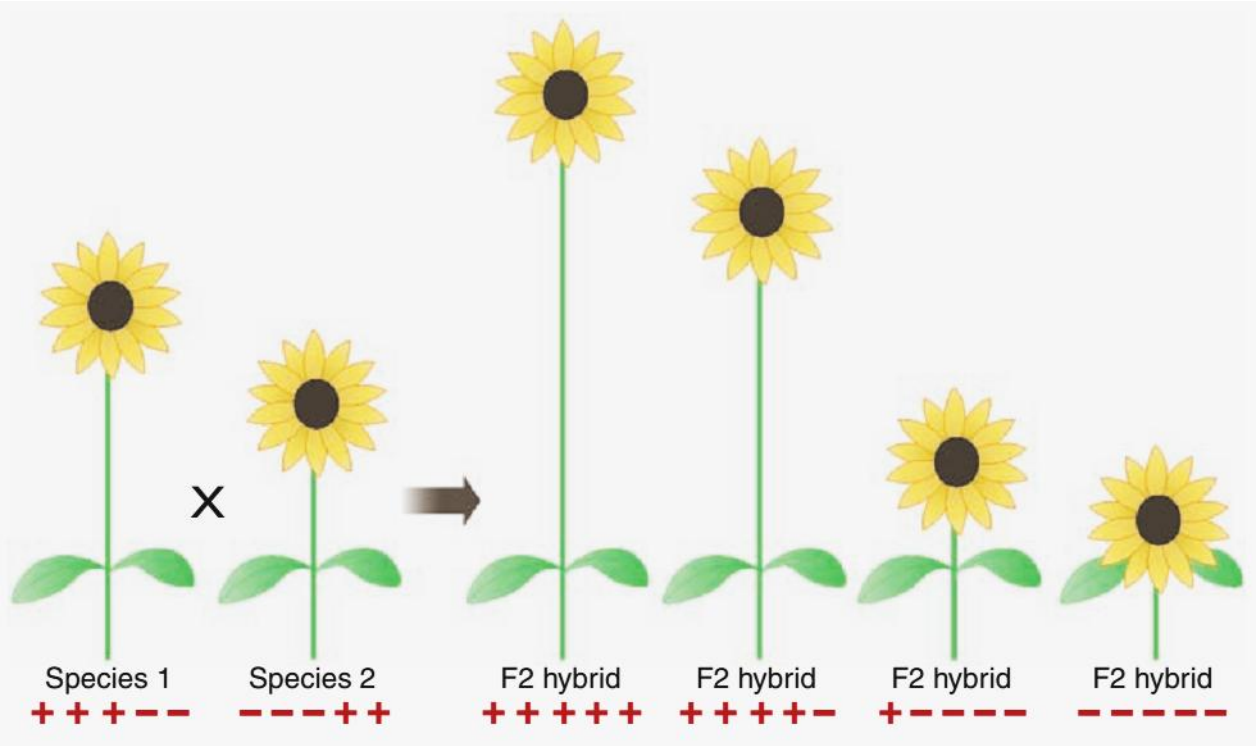


Figure 5 : Exemple de ségrégation transgressive de caractères génétiques (ici un exemple sur 5 locus à 2 allèles « + » et « - » codant pour la taille de la tige des Tournesols *Helianthus annuus*, L.). Reproduit de Rieseberg & Willis 2007. Les hybrides peuvent montrer des phénotypes extrêmes « +++++ » et « - - - - - » qui peuvent être avantageux dans certains types d'environnements.

II) Problématique de notre étude

II-a) Introduction du modèle d'étude : le complexe d'espèces frêne : *F.excelsior*, *F.angustifolia* et hybrides.

Le frêne (*Fraxinus sp*.) appartient à la famille des Oléacées, qui comprend 615 espèces réparties en 24 genres (Classification APG III, Angiosperm Phyllogeny website : http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/ consulté le 26/10/12), dans laquelle figure par exemple le troène (*Ligustrum vulgareae* L.) et l'olivier (*Olea europa* L.). Le frêne, au sein de cette famille, appartient au genre *Fraxinus* qui comprend 43 espèces décrites à ce jour, réparties de manière ubiquiste autour du globe (Wallander et al., 2008, Arca et al., 2012). La monophylie[8] du genre a été démontrée (Wallander & Albert, 2000). Cependant, on rencontre le genre *Fraxinus* principalement dans l'hémisphère nord du globe terrestre, restreint plutôt aux climats tempérés (Wallander et al., 2008, Dobrowolska et al., 2011).

À l'échelle européenne, deux espèces sont principalement rencontrées : le frêne commun ou frêne élevé (*Fraxinus excelsior* L.), qui est classé parmi les feuillus précieux (Picard 1982, Bessières 1992) et est réparti principalement au-dessus du 42ème parallèle de latitude Nord (Wardle 1961, Fernandez-Manjarrés et al., 2006, Gérard et al., 2012). La deuxième espèce de frêne rencontrée en Europe est le frêne à feuilles étroites ou oxyphylle, parfois qualifié de méditerranéen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) (Rameau et al., 1989). Cette espèce est distribuée le long d'un gradient européen Est-Ouest autour du bassin méditerranéen (Gérard et al., 2012), du Portugal jusqu'à l'est de la mer Noire (Heuertz et al., 2004, FRAXIGEN 2005, Gérard et al., 2012, Temunović et al., 2012). On rencontre fréquemment *Fraxinus angustifolia* en Espagne et en Italie (FRAXIGEN 2005, Gérard et al., 2012), jusqu'en Grèce (Papi et al., 2012) et en Croatie (Temunović et al., 2012).

Au niveau écologique, le frêne commun (*F.excelsior*) est une espèce ayant une préférence pour des habitats de type héliophile à demi-ombre, et est qualifié de mésophile[9] à mésohygrophile[10]

[8] Pour les cladistes, le terme de monophylie désigne tous les descendants de l'ancêtre commun (Hennig 1966). Un groupe monophylétique est donc un clade. Il s'oppose aux groupes paraphylétiques et polyphylétiques.

[9] Se dit d'une espèce adapté à des conditions moyennes d'humidité.

[10] Une espèce mésohygrophile est une espèce qui a besoin de grandes quantités d'eau pendant une bonne partie de son développement.

(Rameau et al., 1989). Son expansion dans les successions écologiques, en France, est attribuée à sa capacité à contrôler son contenu en eau, et aux épisodes de perturbations anthropiques ayant favorisé l'extension de son aire de répartition (Marigo et al., 2000, Marie-Pierre et al., 2006). Le frêne commun fut utilisé traditionnellement pour de multiples usages : bois, fourrage pour bétail, médecine traditionnelle, etc… (Marie-Pierre et al., 2006, Mottet et al., 2007) mais n'est plus exploité de nos jours que pour son bois (Classens 2002). De nombreux travaux attestent de la résistance au stress hydrique chez le frêne commun. D'une part à l'échelle individuelle avec la mise en évidence de potentiels hydriques très faibles, de l'ordre de -4 MPa, sans signe visible de flétrissement des feuilles (Besnard et al., 1990, Carlier et al., 1992) et d'autre part au niveau métabolique avec une accumulation, dans les vaisseaux de xylème, d'acide malique et de mannitol (Marigo & Peltier 1996, Guicherd et al., 1997, Stöhr & Lösch 2004) qui interviendraient comme messagers dans la régulation stomatique. Par ailleurs, les jeunes plants de frênes communs sont considérés comme des « pionniers écologiques » avec une croissance très rapide dans les jeunes stades (Hölscher 2004). Cette croissance rapide a été mesurée sur des parcelles agroforestières, et peut atteindre 80 cm par an au cours des 10 premières années (Balandier & Dupraz 1999).

Le frêne oxyphylle ou méditerranéen (*F.angustifolia* Vahl) est quant à lui écologiquement réparti dans des habitats de type thermophile et héliophile. Il est également qualifié de mésophile[1] à mésohygrophile[2] (Rameau et al., 1989). Le frêne méditerranéen a fait l'objet d'une attention moindre par rapport au frêne commun, du fait de son plus faible intérêt économique. Relativement peu de preuves de tolérance au stress hydrique sont rapportées dans la littérature pour le frêne méditerranéen. De manière anecdotique une étude cependant recommande un cultivar de *F.angustifolia* (*Raywood*) pour les plantations d'arbres en milieu urbain du fait de sa tolérance à la sécheresse (Percival et al., 2006). Ses préférences d'habitats écologiques sont les forêts de ripisylve, où il est plutôt considéré comme résistant aux épisodes de crues (Fernandez-Manjarrés et al., 2006, Jaeger et al., 2009).

On rencontre les deux espèces *F.excelsior* et *F.angustifolia* dans une très grande variété d'habitats, allant des plaines alluviales jusqu'aux flancs de montagnes (Rameau et al., 1989, Marigo et al., 2000, Jaeger et al., 2009). Toutes les deux présentent une grande tolérance vis à vis des conditions pédologiques (pH et disponibilité en eau, cf. Figure 6-1 et 6-2, ci-dessous).

Figure 6-1. Conditions pédologiques dans lesquelles sont rencontrées le frêne commun *F.excelsior* . Reproduit d'après la flore forestière française Tome 1 . Rameau et al., 1989.

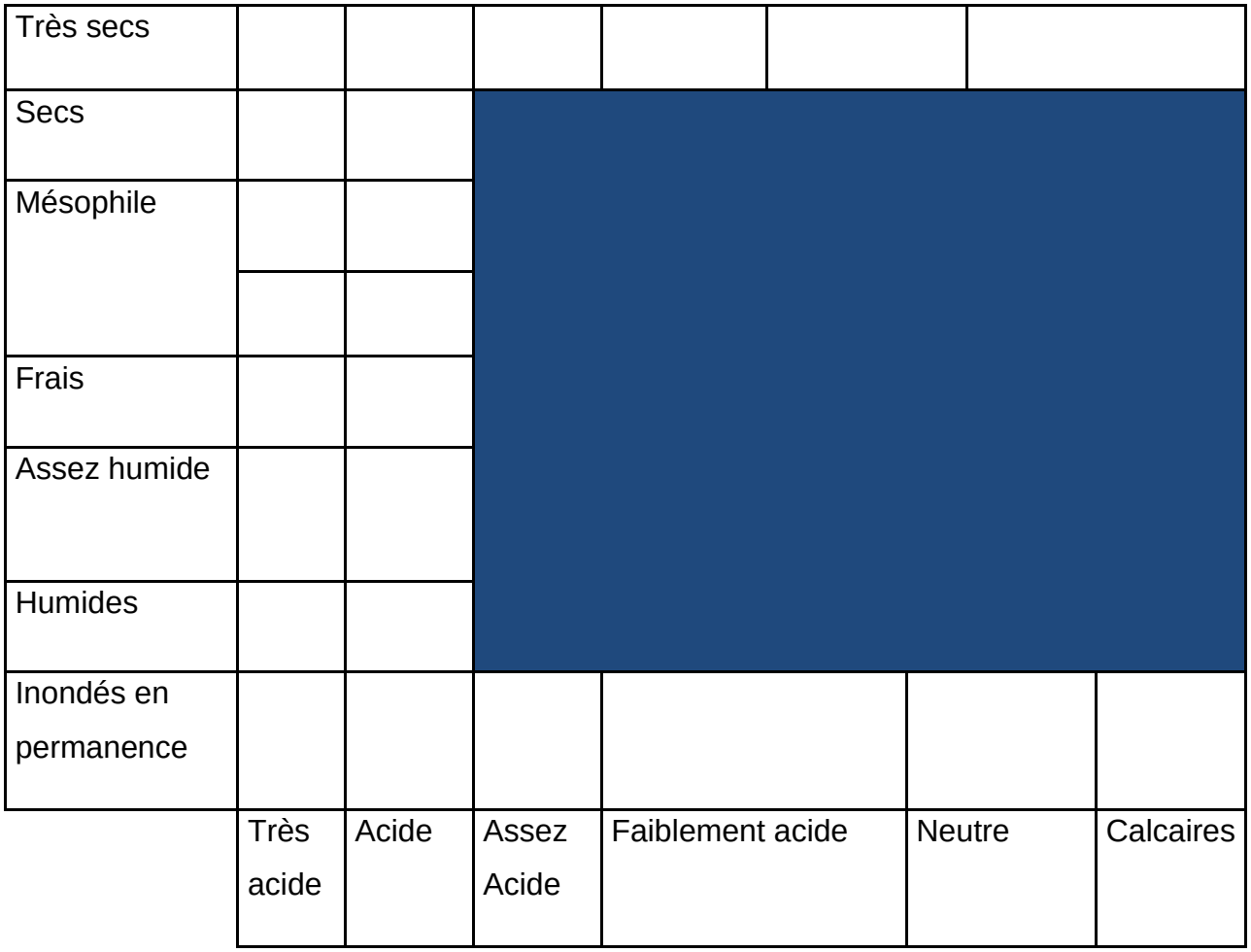
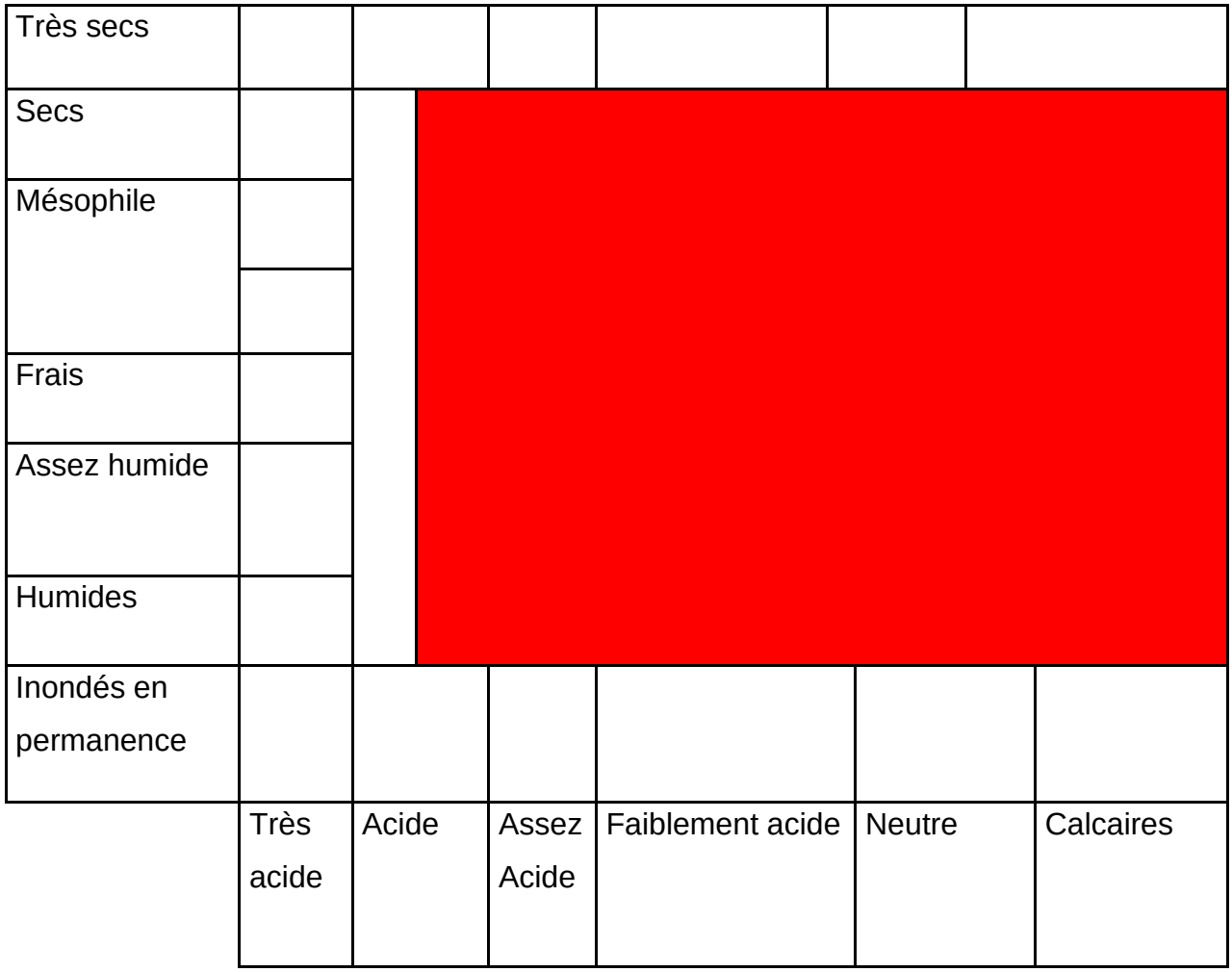
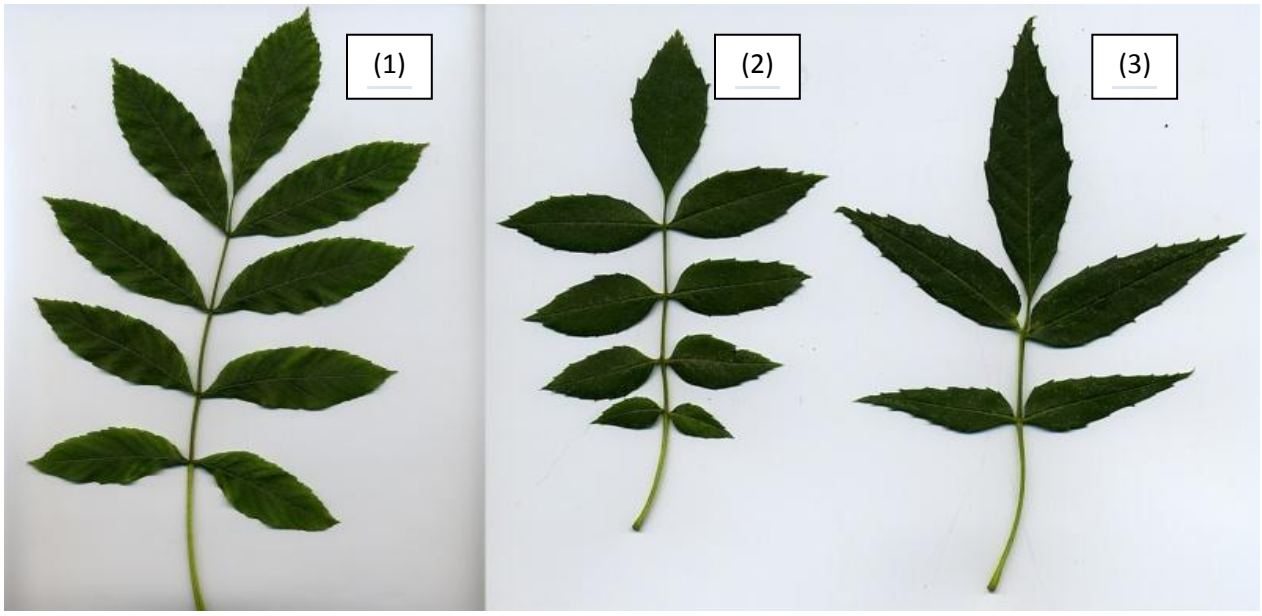


Figure 6-2. Conditions pédologiques dans lesquelles sont rencontrées le frêne medeiteranéen *F.angustifolia* en rouge. Reproduit d'après la flore forestière française Tome 1. Rameau et al., 1989.



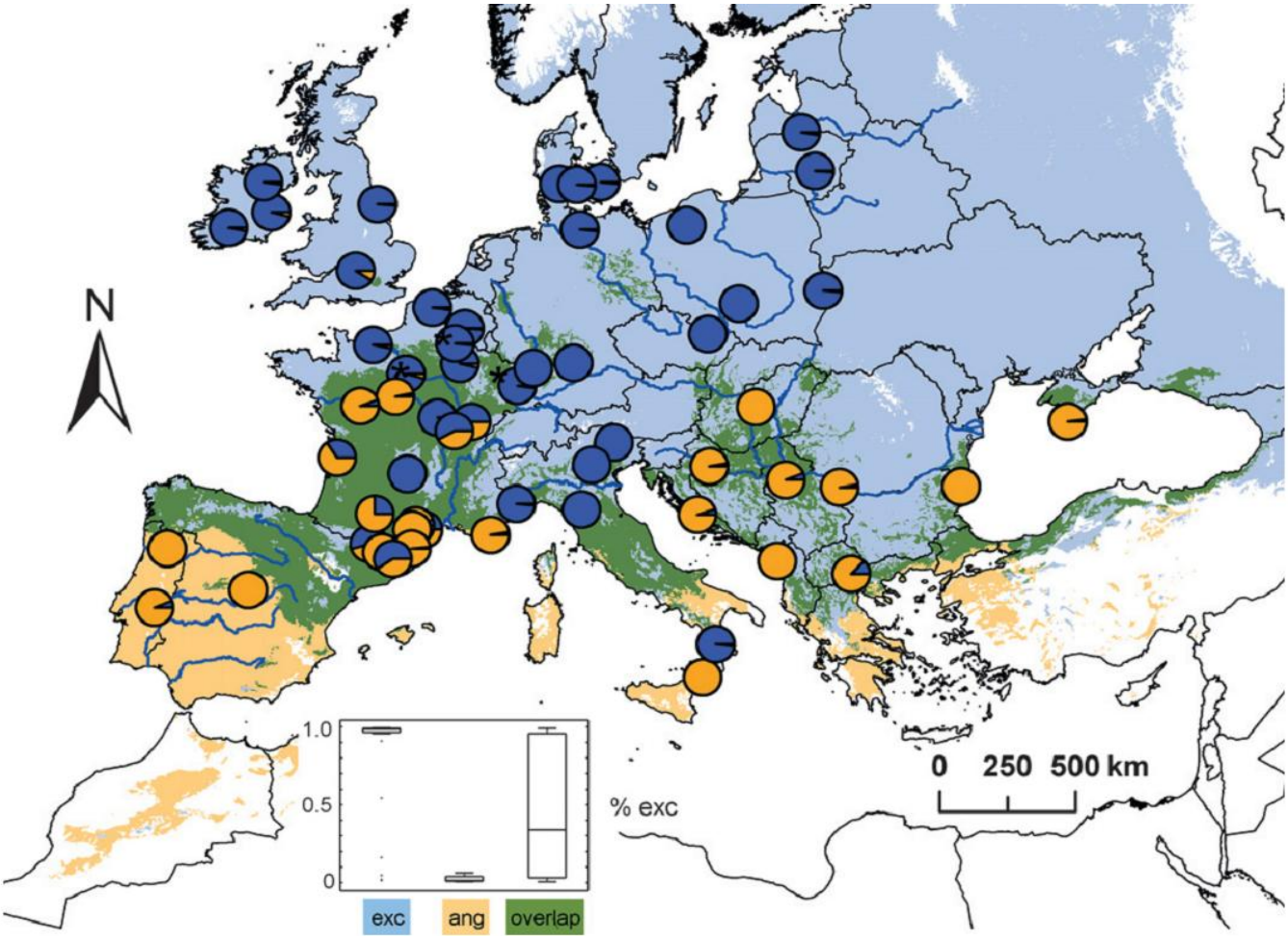
Une caractéristique supplémentaire de ce duo d'espèces est qu'elles présentent des événements récurrents d'introgression décrits depuis longtemps (Rameau et al., 1989, voir Fig. 7). Des individus hybrides *in natura* sont, de plus, décrits dans la littérature récente (Gérard et al., 2006, Gérard et al., 2012, Thomasset et al., 2012) et également obtenus en conditions contrôlées (Morand-Prieur et al., 2003). Deux études (Gérard et al., 2006, Fernandez-Manjarrés et al., 2006) ont par ailleurs démontré qu'à l'intérieur de la zone d'hybridation naturelle étudiée (le long de la Loire), les frênes hybrides ont un pouvoir reproducteur supérieur aux espèces parentales. Ce fait est contraire à ce qui est couramment observé : les individus hybrides ayant généralement des valeurs sélectives moindres. Ainsi les individus hybrides échantillonnés en Loire produisent plus de fleurs et de graines que les espèces « pures » rencontrées sur cette même station (Gérard et al., 2006, Fernandez-Manjarrés et al., 2006). À l'échelle européenne il semblerait que de nombreuses populations de frênes hybrides génotypiquement différentes coexistent (Gérard et al., 2012, Figure 8). En fonction du degré d'introgression variable entre *F.excelsior* et *F.angustifolia,* ces populations hybrides devraient donc présenter des comportements variables face aux contraintes environnementales. De plus, dans le cadre du changement climatique ces processus d'introgression, qui sont considérés théoriquement comme une « autoroute évolutive » dans les processus de spéciation (Hewitt G.M. 1988), pourraient avoir un rôle clef en permettant l'apparition de nouveaux potentiels adaptatifs (Rieseberg et al., 2003, Mallet 2007) chez le frêne. Néanmoins, aucune connaissance n'est disponible sur les réponses des frênes hybrides à une contrainte hydrique.

Figure 7. Photos de feuilles de frênes adultes d'âge indéterminé (avec pétioles) recoltées le long de la Loire représentant les différences de morphologie foliaire.(1) *F.excelsior*, (2) Hybride (3) *F.angustifolia*



.

Figure 8. Carte de répartition des espèces de Frênes européens. En bleu les frênes communs (*F. excelsior* L.) en jaune les frênes méditerranéens (*F. angustifolia* Vahl) et en vert la zone de recouvrement de ces 2 espèces qui correspond à la zone potentielle d'hybridation (vert). Les diagrammes représentent la proportion de pool génétique de *F.excelsior* (bleu) et *F.angustifolia* (orange) dans chaque population échantillonnée. La carte a été créée avec Arc GIS® 10 et le système de projection Lambert a été utilisé. 16 marqueurs SSR et microsatellites ont été utilisés pour discriminer les populations d'après Gérard et al., 2012.



II-b) Questionnement de la thèse et objectifs d'étude.

La disponibilité en eau va devenir la principale contrainte écologique limitant la productivité et la performance des écosystèmes forestiers sous nos latitudes, allant jusqu'à engendrer des dépérissements forestiers massifs. Cette contrainte climatique va probablement se renforcer au vu des prédictions des modèles de changement climatique (cf. § I-a). Étant donné l'importance des écosystèmes forestiers dans les cycles hydrologiques et biogéochimiques, dans la structure des paysages et les services écosystémiques, il semble prioritaire d'étudier et d'anticiper les conséquences de ces changements sur les écosystèmes forestiers. Le complexe d'espèces frêne, compte tenu de ses caractéristiques intrinsèques (hybridation, variabilité d'habitats occupés, tolérance à la sécheresse chez *F.excelsior,* tolérance à l'excès d'eau chez *F.angustifolia*…) nous semble pertinent à retenir comme modèle biologique dans un contexte de changement climatique. Pour envisager la complexité que peut revêtir la réponse à une contrainte hydrique et compte tenu de la rareté de ce type d'études sur les arbres forestiers, nous utiliserons une approche interdisciplinaire en faisant se croiser les compétences de deux disciplines : l'écophysiologie et la génétique.

Les principaux objectifs de cette étude sont : (i) caractériser les populations de frênes étudiées d'un point du vue écophysiologique et génétique sans contrainte hydrique, (ii) rechercher des gènes d'intérêt par une approche gène-candidat pour la tolérance/résistance à la contrainte hydrique et surveiller leur expression au sein des populations de frêne ciblés et en fonction de différents niveaux de contrainte hydrique. Ces deux premiers objectifs seront abordés au chapitre I. Ensuite il nous est apparu complémentaire d' (iii) évaluer les différentes populations de frênes aux dysfonctionnements hydrauliques sous contrainte hydrique. Ceci par le biais de mesures du pourcentage de perte de conductivité hydraulique et enfin (iv) comparer, à la lumière de nos résultats, les réponses écophysiologiques des différentes populations de frênes en fonction de leur statut (espèces parentales ou hybrides).

Nous allons donc analyser les réponses de ce complexe d'espèces en utilisant des populations de frênes issues de stations environnementales contrastées (Fig. 9). L'approche utilisée pour répondre à ces objectifs sera expérimentale et se déroulera en serre en conditions semi-contrôlées. Bien que cette approche soit limitée en termes de représentativité vis-à-vis d'une situation *in natura,* son utilisation présente certains intérêts expérimentaux et pratiques, notamment dans l'application uniforme de la contrainte hydrique (par exemple le contrôle de la

température et donc la minimisation de son effet confondant avec l'application de la contrainte hydrique) et dans la facilitation des mesures écophysiologiques (e.g. autonomie du Licor® 6400) qui sont non-négligeables.

Cette thèse sera présentée sous la forme d'une thèse sur articles, comprenant deux articles qui constitueront les deux chapitres de cette thèse.

Le premier chapitre de cette thèse concernera les deux premières questions abordées au début de ce paragraphe : caractérisation de populations de 2 espèces de frênes et de frênes hybrides et recherche de gènes d'intérêt.

Nous étudierons la caractérisation de ces populations et la recherche de gènes d'intérêt grâce à de jeunes plants de frênes qui ont été obtenus par culture *in vitro* de graines prélevées sur le terrain selon un protocole préétabli (Raquin et al., 2002). Ces graines ont été récoltées sur des arbres adultes, suffisamment distants entre eux pour éviter la consanguinité, dans des stations expérimentales contrastées (cf. Figure 9). Ces stations représentent différentes populations de frênes (six) rencontrées en France ainsi que trois statuts avec deux populations par statut (*F. excelsior*, hybride, et *F. angustifolia* cf. Figure 9). À partir de l'âge de six mois environ, ces jeunes plants ont subi une contrainte hydrique modérée.

La contrainte hydrique a été appliquée par un arrêt d'arrosage, selon trois paliers de contrainte hydrique de plus en plus intenses et se succédant dans le temps. Le contrôle de la déshydratation des plants de frêne a été effectué par pesée afin d'atteindre des seuils prédéfinis de contrainte hydrique, ainsi que par des mesures de potentiel de base pour caractériser la contrainte hydrique. À la fin de la période de contrainte hydrique, les plants de frêne ont été réarosées afin de mesurer les capacités de récupération des populations.

Les mesures écophysiologiques effectuées sont d'ordre morphologique, les échanges gazeux et isotopiques ($\delta^{13}C$[11]). Un génotypage des individus utilisés et une recherche de gènes-candidat pour la tolérance/résistance à une contrainte hydrique ont également été réalisés. Par ailleurs, nous avons relié la réponse écophysiologique mesurée avec une caractérisation de l'expression de gènes en utilisant la méthodologie cDNA-AFLP[12]. Par cette méthodologie, nous

[11] $\delta^{13}C$: Composition isotopique des isotopes stables du ^{12}C et du ^{13}C, exprimé en pour mille (‰), il est relié à la WUEi.

[12] cDNA-AFLP: Technique qui permet la visualisation et la quantification de transcrits basé sur une identification de fragment de gènes issu d'une AFLP à partir de cDNA double brin.

avons pu mettre en évidence un classement des populations par une approche de classification ainsi que le dépôt de 5 nouvelles séquences dans GenBank®. Cette expérimentation a fait l'objet d'un premier article qui sera soumis prochainement dans la revue New Phytologist.

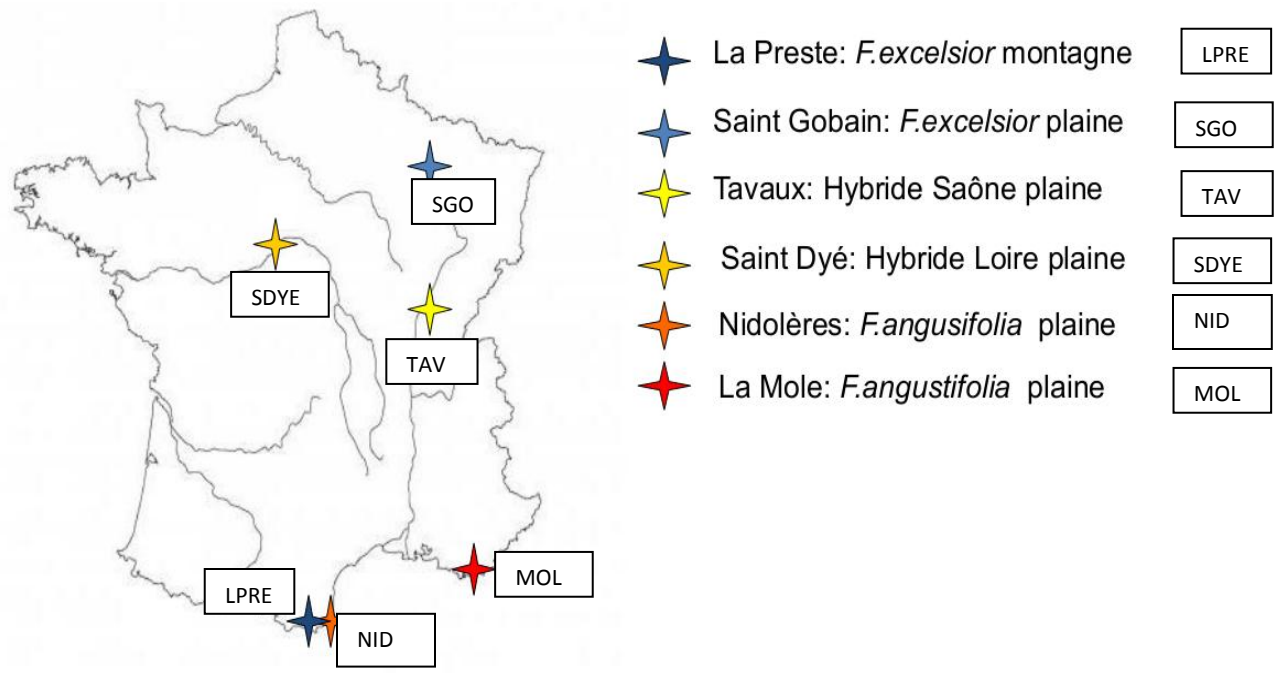


Figure 9. Localisation et statut genetiquement determiné des populations de frênes échantillonées

Tableau 1. Informations sur les populations utilisées lors de la première expérimentation

Localité	La Preste	Saint-Gobain	Tavaux	Saint Dyé	Nidolères	La Mole
Poistion geographique	42.24°N 2.28°E	49.36°N 3.23°E	47.05°N 5.38°E	47.69°N 1.56°E	42.32°N 2.51°E	43.23°N 6.54°E
Altitude (m)	1100	80	190	50	70	30
Climat	Montagnard	Temperé	Temperé	Temperé	Mediterranéen	Mediterranéen
Status gentiquement determiné	*Fraxinus excelsior*	*Fraxinus excelsior*	Hybride	hybride	*Fraxinus angustifolia*	*Fraxinus angustifolia*

Chapitre I

Réponse de populations de frênes communs, méditerranéens et hybrides à une faible contrainte hydrique :

Approches écophysiologiques et génétique.

III-a) Introduction chapitre 1 :

Les prévisions des modèles de changement climatique nous placent dans un contexte écologique où la diversité génétique des arbres forestiers revêt un intérêt renouvelé. Cette variabilité génétique pourrait avoir un effet « tampon » contre l'extrême variabilité des pressions de sélection liées aux variations climatiques localement attendues (e.g. : sécheresses). Dans cette optique, il apparaît important d'évaluer les performances clefs du fonctionnement des arbres (entrée de carbone et pertes en eau) et leur variabilité sous contrainte hydrique. Cette évaluation permettra d'avoir une idée plus précise des potentialités des arbres forestiers pour faire face aux conditions climatiques futures. Dans ce cadre, de récents travaux (Araujo-Calçada et al., in press) ont été menés. Ils consistaient à déterminer si les différences génotypiques connues entre frênes « purs » et frênes de statut hybride étaient associées à des différences de fonctionnement physiologique foliaire. Ces travaux se sont focalisés sur dix populations de frênes (10 individus par population) au stade jeunes plants (6 mois). Ces plants représentaient les différents statuts de frênes rencontrés en France : *F. excelsior*, *F.angustifolia* et hybrides. La comparaison de ces frênes a porté sur des mesures d'échanges gazeux (A^{13}_{max} gs^{14}_{max} $WUEi^{15}_{max}$), sur la variation de ces mêmes paramètres pendant la contrainte hydrique et pendant la phase de récupération, ainsi que sur des caractéristiques morphologiques (croissance absolue et journalière en hauteur, diamètre, nombre d'entre nœuds, densité stomatique, nombre de feuilles et de folioles, contenu des feuilles en azote, LMA[16]) (Root-Shoot ratio) et isotopiques ($\delta^{13}C$[17]).

Les résultats de cette étude (Araujo-Calçada, rapport M2 2009) ont montré des différences de fonctionnement écophysiologique entre les deux espèces de frênes européens (*F.excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl) et leurs hybrides « naturels ». Ces différences sont fortement corrélées à l'origine géographique de hybrides. De plus ces hybrides présentaient un fonctionnement physiologique intermédiaire entre les populations représentant les deux espèces parentales

[13] *A* max : Assimilation, en µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}

[14] *gs* max : Conductance stomatique, en mol H_20 m^{-2} s^{-1}

[15] *WUEi* : Intrinsic Water Use Efficiency, efficacité intrinsèque de l'utilisation de l'eau calculée ici par le rapport A/gs

[16] LMA : Leaf Mass Area, ou masse spécifique foliaire généralement en g m^{-2}

[17] $\delta^{13}C$: composition isotopique entre le carbonne 13 et le carbonne 12 (‰). Indicateur de l'efficacité d'utilisation de l'eau.

(*F.excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl). Ces travaux ont été menés en conditions contrôlées (serre) sans limitation de la ressource hydrique.

Cependant, ces conditions ne sont pas représentatives de celles que les populations naturelles de frênes rencontreront dans le contexte du changement climatique. Notre objectif, dans la continuité de l'étude d'Araujo-Calçada, est de savoir si ces différentes populations de frênes ayant différents statuts (espèces parentales : *F.excelsior* et *F. angustifolia* et hybrides), pourront présenter une réponse différentielle à un stress abiotique tel qu'une contrainte hydrique. Une autre hypothèse, sous-jacente à celle citée précédemment, est que cette variabilité de réponse vis-à-vis d'une contrainte hydrique devrait en partie reposer sur l'origine géographique des populations. Nous supposions d'après les travaux d'Araujo-Calçada une adaptation locale et donc une base génétique à ces réponses écophysiologiques.

Pour tester ces hypothèses, nous avons donc mis en œuvre une expérimentation de contrainte hydrique sur des jeunes plants de frênes issus de six populations naturelles. Cette expérimentation s'est déroulée dans un compartiment climatique d'une serre en conditions semi-contrôlées (PPFD 100 à 800 µmol de photons m^{-2} s^{-1}, température : Jour 20-25°C, Nuit 18°C. Hygrométrie : 50-90 %) avec un apport de lumière par des lampes à vapeur de mercure de 4h à 10h/jour, car la durée du jour n'était pas suffisante pour obtenir une photopériode de 16h, nécessaire à la croissance des jeunes plants.

La contrainte hydrique a été appliquée par une réduction ou un arrêt d'arrosage selon trois paliers successifs : les plants de frêne ont été maintenus (par apport d'eau si nécessaire) sur ces paliers de contrainte hydrique le temps des mesures d'échanges gazeux (deux jours). Une fois les mesures effectuées, l'arrosage était stoppé le temps d'atteindre le palier suivant. Ces paliers ont été choisis par rapport à la quantité maximale d'eau que pouvait contenir le substrat dans lequel les plantes ont poussé. Ils ont donc été déterminées par pesée, en rapport avec le poids de saturation en eau du substrat (P_{sat}) pour chaque plante, respectivement P_{sat} - 100g, P_{sat} - 250g et P_{sat} - 400g. Une étape de réarrosage a ensuite été incluse suivant la contrainte hydrique pour mesurer la capacité de récupération des plantes.

Ce dispositif expérimental nous a permis de caractériser les réponses de ces différentes populations à une contrainte hydrique (légère à modérée). Parallèlement à cette étude écophysiologique de réponse à la contrainte hydrique menée à différentes échelles (plante et feuille), nous avons mené une caractérisation génotypique des individus utilisés. Pour cela,

nous avons utilisé des marqueurs microsatellites, qui avaient été développés dans l'objectif de différencier les frênes hybrides des espèces « pures » (Brachet et al., 1999, Lefort et al., 1999, Aggarwal et al., 2010, Gérard et al., 2012), afin de clarifier le statut des six populations de frênes étudiées.

En outre, une analyse de transcriptomique basée sur l'expression différentielle d'ARNm (Acide RiboNucléique messager) pendant la contrainte hydrique a été réalisée. Ces ARNm ont été traduits en ADNc pour analyse par AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism). Une fois les fragments d'ADNc amplifiés par PCR[18], ils ont subi une sélection restrictive en fonction de la contrainte hydrique et du statut des populations de frêne. Enfin dès que le choix des marqueurs a été arrêté, ils ont été séquencés. Toutes ces étapes ont été réalisées grâce à l'aide de la société Eurofins® Scientific.

[18] PCR: Polymerase Chain Reaction

III-b) Resultats principaux :

Le premier résultat de cette expérimentation montre que ce n'est qu'au dernier palier de contrainte hydrique obtenu (potentiel de base Ψ_{pd} moyen : -0,9 MPa) que l'on peut observer une réponse significative sur les échanges gazeux (*A* et *gs*). Les échanges gazeux au cours des deux précédents niveaux de contrainte hydrique (valeurs de Ψ_{pd} de -0,53 MPa et -0,61 MPa) ne sont pas significativement différents d'une absence de contrainte hydrique (données non-incluses).

En ce qui concerne la réponse des échanges gazeux des différentes populations à une contrainte hydrique modérée (-0,9 MPa), nos résultats suggèrent une absence de différence significative entre les différentes populations de frênes étudiées (*F.excelsior, F.angustifolia,* ou hybride). Cependant, certaines populations ne récupèrent pas totalement de l'application de la contrainte hydrique après 3 jours de réarrosage. De manière globale, les populations d'hybrides testées ici montrent une réponse souvent intermédiaires aux espèces parentales ainsi que des caractères écophysiologiques qui se rapprochent de l'espèce parentale dont la population hybride est morphologiquement le plus proche (*F.excelsior* pour Tavaux ou *F.angustifolia* pour Saint-Dyé)». Grâce à l'apport des marqueurs génétiques SSR[19] et du génotypage nous avons été en mesure de clarifier le statut d'une population qui restait controversé (i.e. Nidolerès est plutôt une population de statut *F. angustifolia* et peu hybride).

Nous avons pu noterune bonne corrélation entre les valeurs de *A* et *gs* (R^2 = 0,65) sans contrainte. A l'échelle des populations, les valeurs moyennes de *A* et *gs* semble reliées à la densité stomatique qui est faible chez *F.excelsior* (72,8 ± 5,5 stomates/mm²) et élevée chez *F.angustifolia* (181,27 ± 9,2 stomates/mm²). Les hybrides Tavaux et Saint-Dyé présentant des valeurs intermédiaires.

Du côté transcriptomique, entre 125 et 145 fragments d'ADNc ont pu être amplifiés. Suite à cette amplification, environ 35 marqueurs d'intérêt (réponse différentielle entre populations et paliers de contrainte hydrique) ont pu être isolés parmi lesquels onze nouveaux marqueurs qui ont été séquencés. Parmi ces onze séquences, certaines correspondent en partie à d'autres séquences déjà déposées dans une banque de données génétiques (NCBI, GenBank®) pour le

[19]Les marqueurs SSR sont des répétitions de séquences nucléotidiques courtes usuellement inférieures ou égales à 6 bases de longueur, qui varient en nombre (Rafalski et al., 1996).

frêne commun (Leger et al., 2010 résultats non-publiés). Ces séquences additionnelles présentent des correspondances avec des gènes déjà séquencés chez d'autres organismes modèles (*i.e. Arabidopsis thaliana*) et indirectement impliqués dans la tolérance/résistance au stress hydrique. Ces séquences présentent également un intérêt supplémentaire, car en complément de celles déjà développées, elles pourront permettre une discrimination plus précise des hybrides (e.g. SNP[20] voir Schroeder et al., 2012). Elles ont fait l'objet d'un dépôt dans la base de données GenBank®, et seront validées a posteriori dans une prochaine étude, par une approche qPCR (PCR quantitative).

Par ailleurs, une approche de classification des populations à partir de l'ensemble des marqueurs cDNA a été menée. Elle devrait faire partie du manuscrit soumis pour publication, mais n'a pas pu être intégrée à temps dans ce manuscrit de thèse.

[20] SNP : Single Nucleotide Polymorphism : variation (polymorphisme) d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes environ une paire de bases sur mille dans le génome humain

III-c) Discussion chapitre 1

Avant de détailler les caractéristiques des populations hybrides de frênes sur lesquelles nous avons centré cette expérimentation et la comparaison entre *F.angustifolia et F.excelsior*, il convient d'en rappeler l'origine. Tavaux (cf. Fig. 9) est une population hybride située dans la vallée de la Saône. Elle est le résultat de l'introgression du génome de *F.excelsior* dans *F.angustifolia* (Fernandez-Manjarres et al. 2006). À Saint-Dyé, nous avons une population hybride située en ripisylve de Loire, ou des individus de *F.angustifolia* persistent (cf. Fig. 9). Elle est le résultat de l'introgression du génome de *F.angustifolia* dans *F.excelsior* (Fernandez-Manjarres et al., 2006).

Globalement, si l'on se réfère aux taux d'introgression obtenus précédemment par génotypage (6 marqueurs anonymes SSR), Saint-Dyé est une population qui possède une composition génétique proche de *F.angustifolia* (taux d'introgression de 60% de *F.angustifolia*, Fernandez-Manjarres et al., 2006). Alors que Tavaux montre un plus faible taux d'introgression de *F.angustifolia* que Saint-Dyé et est donc plus proche génétiquement de *F.excelsior* (taux d'introgression de 40% de *F.angustifolia*, Fernandez-Manjarres et al. 2006).

Ces différences de composition génétique des populations hybrides, se reflètent en partie dans les mesures morphologiques. Ainsi les hybrides de Loire de Saint-Dyé ont un nombre de feuilles, un nombre de folioles par feuille, ainsi qu'une allocation de biomasse (ratio racine/tige) proche de *F.angustifolia* (La Mole). Cette proximité des hybrides de Saint-Dyé avec les populations de *F.angustifolia* (La Mole) se remarque également au niveau de la surface foliaire avec des petites folioles (7 cm^2 contre 5 cm^2 pour *F.angustifolia* (La Mole) et 18 cm^2 pour *F.excelsior* (Saint-Gobain)). En revanche, d'autres critères morphologiques tendent à se rapprocher plus de *F.excelsior* comme le diamètre de la tige principale par exemple (moyenne ± erreur standard : 7,39 ± 0,29 contre 7,62 ± 0,27 mm pour *F.excelsior* (Saint-Gobain) au lieu de 10,19 ± 0,32 pour *F.angustifolia* (La Mole)). Il en est de même pour la population hybride de Saône de Tavaux. Si l'on regarde des variables telles que le nombre total de feuilles, ainsi que le nombre d'entre nœuds (respectivement 29,4 ± 2,5 ; 13,4 ± 0,6 pour la population de Tavaux et 24 ± 2 ; 10,5 ± 0,5 ; 7,3 ± 1,22 pour *F.excelsior* (Saint-Gobain)) leurs valeurs sont plus proches de celles des « vrais » *F.excelsior* (Saint-Gobain). Alors que dans le même temps, certaines variables telles que le diamètre au niveau des cotylédons ou le nombre de folioles par feuille (8,7 ± 0,24, et 9,6 ± 1,63 pour la population de Tavaux et 10,19 ± 0,32 et 9,2 ± 1,63

respectivement pour *F.angustifolia* (La Mole) ont des valeurs qui tendent à se rapprocher de *F.angustifolia* (La Mole).

Cependant la densité stomatique, suit bien le classement génétique des deux populations hybrides puisque celles de Saint-Dyé se rapproche des valeurs de la population de *F.angustifolia* (La Mole), alors que celle de Tavaux est plutôt proche de *F.excelsior* (*F.angustifolia* (La Mole) : 229,9 ± 1,8 ; Saint-Dyé 151,11 ± 9,1 ; Tavaux 134,7 ± 10,4, *F.excelsior* (Saint-Gobain) : 92,9 ± 5,1 stomates mm²). Il est à noter que *F.excelsior* (Saint-Gobain) présente la densité stomatique la plus faible et *F.angustifolia* (La Mole) la plus élevée. Cependant, il reste difficile de savoir si le classement observé ici sur la densité stomatique au stade jeune plant, et qui reflète bien le degré d'introgression, persistera au stade adulte. Il a été montré que les arbres de *F.excelsior* ont un nombre de stomates plus faible au stade jeune plant qu'au stade adulte (77 ± 2,2 stomates mm² jeune plant, 239 ± 3,6 au stade adulte : Hölscher 2004).

Les critères morphologiques ayant pour base la feuille sont à utiliser avec précaution chez le frêne, et notamment pour la discrimination des hybrides par rapport à *F.excelsior* ou *F.angustifolia* car l'on observe fréquemment une inversion du nombre de folioles entre le stade jeune plant et le stade arbre adulte. À l'âge adulte, avec un nombre de folioles compris entre 7 et 15 pour *F.excelsior* et entre 3 et 11pour *F.angustifolia* (Rameau et al., 1989). De plus il n'est pas rare d'avoir des phénotypes « cryptiques » (i.e. très ressemblants à *F.excelsior* ou *F.angustifolia*) chez certains individus hybrides (Thomasset et al., 2012).

Néanmoins à défaut d'usage pour la discrimination des hybrides, ces différentes informations morphologiques devraient pouvoir être d'une certaine aide pour la suspicion d'hybridation *in situ*. Certains critères morphologiques sont en accord avec le degré d'introgression des hybrides, tandis que d'autres sont à l'opposé de ce degré d'introgression. De plus en fonction de la population hybride choisie, ce ne sont pas les mêmes variables morphologiques qui donnent des signaux contradictoires avec la génétique de la population (e.g. nombre de folioles par feuilles pour Tavaux, et croissance en hauteur pour Saint-Dyé). Il serait nécessaire de tester la fiabilité de ces critères de reconnaissance et de valider cette approche par des mesures couplées du degré d'introgression/morphologie sur le terrain.

Étant donné le statut d'hybride des populations de Tavaux et de Saint-Dyé, nous nous attendions à avoir un effet d'heterosis (i.e. vigueur hybride qui surpasse celle des parents Shull

1948) notamment sur un critère tel que la croissance. Nous obtenons plutôt des valeurs intermédiaires de croissance entre *F.excelsior* (Saint-Gobain) et *F.angustifolia* (La Mole). Pour ce qui est de la hauteur finale des hybrides au bout de 6 mois de croissance, Tavaux présente la plus grande hauteur avec pratiquement 800 mm (moyenne ± erreur standard : 798 ± 34 mm), ce qui tend à rapprocher sa population de *F.angustifolia* (La Mole) (992 ± 44 mm). Saint-Dyé est de l'ordre des 700mm (691 ± 37 mm) ce qui est plus proche de *F.excelsior* (Saint-Gobain : 569 ± 32 mm).

En ce qui concerne la croissance journalière, là aussi *F.angustifolia* (La Mole) a les valeurs les plus élevées, en termes de croissance en hauteur (11,82 ± 2,79 mm $jour^{-1}$) et en diamètre (croissance radiale 0,116 mm $jour^{-1}$± 0,004). Tavaux vient ensuite, avec des variables qui se rapproche plus de *F.angustifolia* avec des valeurs de croissance en hauteur et radiales de 9,46 ± 2,17 mm $jour^{-1}$ et de 0,096 ± 0,004 mm $jour^{-1}$ respectivement. Saint-Dyé à des valeurs de croissance plus faible que Tavaux, mais néanmoins plus élevées que celles de *F.excelsior* (Saint-Gobain : 8,38 ± 1,97 mm $jour^{-1}$ contre 6,87 ± 1,66 mm $jour^{-1}$). La croissance radiale de Saint-Dyé est quasi identique en valeurs à celle de *F.excelsior* 0,080 ± 0,004 contre 0,081 ± 0,004 mm $jour^{-1}$.

Si on se focalise sur la croissance au stade jeune plant, on peut en conclure que les hybrides ont probablement un pouvoir colonisateur supérieur (hors contrainte hydrique) à *F.excelsior* (Saint-Gobain), mais néanmoins inférieur à *F.angustifolia* (Nidolerès et La Mole). Cependant, il reste une inconnue en termes d'habitat écologique possible pour *F.angustifolia* (La Mole) et les hybrides. *F.angustifolia* (La Mole) et la population hybride de Saint-Dyé se rencontrent dans des habitats de type ripisylve où la disponibilité en eau est fluctuante. Le site d'échantillonnage de la population hybride de Tavaux est une forêt domaniale qui est située loin de la Saône (environ 4km) ce qui est cohérent avec une prédominance de caractères *excelsior* dans le statut hybride. Comme Tavaux est une région de provenance pour la plantation de frênes en Saône, on peut s'interroger sur quel type de gestion forestière serait le plus adéquat à terme (garder ou non les hybrides).

En termes d'assimilation avant contrainte hydrique, on peut remarquer que le classement des valeurs moyenne d'assimilation est le même que celui de la croissance. À savoir les populations de *F.angustifolia* (Nidolerès et La Mole) ont les valeurs les plus élevées (13,31 ± 0,5 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} 13,82 ± 0,2 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), les hybrides sont intermédiaires (Tavaux 12,26 ± 0,15

µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} , Saint-Dyé 12,59 ± 0,41 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) et *F.excelsior* (Saint Gobain) a les plus faibles valeurs d'assimilation (10,84 ± 0,2 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}). Les valeurs de croissances mesurées sont corrélées avec l'assimilation (test de corrélation de Spearman : 0,5477284, *P*-value=0,0003073, n=39).

En terme de conductance stomatique nous obtenons le même classement que pour l'assimilation avec de nouveau des valeurs de *gs* plus élevées pour *F.angustifolia* (La Mole : 0,27 ± 0,02 mol H_2O m^{-2} s^{-1}), les hybrides de nouveau intermédiaires (Tavaux 0,18 ± 0,02 mol H_2O m^{-2} s^{-1} Saint-Dyé 0,21 ± 0,02 mol H_2O m^{-2} s^{-1}), et enfin *F.excelsior* avec les plus faibles valeurs de conductance stomatique (Saint Gobain : 0,13 ± 0,02 mol H_2O m^{-2} s^{-1}).

Nous avons par ailleurs obtenu une bonne corrélation entre les valeurs d'assimilation et les valeurs de conductance stomatique (R^2 = 0,6492 cf. Figure 3 de l'article ci-dessus) ce qui indiquerait que les différences d'assimilation observées chez les différentes populations de frênes reposent à la fois sur des différences physiologiques, de conductance stomatique (*gs*) et de densité stomatique. Il est par ailleurs possible que la taille des stomates soit un facteur supplémentaire qui explique ces différences d'assimilation (observation personnelle).

Malgré la faible intensité de la contrainte (- 0,9 MPa), celle-ci a été suffisante pour induire une réduction significative des échanges gazeux. La contrainte hydrique a plus fortement impacté les valeurs d'assimilation et de conductance stomatique de *F.angustifolia*. Par contre les valeurs d'échanges gazeux diminuent peu chez *F.excelsior* (Saint Gobain). Les deux populations hybrides semblent moins affectées que *F.angustifolia* (La Mole) mais ne se distinguent pas entre elles.

Pour ce qui est de la récupération des valeurs d'échanges gazeux après une réhydratation de trois jours, on constate que certaines populations réagissent mieux que d'autres. *F.excelsior* (Saint Gobain) récupère rapidement ses valeurs d'échange gazeux (*A* et *gs*), mais celles-ci n'ont été que très peu réduites au cours de la contrainte hydrique. La population de Tavaux obtient de manière surprenante des valeurs de *gs* plus élevées qu'avant l'application de la contrainte hydrique et retrouve des valeurs d'assimilation presque égales à celles qu'il avait avant l'application de la contrainte. Saint-Dyé tout comme *F.angustifolia* (La Mole) ne retrouve pas les mêmes valeurs (*A* et *gs*) qu'avant la contrainte.

Il est à noter que cette contrainte hydrique légère affecte substantiellement les arbres de *F.angustifolia* (La Mole) ainsi que ceux ayant un degré d'introgression qui les rapproche de *F.angustifolia* (i.e. Saint-Dyé). Normalement les jeunes plants récupèrent relativement rapidement les valeurs d'échanges gazeux après une contrainte (e.g. 1-2 jour, Varone et al., 2011). Ici le délai de trois jours n'a pas été suffisant pour lever entièrement les limitations de photosynthèse qui ont été imposées lors de la contrainte hydrique chez Saint-Dyé et pour *F.angustifolia* (La Mole). Ce qui montre une capacité de récuperations plus faible chez ces deux dernières populations. Un délai plus long aurait peut-être permis la récupération complète des valeurs d'échanges gazeux pour ces deux populations.

Ces différences de comportement vis-à-vis d'une contrainte hydrique légère devraient être testées sur des arbres plus âgés, et si elles sont confirmées, devraient être prises en compte dans les perspectives des plantations futures.

Notice sur l'article 1 : *L'article qui suit est en cours de finalisation, certaines analyses n'étant pas encore finalisées (transcriptomique, classification basée sur critère morphologiques et génétiques).Certaines figures (i.e. Figure X, 2 et 3) ne sont pas incluses dans ce manuscrit bien qu'il en soit fait mention dans la partie* ***matériel et méthode*** *(****DNA extraction and individual genotyping*** *et* ***Statistical analysis****) ainsi que dans la section* ***Results****.*

Les nouvelles figures devraient être intégrées dans la version future de la publication associée à ce chapitre.

Research paper

Title: Ash hybrid populations as a reservoir of adaptive variability: New insights from a combined genetic and ecophysiological approach.

Romain Joseph[1,2,3*#], Gwendal Restoux[1,2,3#], Najat Takvorian[1,2,3,4], Juan Fernández-Manjarrés[2], Christian Raquin[1,2,3], Claire Damesin[1,2,3] and Nathalie Frascaria-Lacoste[1,2,3]

[1] Université Paris Sud 11, UMR 8079, Orsay, France, Laboratoire Ecologie, Systématique et Évolution, 91405 Orsay Cedex, France

[2] CNRS, Orsay, France

[3] AgroParisTech, Orsay, France

[4] Université Pierre et Marie Curie, Campus JUSSIEU 4 Place Jussieu 75252 PARIS Cedex 05

[*] Corresponding author: Romain Joseph

Both authors contribute equally to this work

Phone : +33 (0)1 69 15 53 12

Fax : +33 (0)1 69 15 73 53

E-mail : romain.joseph@u-psud.fr

Keywords: Ash French populations, *Fraxinus*, genotyping, hybrids, species complex, water deficit

Running head: FRAXINUS SPP. WATER DEFICIT RESPONSES

Summary

Water deficit is one of the major strains limiting forest productivity and is occurring more and more frequently and severely. In that context, trees are facing strong directional selective pressures in a shorter time span than previously. Apart migration and interannual acclimation linked to their lifespan, their response to climate change is largely dependent on existing population variability. Species complex with large ecological distributions and probably locally adapted populations, offer a valuable opportunity to examine genetic-based variability of response to water constraints. The closely related European ashes (Oleaceae) *Fraxinus excelsior*, a temperate species, and *Fraxinus angustifolia*, a mostly Mediterranean (riverside) species, were studied. Recurrent hybridization has led to at least two stable hybrids zones in France under Atlantic and continental conditions, potentially increasing the emergence of more suited phenotypes adapted to climate change. Using genetic and ecophysiological approaches, we characterized water deficit responses in six French ash populations, representing the parental species and hybrid populations from the two known hybrid zones that were previously morphologically and genetically identified. Genetic population analysis based on microsatellites markers were used to assign precisely the level of hybridization. Measurements of plant growth, leaf gas exchange (*A*, *gs*, *WUEi*), leaf structural characteristics (LMA, stomatal density) were carried out on saplings under greenhouse conditions at three water status: watered, slight water deficit (Ψ_{pd} around -0.9 MPa) and after re-watering. Gene expression before and after water deficit treatments (AFLP profiles based on cDNA with subsequent band sequencing) identified different genetic responses to water deficit. Correlations between individual genetic assignment and ecophysiological results suggested that although some hybrids exhibited intermediate *A*, *gs* and *WUEi* values, no advantageous characteristic could be attributed to hybrids compared to parental species. Many saplings from each type of hybrid population were closer in their

response to either parental species suggesting that physiological traits related to water deficit are largely conditioned by the type of hybrid zone.

Introduction

Understanding and predicting the impact of climate change on forest ecosystems is one of the greatest challenges for the sustainable management of forests (Boisvenue et al. 2006, Allen et al. 2009). Global change is supposed to increase both the frequency and the intensity of extreme climatic events (Rebetez et al. 2006, Bréda et al. 2006, IPCC 2007), threatening forest ecosystems (Allen et al. 2009, Dombroski et al. 2012) because of the sessile nature of trees, their long generation times and their sensitivity to pumping water to the top under water limited conditions (Lanher, 2002, Petit et al. 2006). Recent evidence suggests rising global temperatures are already amplifying drought-induced forest change ad affecting terrestrial net primary productivity (Anderegg et al. 2012, Choat et al, 2012).

Tree species can cope with extreme environmental changes through three processes: migration, acclimation (plasticity) and eventually, adaptation to new conditions in the long term through evolutionary change (Aitken et al. 2007). However, in many cases, migration capabilities of trees will be too slow to follow their optimal climatic area given the expected velocity of climatic change (McLachlan et al. 2005, Allen et al. 2009) so that tree population survival depends largely on the extant natural population variability, upon which new climates will impose strong directional selection on them (Gutschick et al. 2003, Jump et al. 2005). In particular, geographic variation in photosynthesis and water use efficiency, are key processes for plants in general and trees in particular to face the predicted increasing temperatures and CO_2 coupled with a decrease of water availability (Kirschbaum, 2004).

A frequent invoked mean to cope with conditions expected with climate change for tree species is phenotypic plasticity. However assessing the magnitude of plasticity in different functional traits is very complex because it is very difficult to distinguish between the capacity to exhibit a large range of phenotypes for a given genotype (phenotypic plasticity) and the capacity to exhibit an inheritable optimal fitness under conditions for which the individuals were selected for (Darwinian adaptation) (Dobzhansky et al. 1968). From an ecophysiological point of view, organisms can adapt in response to environmental stimuli through metabolic or physiologic adjustments within the cell, or tissues, resulting in the improved ability of that organism to cope with its changing environment. Ecophysiological adaptation to water stress induced by climate change will depend on many physiological factors, such as stomatal closure, growth reduction, anaerobic metabolic pathways (Krasensky & Jonak, 2012), that remains largely unknown for many species (Linhart et al. 1999, Lexer et al. 2005). Thus, it could be interesting to focus research efforts on both ecophysiological and genetic aspects by choosing tree species that present broad ecological preferences for which gene expression variation is possibly linked to differences in physiologic adjustment capabilities under field and controlled conditions (O'Connor et al. 2012).

Ash trees (*Fraxinus spp.*, Oleaceae) in Europe grow from the Mediterranean region to high latitude temperate zones. Common ash (*Fraxinus excelsior*, L.) is widespread over Europe (Rameau et al. 1989, Stöhr & Lösch 2000, Dobrowska et al. 2011) showing an exceptional ecological versatility as it can grow from riversides to dry hill slopes (Rameau et al. 1989, Marigo et al. 2000, Jaeger et al. 2009). Narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*, Vahl) is closely related to common ash and is mainly distributed near the Mediterranean basin along an east-west gradient (Huertz et al. 2004, Fernandez-Manjarrés J., 2012). In addition, these two ash species form a complex at the European scale with overlapping distributions (Gerard et al. 2012).

Moreover, hybridization events have been suggested, (Rameau et al. 1989), assessed in the field (Gérard et al. 2006) and in controlled crosses experiments (Raquin et al. 2002, Morand-Prieur et al. 2003) with recurrent introgression events (Gérard et al. 2006, Fernandez-Manjarrés et al. 2006) occurring among those two closely related ashes. In France, the extent of hybridization between the two species has been analysed using anonymous nuclear microsatellites and morphological characteristics and results suggest that the pattern of hybridization differ between the Loire and the Saône Valley (Fernandez-Manjarrés et al. 2006). The wild climatic conditions in the Loire valley appear to promote morphological and molecular introgression of *Fraxinus angustifolia* into *F. excelsior* whereas the more continental climate of the Saône valley appears to allow introgression of *Fraxinus excelsior* into *F. angustifolia*.

Only few studies have been carried out on ashes, and little focused mainly on drought resistance of common ash (Besnard et al. 1990, Carlier et al. 1992, Marigo & Peltier 1996, Stöhr & Lösch 2000). Thus, *Fraxinus* spp. European complex as a whole can be a suitable biological model for studying the adaption of trees in a changing climate context.

In the present study, we investigated the drought response of ash populations from a physiological and genetic perspective. In particular, we asked the following questions: i) what is the base (normal conditions) of water use efficiency at the sapling stage of *F. excelsior*, *F. angustifolia* and hybrids from two different hybrid zones (Loire and Saône valley) ? ii) Do hybrid populations show less sensitivity to water stress compared to parental populations and is this sensitivity correlated to the degree of introgression of each individual ? iii) Does post-stress recuperation is faster for hybrid saplings compared to parental species ? Finally, does gene expression differs between the parental species and hybrid populations when saplings are subject to water stress ?

We sampled populations from different geographical French locations with individuals from populations previously characterised morphologically and genetically to belong from the two species (*F. excelsior* and *F. angustifolia*) or hybrids. Using both a population genetic approach, and structural characters, we determined the species status of individuals and the degree of introgression of hybrid populations. We then monitored the response of these populations to an induced water-constraint on saplings in semi-controlled conditions (greenhouse), measuring ecophysiological parameters such as photosynthesis, stomatal conductance, growth rate, and leaf mass area. We jointly conducted a differential genetic expression (using mRNA extracts) experiment to detect genes implied in water deficit response, and investigate the genetic determinism of this ecophysiological response. For this purpose (i.e. variation in gene expression between individuals and populations in non-model organisms), we chose cDNA-AFLP (Amplified fragment length polymorphism) methodology which was suitable for the aim of this study in our *Fraxinus* species complex (Wolkmuth et al. 2003, Knight et al. 2006, Korpelainen et al. 2010). We finally discussed the possible role of hybrid populations with respect to any advantage regarding responses to water deficit from a conservation perspective under climate change.

Materials and methods

Plant material

Six French *Fraxinus spp.* populations were sampled from different French geographical locations including four parental and two hybrid populations (see Table 1). Parental species populations include a plain (Fe1) and a mountain (Fe2) *F. excelsior* and two plain *F. angustiofolia* (Fa1 and Fa2) populations. The two ash hybrid populations were sampled in plain area, one in the Saone valley (Hy1) and the other along the Loire river (Hy2). Each studied plant

117 came from seeds collected on trees located along a transect gradient at least 30m apart to avoid
118 inbreeding. About 30 healthy seeds per population were *in vitro* germinated at the end of
119 January 2010 during two days, following Raquin et al. 2002. These two days old seedlings were
120 grown during two (*F. angustifolia* and related hybrids) or three (*F. excelsior* and related hybrids)
121 weeks, on MS culture medium (Murashigue & Skoog 1962) and under 16 h day^{-1}photperiod,
122 25µmol m^{-2} s^{-1} PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) and 26°C night and day. Seedlings
123 were then transferred in PVC pots (around 0.5L) pots filled with a homogenized
124 peat/sand/perlite mixture substrate (2/1/1 v/v, PSP substrate hereafter), supplemented with
125 Osmocote® fertilizer (200 g per 40 L of mixture) and grown during two months under semi-
126 controlled conditions : 18°C night and 20-22°C day, 12 h day^{-1} photoperiod (adjusted in the
127 greenhouse by additional lightening using Mercury vapor lamps), 800 µmol photons m^{-2} s^{-1}
128 PPFD during the sunny days, 50-80% relative humidity (RH) depending on lightening. In order
129 to ensure plants viability, they were grown under 4 days acclimatization to RH conditions during
130 the greenhouse transfer. At the end of April, saplings were transferred in 2L pots filled with the
131 same fresh weight (900g) of PSP substrate.

132 *Experimental design and water treatments*

133 Water treatments were performed on 5 month-old plants (at the end of June 2010).
134 Twenty saplings per population were randomly chosen (n=120 saplings in total). Ten plants per
135 population were used for control (C, continuously watered plants, n=60 in total) and water
136 treatments (n= 60). In order to avoid greenhouse effect, a semi-randomized block experimental
137 design was used: three water status groups of saplings were grown on 2 tables where parental
138 and hybrid populations were mixed inside each condition. No seasonal effect was observed (on
139 leaf gas exchange) in the greenhouse using continually watered plants. Three water statuses were

140 determined for the 60 plants used for water treatment: before water deficit (BD), at the maximum
141 of water deficit (WD) and after rehydration (R). WD status was obtained by stopping watering
142 till a loss of 73% of water weight relatively to water saturation. R status was obtained by full
143 watering during 3 days after deficit.

144 The experiment began on June 24th 2010 (day of year=doy=175) For each water status, predawn
145 water potential, leaf gas exchange were measured, and mature leaflets were harvested and kept at
146 -80°C until genotyping and cDNA-AFLP analysis. Leaflets used for gas exchange at maximum
147 water deficit were used for determination of leaf structural characteristics (stomatal density,
148 LMA (leaf mass per area), nitrogen content and $\delta^{13}C$).

149 *Plant growth and water status*

150 Growth measurements (total height, internode number, basal diameter) were carried out
151 each week from April 28th (Doy, 118) to June 30th (doy 181). Total height was measured using
152 cotyledon scars as reference point. Basal diameter was measured at the reference point and node
153 number was counted once a week. The mean height and radial growth rates (mm.day^{-1}) were
154 estimated over 63 days.

155 At the end of the experiment, control plants were used to estimate the root/shoot ratio and the
156 total plant leaf number. Plant water status was characterized by the predawn leaf water potential
157 (Ψ_{pd}) measured on leaf before sunrise using a Scholander pressure chamber (type PMS 600
158 PMS® Instruments Co. Albany Oregon USA, Scholander et al. 1965). For each population and
159 each water status, three randomly chosen plants were used

160 *Leaf gas exchange measurements*

Maximal assimilation (*A*max, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) and maximal stomatal conductance (*gs*max, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) were measured using a Licor® 6400 (LI-COR Bioscience®, Lincoln, Nebraska USA) with a 6400-02B LED Light Source chamber. The measurements were done on terminal leaflets for 5 plants out of 10 from each population under 380 µmol mol^{-1} CO_2, at 20°C, 60% RH (relative humidity) and 1000 µmol photons m^{-2} s^{-1} PPFD (saturating light). Each plant value is the average over five individual measurements under stabilized chamber conditions.

The *WUEi* (intrinsic Water Use Efficiency) was calculated as the instantaneous CO_2 assimilation (*A*) and stomatal conductance (*gs*) ratio (*WUEi =A*/*gs*) (Osmond et al 1980) and estimated by carbon isotope composition ($\delta^{13}C$) values (see below).

Carbon isotopic composition and leaf structural characteristics

Terminal leaflets used for leaf gas exchange measurements were harvested before rehydration step, oven dried and reduced into powder as described above for stomatal density, LMA (leaf masss per area), nitrogen content and $\delta^{13}C$ analysis.

Stomatal density was estimated for all plants following a modified procedure from Thomasset et al, (2011). Stomata numbers were then counted for each leaf on 5 square area (0.613 mm^2 each), and the mean value obtained was used to compute each plant stomatal density. Each leaflet area was measured using an area-meter (Delta-T Devices® Cambridge UK) and the dried biomass was obtained by oven drying (48h at 60°C) to determine LMA. The biomass was reduced into powder with a MM300 mixer mill (Retsh® Haan, Germany) and used for nitrogen content and total organic matter $\delta^{13}C$. Carbon isotopic discrimination ($\Delta^{13}C = [\delta^{13}C_{air}/\delta^{13}C_{leaf}]-1$) was calculated as described by Farquhar et al. (1982b). $\delta^{13}C_{air}$ was measured 3 times during the experiment (On 16th and 30th of June, and 18th of July with two glass air balloons each time). $\delta^{13}C$ on leaf and air were measured using a mass spectrometer (VG Optima®, Fison,

184 Villeurbane, France) combined to an elementary analyser (Flash EA, Thermo Scientifique®,
185 Courtaboeuf, France).

186 *DNA extraction and individual genotyping*

187 Total DNA was extracted from leaflets kept at -80°C using the NucleoSpin® Extract II
188 kit following manufacturer's instructions (Macherey-Nagel®, Germany). Sixteen SSR (single
189 sequence repeat) markers (Brachet et al. 1999, Lefort et al.1999, Aggarwal et al. 2010, Gérard et
190 al. 2012), were used in a genotyping experiment on total DNA (INRA, UMR 1095 GDEC
191 Clermont-Ferrand, France) of sixteen plants per population.

192 *cDNA-AFLP Analysis*

193 Total RNA was prepared from one leaflet per plant with TRIzol® reagent following
194 manufacturers' guidelines. cDNA synthesis was performed following a modified Vuylsteke et al.
195 (2007) protocol.

196 5µg (pool of 1 µg of 5 individuals from each population) of total RNA were incubated for 2 h at
197 42°C in 50 µl of first strand cDNA synthesis (1.7µM biotinylated oligo-dT primer 500µM dNTP,
198 10mM dithiothreotol (DTT) and 240U SuperScript™ II RT) . 32 µl of second strand synthesis
199 mix (187.5µM dNTP, 375µM DTT, 0.1 U of *E. coli* DNA ligase, 0.01 U Ribonuclease H and 0.3
200 U DNA polymerase I) were added to the reaction mixture and incubated for 1 h at 12°C followed
201 by 1 h at 22°C Vuylsteke et al. (2007).

202 AFLP analysis was performed by EUROFINS® Scientific using a Vos et al. (1995) and
203 (Vuylsteke et al. 2007) modified protocols. Double-stranded cDNA was digested by *EcoRI*
204 restriction enzyme and 3' *termini* were recovered by biotin binding on streptavidin-coated beads
205 (Dynabeads®). After the second digestion with *MseI* restriction enzyme, released restriction

fragments from the beads were ligated with *EcoRI* and *MseI* adapters. Selective pre-amplification and amplifications were carried out using Eco+A/Mse+C primers (pre-amplification), and E13/Mse+C, E41/Mse+C, E13/M15 (amplifications) primers. All reagents were purchased from Life technologies® except restriction enzymes which were from Thermo Scientific® Life technologies.

Statistical analysis

Individual variations of *A*, *gs* and *WUEi* obtained during the leaf gas exchange measurements (five plants x six populations x 3 water treatments) were analyzed according to the populations they belong to and the water status through a linear model. To ensure homoscedasticity and normality of the residuals, a Box-Cox power transformation (Box & Cox, 1964) was applied to the datasets (*A*, *gs*, *WUEi*) as indicated by the Y_{ijk} formula (see below). The λ value was computed for each dataset using a maximum likelihood approach (See supplementary material S2). A linear model was designed to analyze the subsequent transformed dataset. It considered both main and the interaction effects as indicated by Y_{ijk} formula which corresponds to the transformed response variable of the k^{th} individual of the i^{th} population under the j^{th} hydric status. α is the population effect, β the water treatment effect, ($\alpha \, x \, \beta$) the interaction and ξ the residual error term. Since individuals were randomly chosen for each measurement we cannot consider an individual effect. Multiple means comparisons among effect levels were made using Tukey HSD (honestly significant difference).

$$Y_{ijk} = \alpha_i + \beta_j + (\alpha \times \beta)_{ij} + \xi_{ijk}$$

$$Y^{(\lambda)} = \begin{cases} (Y^{\lambda} - 1)/\lambda & (if\ \lambda \neq 0) \\ \log(Y) & (if\ \lambda = 0) \end{cases}$$

Morphological measures, growth rates and leaf characteristic differences among populations were analyzed using one way ANOVAs test coupled with Tukey HSD tests for levels comparisons when residuals normality and homoscedasticity assumptions were fulfilled. Otherwise, Kruskall-Wallis ranking tests were computed using a Bonferroni correction for multiple tests.

We computed non-supervised classification analyses for which we imposed 2 clusters (one for each species, *F. excelsior* and *F. angustifolia*). We computed these analyses on the base of three datasets: i) morphological and growth measures (Height, diameter, number of internodes, LMA, stomatal density, leaflet area and weight, growth rates in height and diameter), ii) genetic markers (SSRs) and iii) the combination of the two previous datasets. We used the 96 individuals of which we extracted the genotypes. The computations were conducted using the DAPC method (Jombart *et al.*, 2010), which consists in the succession of a principal component analysis (PCA) followed by a discriminant analysis (DA) on the projections in the most relevant PCA axis. Prior assignation was computed using a k-means method on the most relevant PCA axis.

All computations were conducted using R 2.14.1 software (R Development Core Team. 2012, Vienna, Austria) and both ADE4 (Dray & Dufour, 2007) and ADEGenet (Jombart, 2008) packages for classification.

Results

Plant growth, and structural characteristics

At the end of the experiment (i.e. after Rehydratation step), the population Fe1 exhibited the smallest individuals with significantly lower heights and internodes numbers and less leaves

than all other populations (Table 2). Even if not significantly different from all other populations, Fa1 tended to display the larger individuals with maximum values for all morphological measurements of aerial organs. There were significant differences between *Fa* and *Fe* populations for the basal diameters, the number of internodes, the number of leaves, (their LMAs, the number of leaflets and their surfaces as well as the stomatal density) (Table 2). Thus on the basis of morphological characteristics, the global trend tended toward bigger individuals in *F. angustifolia* and smaller for *F. excelsior*, with, on the one hand, Fa1 and Fa2 populations and, on the other hand, Fe1 and Fe2 populations being closer between them than to other populations. Hybrid populations were in between, being alternatively closer to *Fad* or *Fe* populations with intermediate values (Table 2). However the *F.excelsior* populations exhibited a larger root system than *F. angustifolia* populations with smaller root: shoot ratios for these latter ones. In terms of growth, whereas height growth rates were very contrasted between F. angustifolia and F. excelsior, with lower values for Fe1 and Fe2 than for Fa1 and Fa2 populations (only significantly different for Fe1), the differences between the 2 groups in terms of radial growth rates were weaker. However the rank of populations was the same with Fa1 populations growing the faster and Fe1 population growing the slower (Table 1). Finally, we did not observe any significant differences in terms of leaf nitrogen content and Δ13C for all populations. All Fa populations are distinguished from all others by a higher LMA. The stomatal density showed an important gradient among populations (with significant differences) Fe1 has got the lowest values whereas Fa 1 has got the highest (3.2 times fold than Fe1).

The classification of individuals based on morphological and growth characteristics into 2 clusters led to assignation of Fe1 and Fe2 populations to the *Fraxinus excelsior* group and Fa2, Fa1 and Hy2 populations to the *Fraxinus angustifolia* group. Hy1 population exhibited a more contrasted assignation with individuals mainly belonging to the *F.excelsior* group and others to

the *F.angustifolia* group (Figure X). This was congruent with the DAPC classification based upon genetic markers only except that in this latter case Hy1 population was unambiguously assigned to the *F. angustifolia* cluster (Figure X2). Finally when combining genetic and morphological measurements, it resulted in a more nuanced classification than with genetic data only but more sharped than with morphological data only (Figure X3). This combined approach was more close to the prior classification of the populations according to the field observations and was less dependent on the genetic markers that were chosen for the analysis.

Predawn water potential and leaf gas exchange.

We observed no difference on leaf gas exchange (*A*, *gs* and *WUEi*) over time on control plants indicating no seasonal variations of the measures (not shown). Before the water deficit treatment (BD), using the same dataset as for the classification (n=42), we observed a significant and positive correlation between *A* and *gs* (11.02; $p=5.8^{e-3}$). This relationship was constant over populations. However we did not observe any significant correlation between *A* and the stomatal density, all the variations of *A* being explained by the populations plants belong to. During the water deficit experiment (n = 90), water treatments had a significant effect on gs ($F = 49.98$; $df = 2$; $p < 10^{-4}$), *A* ($F = 49.41$; $df = 2$; $p < 10^{-4}$) and *WUEi* ($F = 50.87$; $df = 2$; $p < 10^{-4}$). We observed a significant differentiation in *gs*, *A* and *WUEi* between treatments BD and WD for each population except for Fe1 population (Figure 2, supplementary material). Contrarily we observed a total recovery between BD and R with no significant differentiation in *A* and *WUEi* for all populations, and all populations except Fa1 for gs. The Fe1 population was the only one to differ significantly in all components of gas exchange between WD and R whereas Hy2 exhibited a significant differentiation only for *A*. The *gs* level differed significantly only between the following populations pairs Fa1 *vs* Fe1, Fa1 *vs* Fe2, Fa2 *vs* Fe1 under the BD treatment. For

295 *A*, Fa1 *vs* Fe1, Fa2 *vs* Fe1, Fe1 *vs* Hy1 and Fe1 *vs* Hy2 differed significantly under the BD
296 treatment. Finally, only Fa2 and Fe1 populations differed significantly for *WUE* under the WD
297 treatment.

298 *Genetic markers*

299 Leaf transcriptome profiles of ash population under study were compared in order to
300 detect transcriptional changes in response to water stress conditions. Leaves were harvested from
301 five individuals for each population submitted to three watering conditions: control (before
302 deficit treatment), maximum deficit water treated and rehydrated plants. RNA was extracted and
303 used for cDNA synthesis. Transcriptome profiles were generated by a cDNA-AFLP protocol as
304 described in Material and Methods followed by a fluorescence-based automated capillary
305 electrophoresis. Electrophoregrams comparison of selective amplification performed with three
306 primer combinations by fluorescence presence, absence or intensity variation, and showed
307 distinct expression patterns between populations and between treatments. AFLP fragments with
308 sizes lower than 50 bp and those showing fluorescence under threshold were not retained.
309 Results analyse revealed 120 polymorphic markers with sizes ranged between 50 and 450 bp
310 (not shown).

311 Investigations focused on thirty of them showing differential expression both among trees
312 and across water treatment levels. These AFLP markers were excised from polyacrylamide gels
313 and ten were successfully reamplified and sequenced (supplementary material S1).

314 Comparison by basic local alignment search tool (BLAST) program (Altschul et al.,
315 1990), with GenBank database deposited sequences revealed sequence similarity for six of them.
316 Results showed genes involved in some major biological pathways as photosynthesis or protein
317 translation and in responses to stress. Four sequences were similar to Rubisco carboxylase small

chain 1B, 60S ribosomal protein L34-1, Ferredoxin--NADP+ reductase and Metallocarboxypeptidase inhibitor (Table 3).

Discussion

Genetic assignments of populations and ecophysiological characterization of ash populations

Genetic analysis revealed a continuum towards our *Fraxinus* populations sampled across France for this study. *F.excelsior* populations exhibited a clear genetic assignment. Firstly, we could see *F. excelsior* populations (Fe1 and Fe2) genetically quite well assigned (Figure 1) and exhibiting a whole bunch of ecophysiological characteristics in accordance with genetic assignment with low values of height, growth rate, and leaf gas exchange without implied water deficit (*A*, *gs*, *WUEi*, Figure 2). Secondly, hybrid populations are, as expected, a heterogeneous genetic mix between the Mediterranean and Northern populations sampled here, nevertheless Hy2 population showed clear assignment to *F.angustifolia* population (Figure 1). This latter is consistent with previous morphological observations and genetic studies in the field (Gérard et al. 2006, Thomasset et al. 2011) except for Hy2 whose exhibit a well establish intermediate morphology and viewed as a "typical intermediate" hybrid between *F.excelsior* and *F.angustifolia* (pers. obs.). Despite this last concern, ecophysiological data are in accordance with genetic classification, where they found to be intermediates between *F.excelsior* and *F.angustifolia* populations. Where Hy1 population was close to Fe2 in all ecophysiological measurements, except for leaf number where Hy2 is much closer to *F.angustifolia* populations on a genetic basis (Figure 1). However, for this last population, it was not strictly consistent with all ecophysiological data without water deficit treatment. For some measurements this population was closer to strictly, *F.excelsior* populations like *A*, basal diameter and leaf number.

On the other hand, some ecophysiological measurements tend to be closer to *F.angustifolia* (*gs*, root-shoot ratio and growth rate). It remained unclear at that time what caused this dichotomous between these ecophysiological measurements, despite the genetic results suggesting a closer *F.angustifolia* "assignment" for this population. A hypothesis that could explain this pattern is recent events of hybridization (introgression) for this population, as hybrids can display a mosaic of morphology from their parental species in the first's generations. (Rieseberg and Ellstrand 1993) However, it seemed not to be the case because the Loire region is where oldest hybridizations events in France occurred (Fernandez-Manjarrés et al. 2006).

To conclude when looking on how *F.angustifolia* populations (Fa1 and Fa2) behave on both ecophysiological measurement and genetic clustering, they showed good genetic assignment among individuals (Figure 2). This clear genetic clustering among our *Fraxinus angustifolia* populations reflected also on ecophysiological measurements with close values on most of measurements done between these two populations (Table 2). Small differences in values were noticed in *A*, leaflet surface, stomatal density and *gs*. Major differences in values were found in height and growth rate. To help species classification and hybrid discrimination, our results showed that LMA did not serve, as a good ecophysiological criterion for our *Fraxinus* populations as only two *F.angustifolia* populations were significally different from *F.excelsior* for this trait. Furthermore, LMA was not correlated with genetic data suggesting this trait is not an useful discriminant tool in this species complex and furthermore did not ground on a genetic basis in *Fraxinus* populations tested here. This later result is contrary of what have been expected regarding the strong differences measured on leaflet area. To conclude, we found surprisingly low LMA values compared to literature (Barthod et al. 2004). However, these authors have done their measurements on both combined leaves and leaflets (with means values ranging from 40 to 70 g m^2) on undetermined aged *F. excelsior* trees, and leaving us with an

365 increasing difficulty to conclude if our lowest values (around 35 g m² in mean) are representative
366 in this species complex.

367 *Ecophysiological response of ash population at seedling stage facing in water*
368 *constrained and after rehydratation*

369 Although water deficit applied here is not very strong (see Ψ_{pd} values), it has triggered a
370 shift in both assimilation and stomatal conductance that was not totally relieved for all *Fraxinus*
371 populations when we rewatered the plants for 3 days. When firstly focusing on *F.excelsior*
372 populations' behavior in our experimental setup, different strategies were observed among
373 populations facing water deficit. *F. excelsior* populations tend to reach similar values at before
374 water deficit period and while rehydrated in both *A* and *gs* and exhibit thus a more isohydric
375 behavior. However, we have not measured leaf midday water potential to asses this finding, as it
376 is used to define isohydric and anisohydric behavior (Jones et al. 2007). However this water
377 behavior classification is ecologically sounded as *F.excelsior* exhibit slow growth in early stages
378 and is found on a very large type of habitats, thus exhibiting a broad response between ecotypes
379 to an induced water constraint (i.e. waterlogging, Jaeger et al. 2009). To our knowledge, little is
380 known based on literature on ashes water deficit responses. Measurements were mostly carried
381 out on adult *F.excelsior* trees only, and in the field on previous studies (Besnard et al. 1990,
382 Carlier et al. 1992, Marigo and Peltier 1996, Stöhr & Lösch 2000) and revealed a strong
383 resistance as Ψ_{pd} values could reach -4.0 MPa. Furthermore, mannitol accumulation in xylem is
384 used by *F.excelsior* trees as a mean to counteract detrimental effects of drought stress. However
385 there are some ecological pieces of evidence that *F.excelsior* trees are plastic facing water deficit
386 constraint (Rameau et al. 1989, Marigo et al. 2000, Jaeger et al. 2009). Contrary to Jaeger et al.
387 2009, we find a relative homogeneous ecophysiological response between both *F.excelsior*

388 populations that comprised both plain and mountainous populations used here. Although, it is too
389 straightforward concluding that point, as we do not share the same geographical origin of our
390 *F.excelsior* saplings. Secondly, when looking closer at hybrid population's behavior facing water
391 deficit they displayed a dichotomous pattern that are in respect with their closest genetic parental
392 species. Hy1 which is close to *F.excelsior* populations tend to react to a water deficit in a same
393 way. While Hy2 populations tend to react much more like *F.angustifolia* populations. Finally,
394 for *F.angustifolia* populations, they did not reach a similar level in *A* and *gs* and seemed to need
395 a longer time to recover fully after an imposed water deficit period, this trend are pretty close to
396 anisohydric behavioral plants (Jones, 2007) as they could trivially viewed as "risk-taking plants"
397 (Sade et al. 2012). However, this anisohydric behavior could be worthwhile under mild-water
398 deficit scenarios and is pretty matched to the ecology of *F.angustifolia* (it is classified as an
399 "ecological niche opportunist" (Fernandez-Manjarrés pers.com.). However it could be a risky
400 strategy in a sense that it could turn up to be unadvantageous under hard water deficit scenarios
401 that are forecasted for the next decades (IPCC, 2007). Furthermore *F.angustifolia* modeled
402 distribution area limits in Europe seemed to be strongly restricted by the number of frost days in
403 January and summer precipitations (Gérard et al. 2012, and Fernandez-Manjarrés pers. com.).
404 Thus we can basically classified *F.excelsior* populations 'behaviour as isohydric and
405 *F.angustifolia* populations' as anisohydric, however hybrid behavior was not intermediate
406 between parental one but close to their genetic relative. (i.e. isohydric for Hy1 and anisohydric
407 for Hy2). When focusing on *WUEi* as an integrator of gas exchange response, *F.excelsior*
408 populations are efficient when water is fully available (around 80 in mean) but failed to rise up
409 their *WUEi* mean values at the *F.angustifolia* populations' level for maximum water deficit
410 period (around 135 in mean against 100 for *F.excelsior* populations, Figure 2D). *F.angustifolia*
411 populations seemed more "plastic" to the water deficit applied here. These populations showed

412 relatively low values of *WUEi* (around 50 in mean) when water is available, but were able to
413 restrict their *gs* without a dramatic decrease in assimilation when a water deficit occurred. This
414 trend were reversed when we rehydrated all plants for 3 days as *F. angustifolia* populations tend
415 not to be as efficient as *F.excelsior* in respect of water use. This latter *WUEi* pattern is
416 ecologically coherent with *F.angustifolia* habitats, as it is found on riparian areas in south east
417 France, where water availability is very fluctuant both in time and space. However, all of our
418 ecophysiological measurements were carried out at sapling stage, and the adaptive ecological
419 strategies that *Fraxinus* trees exhibit here will here remaining to be observed on much aged trees.
420 Finally, these characteristics could be very different on adult trees depending on ecological
421 history organism have encountered during they developmental phase, as it has been shown for
422 *Populus* clones by Raj et al. (2011).

423 *Genetic link with ecophysiological variables*

424 A correlation between ecophysiological data was found for this study when comparing
425 the prior probability to be classified as an *F.angustifolia* individual. However the sub dataset
426 where the individual link between ecophysiological measurements and genetic clustering could
427 matched, was too small to have a strong general picture on this feature, as only 36 individuals
428 were parried for these correlations (based on rank). Graphics of ecophysiological traits tested are
429 provided in supplementary material (supplementary material S1). Despite this last issue, this
430 result confirmed and strengthened the fact that much ecophysiological and morphological
431 characterization among ashes species complex shares a genetic basis. This result is
432 morphologically in accordance with previous studies (Gérard et al. 2006 and Fernandez-
433 Manjarrés et al. 2006). It has been found for controlled hybrids from another study (Thomasset et
434 al., 2011), with heritability of traits (leaflet area, leaflet number, leaflet mass, number of teeth per

435 leaflet) depending on which mother were used (i.e. *F.excelsior* or *F.angustifolia*) to obtain F1
436 hybrid (asymmetric inheritance). However, it is first step, as few comparative studies on both
437 ecophysiological processes and gene expression were conducted to explore tree capability of
438 adaptation to abiotic constraints in species complexes (Bogeat- Triboulot et al. 2006, Cooke et al.
439 2007) and it is a rarest item that a good link between them was found. As an example, cavitation
440 resistance among European beech (*Fagus sylvatica L.*) populations has a non-genetic
441 determinism (Wortemann et al. 2011).

442 *Differential expression of cDNA-AFLP markers*.

443 Firstly, not much variation has been found among markers when we analyzed them to
444 choose interesting ones. Several genes were unraveled, but six out of ten have been already
445 discovered by another team on *F.excelsior* cDNA cloned using bud tissues (Leger et al. 2010,
446 unpublished results) as we find a very good sequence homology (> 95%), for six out of ten
447 markers sequenced (Table 2). Due to restriction in sequence length (200 bp) five sequences have
448 not been registered in Genbank® and thus could not have accession numbers (Table 2). We give
449 all eleven cDNA sequences revealed here in Supplementary material S1.

450 No genes directly involved in drought stress response were revealed, but one involved in
451 oxidative response, at the cellular level, were found (Ferrodoxin NADP+ reductase). No records
452 have been found through NCBI database for these sequences on genes already recorded in tree
453 model organisms (e.g. *Populus*). However we found, matching with *Arabidopsis thaliana*
454 records. A strong sequence homology with Rubisco small chain 1B in *A. thaliana* was found.
455 This marker is not expressed in *F.angustifolia* population, however finding a biological
456 explanation for this feature is somewhat contradictory, because an increase in sub-unit Rubisco
457 concentration could be a oxidative stress response due to Rubisco fragmentation (Luo et al.

458 2002, Hajheidari et al. 2005). On the other hand, in rice, Rubisco can serve as a nitrogen store,
459 especially during periods when less protein is needed for photosynthetic CO_2 assimilation
460 (Horton & Ruban 2005). However we could, in light of our results, reject this latter type of
461 storage because we haven't found any nitrogen content difference in our ashes population (i.e.
462 difference in *F.angustifolia* from other populations). A FNR-like (Ferredoxin-$NADP^+$
463 Reductase) gene sequence was found in *A. thaliana*. FNR are ubiquitous flavoenzymes that
464 deliver NADPH or low potential one-electron donors (ferredoxin, flavodoxin) to redox-based
465 metabolisms (Carrillo & Ceccarelli, 2003). Thus, are critical in protection against an oxidative
466 stress response. Its expression pattern is constant in our ashes regarding water deficit except for
467 Hy2 in water deficit period. A major biological protein (60S ribosomal protein) involved in RNA
468 and DNA biding was found (Table 2). Furthermore, these sequences should be cross validated
469 with real time qPCR analysis for individuals in a future work. Meanwhile, these sequenced
470 markers could turn up to be very helpful in discriminating processes of hybridization in *Fraxinus*
471 *sp.* complex in the field, completing existing markers developed in our team, and lead to more
472 precise hybrid discrimination. As the number of markers required for discriminating hybrids *in*
473 *natura* tend to rise exponentially with introgression events, especially after several generations of
474 backcrossing (Rhymer & Simberloff 1996) and could be as up to 70.

475 Around twenty markers among the 145 were hardly found to fit both criteria (differential
476 expression among populations and water deficit treatments) for all *Fraxinus* populations. This
477 suggests ourselves, that cDNA-AFLP methodology proven not to be as efficient in our non-
478 model organism we were expected it will regarding Breyne 2003, Vuysteke 2007 and
479 Korpelainen & Kostamo, 2010. An improved and suitable methodology (Shotgun, 454
480 pyrosequencing, high-throughput methods…) should be implemented for futures studies to
481 unveil gene of drought tolerance/resistance in *Fraxinus sp.* complex.

Hybrid potentialities

Hybrids are common in many plant species (Rieserberg et al. 2003) and could promote new genotypes that are more locally adapted than parental species (Mallet et al. 2007) and seen often as "natural laboratories" in an evolutionary perspective (Hewitt 1988) opening an alternative pathway to faster evolution process (Mallet et al. 2007). Furthermore, they could have phenotypes outside the range of parental species due to complementary allelic effect (Lexer et al. 2004). It is firmly the case for ashes, as pointed out by Gérard et al. 2006a, which worked on two ash hybrid zones located in France across the Loire basin where Hy2 population seeds were collected. In this study, across the Loire basin, hybrids produced more flower and fruits the two years of observations. Thus, hybrids trees could have a significant ecological and evolutionary strategic advantage in the field that are in accordance with our results, which they exhibited intermediate morphology and values on most of ecophysiological measurements. However, hybrids populations tested, showed contrasting behaviour when we applied a slight water deficit at sapling stage, Hy1 tend to react like an *F.excelsior* population while Hy2 tend to display an *F.angustifolia* behaviour. Thus, hybrids did not exhibit a "heterosis" response when implement a water constraint. Furthermore, we do not observe an "intermediate response" to water deficit. This latter result is unexpected for them, regarding their observed advantages in field conditions (Gérard et al. 2006b). However, they have displayed a variability of ecophysiological response that could turn up to be an interesting feature for potential use in forestry programs, because an often-highlighted risk mitigation strategy is the optimization of processes against maximization. This variety of ecophysiological response could be explained by the fact that we do not have knowledge on introgression levels in our sampled trees, except with the insights of the genotyping analysis process. In accordance, we did not have any information on hybrids generations (e.g. F1). These are major concerns of our finding on hybrids, and restrict the

predictability of our results in field conditions. On the other hand, we used "natural" hybrids populations and sampling was done in a way (i.e. maximizing the genetic diversity) that it gives us an broad view of genetics and ecophysiological characteristics of each hybrid population behaviour used here, which can be use directly by forest managers without further efforts (e.g. controlled crosses to obtain hybrids).

Hybrids response on that study

Hybrid have also a major advantage in our case, is that they do not exhibit seed dormancy which is a common feature of *F.excelsior* seeds (can last up for six years, Gérard et al. 2006b), except for Hy1 who is close in both behaviour and global morphology to common ash (Raquin C., pers. com.). Their relative rapid growth (but inferior than "pure" *F.angustifolia* trees) gives us an ecological advantage at the sapling stage, which can outcompete "pure" *F.excelsior* saplings and represent promising perspectives for forest plantation programs using hybrid ashes. They can represent a potential stock of adaptive response, as they do not present extreme behaviour facing water deficit as parental species exhibit. Choosing one hybrids population from another one between the two tested here is a matter of risk/cost strategies and should be evaluated cautiously, in an ecological framework. A precedent exist in ashes where seeds of Hy1 population where misleading classified as true *F.excelsior* trees by foresters, and transplanted in Ireland. In this newly environment, they exhibit a much-curved stem that turns out unsuitable for noble wood usages, thus assisted migration programs that are building nowadays, should be done with cautiousness. Thus, despite clears hybrid ashes advantages, displayed in this study (no seed dormancy, fast growth) we argue that small transplantation experiments should be done, before planning whole plots reforestation with ashes hybrids trees.

Acknowledgements

529 JR is very grateful to the following people who greatly helped me during this work: Jean Dufour
530 (INRA, Orleans) for providing seed material from the French locations studied. Great help with
531 greenhouse culture chamber and sapling care was provided by Lionel Saunois and Amandine
532 Dubois (Université Paris Sud). I wish to thank also Daniel Berveiller (CNRS) from introducing
533 me to the Li-cor 6400®. Caroline Lelarge (CNRS) and Marlène Lamothe (CNRS) at the
534 "Platform Metabolism-Metabolome" IFR87 for isotopic measurements.

535

References

Agrawal A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294:** 321–6.

Aggarwal RK, Allainguillaume J, Bajay MM, Barthwal S, Bertolino P, Chauhan P, Consuegra S, Croxford A, Dalton DL, Belder E, Díaz-Ferguson E, Douglas MR, Drees M, Elderson J, Esselink, GD, Fernández-Manjarrés JF, Frascaria-Lacoste N. *et al*. 2010. Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2010-30 September. *Molecular ecology resources* **11:** 1219-222.

Aitken SN, Yeaman S, Holliday J, Wang T, & Curtis-McLane S. 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* **1:** 95-111.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215:** 403-410.

Allen DC, Macalady KA, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, & Hogg EH. 2011. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259:** 660-684.

Anderson BT. 2011. Intensification of seasonal extremes given a 2°C global warming target. *Climatic Change* **112:** 325-337.

Arca M, Hinsinger DD, Cruaud C, Tillier A, Bousquet J, & Frascaria-Lacoste N. 2012. Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar Fraxinus. *PloS one* **7:** e34089.

Barton NH, Hewit GM. 1989. Adapation, speciations and hybrid zones. *Nature* **341:** 497-503.

Besnard G, Carlier G. 1990. Potentiel hydrique et conductance stomatique des feuilles de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) du Haut-Rhône français. *Annals of forest science* **47:** 353-365.

Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombaut S, Vanderhaeghen R. *et al*. 2003. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular genetics and genomics* : MGG, **269:**173–9. Doi: 10.1007/s00438-003-0830-6.

Bogeat-Triboulot MB, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T, Altman A, Hausman JF, Polle A, Kangasjärvi J, & Dreyer E. 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in Populus euphratica, a poplar growing in arid regions. *Plant physiology* **143:** 876-92.

Boisvenue C, Running SW. 2006. Impacts of climate change on natural forest productivity evidence since the middle of the 20th century. *Global Change Biology* **12:** 1–2.

Box GEP, Cox DR. 1964. An analysis of transformation. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* **26:** 11-252.

Brachet S, Jubier MF, Richard M, Jung-Muller B, Frascaria-Lacoste N. 1999. Rapid detection of microsatellite loci in the common ash Fraxinus excelsior using 5′ anchored PCR. *Molecular Ecology* **8:** 160-163.

Bréda N, Badeau V. 2008. Forest tree responses to extreme drought and some biotic events: Towards a selection according to hazard tolerance? *Comptes Rendus Geoscience* **340:** 651-662.

Carrillo N, Ceccarelli E. 2003. Open questions in ferredoxin-NADP+ reductase catalytic mechanism. *European Journal of Biochemistry* **270:** 1900–1915. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03566.x.

Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R. *et al*. 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491:** 4–8.

Cooke JEK, & Weih M. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *The New phytologist* **167:** 19-30.

Day ME, Greenwood MS, & Diaz-Sala C. 2002. Age- and size-related trends in woody plant shoot development: regulatory pathways and evidence for genetic control. *Tree Physiology* **22:**507-513.

Dobrowolska D, Hein S, Oosterbaan A, Wagner S, Clark J, & Skovsgaard JP. 2011. A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. *Forestry* **84:** 133-148.

Dobzhansky T, Hecht MK, Steere WC. 1968. On some fundamental concepts of evolutionary biology. *Evolutionary biology volume 2* (1st ed.). New York: Appleton-Century-Crofts. 1–34.

Dray S, & Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22:** 1-20.

Farquhar GD, O'leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon discrimination and the inter-cellular carbon-dioxyde concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9:** 121-137.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14:** 2611-2620.

Fernandez-Manjarrés JF, Gerard PR, Dufour J, Raquin C, & Frascaria-Lacoste N. 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular ecology* **15:** 3245-57.

Gérard PR, Fernandez-Manjarrés J, & Frascaria-Lacoste N. 2006a. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl *Molecular ecology* **15:** 3655-3667.

Gérard PR, Christian R, & Frascaria-Lacoste N. 2006b. New insights in the recognition of the European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl as useful tools for forest management. *Annals of Forest Science* **63:** 733–738.

Gutschick VP, BassiriRad H. 2003. Extreme events as shaping physiology, ecology, and evolution of plants: toward a unified definition and evaluation of their consequences. *New Phytologist* **160:** 21-42.

Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghian SY, Ober ES, & Salekdeh GH. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* **5:** 950–60. doi:10.1002/pmic.200401101

Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M, Pastorelli R, Salvini D, Paule L, Frascaria-Lacoste N, Hardy, OJ, Vekemans X, & Vendramin GG. 2004. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular ecology* **13:** 3437-3452.

Hewitt GM. 1988. Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in ecology and evolution* **3:** 158–167.

Horton P, Ruban A. 2005. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of experimental botany* **56:** 365–73.

Jaeger C, Gessler A, Biller S, Rennenberg H, & Kreuzwieser J. 2009. Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. *Journal of experimental botany* **60:** 4335-4345.

Jones HG. 2007. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of experimental botany* **58:** 119–30.

Jump AS, Penuelas J. 2005. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change, *Ecology Letters* **8:** 1010-1020.

Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **24:** 1403-1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129

Jombart T, Devillard S, Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* **11:** doi:10.1186/1471-2156-11-94

Kirschbaum MUF. 2004. Direct and indirect climate change effects on photosynthesis and transpiration. *Plant biology* **6:** 242–253.

Knight C, Heiko V, Kroymann J, Shumate A, Witsenboer H, & Mitchell-Olds T. 2006. Expression profiling and local adaptation of *Boechera holboellii* populations for water use efficiency across a naturally occurring water stress gradient. *Molecular ecology* **15:** 1229–37.

Korpelainen H, & Kostamo K. 2010. An improved and cost-effective cDNA-AFLP method to investigate transcription-derived products when high throughput sequencing is not available. *Journal of biotechnology* **145:** 43–6. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.10.006.

Krasensky J, Jonak C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks *J. Exp. Bot.* **63:** 1593-1608. doi:10.1093/jxb/err460

Lefort F, Douglas GC.1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer, Fraxinus, Prunus and Quercus*. *Annales des Sciences Forestières* **56:** 259–263.

Linhart YB. 1999. Variation in woody plants: molecular markers, evolutionary pro- cesses and conservation biology. *Molecular Biology of Woody Plants*. For. Sci. **64:** 341–74. Dordrecht: Kluwer Acad.

Luo S, Ishida H, Makino A, Mae T. 2002. Fe2+-catalyzed site-specific cleavage of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase close to the active site. *The Journal of biological chemistry* **277:** 12382–7.

Petit RJ, Hampe A. 2006. Some Evolutionary Consequences of Being a Tree, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37:** 187–214.

Mallet J. 2007. Hybrid speciation. *Nature* **446:** 279–83.

Marigo G, Peltier JP. 1996. Analysis of the diurnal change in osmotic potential in leaves of *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Experimental Botany* **47:** 763-769.

McLachlan JS, Clark JS, Manos PS. 2005. Molecular indicators of tree migration capacity under rapid climate change. *Ecology* **86:** 2088–2098.

Mottet A, Julien MP, Balent G, and Gibon A. 2007. Agricultural land-use change and ash (*Fraxinus excelsior* L.) colonization in Pyrenean landscapes: an interdisciplinary case study. *Environmental Modeling & Assessment* **12:** 4293-302.

O'Connor MI, Selig ER, Pinsky ML, & Altermatt F. 2011. Toward a conceptual synthesis for climate change responses. *Global Ecology and Biogeography*, **21:** 693-703.

R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.

Raj S, Bräutigam K, Hamanishi, ET, Wilkins O, Thomas BR, SchroederWS, Mansfield D, Plant AL, and Campbell MM. 2011. Clone history shapes Populus drought responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108:** 12521–12526.

Rameau JC, Mansion D, Dumé G. 1989. *Flore forestière française Tome 1, Plaines et collines*. Institut du développement forestier. ISBN 2-904740-16-3.

Raquin C, Jung-Muller B. *et al*. 2002. Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl). *Annals of Forest Science* **59:** 219-224.

Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T. *et al*. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **301:** 1211–6.

Rieseberg LH, Ellstrand NC. 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit Rev Plant Sci* **12:** 213–241.

Rhymer JM, Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst* **27:** 83–109.

Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M. 2012. Risk-taking plants: Anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *Plant signal behaviour*. **7:** 767-770.

Scholander PH, Hammel T. *et al*. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative pressure can be measured in plants. *Science* **148:** 339-346.

Stöhr A, Lösch R. 2004. Xylem sap flow and drought stress of *Fraxinus excelsior* L. saplings. *Tree physiology*, **24:**169-80.

Thomasset M, Fernandez-Manjarres JF. *et al*. 2011. Molecular and morphological characterization of reciprosal F1 hybrid (*Fraxinus excelsior* x *Fraxinus angustifolia*, Oleaceae) and parental species reveals asymmetric character inheritance. *International Journal of Plant Sciences* **172:** 423-433.

Vos et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* **23:** 4407-4414.

Vuylsteke M, Peleman JD Van Eijk MJT. 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature protocols* **6:** 399-413.

Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, Fumanal B, Alia R, Ducousso A. *et al*. 2011. Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree physiology* **31:** 1175–1182.

677 **Table 1**. Stand characteristics of the studied *Fraxinus* populations. The indicated abbreviations will be used in the
678 text to refer to the populations. (GPS coordinates, altitude is in m.asl).

Abbreviation	**Fe1**	**Fe2**	**Hy1**	**Hy2**	**Fa1**	**Fa2**
Locality name	La Preste	Saint-Gobain	Tavaux	Saint Dyé	Nidolerès	La Mole
Geographical position	42.24°N 2.28°E	49.36°N 3.23°E	47.05°N 5.38°E	47.69°N 1.56°E	42.32°N 2.51°E	43.23°N 6.54°E
Altitude (m)	1100	80	190	50	70	30
Climate	Mountainous	Temperate	Temperate	Temperate	Mediterranean	Mediterranean
Status in the species complex	*Fraxinus excelsior*	*Fraxinus excelsior*	hybrids	hybrids	*Fraxinus angustifolia*	*Fraxinus angustifolia*

679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697

Table 2. Mean plant and leaf (structural) characteristics for each *Fraxinus* population. Different superscript letters indicate significant differences (ANOVA, Pairwise Wilcoxon Rank Sum Test with Bonferroni correction for *P*-values, *P*-value< 0.05) among populations. Values are means +/- SE n=20 except for Root: Shoot ratio nitrogen content, number of leaflet per leaf (n=10) and $\Delta^{13}C$ (n=5). LMA is leaflet mass area.

Population	Fe1	Fe2	Hy1	Hy2	Fa1	Fa2
Parameter						
Plant morphological characteristics at the end of the experiment						
Height (mm)	480^{a}±30	569^{b}±32	798^{bc}±34	691^{bc}±37	992^{c}±44	853^{bc}±47
Basal diameter (mm)	7.15^{a} ±0.33	7.62^{a}±0.27	8.7^{b}±0.24	7.39^{a}±0.29	10.19^{b}±0.32	8.59^{b}±0.34
Internodes number	7.3^{a}±0.4	10.5^{b}±0.5	13.4^{c}±0.6	15.4^{c}±0.6	19.1^{d}±0.4	18.6^{d}±0.5
Number of leaves	13.9^{a}±1.4	24^{b}±2	29.4^{bc}±2.5	31.4^{bc}±2.8	44.3^{c}±1.5	40.1^{c}±4.7
Root : Shoot Ratio	1.03^{b}±0.12	0.84^{ab}±0.07	0.78^{ab}±0.08	0.59^{a}±0.06	0.58^{a}±0.03	0.56^{a}±0.18
Plant growth rates during the experiment						
Height growth rate (mm day^{-1})	5.39^{a}±1.3	6.87^{ab}±1.66	9.46^{bc}±2.17	8.38^{ab}±1.97	11.82^{bc}±2.79	10.16^{bc}±2.27
Radial growth rate (mm day^{-1})	0.076^{a} ±0.003	0.081^{a}±0.004	0.096^{ab}±0.004	0.080^{a}±0.004	0.116^{b}±0.004	0.091^{a}±0.005
Leaf structural (and biochemical) characteristics						
LMA (leaflet) (g m^{-2})	33.7^{a}±1.5	34.7^{a}±1.8	34.3^{a}±1.1	32.1^{a}±1.7	38.4^{b}±1.2	38.7^{b}±1.4
Number of leaflet per leaf	5.7^{a}±0.95	7.3^{b} ±1.22	9.6^{c}±1.63	6.6^{ab}±1.18	9.2^{c}±1.63	9.7^{c}±1.43
Leaflet surface (cm^2)	22.84^{c}±1.58	17.73^{b}±1.17	10.98^{ab}±0.70	7.94^{a}±0.58	7.24^{a}±0.45	5.86^{a}±0.44
Stomatal density (Number per mm^2)	72.8^{a} ±5.5	92.9^{ab}±5.1	134.7^{ab}±10.4	151.1^{b}±9.1	229.9^{d}±1.8	181.7^{c}±9.2
Nitrogen content (%)	3.1^{a}±0.19	2.9^{a}±0.12	3.2^{a}±0.15	3.0^{a}±0.13	3.0^{a}±0.12	3.30^{a}±0.17
Leaflet $\Delta^{13}C$ (‰)	22.95^{a}±0.15	23.38^{a}±0.24	23.29^{a}±0.40	23.44^{a}±0.44	22.61^{a}±0.44	22.79^{a}±0.54

703 **Table 3.** Genbank® accession number and BLAST® search result for cDNA-AFLP sequenced. Sequences shorter
704 than 200 bp were not submitted to Genbank® and were tagged "Not recorded". All markers' complete sequence was
705 displayed in Supplementary material S3.

Marker name	Genbank® accession number	E-value	Percentage of identity	Putative function in other species (from Genbank® Unigene® or Gene® information link)	Protein family in Genbank®
E41MseC-211	FR637668	1e-86	100%	Unknown	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B (*Arabidopsis thaliana*)
E41MseC-226	Not recorded	0.005	91%	Unknown	Uncharacterized LOC100251552 (*Vitis vinifera*)
E41MseC-285	KC236983	3e-123	100%	Unknown	60S ribosomal protein L34-1 (*Arabidopsis thaliana*)
E41MseC-356	KC236984	9e-155	92%	Hypothetical protein LOC100253534	Uncharacterized protein LOC100253534 (*Vitis vinifera*)
E13M15-217	Not recorded	2e-20	54%	Ferredoxin-NADP+ reductase (*Arabidopsis thaliana*)	Ferredoxin--NADP+ reductase (*Arabidopsis thaliana*)
E41MseC-266	KC236985	0.005	91%	Unknown	Unknown
E13M15-110	Not recorded	-	-	No correspondence	No correspondence
E41MseC-372	KC236986	4e-124	98%	Unknown	LOC100253534 uncharacterized predicted protein (*Vitis vinifera*)
E41MseC-146	Not recorded	0.12	31%	Unknown	Unknown
E41MseC-446	KC236987	0.000	100%	NitaCp091 hypothetical protein (*Nicotiana tabacum*)	Metallocarboxypeptidase inhibitor (*Medicago trunculata*)

706

707

708

Figure1. Posterior probability of membership in clusters using Evanno et al. (2005) method (i.e. that individual *i* is from population *k*) modified from Structure 2.3.4 for K=2. The prior probability for each population is 1/K (i.e. here 1/2). Each bar represents a single individual (n=91).

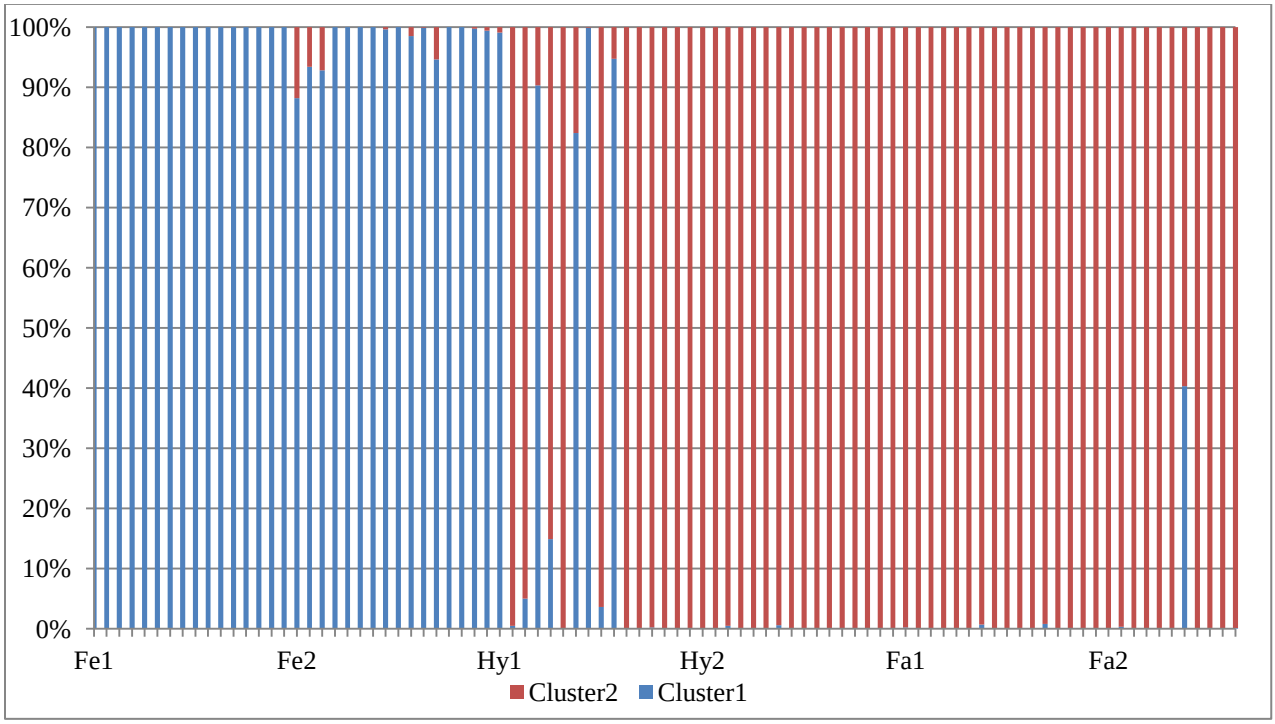
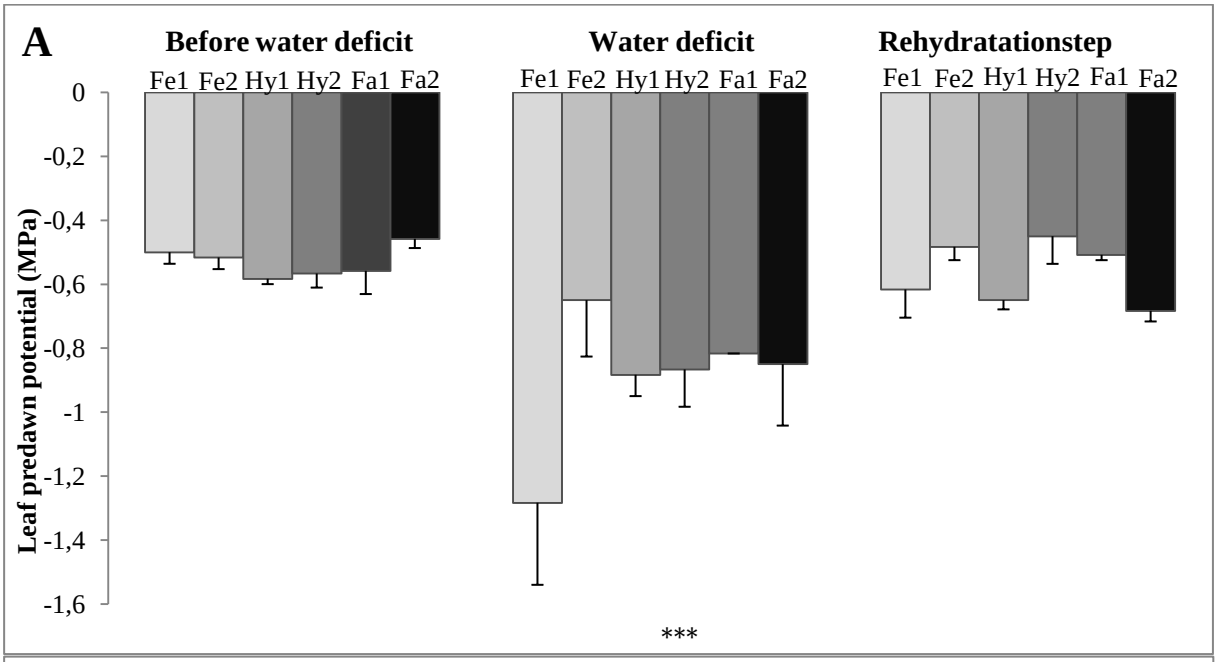
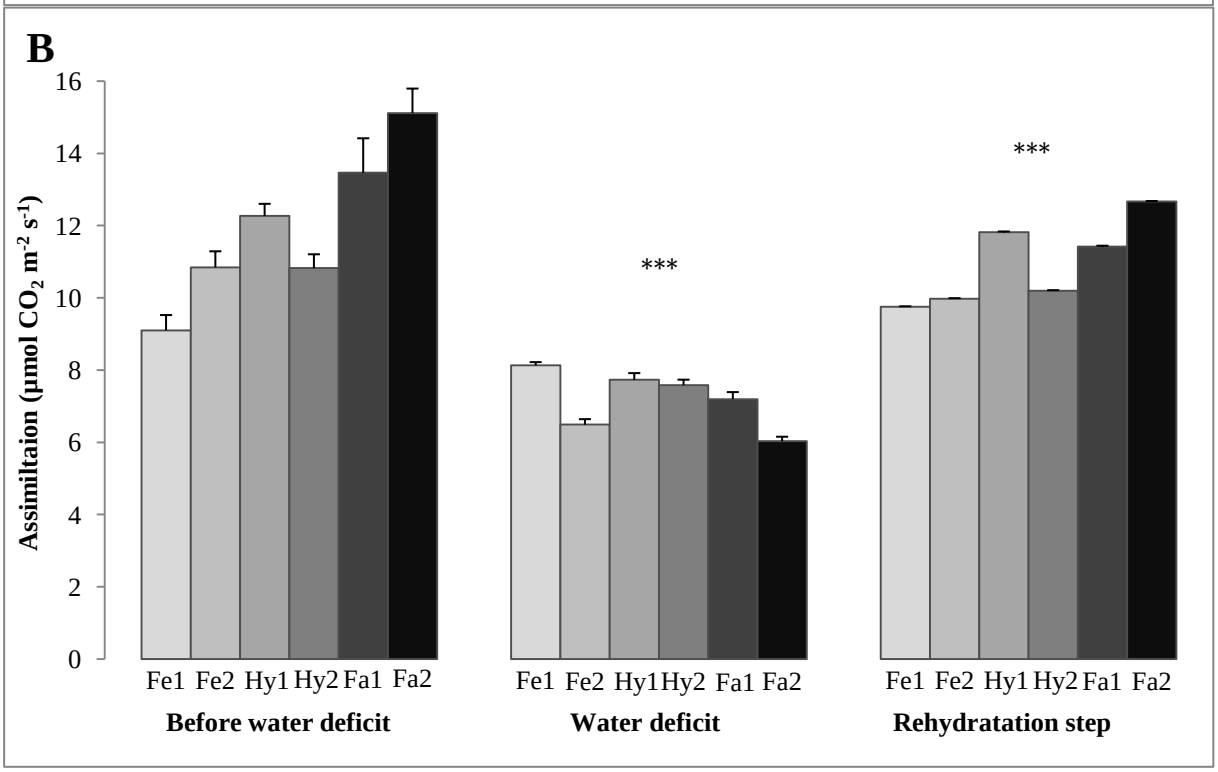
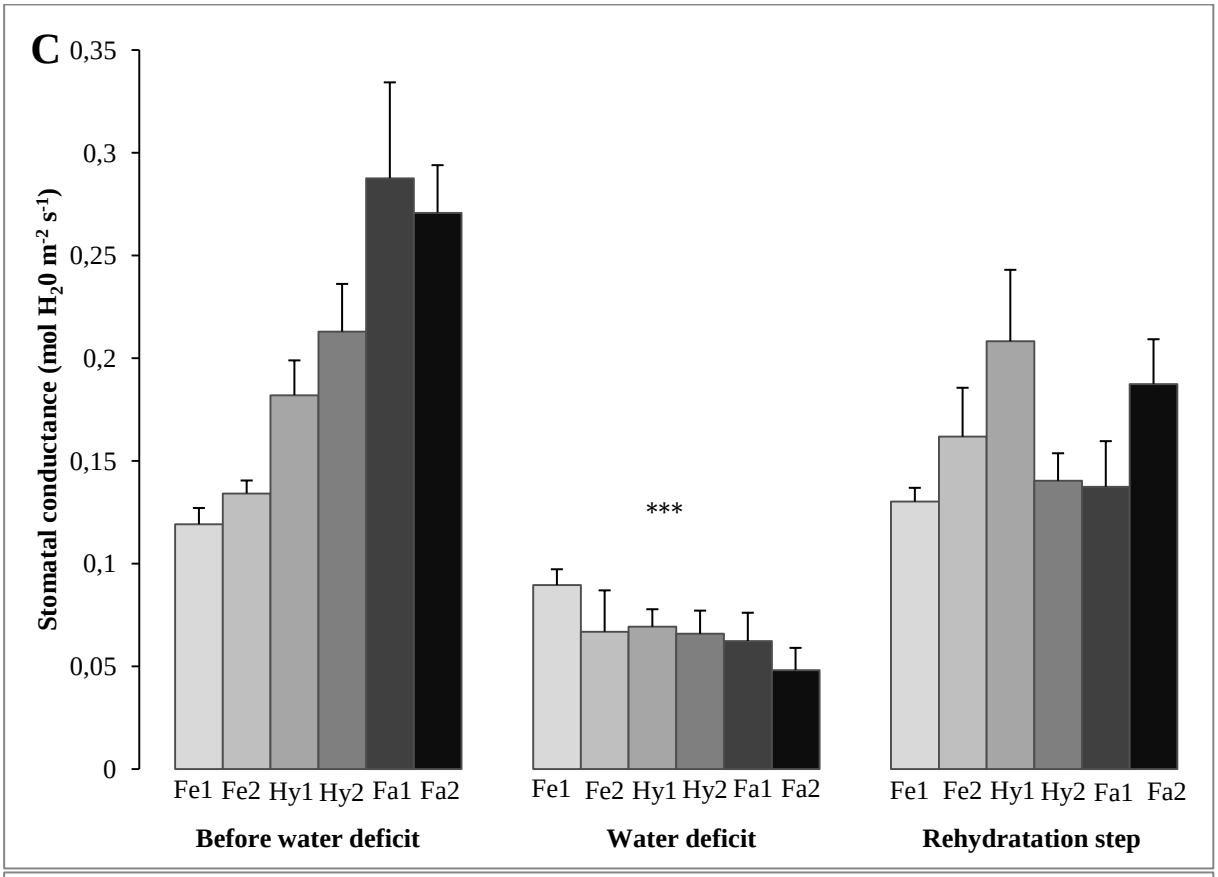


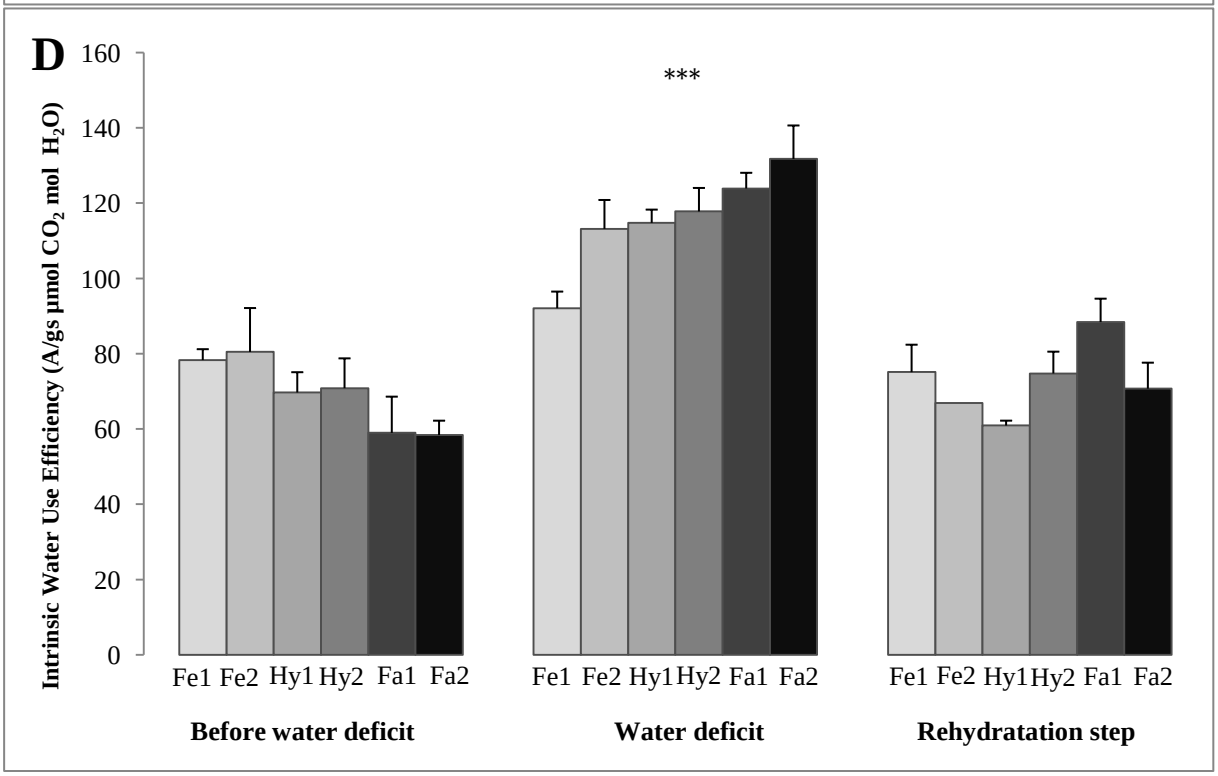
Figure2. Leaf predawn potential (ψ_{pd} ,A) assimilation (*A*) (B), stomatal conductance (*gs*) (C) , intrinsic water use efficiency (*A/gs*, D) for the 6 studied *Fraxinus* populations (Fe1, Fe2, Hy1, Hy2, Fa1 and Fa2) at three steps of the experiment (before water deficit, Maximum water deficit and after Rehydratation step). Values are given as mean + /- SE (errors bars). n=3 for predawn potential, otherwise n=5. Significant difference between water levels are marked with an asterisk * *P*-value < 0.05, ***P*-value < 0.01, ****P*-value < 0.001.






C
Stomatal conductance (mol H_20 m^{-2} s^{-1})
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
***
Fe1 Fe2 Hy1 Hy2 Fa1 Fa2
Before water deficit
Water deficit
Rehydratation step

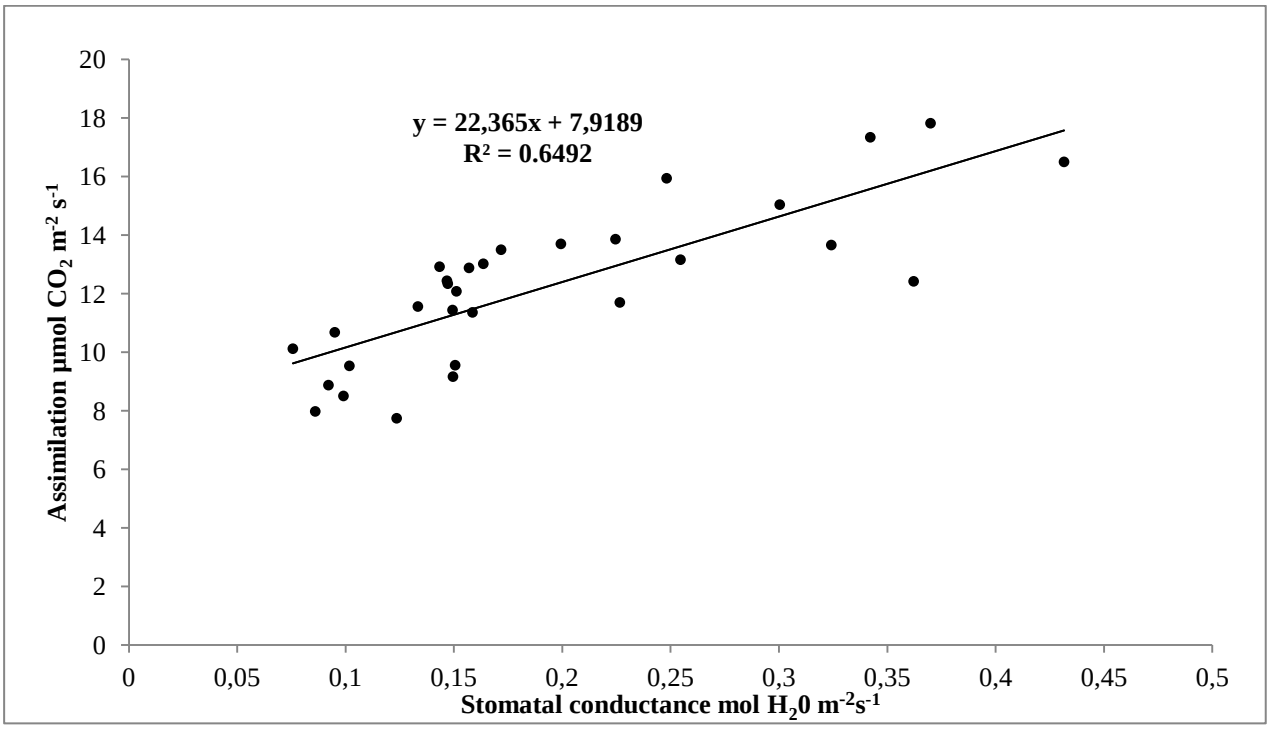
723


D
Intrinsic Water Use Efficiency (A/gs µmol CO_2 mol H_2O)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
***
Fe1 Fe2 Hy1 Hy2 Fa1 Fa2
Before water deficit
Water deficit
Rehydratation step

724

725

726 **Figure 3.** Relationship between Assimilation (*A*) and stomatal conductance (*gs*) in both
727 individual values before water deficit application.



728

729

730 **Suplementary material (S1):** Consensus sequences for cDNA-AFLP markers chosen

Maker name	Primer sequence	Consensus sequence
E41MseC-211	GACTGCGTACCAATTCAGGGTTACTCAGGACTCATC	GCAAGGAATCCATTTCGATCGGAGAAGATAATCGACTTCCTTGAGGAGTTGTTCCCTAGTGAGATCTGGAAGGTATGAAAGAGTCTCATACTTCTTCAAGCCAGTTGGTGGCCACACCTTCATGCAAGACACCCTACCACCATTGCTAGCAATGGATGTGATGTCATCATTCTTGCG
E41MseC-226	GACTGCGTACCAATTCAGGGTTACTCAGGACTCATC	CTATCGGTTTCGTGTTGAGCTTCATTCTGCGGTGCTAAAGTTGCTCCTTTGACATCAGAGTAATTAGGCAGTTCTTTTGCATCGGAATGATTAGGCAGTTCTTCTCTTGCATTGGCATCAGAGTTGGGCCGTTCTGATTCTAAGGAAGCTACCATTTCTTCGTATTTGGAAATGACTTTTTGAATCTCGTC
E41MseC-285	GACTGCGTACCAATTCAGGGTTACTCAGGACTCATC	GGATTCCTCACTTGAGACCTGCTGAATACAAGAGGTCTAGATTATCTAGAAACCGGAGGACTGTAAACCGAGCTTATGGTGGGGTTTTATCTGGCAGTGCTGTAAGGGAAAGGATCATCAGAGCTTTTTTGGTAGAAGAGCAAAAGATTGTGAAGAAGGTTTTGAAGATTCAGAAGGCCAAGGAAAGGCTCGCTTCCAAGGCCTGAACTTGAATATGGAGCAATGGTGTTTTT
E41MseC-356	GACTGCGTACCAATTCAGGGTTACTCAGGACTCATC	AGAAGAAAGCTAAACAACAGCAGTTTCAGAAGCAGACGCAGGTGTGGGAAGGTAAACCTGTTGAAGAGAAGATAAAGGAAGACACAAATGGAGATATCAAATCCAAGCCTTCGGAAGTTATTTCTGATGTGGTCAAGGGGACCACGCCTGATGAAACTTCTGGGAATGACCACCTTTCCGAGAATACTAATGTCCCCAAAACTATACATCCTGATGTGGTTCTAGAGGAGAGCCTAGCTAATGGGGTTGCAAAATCTTGCTAGATTCAGCCATGCACAAAGGCGGTCCATGCTCTAATGGGGTGTGCTTTTACAGGATTGCAATGAACATAATATGCNC
E13M15-217	GACTGCGTACCAATTCAGTGTTACTCAGGACTCATC	GATACGCTCAAGAGGGTTGCACAGGAGAGAGGGGAGAGCTGGGACGAGAAACTCTCTCAACTGAAAAAGAACAAACAGTGGCACGTCGAAGTCTATTGATTCTGCTCAAGTTGTAGCTGATTGTTACTCAATATATCATGAGAAAGTAGGATTCTTCTTGCTACATGGTGTTGGTATTTGTT
E41MseC-266	GACTGCGTACCAATTCAGGGTTACTCAGGACTCATC	AAGCTGGCNAATCNAACAGTTTAGTAAGCTCTTTTGCTTCAGTTGGACTGCTATTNTCAAGATTATATCTTTATTTTCATTCAGACGTGNNNNNNCCAACAGTTGGCTGATTTGGTTTTCNTACCTTTTTTTNNNNNNCTTTACGTTTGAAACTGCTAGTGACCTCAAACGTGTAATGCACATATCAAAATGATACAATTAGTTGCTTTATATTTCCGAGACTTGTATTGN

Maker name	Primer sequence	Consensus sequence
E13M15-107	GACTGCGTACCAATTCAGTGTTACTCAGGACTCATC	CAGAAATAGTGCCTCTTATGTCATCTGAAGTGAGTTGCTTGTGATTATTGTAACACATTCCATTGTT
E41MseC-372	GACTGCGTACCAATTCAGTGTTACTCAGGACTCATC	AGAAGAAAGCTAAACAACAGCAGTTTCAGAAGCAGACNCAGGTGTGGGAAGGTAAACCTGTTGAAGAGAAGATAAAGGAAGACACAAATGGAGATATCAAATCCAAGCCTTCGGANGTTATTTCTGATGTGGTCAAGGGGACCACGCCTGATGAAACTTCTGGGAATGACCACCTTTCCGAGAATACTAATGTCCCCAAAACTATACATCCTGATGTGGTTCTAGAGGAGAGCCTAGCTAATGGGGTTGCAAAATCTTGCTAGATTCAGCCATGCACAAAGGCGGTCCAT
E41MseC-146	GACTGCGTACCAATTCAGTGTTACTCAGGACTCATC	CGCACGGGGATTTTGGTGTGCGCTTCTACCTTGGGATATATGGCCTTTTCTGTTGAACTGNTTAGGGCAAAATTTCATGATAATGATGATTTATG
E41MseC-446	GACTGCGTACCAATTCAGTGTTACTCAGGACTCATC	AGAAGGTCACGGCGAGACGAGCCGTTTATCATTACGATAGGTGTCAAGTGGAAGTGCAGTGATGTATGCAGCTGAGGCATCCTAACAGACCGGTAGACTTGAACCTTGTTCCTACATGACCTGATCAATTCGATCAGGCACTCGCCATCTATTTTCATTGTTCAAATCTTTGACAACACGAAAAACCATTGTTCAACTCTTTGACAACATGAAAAAACCAAAAGCTCTGCCCTCCCTCTCTATCCATCCAAGGGATGGAAGGGCAGAGGCCTTTGGTGTCCCCTCCAGTCAAGAATTGGGGCCTCACAATCACTAGCCAATAGGCTTTTCTCTCATGCCTTTCTTCGTTCATGGTTCGATATTCTGGTGTCCTAGGCGTANANNAACCACACCAATCCATCNCCGAACTTGGTG

Chapitre II

Réponse de la conductivité hydraulique de populations de frênes à une forte contrainte hydrique

IV-a) Introduction Chapitre 2 :

À l'échelle individuelle, les épisodes de sècheresse extrêmes peuvent engendrer principalement deux types de réponses (famine carbonée et dysfonctionnement hydraulique) qui peuvent suivre des dynamiques très différentes. Dans le premier chapitre, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une sécheresse modérée sur l'assimilation carbonée de jeunes plants. L'aspect dysfonctionnement hydraulique n'a pas été abordé. Le dysfonctionnement hydraulique se manifeste principalement par la cavitation (ou l'embolie *i.e.* l'entrée d'air dans les vaisseaux de xylème).

Les premiers travaux qui se sont intéressés à la résistance des arbres à l'embolie datent de la fin des années 1980. Depuis cette date, les travaux qui ont porté sur ce trait fonctionnel ont montré une relation étroite entre la résistance à la cavitation et la tolérance à la sécheresse chez de nombreuses espèces d'arbres et d'arbustes (Delzon et al., 2010). La résistance à la cavitation est donc considérée à l'heure actuelle comme un bon indicateur de la résistance à la sécheresse. Nous souhaitions donc obtenir des informations sur les éventuels dysfonctionnements hydrauliques des populations (*F.excelsior, F.angustifolia* et hybrides) de frênes à des événements de sécheresse.

Nous avons donc décidé de tester la résistance à la cavitation chez quatre populations de frênes (représentant différents statuts). Ces arbres proviennent de la culture *in vitro* de graines de frênes provenant de quatre localités : Saint Gobain (SGO population de *F.excelsior*), Tavaux (TAV, population hybride de Saône), Saint-Dyé (SDYE, population hybride de Loire) et enfin Mas-Larrieu sur la côte méditerranéenne (MLA population de *F.angustifolia*, voir Tableau 2 ci-dessous. Ces arbres de 3 ans ont poussé dans le jardin commun du campus de l'université d'Orsay. Cinq individus par population (20 au total) ont été choisis aléatoirement parmi un pool d'arbres de la population. Trois paliers de contrainte hydrique qui vont de -1.5 MPa a -4 MPa (Ψ_{pd}) ont été appliqués par arrêt d'arrosage. Le suivi de l'installation de la contrainte hydrique s'est déroulé avec une chambre à pression de type Scholander ; l'expérimentation s'est déroulée en serre sous conditions semi-contrôlées. La réponse à la cavitation a été mesurée via le PLC (*Percentage of Loss Conductivity* i.e. Pourcentage de perte de conductivité) qui est calculé tel que ci-dessous à partir du ratio de la

conductivité initiale (K_{int}) et de la conductivité maximale (K_{max}) du rameau ou pétiole considéré.

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

En général les mesures de cavitation sont effectuées sur des morceaux de branches d'arbres relativement âgés avec un Xyl'em®. Cependant nos arbres n'étaient pas suffisamment ramifiés pour pouvoir entreprendre ce type de mesures. Nous avons donc adapté la méthodologie aux pétioles de nos frênes. Nous avons par ailleurs, mesuré les échanges gazeux avec un Licor® 6400 avant et au cours des trois paliers de contrainte hydrique.

Nous avons complété ces mesures par un suivi de l'état du photosystème II, suivi par fluorescence chlorophyllienne (ratio Fv/Fm, Pam2000 WALTZ®) sur des feuilles adaptées à l'obscurité (mesures à 4h30). La morphologie des feuilles a été caractérisée par une mesure de LMA.

L'article correspondant sera prochainement soumis dans la revue Tree Physiology.

Tableau 2 : Informations sur les populations de frêne étudiées pour cette étude.

Localité	Saint-Gobain	Tavaux	Saint Dyé	Mas Larrieu
Coordonées geographiques	49.36°N 3.23°E	47.05°N 5.38°E	47.69°N 1.56°E	42.35°N 3.02°E
Altitude (m)	80	190	50	10
Climat	Temperé	Temperé	Temperé	Mediterranéen
Statut	*Fraxinus excelsior*	hybride	hybride	*Fraxinus angustifolia*

IV-b) Principaux résultats de cette étude

Lors de cette étude, nous avons pu appliquer une contrainte hydrique de manière uniforme, car nous ne trouvons aucune différence significative pour le potentiel de base (ψ_{pd}) entre les populations de frêne étudiées quel que soit le niveau de contrainte hydrique appliqué.

Les valeurs de LMA mesurées sur feuilles entières se sont révélées plus élevées que dans la première expérimentation (80-100 contre 30-35 $g.m^{-2}$). Cette différence provient du fait que nous avons mesurés le LMA sur des feuilles entières plutôt que sur des folioles.

Saint-Dyé est la seule population à avoir un LMA significativement plus élevée (test de comparaison multiple de Wilcoxon *P*-value < 0,05) que les autres populations (102,84 ± 3,88 $g.m^2$). L'autre population hybride, Tavaux a le LMA le plus faible (82,49 ± 0,66 $g.m^2$). Saint Gobain (87,64 ± 9.26 $g.m^2$), et Mas Larrieu (96,49 ± 7,66 $g.m^2$) ne sont pas significativement différents. En termes d'échanges gazeux, en absence de contrainte hydrique les valeurs d'assimilation varient de 9 à 15 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. Les arbres de la population de Mas Larrieu ont les valeurs les plus élevées (15,04 ± 1,12 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), et cette population est significativement différente de Saint-Gobain et Saint-Dyé. (test de comparaison multiple de Wilcoxon, *P*-value = 0,016). Les populations de Saint-Gobain et Saint-Dyé ont des valeurs d'assimilation proches de 9 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} en moyenne (9,34 ± 1,21 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} et 9,27 ± 1,06 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), et la population de Tavaux est intermédiaire en assimilation (12,84 ± 1,36 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} moyenne).

Quand la contrainte hydrique est installée, l'assimilation de toutes les populations chute autour de 6 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} en moyenne, à l'exception de la population hybride de Saint-Dyé qui a les valeurs les plus élevées (7,33 ± 2,17 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} en moyenne), ceci pour des niveaux de contrainte hydrique intermédiaires (ψ_{pd} compris entre -1,5 et -3 MPa). Au plus fort de la contrainte hydrique (ψ_{pd} -4,0 MPa) les valeurs d'assimilation sont proches de 0 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. Néanmoins nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives entre populations (test de comparaison multiple de Wilcoxon, toutes *P*-values < 0,05).

Pour les valeurs de *gs* sans contrainte hydrique, la population de frêne de Mas Larrieu à la plus forte valeur de *gs* (0,45 ± 0,05 µmol mol H_2O m^{-2} s^{-1}) et cette valeur est

significativement différente des autres valeurs de *gs* mesurées pour les autres populations de frêne (test de comparaison multiple de Wilcoxon, *P*-values = 0,048).

Les populations de Saint-Gobain et Saint-Dyé ont les plus faibles valeurs moyennes de *gs* (0,26 ± 0,06 mol H_2O m^{-2} s^{-1} et 0,23 ± 0,02 mol H_2O m^{-2} s^{-1}), alors que Tavaux est de nouveau intermédiaire (0,32 ± 0,06 mol H_2O m^{-2} s^{-1}).

Pendant la contrainte hydrique Saint-Dyé a de nouveau les valeurs de *gs* les plus élevées jusqu'au dernier niveau de contrainte où *gs* est proche de 0 mol H_2O m^{-2} s^{-1}. Cependant, aucune différence significative entre populations n'a pu être mise en évidence pour les valeurs de *gs* (pairwise Wilcoxon-test comparaisons, toutes *P*-values > 0,05).

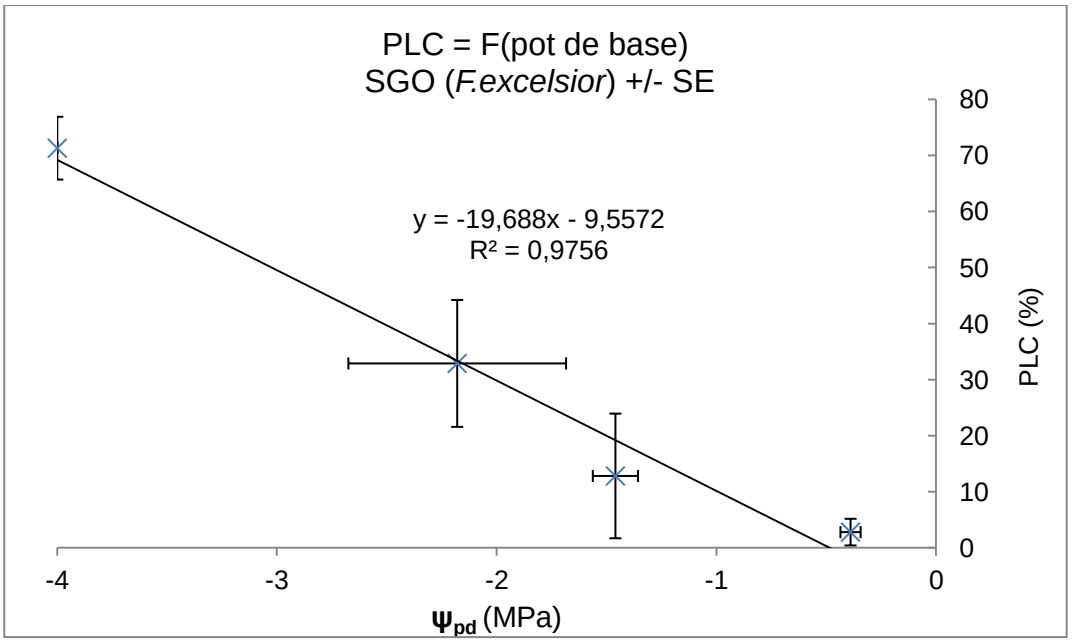
Concernant la *WUEi*, les valeurs pour la population avant contrainte sont de 40,51 ± 5,45 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} pour Saint Gobain, 44,06 ± 6,73 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} pour Tavaux, 39,63 ± 4,14 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} pour Saint-Dyé, et 33,85 ± 3,42 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} pour Mas Larrieu. Cependant les valeurs de *WUEi* pour la population de Mas Larrieu augmentent légèrement à 80 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} pendant la contrainte hydrique. Alors que les autres populations de frêne (Saint-Gobain, Saint-Dyé et Tavaux) ont des valeurs proches de 50 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} pour le niveau de contrainte hydrique le plus élevé. Néanmoins aucune différence significative n'a cependant été relevée pour la *WUEi* (test de comparaison multiple de Wilcoxon, toutes *P*-values > 0,05).

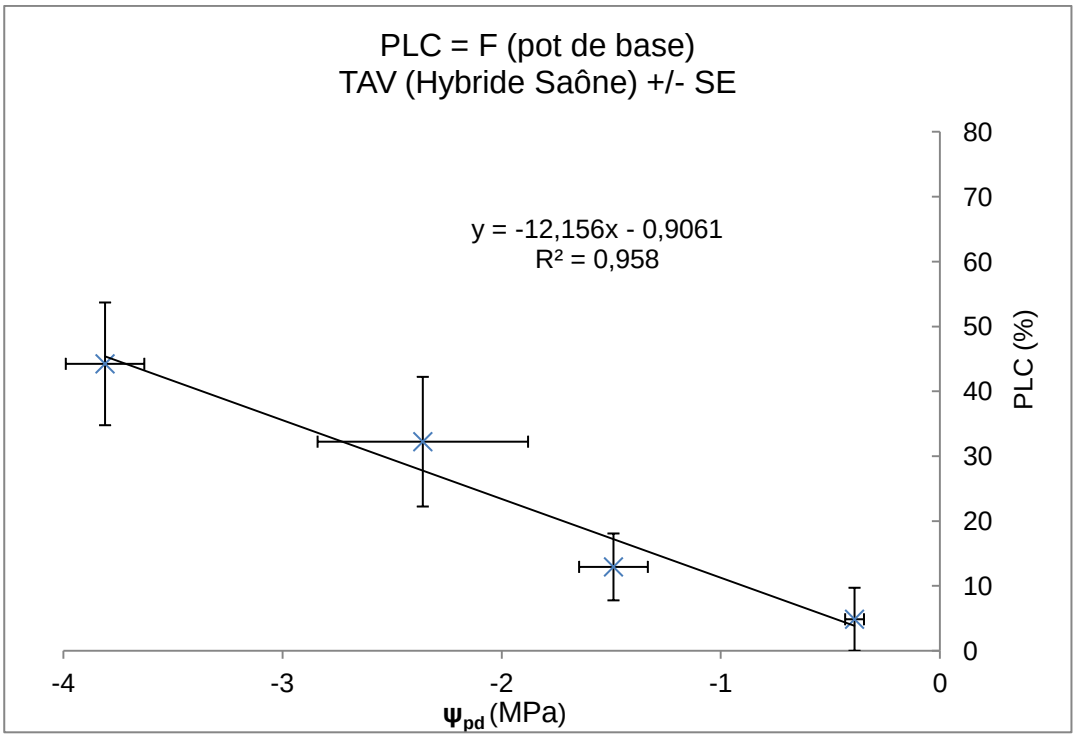
La fluorescence chlorophyllienne n'a pas montré de différence significative entre populations (test de comparaison multiple de Wilcoxon, toutes *P*-values > 0,05) (toutes les valeurs de Fv/Fm sont proches de 0,83 on note une légère baisse à 0,75 du ratio Fv/Fm pour le dernier niveau de contrainte hydrique, mais là encore il n'y a pas de différence significative entre les populations de frênes étudiées (test de comparaison multiple de Wilcoxon, toutes *P*-values > 0,05).

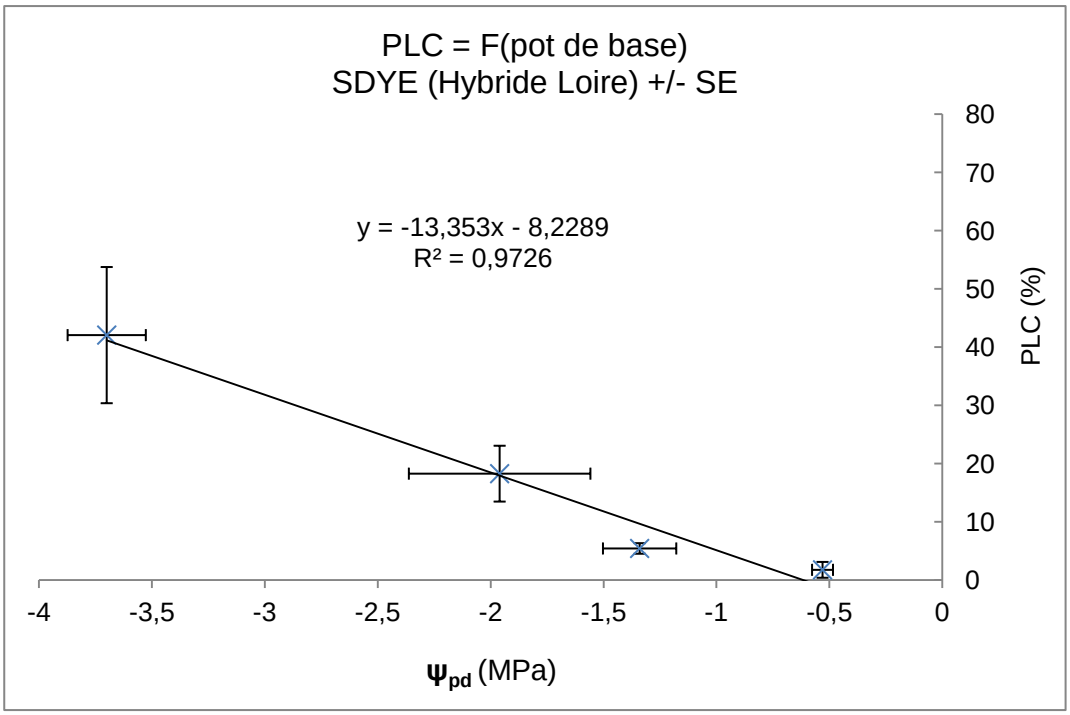
Pour finir sur les valeurs de PLC, on note une bonne corrélation entre le PLC et le potentiel de base (Figure 10 ci-dessous). Les valeurs moyennes de PLC démarrent à moins de 5 % chez les plantes bien arrosées (Saint-Gobain : 2,81 ± 2,37 %, Tavaux : 4,85 ± 4,85 %, Saint-Dyé : 1,78 ± 1,3 %, Mas Larrieu : 3,29 ± 1,72 % moyenne PLC +/- SE) mais augmentent jusqu'à 70 % pour la contrainte hydrique maximale. A ce niveau de contrainte hydrique, Saint-Gobain a les valeurs de PLC les plus élevées (71,3 ± 5,6 %). Mas Larrieu a les plus faibles valeurs de PLC (22,11 ± 11,16 %). Les populations de frêne hybride, Saint-Dyé et Tavaux, sont à 42,08 ± 11,7 % et 44,22 ± 9,5 % respectivement. Néanmoins aucune

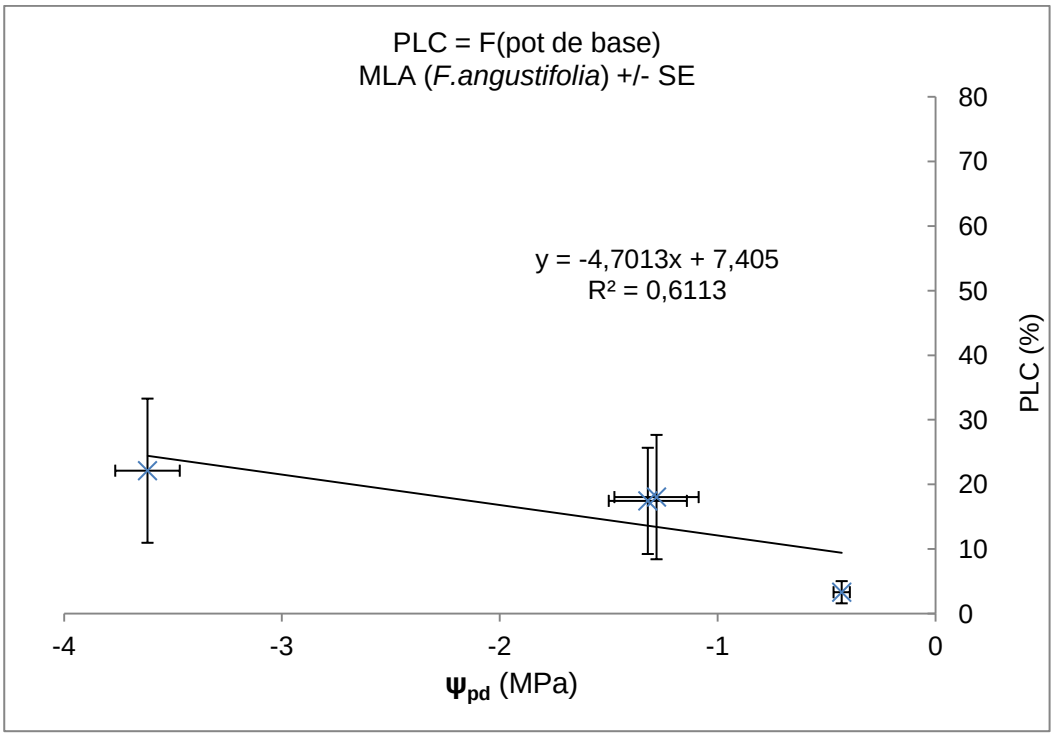
différence significative n’a pu être mise en évidence entre populations et quel que soit le niveau de contrainte hydrique (test de comparaison multiple de Wilcoxon toutes *P*-values > 0,05).

Figure 10 : Courbes montrant les variations du pourcentage de perte de conductivité (PLC) mesurée sur pétiole de frêne en fonction du potentiel de base (ψ_{pd}) pour chaque population de frêne étudiée. Moyenne ± SE n=5. SGO pour Saint-Gobain, TAV pour Tavaux, SDYE pour Saint-Dyé et MLA pour Mas Larrieu.






PLC = F(pot de base)
SDYE (Hybride Loire) +/- SE
y = -13,353x - 8,2289
R² = 0,9726
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PLC (%)
-4
-3,5
-3
-2,5
-2
-1,5
-1
-0,5
0
ψpd (MPa)


PLC = F(pot de base)
MLA (F.angustifolia) +/- SE
y = -4,7013x + 7,405
R² = 0,6113
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PLC (%)
-4
-3
-2
-1
0
ψpd (MPa)

IV-c) Discussion chapitre II

Dans cette deuxième expérimentation centrée sur la résistance à la cavitation, nous avons utilisé les mêmes populations hybrides qu'au chapitre I (Saint-Dyé et Tavaux), mais cette fois nous avons ciblé une contrainte hydrique plus forte en 3 paliers de -1,5 MPa de potentiel de base (Ψ_{pd}) a - 4 MPa (voir article ci-dessous). La contrainte hydrique a été appliquée de manière homogène entre populations. Le faible échantillonnage (n=5) n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives pour la plupart des variables testées nous allons donc discuter de certaines tendances et des valeurs observées dans nos résultats.

Les valeurs de PLC (Pourcentage de perte de conductivité hydraulique) sont faibles avant contrainte (< 5%), et les populations ne se différencient pas entre elles. Lors du premier niveau de contrainte hydrique (Ψ_{pd} : -1,5 MPa), ce sont les populations hybrides qui affichent les PLC les plus élevés (Tavaux 18,94 ± 6,85 % et 16,29 ± 11,52 % pour Saint-Dyé, contre 9,36 ± 4,60% pour *F.excelsior* Saint-gobain et 4,05 ± 1,44 % pour *F.angustifolia* Mas-Larrieu).

Lors du deuxième palier de contrainte hydrique (Ψ_{pd} : -2,5 MPa) nous pouvons observer une dichotomie sur les valeurs de PLC entre d'une part, Saint-Dyé et *F.angustifolia* (Mas-Larrieu) qui ont des faibles valeurs (18,29 ± 1,36 % et 18,02 ± 1,71 %) et d'autre part Tavaux et *F.excelsior* (Saint-gobain) (32,22 ± 9,87 % et 32,90 ± 9,80 %). Enfin pour le plus sévère niveau de contrainte hydrique (-4 MPa) *F.excelsior* (Saint-gobain) perd plus de conductance hydraulique (71,30 ± 5,50 %), alors que *F.angustifolia* (Mas-Larrieu) semble être le moins sensible (22,11 ± 11,60 %). Les populations hybrides ont des valeurs de PLC proches et intermédiaires (Tavaux 44,22 ± 9,45 % et Saint-Dyé 42,08 ± 11,69 %).

De manière surprenante il semblerait que *F.excelsior* (Saint-gobain) perd plus de conductivité hydraulique, que *F.angustifolia* (Mas-Larrieu). Cependant la résistance à la contrainte hydrique du frêne commun *F.excelsior* (Saint-gobain) est fréquemment rapportée dans des expérimentations de terrain (Besnard & Carlier 1990, Marigo & Peltier 1996, Marigo et al., 2000). Les hybrides présentent de nouveau des valeurs de PLC

intermédiaires : ils montrent néanmoins une sensibilité précoce à la perte de conductivité sur le premier palier de contrainte hydrique (valeurs de PLC les plus élevées au Ψ_{pd} de -1,5 MPa).

Nous retrouvons les mêmes valeurs d'assimilation qu'au chapitre I, sans contrainte hydrique pour toutes les populations (Saint gobain, Mas Larrieu et hybride : Tavaux et Saint Dyé), à l'exception de Saint Dyé qui a une assimilation plus faible que celle mesurée au chapitre I (9,27 ± 1,06 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} contre 12,59 ± 0,41 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}). En revanche, la conductance stomatique augmente chez toutes les populations (les valeurs moyennes vont de 0,28 à 0,5 mol H_2O m^{-2} s^{-1}, alors qu'elles étaient de 0,12 à 0,28 mol H_2O m^{-2} s^{-1} au chapitre I). Ces différences de valeurs pour les échanges gazeux pourraient être dues à un effet de phénologie comme constaté lors de l'assimilation entre jeunes arbres et arbres adultes par Hölscher (2004).

Quand la contrainte hydrique est appliquée, c'est la population de Saint-Dyé qui garde les valeurs d'assimilation et de conductance stomatique les plus élevées pour des potentiels de base situés entre -1,5 MPa et -2,5 MPa (7,51 ± 2,58 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} et 7,33 ± 1,17 mol H_2O m^{-2} s^{-1} contre 5,61 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} et 4,49 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} pour les autres populations en moyenne 0,20 ± 0,09 mol H_2O m^{-2} s^{-1}, 0,16 ± 0,07 mol H_2O m^{-2} s^{-1} contre 0,13 mol H_2O m^{-2} s^{-1} et 0,09 mol H_2O m^{-2} s^{-1} pour les autres populations en moyenne). A un potentiel de base de - 4 MPa, les valeurs de *A* et de *gs* pour toutes les populations de frêne tendent vers 0. Ce qui est cohérant avec la littérature (Besnard & Carlier 1990). Il semblerait donc y avoir un léger avantage pour Saint-Dyé sous contrainte hydrique intermédiaire (Ψ_{pd} entre -1,5 MPa et -2,5 MPa), cependant celle-ci est à relativiser à l'aulne des valeurs de *WUEi*, où l'on voit que Saint-Dyé n'obtient pas les meilleures valeurs pour la contrainte hydrique intermédiaire (cf. Figure 2c de l'article ci-dessous).

Le ratio Fv/Fm permet de connaitre l'état du photosystème II : une valeur empirique de 0,84 de ce ratio indique un photosystème II pleinement fonctionnel (Krausse & Weiss 1984). Dans notre cas nous avons rencontré des problèmes pour les mesures sans contrainte hydrique. L'appareil indiquait des valeurs de ratio Fv/Fm proches de 0,75 ce qui n'est pas

réaliste. Ces données n'ont pas été présentées (cf. Figure 2d article ci-dessous). Une fois la contrainte hydrique appliquée nous avons pu mesurer des valeurs proches de 0,84 quelles que soient les populations de frênes testées. Seul le dernier niveau de contrainte hydrique a affecté le photosystème II (valeurs de 0,76 environ), ce qui démontre une bonne résistance du photosystème II à la contrainte hydrique. Cette résistance n'était pas connue chez le frêne, mais bien démontrée chez de nombreuses autres plantes, comme par exemple le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cornic et al., 1987, Cornic et al., 1989).

Nos résultats démontrent une bonne résistance à la perte de conductivité hydraulique du complexe d'espèce frêne (surtout *F.angustifolia* et les hybrides), ainsi on estime que des valeurs de PLC de plus de 88 % sont critiques pour les angiospermes (Urli et al., 2013), valeurs qui ne sont pas atteintes dans cette expérimentation, même lors de la contrainte hydrique la plus élevée (Ψ_{pd} : -4 MPa). Cependant ce qui est surprenant c'est que les valeurs de PLC les plus élevées sont atteintes chez *F.excelsior*, et pas chez *F.angustifolia*. Étant donné l'écologie de cette dernière espèce (zone de ripisylve) nous aurions attendu des valeurs de PLC plus élevées chez *F.angustifolia*. Ces résultats sont à nuancer selon deux points : (i) l'un méthodologique, nous avons mesuré le PLC sur des feuilles (les arbres de trois ans n'avait pas suffisamment de branches), or il a été montré que les arbres peuvent sacrifier des feuilles pour éviter un développement généralisé de l'embolie à l'échelle de l'organisme (Rood et al., 2000). (ii) L'autre physiologique, car il existe des évènements de récupération de l'embolie (Hacke & Sperry 2003). Cependant ces évènements de récupération de l'embolie, n'ayant été que rarement observés *in vivo* (Sperry 2013), seraient probablement des artefacts liés à la méthodologie de mesure de l'embolie (Cochard & Delzon 2013).

Par ailleurs, il semble que le photosystème II soit peu affecté par la contrainte hydrique, et on ne note pas de sensibilité entre les différentes populations (*F.excelsior*, *F.angustifolia* ou hybrides). Ces différents résultats, même s'ils restent à confirmer, nous confortent sur l'importance de prise en compte des procesus d'hybridation dans un cadre de changement climatique.

Research paper

Title:

Is there population variability in vulnerability of leaf xylem to cavitation? A case study on ash (Oleaceae) species complex.

Romain RJ JOSEPH [1*], Tété TBS BARIGAH-SEVERIN [2], Hervé HC COCHARD [2], Nathalie NFL FRASCARIA-LACOSTE[1] and Claire CD DAMESIN[3]

[1] AgroParisTech, Unité Mixte de Recherche 8079, 91045, Laboratoire Écologie, Systématique et Évolution, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France

[2] Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 547 Physique et physiologie Intégrative de l'Arbre Fruitier et forestier Site de Crouël 5, chemin de Beaulieu 63039 Clermont-Ferrand, France

[3] Université Paris Sud, Unité Mixte de Recherche 8079, 91045, Laboratoire Écologie, Systématique et Évolution

[*] Corresponding author: Romain JOSEPH

Phone: +33 (0)1 69 15 53 12

Fax: +33 (0)1 69 15 73 53

E-mail: romain.joseph@u-psud.fr

Keywords: water constraint, PLC, *Fraxinus excelsior* L., *Fraxinus angustifolia* Vahl, ash hybrid, greenhouse experiment.

Running head: ASH POPULATIONS AND EMBOLISM RESISTANCE

Abstract

The extremes drought stress event that is forecasted could trigger massive hydraulic failure in forest as a result of global climate change. The risk of such failure on forest could be assessed by testing via resistance to the loss of hydraulic conductivity due to drought in individual trees. However, the level of variation of this resistance in natural tree populations remains poorly described. We investigated ash trees (*Fraxinus*, Oleaceae) in four populations of various status (*F.excelsior*, *F.angustifolia* and two natural hybrids) growing in contrasting locations in France in order to assess the variability of vulnerability to embolism in natural populations. Specifically we investigate percentage of loss of xylem conductivity (PLC) in response to water constraint at three levels of severity (with ψ_{pd} values from -1.5 to -4 MPa). Water constraint was implemented using a greenhouse experimental design under semi-controlled conditions. Individual trees were used and PLC values were obtained on petioles using a Xyl'em® apparatus. Furthermore, gas exchange and functional integrity of PSII via chlorophyll fluorescence was monitored throughout water constraint. Our results give insights that ash trees would present an optimized functioning to water deficiency. Furthermore, data suggest they maintain assimilation, stomatal conductance and PSII status from mild to severe water deficit, and avoid complete loss of hydraulic conductance due to water constraint in the most severe drought level (i.e. PLC values < 80%). *F.excelsior* and *F.angustifolia* response facing water constraint could be viewed as isohydric and anisohydric behaviour, whereas hybrids trees show intermediates responses for most of the ecophysiological traits tested here and in response of water constraint. Hybrid with intermediates characteristic could be interesting for foresters in an uncertain global change perspective. However despite the promising clues regarding behaviour during a water constraint, further characterisation of the water constraint response of ash populations is needed.

Introduction

Global change is now threatening many ecosystems worldwide (IPCC, 2007). One consequence of this global change is the increase of occurrence and intensity of extremes climatic events in Europe, including drought and heat waves (Meehl et al. 2007). Such exceptional meteorological phenomena have already caused severe diebacks of trees in European forest (Ciais et al. 2005, Peñuelas et al. 2007). As a result there has recently been substantial reduction in physiological processes that are key for forest ecosystem (including growth, photosynthesis, respiration, carbon allocation, etc…), and with associated economic losses in a close past (Ciais et al. 2005, Bréda et al. 2006, Martínez-Vilalta et al. 2012). Drought can be defined, as a situation when a deficiency of precipitation over some period of time results in a water shortage (Trenberth et al. 2007). Water deficit can be defined when the demand of plants for water is superior to the water availability of the soil (Jones et al. 1981). Depending on its intensity and duration water deficit has two major consequences for plants: hydraulic failure and carbon starvation are both driven by stomatal kinetics (McDowell et al. 2008, Adams et al. 2009, Sala 2009, Galiano et al. 2010, McDowell 2011, Anderegg et al. 2012).

Hydraulic failure can be induced when the evaporative demand is too high or if there is frost, according to the tension-cohesion water flow theory. (i.e. which water is transported through the xylem vessels in a metastable state (Dixon HH. 1914). Carbon starvation results from the depletion of stored carbohydrates in a tree organism. This starvation develops when carbon supply is unable to support the rate of metabolism owing to stomatal closure. To the extent that plant metabolism requires a constant supply of carbohydrates, stomatal closure may lead to carbon starvation in the long term (Adams et al. 2009). Carbon starvation has been a focus of study, because of interest in the context of stomatal regulation in drought limited plants (Jones 1973, Parker & Patton 1975, Boyer 1976, Cowan & Farquhar 1977, Cornic 2000, Medrano et al. 2002). However, the association between carbon starvation and drought-related mortality of trees remains unclear because several assumptions of the carbon starvation model do not hold true (Sala et al. 2009). With regard to hydraulic failure events, an understanding of whole hydraulic failure dynamic that integrates the processes that lead to tree mortality has not yet been obtained (Meinzer & McCulloh 2013).This is especially true in terms of studies under field conditions whereas soil water availability and vapour pressure deficit could drive different types of

drought (Tardieu & Simonneau 1998). Furthermore these two pathways that can lead to tree mortality, remain inextricably linked (Sala et al. 2009, McDowell et al. 2011), which limits our capacity to disentangle their individual effects. Mechanisms that could prevent catastrophic hydraulic failure in plants, include an increase in the ionic concentration in xylem sap (Trifilò et al. 2008, 2011), storage of carbohydrate (Mitchell et al. 2013), and xylem refilling (Hacke et al. 1996, Salleo et al. 1996, Nardini et al. 2008) although for the mechanisms behind this latter mechanism and the frequency with which it occurs remain controversial (Sperry et al. 1988, Borghetti et al. 1991, Holbrook & Zwieniecki 1999, Tyree et al. 1999, Hacke et al. 2003, Salleo et al. 2004, West et al. 2007).

Furthermore, the capacity of plants to generate several xylem recovery events is yet to be evaluated (Hacke et al. 2001, Stiller et al. 2002). This had led scientists to develop the concept of "hydraulic safety margin" which is the difference between the minimum xylem pressure (Ψ_{min}) normally attained in a given plant organ and a reference point on its hydraulic vulnerability curve (Alder et al. 1996, Hacke & Sauter 1996, Pockman & Sperry 2000, Vilagrosa et al. 2003, Brodribb & Holbrook 2004, Meinzer et al. 2009, Hoffmann et al. 2011, Johnson et al. 2012). The "hydraulic safety margin" defines a safe range of pressure (expressed in MPa) within which hydraulic operations can occur and in which plants can uptake water via evaporation without risking hydraulic dysfunction (i.e. cavitation) in xylem conduits. However reports by numerous researchers (Choat et al. 2012) indicates that many tree species are currently operating close to their hydraulic safety margins, suggesting that safety margins are narrower than expected. The fact that hydraulic functioning is occurring close to its limits highlights the potential high risk for forest ecosystems posed by predicted future scenarios of global climate change (Hoffmann et al. 2011). The threatened sustainability of current temperate forest ecosystems rises up the following question: How successfully will tree species acclimatise to drier conditions, and avoid catastrophic cavitation events. Despite research effort on this issue, the answer remains poorly defined in terms of results obtained from the field (Aitken et al. 2008, Chmura et al. 2011). Furthermore variability in the range of experiments on drought and the scales used has prevented the emergence of a universal water stress scheme (Reyer et al. 2012). The need for progress on this topic is underscored by the risk that the effect of global climate change on forest be mediated principally, albeit not exclusively, by

hydraulic dysfunction (Wang et al. 2012, Choat et al. 2012). Ultimately, the present lack of knowledge on hydraulic dysfunction results from an absence of both sound criteria and effective techniques to evaluate the susceptibility of trees to hydraulic failure and their capacity to tolerate drought. However xylem cavitation resistance was recently identified as a functional trait that appears to be useful for the screening of drought resistance in tree (Cochard et al. 2008). Cavitation or embolism is the formation of air bubbles in xylem tissue (tracheids or vessels: Cochard et al. 1990). This leads to the dysfunction xylem tissue by disruption of the water column inside xylem vessels, and by the way reduce hydraulic conductance. There is now abundant evidence that xylem cavitation resistance is a key physiological trait that is closely correlated to local soil water conditions (Maherali et al. 2004, Meinzer et al. 2009, Lens et al. 2013) and species resistance to drought events induced by hydraulic failure (Delzon et al. 2010). Furthermore, xylem cavitation resistance has proven to be associated with the capacity of tree species to survive extreme drought events (Tyree & Sperry 1989, Bréda et al. 2006, Cochard et al. 2008, Brodribb & Cochard 2009). Thus, assessment of resistance to the loss of hydraulic conductance is a sound approach to measure the response of trees to drought. Against this background, the testing of resistance to the loss of hydraulic conductance in a widely distributed broadleaf temperate tree species could be useful in the search for local adaptation to the drier conditions that are currently forecasted. Meanwhile, the phenotypic plasticity of this trait should be though more documented and could help prevent catastrophic events (like mortality) in future forest stands. The complex of European Ash species (*Fraxinus excelsior*, L. and *Fraxinus angustifolia*, Vahl, Oleaceae) is a candidate for such testing. Firstly as a tree species, common ash (*Fraxinus excelsior*, L.) is widely spread among Europe (Rameau et al. 1989, Stöhr & Lösch 2004, Dobrowolska et al. 2011) it shows an exceptional ecological range as it can grow near rivers or on hill slopes (Rameau et al. 1989, Marigo et al. 2000, Jaeger et al. 2009). In addition narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*, Vahl) is found near the Mediterranean basin, along an east-west gradient (Heuertz et al. 2004, Gérard et al. 2012, Temunović et al. 2013), grows on riverbanks in France (Marigo et al. 2000) and is tolerant to flooding (Jaeger et al. 2009). Secondly, these two ash species form a species complex at the European scale undergoing hybridisation events across the continent. Hybridisation has been demonstrated by controlled crosses of ashes seedlings within laboratory conditions (Morand-Prieur et al. 2002)

and has also been observed under natural conditions (Rameau et al. 1989, Morand-Prieur et al. 2002, Gérard et al. 2006a, Thomasset et al. 2012).

Natural hybrid zones can promote the emergence of new genotypes or phenotypes that are better adapted to their local environment than either of their parental species (Mallet et al. 2007). Furthermore hybridisation processes are considered to provide a rapid evolutionary mechanism to promote the emergence of new species, in contrast to allopatric speciation for example (Arnold 1997, Rieseberg 1997). Indeed, this has been identified as a crucial feature in ash populations, given recent evidences of hybridisation were discovered between two European ash species, and the demonstration of progressive introgression of the genetic pools of both species in several ash hybrid populations (Huertz et al. 2004, Gérard et al. 2006a, Gérard et al., 2006b, Thomasset et al. 2012). These findings suggest that ash species complex (*F.excelsior, F.angustifolia* and their hybrid) may have substantial potential for acclimatisation in the context of the high climate variability that is currently predicted. Using ecophysiological measurements, the aim of this study was to assess potential differences in resistance to the loss of hydraulic conductance in the ash species complex when facing strong water constraint.

Specifically, we ask the key questions: First does resistance to the loss of hydraulic conductance differ between ash populations? Second how do these ash trees react to moderate to strong drought, in terms of photosynthesis (gas exchange and photosystem II status) and water use efficiency? Third do hybrid ashes have a better resistance to the loss of hydraulic conductance during a water constraint than *F.excelsior* or *F.angustifolia*?

This study was conducted on young ash trees to investigate resistance to the loss of hydraulic conductance upon exposure to water constrained in an experiment using three moderate to strong levels. The severity of water constraint was defined by measurements of predawn leaf water potential (ψ_{pd}) that ranged from -1.5 MPa to -4 MPa. The resistance of ashes tree to the loss of hydraulic conductance were assessed by calculation of the PLC (percentage of loss conductivity) based on leaf hydraulic conductivity measurements (K_{leaf}). Furthermore gas exchange and integrity of PSII state were monitored throughout the progressive severity of water constraint to obtain a more complete picture of water constraint response. Given this approach, this

experiment could potentially reveal how ash tree populations will react in future climate scenarios associated with global change. The conclusions of this study could be relevant for foresters who need to take key decisions now for the management of forest ecosystems likely to experience several extreme drought events before they are harvested, typically around 100 years' from now.

Material and methods

Plant material and experimental design

The trees used for this experiment were randomly selected from a pool (150 trees) of three-year old ash trees that were grown for another experiment (Araujo-Calçada et al. unpublished). This pool of ash trees comprised 10 French populations with 15 trees of each. Trees were grown in the common garden at the Université Paris Sud campus. Individuals which show extreme morphologies (too tall too short, or too much branching), were discarded from the experimental design. Owing to technical limitations in PLC measurements, we focused our experimental design on only four French ash populations that could present different local adaptations (see Table 1), and only five plants for each population (i.e. 20 plants in total). The four populations represent previously morphologically and genetically described different statuses (*F. excelsior*, *F. angustifolia* or hybrid, Gérard et al. 2006a). Names of populations represent their French localities: SGO is for Saint-Gobain, TAV is for Tavaux, SDYE is for Saint Dyé and MLA is for Mas Larrieu. These trees were grown *in vitro* following the method of Raquin et al. 2002 and transplanted for the first year (2009), into 12 l. PVC pots with a peat/sand/perlite mixture (2/1/1 v/v) supplemented with Osmocote® fertilizer (200g per 40 l of mixture) in a greenhouse on the Université Paris Sud campus. Thereafter, the trees were moved to a common garden near Orsay (48.41° N 2.09°E) where they continued to grow for 2010 and 2011. All individual ash trees that were selected were placed in the greenhouse, in semi-controlled conditions (mean temperature 25.5°C, mean relative humidity 63.5 %), (photosynthetic photon flux density (PPFD) was comprised between 150 and 800 µmol photons m^{-2} s^{-1} : for cloudy and sunny days respectively). The plants were transferred back to the greenhouse, on July 28 and were manually watered to an adequate level each day at noon. Water constraint was imposed by stopping the watering of the plant. The predawn leaf potential was monitored to trigger the

physiological measurements detailed above. Such measurement started immediately once the target levels of severity of water constraint were reached (i.e.-1.5 to -2 MPa for the least severe level, -2.5 to -3.0 MPa for the intermediate level and -4.0 MPa for the most severe level of water constraint step). The water constraint experiment started on August 1 and ended on of August 19, 2011.

Leaf mass per area

The leaf mass per area (LMA g m^{-2}) was determined for a leaf with an intermediate position on tree stem for each single tree before water constraint implementation. Its area was determined using an area-meter (Delta-T Devices® Cambridge UK) immediately after cutting. Thereafter, the whole leaf was dried in an air oven for 48h at 60°C, and then its dry mass (g) was measured to calculate LMA.

Predawn water potential

Plant predawn water potential (ψ_{pd}) was measured throughout the experiment, in order to apply three different levels of water deficiency. At the least severe level of water constraint, plants had to be between -1.5 to -2.0 MPa. The intermediate level of water constraint was targeted between -2.5 to -3.0 MPa, and the most severe level was around -4.0 MPa corresponds to the lowest limit of the Scholander pressure chamber (Scholander et al. 1965) used in this work (type PMS 1600, PMS® Instruments Co. Albany, Oregon USA). When all plants had reach the targeted ψ_{pd} value, measurement of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and PLC were carried out as explained below.

Gas exchange measurements

Data on gas exchange were obtained throughout the period of water constraint using a Licor® 6400 (LI-COR® Bioscience, Lincoln Nebraska USA) equipped with a 6400-02B LED Light Source chamber. Measurements taken place between 10:00 A.M. and 2:00 P.M. which pans to the period of maximal stomatal opening. The following parameters were set in the chamber (CO_2 concentration: 380 µmol air mol^{-1}; temperature fixed at 25°C; relative humidity (RH) fixed at 60 %; PPFD 1,000 µmol photons m^{-2} s^{-1}). As soon as the conditions in the chamber with the leaf were stabilized (30 to 45 min), five measurements were

recorded, each 30 seconds. For subsequent statistical analysis the mean of each set of five measurements was used as the single value for that specific tree. The *WUEi* (intrinsic water use efficiency) was calculated as the ratio of instantaneous CO_2 assimilation (*A*) to stomatal conductance (*gs*) (*WUEi = A / gs*).

Chlorophyll fluorescence

In order to assess the effect of the various levels of water constraint on the integrity of PSII system, the effective quantum yield of photosystem II (Y = (Fm'-Ft): Fm' = ΔF: Fm') was measured before sunlight (4:30 AM) with a PAM 2000 (Walz®, Effeltrich Germany) fluorescence chlorophyllmeter. Measurements were conducted on dark acclimatised-leaves with the obtained values being equivalent to Fv/Fm averages. One leaf per plant was measured and five repeated measurements were made on the same leaf. For subsequent statistical analysis the mean of each set of five measurements was used as the single value for that specific tree.

Xylem conductivity and cavitation measurements

The hydraulic measurement method used in this study was first described by Sperry et al. in 1988. This method was designed for cavitation measurements on small branch segments (few cm).A special device was design to implement Sperry et al. method is the Xyl'em® embolismmeter that was used here (Bronhkorst®, France, http://www.bronkhorst.fr/fr/produits/xylem_embolismmeter). However, given that our ash trees were not tall enough to have sufficient branches for all measurements we decided to adapt the apparatus. For making measurements on leaf petioles we adapt the Xyl'em® design by reducing the diameter of the manifold exits via customised PVC section tubes (0.2 to 1 mm in diameter) and Teflon® rubber to ensure that the petiole/PVC tube contact zone was waterproof. Cavitation of leaf petiole xylem conduits were determined by PLC measurements. However the limited number of plant leaf was another issue that needed to be dealt with in our experiment. We initially considered carrying out the PLC measurements with one leaf per plant which enable us to complete the experiment given the number of leaves available. Therefore, preliminary tests were conducted on two leaf petioles localised at the same node of a single tree. To test the validity of this approach, excised leafs samples were measured for plants had been previously discarded from the experiment and

exposed to water constraint. Sixteen plants were used to assess the reproducibility of PLC measurements (data not shown). Once the reproducibility of the K_{leaf} and PLC measurements had been confirmed, we could then use one petiole stem (around 5 cm in length) per plant. This petiole was cut under water to avoid the induction of artificial air embolism during leaf excision, as recommended by (H. Cochard pers. comm.). Petiole samples were then taken from the greenhouse to the laboratory, while still under water thereafter the preparation of samples for the conductivity measurements was initiated. Sample preparation involved tight constriction of the leaf petiole with Teflon® rubber and then cutting of the terminal leaflet under water to allow water to flow through the petiole xylem without the induction of leaflet resistance. Once the five petiole stem sample had all been prepared, they were slowly and carefully inserted into the manifold device, without providing the relief of experimental water constraint induced loss of hydraulic conductivity. The next step involved the tight and careful attachment of collars at the leaf petiole stems to the manifold device. We measured only five samples each time to avoid hydraulic circuit resistance in both the Xyl'em® apparatus and in the manifold device that could have interfered with conductivity measurements (H. Cochard pers. comm.). For each leaf petiole, the initial sample conductivity (K_{init}) was measured with an ionic solution of 10 mM KCl and 1 mM $CaCl_2$ which was introduced by perfusion in the leaf petiole. K_{init} was first determined, after the sample was flushed with a high pressure flow ($\geq$ 2 MPa) for two seconds to determine the maximal conductivity of the leaf petiole sample. K_{max} was then determined by three repeated measurements, with each individual K_{max} measurement was separated by high pressure flow flushing (during 30, 60 and 120 seconds respectively). The mean value of these three K_{max} measurements was used for PLC calculations as follows:

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

Statistical analysis

R 2.14.2 software was used to analyze our data (R Development Core Team, 2011). All data were checked for a normal distribution (Shapiro test) and homogeneity of variance (Bartlett test). The dataset from the measurements was subdivided in terms of the different levels of water constraint and analysed separately, in order to identify population differences for each variable tested. Firstly, Kruskall-Wallis tests were conducted

to assess the effect of populations on the variables tested among each level of water constraint. Thereafter, population differences within each level of water constraint were sought by multiple comparisons using pairwise Wilcoxon rank-based-test comparison with Bonferroni corrections for *P*-values. This procedure was used because of non-normality of data and non-heteroscedasticity of variance.

Results

Predawn leaf water potential

Plant predawn water potential (ψ_{pd}), reached the desired target ranges of water constraint (Fig. 1a). The only exception was in the MLA population which did not differ in ψ_{pd} between the attempts to apply the least severe and intermediate levels of water constraint. In the absence of water constraint application all ash plants did not reach 0 MPa as expected. Instead all plants showed values around -0.5 MPa (Fig.1a), although the plants were well watered at that time. No significant differences were found among population and across levels for plant predawn water potential (pairwise Wilcoxon-test comparisons, *P*-values < 0.05).

LMA

Mean LMA values measured for whole leaves (N = 5 per population), ranged from 80 to 100 g m^{-2} (see Table1). Only SDYE population had a significant higher value of LMA compare to other populations (pairwise Wilcoxon-test comparisons, *P*-values < 0.05 Table 1).

Hydraulic conductivity

The mean values of PLC started at less than 5% in well watered plants (SGO: 2.81 ± 2.37, TAV: 4.85 ± 4.85, SDYE: 1.78 ± 1.3, MLA: 3.29 ± 1.72 Mean PLC +/- SE) but increased up to almost 70 % at the most severe level of water constraint (Fig. 1b). Upon exposure to that level, the SGO population had the highest mean value of PLC of 71.3 ± 5.6 %. MLA had the lowest PLC values of 22.11 ± 11.16 % while hybrid individuals remained, intermediate with mean of 42.08 ± 11.7 % and 44.22 ± 9.5 % for SDYE and TAV ash hybrid population (Fig. 1b). Nonetheless, these PLC values did not differ statistically among the different ash's

populations for all levels of water constraint severity (pairwise Wilcoxon-test comparisons all *P*-values > 0.05, Fig. 1b).

Gas exchange

In terms of gas exchange, mean assimilation values ranged from 9 to 15 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}, in the absence of water constraint. Whereas MLA trees had the highest values, and this population is statistically different from SGO and SDYE populations (pairwise Wilcoxon-test comparison, *P*-value = 0.016). SGO and SDYE showed mean values close to 9 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} in mean in the lowest severity of water constraint (Fig. 2a), and TAV populations remained intermediate in terms of assimilation at this stage. When we implemented water constraint the mean assimilation values of all populations became similar at 6 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} (Fig. 2a), except for SDYE trees, which exhibited the highest values (7 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}). At the most severe level of water constraint, assimilation values were close to 0 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} (Fig. 2a). No significant population differences among the populations in terms of the assimilation measurements during water constraint (pairwise Wilcoxon-test comparisons, all *P*-values < 0.05 see Figure 1a). In terms of *gs* measurements without water constraint, the ash populations were ranked in a same manner as for the assimilation values (Fig. 2b). Specifically MLA trees exhibited the highest and significant different values (pairwise Wilcoxon-test comparisons, *P*-values = 0.048 see Fig. 2b) of stomatal conductance with a mean of 0.5 mol H_2O m^{-2} s^{-1}. SDYE and SGO had the lowest mean values, 0.28 mol H_2O m^{-2} s^{-1} in mean. During water constraint, SDYE have higher but not significantly different *gs* from other populations. At the last step of water constraint stomatal conductance values were close to 0 mol H_2O m^{-2} s^{-1} for all ash populations (Fig. 2b). No significant differences were revealed among all populations and across all levels of water constraint severity for the stomatal conductance values (pairwise Wilcoxon-test comparisons, all *P*-values > 0.05).

Mean values of intrinsic water use efficiency (*WUEi*) were for SGO: 40.51 ± 5.45 µmol CO_2 mol H_2O^{-1}, TAV: 44.06 ± 6.73, SDYE: 39.63 ± 4.14, and MLA: 33.85 ± 3.42 in the absence of water constraint (Fig. 2c). However MLA *WUEi* value raised at most severe level of water constraint to 80 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} (Fig. 2c) while the trees from other populations retained values of *WUEi* close to 50 µmol CO_2 mol H_2O^{-1} at the most

severe level of water constraint (Fig. 2c). Nonetheless, no significant differences among all populations or across all levels of water constraint severity were found for *WUEi* (pairwise Wilcoxon-test comparisons, all *P*-values > 0.05).

Chlorophyll fluorescence

Mean values of the Fv/Fm ratio were between 0.82 and 0.83 for ash trees subjected to water constraint (see Fig. 1d) (SGO: 0.83 ± 0.004, TAV: 0.82 ± 0.003, SDYE: 0.82 ± 0.01, MLA: 0.83 ± 0.04). There was a slight decrease of Fv/Fm ratio at the most severe level of water constraint (SGO: 0.79 ± 0.02, TAV: 0.76 ± 0.02, SDYE: 0.75 ± 0.03, MLA: 0.76 ± 0.01 Fv/Fm ratio ± SE). No statistical differences across the different levels of water constraint and between ash populations were found (pairwise Wilcoxon-test comparisons, all *P*-values > 0.05).

Discussion

Comparison of water constraint response of F.excelsior and F.angustifolia

F.excelsior and *F.angustifolia* species are represented by SGO and MLA populations (see Table 1), morphology was not different based on leaves measurements (LMA), we did not observe strong difference in both size and shape on theses 2 species at a tree level during growth in common garden (pers. obs.). SGO and MLA populations did not differ in their efficiency to use water. *WUEi* values are relatively low for both SGO and MLA populations and more generally for trees (e.g. *Fagus sylvatica WUEi* = 70 to 110 µmol CO_2 mol H_2O m^{-2} s^{-1} Duquesnay et al. 1998). SGO and MLA populations neither differ in terms of assimilation and stomatal conductance even though both species did not exhibit same assimilation values (9 to 15 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} respectively) in and stomatal conductance (0.28 to 0.5 mol H_2O m^{-2} s^{-1} in mean respectively) in well watered conditions. However this point should be reassessed because we work with a reduce number of individuals for each species. Considering water constraint effect, both populations has the same behavior in gas exchange measurements suggesting that these two ash species are closely related, which is confirmed by phylogenetic analysis (Hinsinger et al. 2013 in prep.). In addition no difference was unveiled between these

two species for PSII photosystem in both well watered and water constrained situation. Despite the insights of assimilation and stomatal conductance measurements without water constraint, it seems that both species shares an identical photosynthetic apparatus, thus metabolic differences (*e.g.* maximal rate of carboxylation: V_{cmax} and/or maximal rate of electron flow: J_{max}) should explain the different values recorded in our study. Based on loss of hydraulic conductance values from this experiment, MLA population is tolerant to hydraulic failure; on the contrary SGO population is sensitive to hydraulic failure. As a positive point for SGO and MLA populations in a climate change context, we did not reach lethal threshold of PLC values (i.e. : 80%, Tyree et al. (2002, 2003) and Kursar et al. (2009) suggesting stronger water constraint to ensure lethal hydraulic failure in ashes. These different sensibilities to loss of hydraulic conductivity could be based on xylem anatomical difference in both species, however a quick search in InsideWood® database (Wheeler, EA. 2011), reveals only small wood anatomical differences between *F.excelsior* and *F.angustifolia* species (3 criterion differs across 29). Remarkably, *F.excelsior* and *F.angustifolia* differs in mean xylem vessel diameter (*F.excelsior* 50-100µm and *F.angustifolia* 100-200µm) that could potentially explain the *gs* values between them. PLC results, are in opposition with what have been previously reported for the two ash species in which *F.excelsior* is considered drought tolerant; Lemoine et al. 2001) while *F.angustifolia* was considered more flood tolerant (Jaeger et al. 2009). Further investigation is thus needed to confirm or infirm hydraulic risk of these ash species. In conclusion, looking to water constraint response, we could see that both species have a same behavior (reducing *A*, *gs*), but shows a tendency to express not the same level of leaf embolism susceptibility for a same (ψ_{pd}) value, suggesting a differential approach in water limited situation. This tendency should be taken into account in a global change perspective for these two species.

Ash hybrid populations water constraint response

Hybrid zones could promote emergence of new individuals that are more suited to environmental hazards. Hybrids individuals could serve as a reservoir of genetic variability, on which phenotypic plasticity is linked. Furthermore there is plenty of evidence of heterosis effect on hybrids plants (Rieseberg et al. 2000). Hybridization process by introgression has been noticed several times in ash (Gérard et al. 2006b, Fernandez-

Manjarres et al. 2006, and Gérard et al. 2012). One of our major goals for this work was to evaluate their performance regarding to *F.excelsior* and *F.angustifolia*. We do not observe a heterosis effect or a better response on our ash hybrid populations, on our ecophysiological measurements, except in one case (*A* and *gs* under water constraint for the Loire population SDYE Fig. 1a). We had rather an intermediate response for most of traits that have been investigated here, with sometimes high variability (*e.g.* SDYE assimilation value, Fig. 1a). Despite this lack of exhibited phenotypic superiority in our ash hybrid population, the variability they exhibit could serve as insurance against catastrophic stand decline in a climate change scenario. However, we used only using French localised hybrids tree , which are often highly back-or intercrossed, (F_1,F_2,…) but represent hybrid generations occurring in stable populations (Carney et al. 2000). Thus, further experimentation is needed with controlled F1 hybrids crosses to confirm ash hybrid population's potential in dryer conditions and their genetic basis. Some chloroplasts traits were found to have a maternal inheritance in ash (*F.exceslsior* Morand-Prieur et al. 2002), so looking at the heritability of ecophysiological features linked to their genetic basis make sense in F1 hybrids.

Advantages and drawbacks of measuring PLC on leave petioles

PLC measurements on leaf petiole are fast, efficient and offer more repeatable measurements than other embolism measurements methods (*e.g.* vulnerability curves VC thereafter), that use branch segments and so are more destructive. This type of technique has also an advantage that it could be carried out on young tree. Furthermore assessing loss of conductivity in petiole xylem makes sense, as a study demonstrate that K_{leaf} is positively correlated with embolism at the plant level (e.g. P_{50} , Nardini et al. 2012). Thus this type of measurements could be used as a proxy for evaluating rapidly embolism level in living tree without the confounding effect resulting from branch excision injury. More generally, on the relationships between hydraulic failure and water deficit, the PLC values we recorded should be counterbalanced in the light of two phenomenon linked to xylem dysfunction events. On a first hand, there is now abundant evidence in the literature that many plants are able to refill xylem conduit (Hacke & Sauter, 1996, Salleo et al. 1996, Salleo et al. 2004, Konrad et al. 2005, Nardini et al., 2008, Brodersen et al. 2011), so a given values of PLC at a precise

time point did not indicate that xylem tissues are definitely useless for sap transport. On the other hand, there are also many papers dealing with "cavitation fatigue" concept (i.e. a unique xylem conduit could not be refilled infinitely, Hacke et al. 2001, Stiler et al. 2002, Hacke et al. 2003). These authors showed that 'cavitation fatigue' is linked with increased xylem permeability to air, consequently to successive cavitation events. As it has been shown that many woody species appeared to operate with relatively high PLC values throughout the growing season (Hargrave et al. 1994; Sperry et al. 1994; Tognetti & Borghetti 1994; Magnani & Borghetti 1995). This seasonality of PLC values restricts the usage of petiole as an embolism-proxy, as leaves could experience several events of water deficit-induced loss of conductivity. More PLC leaves-based measurements and comparison with branch PLC should be carried out to confirm that PLC leaves-based measurements could be considered as a real proxy of embolism-level in the whole plant because there is controversy in the literature.

Finally our results should be interpreted in the light of a tradeoff between high cavitation resistance and resilience after hydraulic failure event (Meinzer & McCulloh, 2013). Even if this last assumption needs more experimental evidences, we could consider that traditional approaches to characterizing the vulnerability of tree to hydraulic failure events may need to be reassessed in the light of this tradeoff.

Perspectives

On a methodological point of view, as a first attempt for PLC measurements on petiole, it has been found reliable even if the relevance with whole hydraulic status of tree needs more experimental evidence. The methodology needs further material improvements (*e.g.* debimeter design), to become a standardize procedure**.** A future possibility in studying ashes resistance to cavitation is the establishment of vulnerability curves (VCs, i.e. PLC in function of xylem pressure; see Delzon et al. 2010 for details) with the CAVITRON technique, a centrifugation-based technique described by (Cochard et al. 2005). VCs seemed to be very characteristic of a given species (Melcher et al. 2012) and gives an insight of the drought tolerance and or resistance among closely related species (Poot & Veneklaas 2013). Ashes species complex (*F.excelsior*, *F.angustifolia* and hybrids individuals) should be evaluated via this criterion, as soon as a technical solution has arisen for

implement VCs curves for species that have greater than 2m long xylem vessels, as it's the case for ashes (Cochard 2002). More precise information on embolism formation should be gained through this technique and potential different shape (R or S) of vulnerability curves should be found. On the drought response in ashes, our results are in accordance with those of Guicherd et al. 1997 on common ash being able to cope with extreme leaf water potentials as low as – 4.0 MPa .Our results extend this ability to cope with low water potential to *F.angustifolia* and hybrids. However all ashes populations have a tendency to have not the same amount of PLC for a same leaf water potential, this could be explained by a potential organ-based embolism as it has been shown in *F.excelsior* by Cochard et al. 1997. Exploration of embolism formation in several part of *F.angustifolia* and hybrids trees should unveil clues about our observed inconsistence between PLC and leaf water potential measurements. Carbon starvation risk for ashes dieback should be assessed too, in *F.excelsior* and *F.angustifolia* and hybrid for longer water constraint, to gain a more comprehensive view of which mechanism (i.e. carbon starvation or hydraulic failure) is more likely to trigger mortality events in forest stands with ash tree as little information is available for this species complex.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the following people who greatly helped me during this work. Great help with greenhouse and plant care was provided by Lionel Saunois and Amandine Dubois (Université Paris Sud). Technical assistance in building up the experimental setup was provided by Jean-Louis Mabout (CNRS).

Funding

Project was funded by the FRB "Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité" project FRENETIC. JR received financial support from the French ministry of Education for his PhD and funding from the University Paris-Sud, CNRS and AgroParisTech, which supported the ESE Laboratory.

Conflict of interest

None declared

References

Journal articles

Adams HD, Guardiola-Claramonte M, Barron-Gafford GA, Villegas JC, Breshears DD, Zou CB, Troch PA, and Huxman TE (2009) Temperature sensitivity of drought-induced tree mortality portends increased regional die-off under global-change-type drought. Proc Natl Acad Sci USA 106: 7063–7066. doi:10.1073/pnas.0901438106. PMID: 19365070.

Aitken SN, Yeaman S, Holliday J, Wang T, Curtis-McLane S (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. Evolutionary Applications 1: 95–111.

Alder N, Pockman W (1997) Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. Journal of experimental botany 48:665–674.

Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, et al. (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. Forest Ecology and Management 259:660–684.

Anderegg WRL, Berry JA, Smith DD, Sperry JS, Anderegg LDL, Field CB (2012) The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. Proc Natl Acad Sci USA 109:233–237. doi:10.1073/pnas. 1107891109. PMID:22167807.

Anderson BT (2012) Intensification of seasonal extremes given a 2°C global warming target. Climatic Change 112:325–337.

Arca M, Hinsinger DD, Cruaud C, Tillier A, Bousquet J, & Frascaria-Lacoste N (2012) Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar *Fraxinu*s PloS one 7:e34089.

Borghetti M, Edwards WRN, Grace J, Jarvis PG, Raschi A (1991) The refilling of embolized xylem in Pinus sylvestris L. Plant Cell Environ 14:357-369.

Bréda N, Huc R, Granier A Dreyer E (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. Ann For Sci 63:625–644.

Brodersen CR, McElrone AJ, Choat B, Matthews MA, Shackel KA (2010) The dynamics of embolism repair in xylem: in vivo visualizations using high-resolution computed tomography. Plant physiology, 154:1088–95.

Brodribb T (1996) Dynamics of Changing Intercellular CO_2 Concentration (ci) during Drought and Determination of Minimum Functional ci. Plant Physiol 111:179-185.

Brodribb TJ, Holbrook NM (2004) Diurnal depression of leaf hydraulic conductance in a tropical tree species. Plant Cell Environ 27: 820–827.

Brodribb TJ, Cochard H (2009) Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. Plant Physiol 149:575–584.

Boyer JS (1976) Photosynthesis at low water potentials. Philosophical transactions - Royal Society Biological sciences 273:501 -512.

Carney SE, Gardner KA, Rieseberg LH (2000) Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (Helianthus). Evolution international journal of organic evolution 54:462–74.

Ciais P, Reichstein M, Viovy N, Granier A, Ogée J, Allard V et al. (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. Nature 437:529–33.

Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R et al. (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. Nature 491:4–8.

Chmura DJ, Anderson PD, Howe GT, Harrington CA, Halofsky JE, Peterson DL, et al. (2011) Forest responses to climate change in the northwestern United States: Ecophysiological foundations for adaptive management. Forest Ecology and Management 261:1121–1142.

Cochard H, Tyree MT (1990) Xylem dysfunction in Quercus: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. Tree physiology 6:393-407.

Cochard H, Peiffer M, Le Gall K, Granier A (1997) Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in Fraxinus excelsior L.: impacts on water relations. Journal of Experimental Botany 48:655-663.

Cochard H (2002) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. Plant, Cell & Environment 25:815–819.

Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. Physiologia Plantarum 124:410–418.

Cochard H, Barigah ST, Kleinhentz M, Eshel A (2008) Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among Prunus species ?. Journal of Plant physiology 165:976–982.

Cornic G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. Trends Plant Sci 5:187–8.

Cowan IR, Farquhar GD (1977) Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. Symp Soci Exp Biol 31:471–505.

Delzon S, Douthe C (2010) Mechanism of water-stress induced cavitation in conifers: bordered pit structure and function support the hypothesis of seal capillary-seeding. Plant cell & environment 33:2101–2111.

Dobrowolska D, Hein S, Oosterbaan A, Wagner S, Clark J, Skovsgaard JP (2011) A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. Forestry 84:133–148.

Duquesnay A, Breda N (1998) Changes of tree-ring δ13C and water-use efficiency of beech (Fagus sylvatica L.) in north-eastern France during the past century. Plant Cell & Environment 21:565–572.

Galiano L, Martínez-Vilalta J, Lloret F (2011) Drought-Induced Multifactor Decline of Scots Pine in the Pyrenees and Potential Vegetation Change by the Expansion of Co-occurring Oak Species. Ecosystems 13:978–991.

Gérard PR, Fernandez-Manjarres JF, Frascaria-Lacoste N 2006a Temporal cline in a hybrid zone population between Fraxinus excelsior L. and Fraxinus angustifolia Vahl. Mol Ecol 15:3655–3667.

Gérard PR, Fernández-Manjarrés JF, Bertolino P, Dufour J, Raquin C, Frascaria-Lacoste N 2006b New insights in the recognition of the European ash species Fraxinus excelsior L. and Fraxinus angustifolia Vahl as useful tools for forest management. Ann Sci For 63:733–738.

Gérard P, Temunovic M, Sannier J, Bertolino P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N, Fernandez-Manjarres JF (2012) Chilled but not frosty: understanding the role of climate in the hybridization between the Mediterranean Fraxinus angustifolia Vahl and the temperate Fraxinus excelsior L.(Oleaceae). Journal of Biogeography 40:835-846.

Guicherd P, Peltier JP, Gout E, Bligny R, & Marigo G (1997) Osmotic adjustement in Fraxinus excelsior L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. Trees, 11,155–161.

Hacke UG, Sperry JS (2003) Limits to xylem refilling under negative pressure in *Laurus nobilis* and *Acer negundo*. Plant, Cell and Environment 26:303–311.

Hacke UG, Stiller V, Sperry JS, Pittermann J, McCulloh KA (2001) Cavitation fatigue. Embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. Plant physiology 125:779–86.

Hacke U, Sauter J (1996) Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. Oecologia 105:435–439.

Hargrave KR, Kolb KJ, Ewers FW, Davis, SD (1994) Conduit diameter and drought-induced embolism in SalTia-Mellifera Greene (labiatae). New Phytol 126:695–705.

Heuertz M, Hausman JF, Hardy OJ, Vendramin GG, Frascaria-Lacoste N, Vekemans X (2004) Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Evolution international journal of organic evolution 58:976–88.

Hoffmann W, Marchin RM, Abit P, Lau L (2011) Hydraulic failure and tree dieback are associated with high wood density in a temperate forest under extreme drought. Global Change Biology 17:2731–2742.

Holbrook NM, Zwieniecki MA (1999) Embolism repair and xylem tension. Do we need a miracle ? Plant Physiology 120:7–10.

IPCC 2007. Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, UK and NY, USA: Cambridge University Press.

Jaeger C, Gessler A, Biller S, Rennenberg H, Kreuzwieser J (2009) Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. Journal of experimental botany 60:4335-4345.

Johnson DM, McCulloh KA, Woodruff DR, Meinzer FC (2012) Hydraulic safety margins and embolism reversal in stems and leaves: why are conifers and angiosperms so different? Plant Sci 195:48–53.

Jones HG (1973) Moderate-term water stresses and associated changes in some photosynthetic parameters in coton. New Phytologist 72:1095–1105.

Jones MM, Turner NC, Osmond CB (1981). Mechanisms of drought resistance. In Paleg L.G., Aspinall D. (Eds), The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press Australia Pub. 15-37.

Konrad W, & Roth-Nebelsick A (2005) The significance of pit shape for hydraulic isolation of embolized conduits of vascular plants during novel refilling. Journal of biological physics 31:57–71.

Lens F, Tixier A, Cochard H, Sperry JS, Jansen S, Herbette S (2013) Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies. Current Opinion in Plant Biology 16:1–6.

Lemoine D, Peltier JP, Marigo G (2001) Comparative studies of the water relations and the hydraulic characteristics in *Fraxinus excelsior* , *Acer pseudoplatanus* and *A* . *opalus* trees under soil water contrasted conditions. Annals of forest science 58:723–731.

Kursar T, Engelbrecht BMJ, Burke A, Tyree MT, EI Omari B, & Giraldo JP (2009) Tolerance to low leaf water status of tropical tree seedlings is related to drought performance and distribution. Functional Ecology 23:93–102.

Nardini A, Ramani M, Gortan E, Salleo S (2008) Vein recovery from embolism occurs under negative pressure in leaves of sunflower (Helianthus annuus). Physiologia plantarum 133:755–64.

Nardini A, Pedà G, La Rocca N (2012) Trade-offs between leaf hydraulic capacity and drought vulnerability: morpho-anatomical bases, carbon costs and ecological consequences.The New phytologist 196:788–98.

Magnani F, Borghetti M (1995) Interpretation of seasonal changes of xylem embolism and plant hydraulic resistance in Fagus sylvatica. Plant, Cell and Environment 18:689–696.

Maherali H, Pockman WT, Jackson RB (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. Ecology 85:2184–2199.

Mallet J (2007) Hybrid speciation. Nature 446:279–83.

Marigo G, Jacky JP (2000) Success in the demographic expansion of Fraxinus excelsior L .Trees15:1–13.

Martínez-Vilalta J, Lloret F, Breshears DD (2012) Drought-induced forest decline: causes, scope and implications. Biology letters 8:689–91.

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T et al. (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. The New phytologist 178:719–39.

McDowell NG, Beerling DJ, Breshears DD, Fisher RA, Raffa KF, Stitt M (2011)The interdependence of mechanisms underlying climate-driven vegetation mortality.Trends in Ecology & Evolution 26:523–532.

Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. Annals of Botany 89:895–905.

Meehl GA, Stocker TF, Collins WD, Friedlingstein P, Gaye AT, Gregory JM, Kitoh A, Knutti R, Murphy JM, Noda A, Raper SCB, Watterson IG, Weaver AJ, Zhao ZC (2007) Global climate projections.

Meinzer FC, Johnson DM, Lachenbruch B, McCulloh KA Woodruff DR (2009) Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. Funct Ecol 23:922–930.

Meinzer FC, McCulloh KA (2013) Xylem recovery from drought-induced embolism: where is the hydraulic point of no return?. Tree Physiology 33:331–334.

Melcher PJ, Holbrook NM, Burns MJ, Zwieniecki MA, Cobb AR, Brodribb TJ, Choat B, Sack L (2012) Measurements of stem xylem hydraulic conductivity in the laboratory and field. Methods in Ecology and Evolution 3:685 -694.

Mitchell PJ, O'Grady AP, Tissue DT, White D, Ottenschlaeger ML, Pinkard E (2013) Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality.The New phytologist 197:862–72.

Morand ME, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002) A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. Molecular ecology 11:377–85.

Morand-Prieur ME, Vedel F, Raquin C, Brachet S, Sihachakr D, Frascaria-Lacoste N (2002) Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. Molecular ecology11: 613–7.

Parker J, Patton RL (1975) Effects of drought and defoliation on some metabolites in roots of black oak seedlings. Canadian Journal of Forest Research 5:457–463.

Peñuelas, J, Prieto P, Beier C, Cesaraccio C, de Angelis P, de Dao G et al. (2007) Response of plant species richness and primary productivity in shrublands along a north–south gradient in Europe to seven years of experimental warming and drought: reductions in primary productivity in the heat and drought year of 2003. Global Change Biology 13:2563–2581.

Pockman WT, Sperry JS (2000) Vulnerablity to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. American Journal of Botany 87:1287–1299.

Poot P, & EJ Veneklaas, (2012) Species distribution and crown decline are associated with contrasting water relations in four common sympatric eucalypt species in southwestern Australia. Plant and Soil, 364, 2012, 409–423,

R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.

Raquin C, Jung-Muller B, Dufour J, & Frascaria-Lacoste N (2002) Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsio*r (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl). Annals of Forest Science 59:219–224.

Reyer CPO, Leuzinger S, Rammig A, Wolf A, Bartholomeus RP, Bonfante A et al. (2013) A plant's perspective of extremes: terrestrial plant responses to changing climatic variability. Global Change Biology 19:75–89.

Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. Annual Review of Ecology and Systematics 28:359-389.

Rieseberg LH, Baird SJ, & Gardner K (2000) Hybridization, introgression, and linkage evolution. Plant molecular biology 42:205–24.

Sala A, Piper F, Hoch G (2009) Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. New Phytol 186:274–281.

Salleo S, Gullo M, Paoli D, Zippo M (1996) Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of Laurus nobilis: a possible mechanism. New Phytologist 132:47–56.

Salleo S, Lo Gullo MA, Trifilo P, Nardini A (2004) New evidence for a role of vessel-associated cells and phloem in the rapid xylem refilling of cavitated stems of *Laurus nobilis* L. Plant Cell Environ 27:1065–1076.

Scholander PH, Hammel T et al. (1965) Sap pressure in vascular plants: negative pressure can be measured in plants. Science 148:339-346.

Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. Plant, Cell and Environment 11:35-40.

Sperry JS, Nichols KL, Sullivan JEM, Eastlack SE (1994) Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. Ecology 75:1736–1752.

Stiller V, Sperry JS (2002) Cavitation fatigue and its reversal in sunflower (Helianthus annuus L.). Journal of experimental botany 53:1155–61.

Stöhr A, Lösch R (2004) Xylem sap flow and drought stress of *Fraxinus excelsior* saplings. Tree physiology 24:169–80.

Tardieu F, Simonneau T (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviors. Journal of Exp Bot 49:419–432.

Temunović M, Franjić J, Satovic Z, Grgurev M, Frascaria-Lacoste N, Fernández-Manjarrés JF (2012) Environmental heterogeneity explains the genetic structure of Continental and Mediterranean populations of Fraxinus angustifolia Vahl.PloS one 7:e42764.

Trenberth KE, Jones PD, Ambenje P, Bojariu R, Easterling D, Klein Tank A, Parker D, Rahimzadeh F, Renwick JA, Rusticucci M, Soden B, Zhai P (2007) Observations: surface and atmospheric climate change. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M.,Miller, H.L. (Eds.), Climate Change 2007: The Physical

Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.CambridgeUniversity Press, Cambridge, United Kingdom and NewYork, NY, USA 235–336.

Trifilò P, Lo Gullo MA, Salleo S, Callea K, Nardini A (2008) Xylem embolism alleviated by ion-mediated increase in hydraulic conduc- tivity of functional xylem: insights from field measurements. Tree Physiol 28:1505–1512.

Trifilò P, Nardini A, Raimondo F, Lo Gullo MA, Salleo S (2011) Ion-mediated compensation for drought-induced loss of xylem hydraulic conductivity in field-growing plants of *Laurus nobilis* L. Funct Plant Biol 38:606–613.

Tognetti R, Borghetti M (1994) Formation and seasonal occurrence of xylem embolism in *Alnus cordata*. Tree Physiol 14:241–250.

Thomasset M, Fernández-Manjarrés JF, Douglas GC, Bertolino P, Frascaria-Lacoste N, Hodkinson TR (2012) Assignment testing reveals multiple introduced source populations including potential ash hybrids (*Fraxinus excelsior* × *F. angustifolia*) in Ireland. European Journal of Forest Research 132:195-209.

Tyree MT, Sperry JS (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40:19–38.

Tyree MT, Salleo S, Nardini A, Lo Gullo MA & Mosca R (1999) Refilling of embolized vessels in young stems of laurel. Do we need a new paradigm?. Plant Physiology 120:11–21.

Tyree MT, Cochard H (2003) Vessel contents of leaves after excision a test of Scholander's assumption. Journal of experimental botany 54:2133–2139.

Vilagrosa A, Bellot J, Vallejo VR, Gil-Pelegrin E (2003) Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. Journal of Experimental Botany 54:2015–2024.

Wang W, Peng C, Kneeshaw DD, Larocque GR, Luo Z (2012) Drought-induced tree mortality: ecological consequences, causes, and modeling. Environmental Reviews 20:109-121.

West AG, Hultine KR, Jackson TL, Ehleringer JR (2007a) Contrasting hydraulic strategies explain differential summer moisture use of *Pinus edulis* and *Juniperus osteosperma*. Tree Physiology 27:1711–1720.

Wheeler, EA InsideWood – A Web resource for hardwood anatomy Elisabeth A. Wheeler. International association of wood anatomists.32:199–211.

Zwieniecki MA, Holbrook NM (1998) Diurnal variation in xylem hydraulic conductivity in white ash (*Fraxinus americana* L.) red maple (*Acer rubrum* L.) and red spruce (*Picea rubens* Sarg.). Plant, Cell and Environment 21:1173–1180.

Books

Arnold ML (1997) Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press

Dixon H (1914) Transpiration and the ascent of sap in plants. New York, Macmillian.

Rameau JC, Mansion D, Dumé G (1989) Flore forestière française Tome 1, Plaines et collines Institut du développement forestier. ISBN 2-904740-16-3.

Tyree MT, Zimmermann MH (2002) Xylem structure and the ascent of sap. 2nd edn. Springer, Berlin.

Websites

InsideWood – A Web resource for hardwood anatomy http://insidewood.lib.ncsu.edu/search;jsessionid=083628C70A83859712C88306CCFA1C1B?0 (5 June 2012, date last accesed)

Table 1. Stand characteristics of the studied *Fraxinus* populations. The indicated abbreviations will be used in the text to refer to the populations. (GPS coordinates, altitude is in meter above sea level). LMA (Leaf mass per area) value is given as mean +/- SE (N = 5) statistical difference are indicate by different superscript letters (Wilcoxon pairwise comparison implemented with Bonferroni correction for *P*-values).

Abbreviation	SGO	TAV	SDYE	MLA
Locality name	Saint-Gobain	Tavaux	Saint Dyé	Mas Larrieu
Geographical position	49.36°N 3.23°E	47.05°N 5.38°E	47.69°N 1.56°E	42.35°N 3.02°E
Altitude (m)	80	190	50	10
Climate type	Temperate	Temperate	Temperate	Mediterranean
Status in the species complex	*Fraxinus excelsior*	hybrid	hybrid	*Fraxinus angustifolia*
Leaf Mass per area g m^{-2}	87.64 ± 9.26^{a}	82.49 ± 0.66^{a}	102.64 ± 3.88^{b}	96.49 ± 7.66^{a}

Figure 1: All values are displayed function of drought stress applied. These different levels of water constraint are referenced as follow 1: no water constraint, 2: between -1.5 and -2 MPa, 3: -2.5 to -3 MPa and 4: -4 MPa (a) Leaf predawn potential evolution for ashes used in this experiment. Population acronym is displayed in Table1. (b) Percentage of loss of conductivity (PLC) values. All values are mean +/ SE (N = 5) except for the last level of drought stress where N = 3 for SGO, SDYE and MLA. Different letters indicate different statistical difference (pairwise Wilcoxon-test comparison implemented with Bonferroni correction for *P*-values).

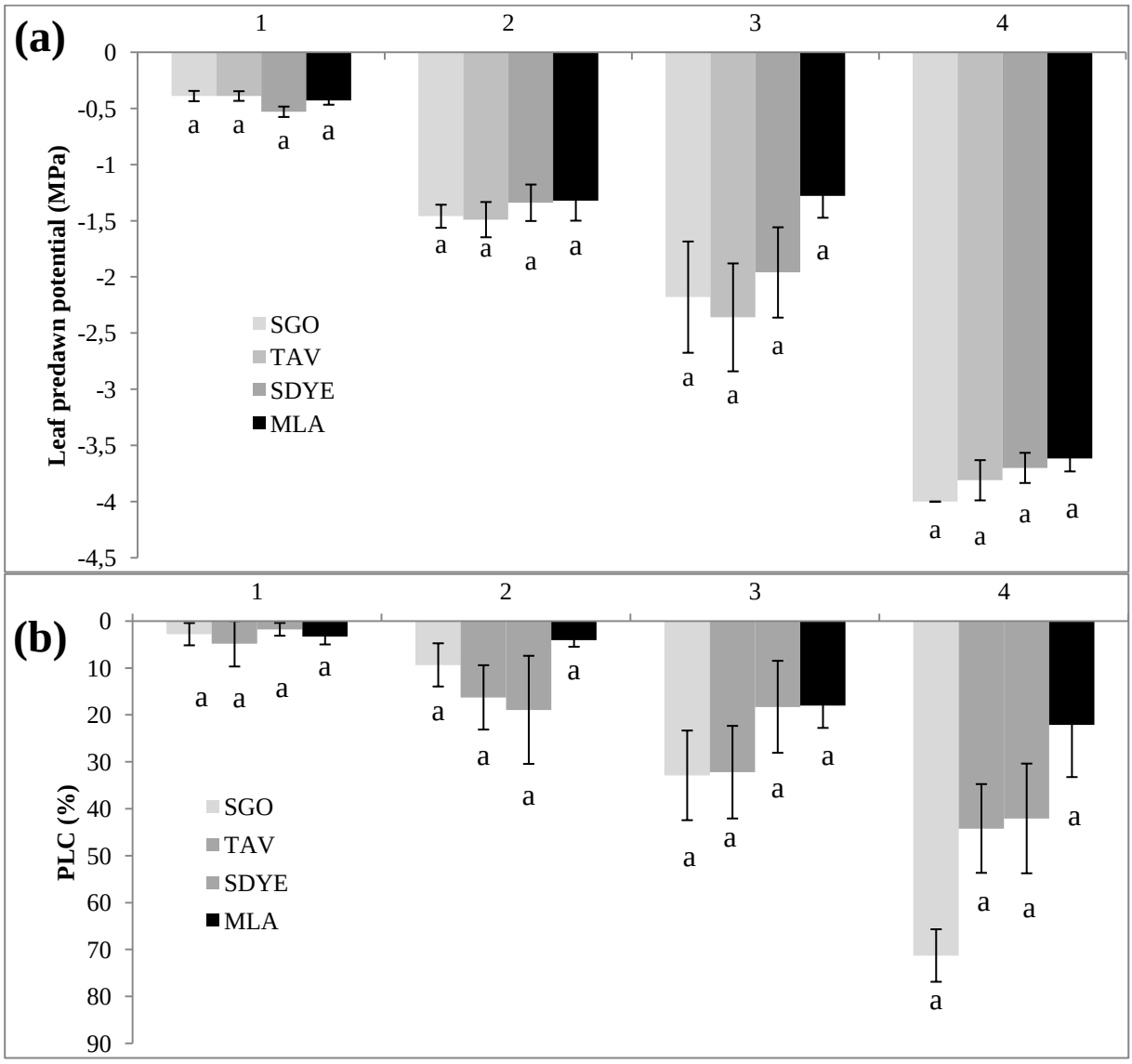
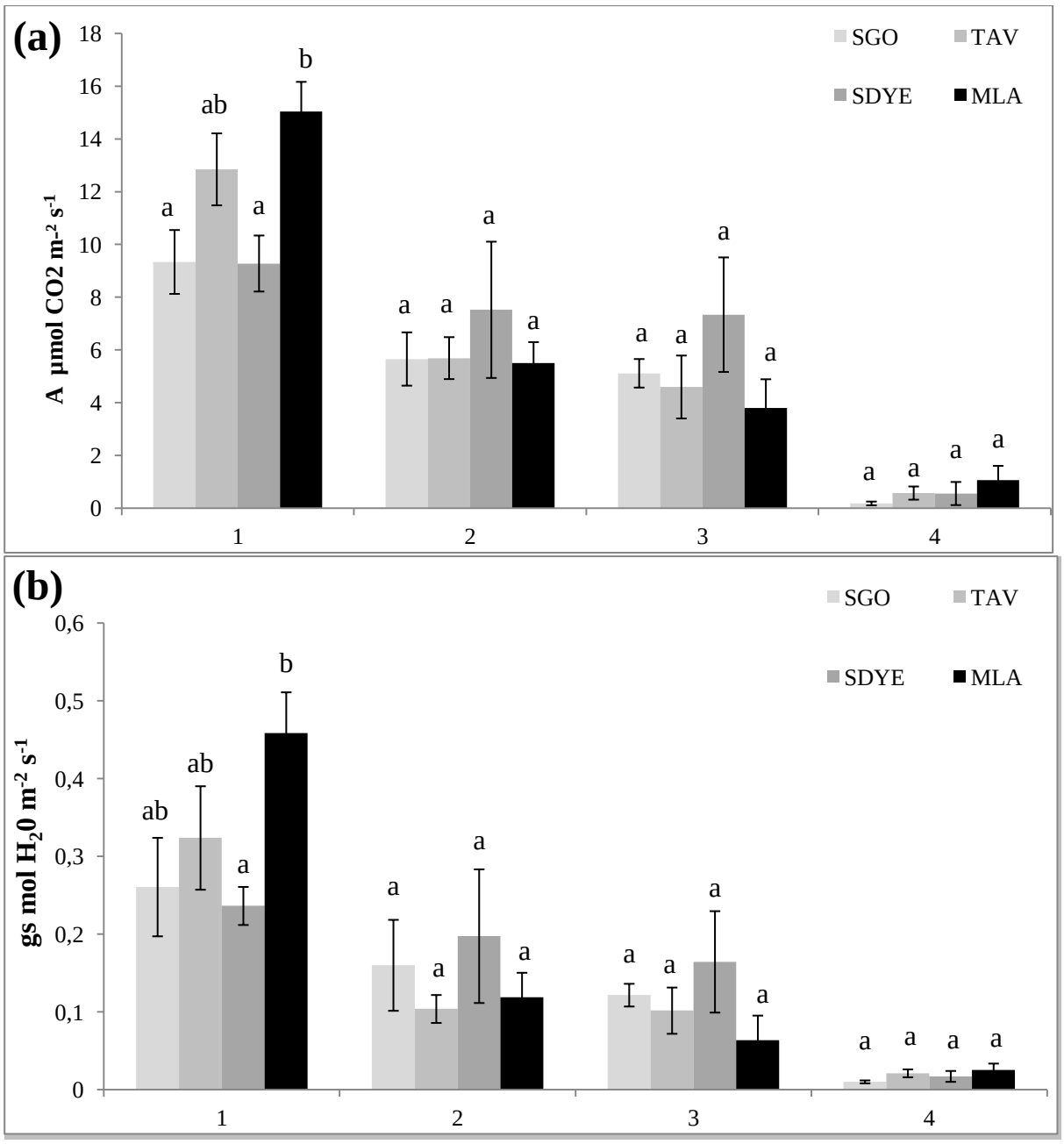
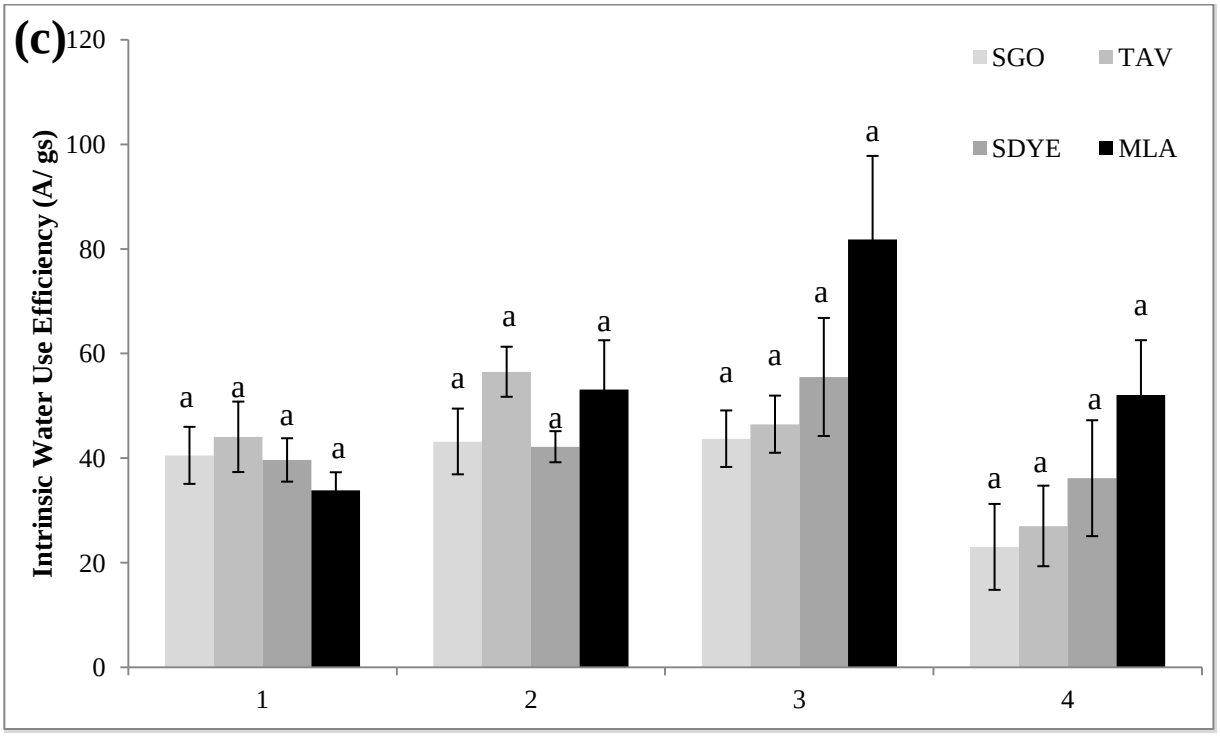
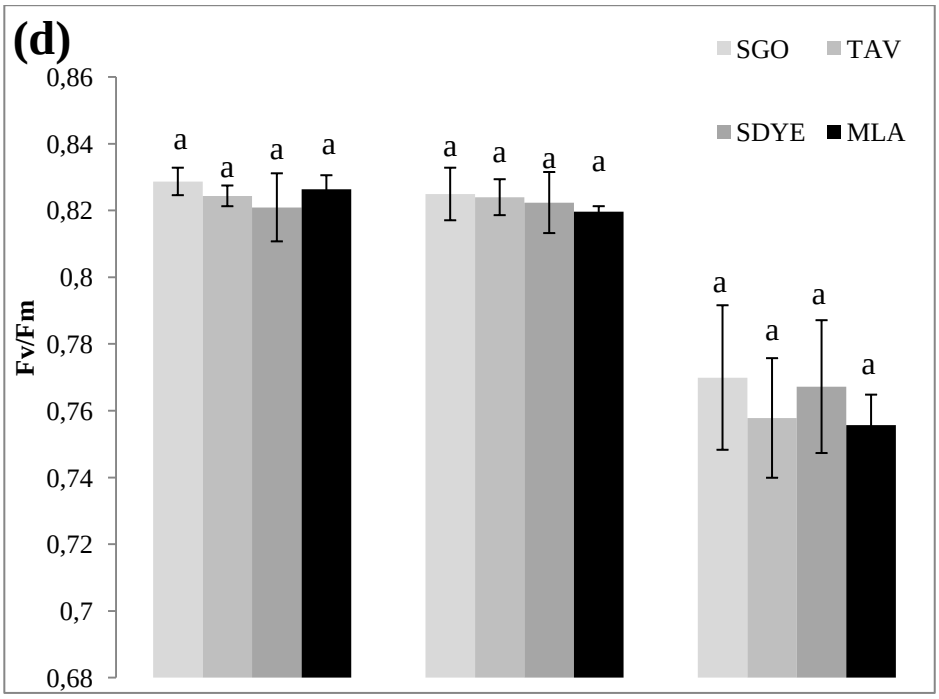


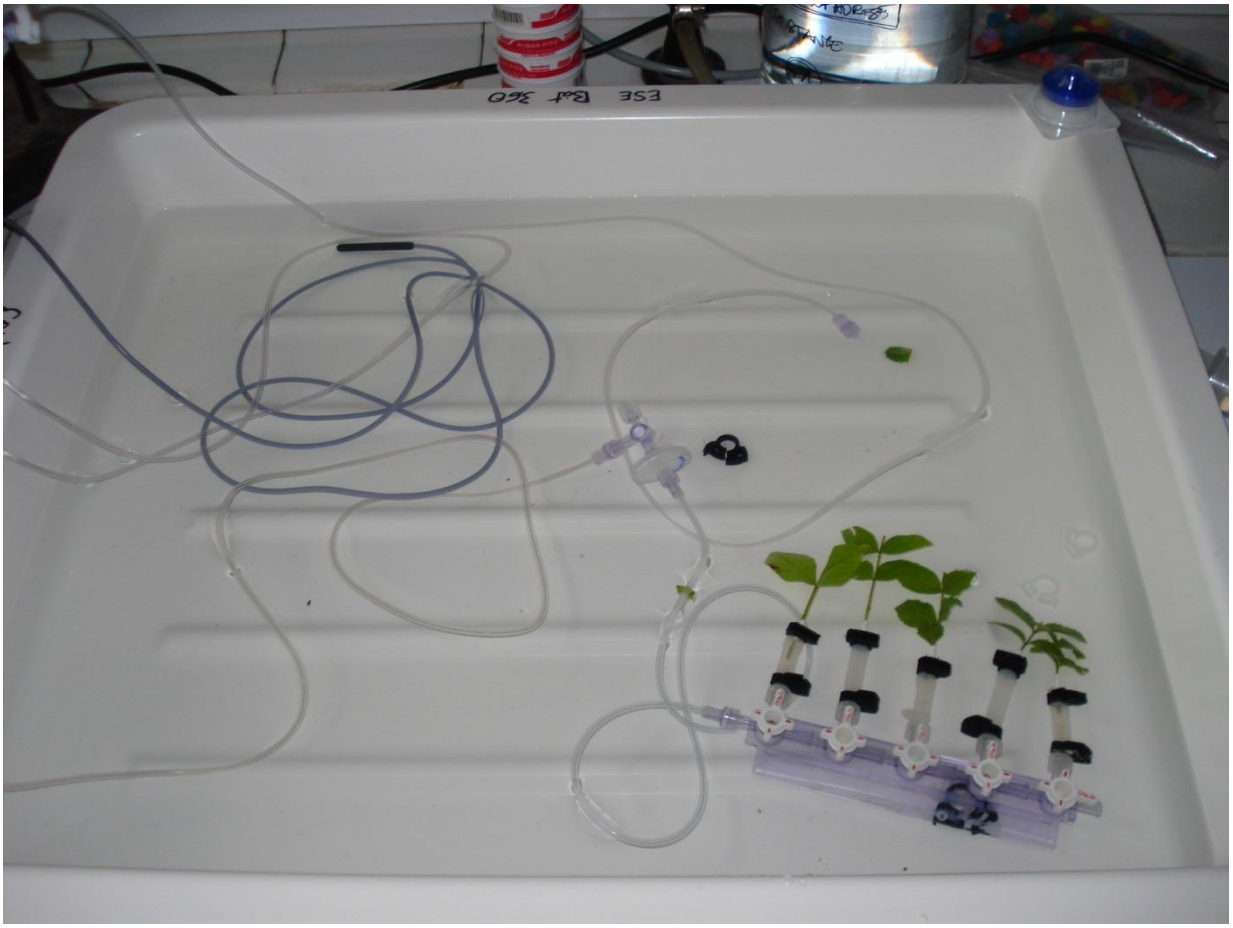
Figure 2. (a) Assimilation mean +/- SE N = 5. (b) Stomatal conductance mean +/- SE (N = 5). (c) Intrinsic water use efficiency calculated as the ratio of assimilation (*A*) to stomatal conductance (*gs*). (d) Chlorophyll fluorescence mean +/- SE N = 5, except for the most severe level of drought stress for which N = 3 for SGO, SDYE and MLA. Different letters indicate different statistical difference (pairwise Wilcoxon-test comparison implemented with Bonferroni correction for *P*-values). The different levels of water constraint are referenced as follow 1: no water constraint, 2: between -1.5 MPa and -2 MPa, 3: -2.5 to -3 MPa and 4: -4 MPa.




(c)
Intrinsic Water Use Efficiency (A/ gs)
120
100
80
60
40
20
0
SGO
TAV
SDYE
MLA
a
1
2
3
4


(d)
Fv/Fm
0,86
0,84
0,82
0,8
0,78
0,76
0,74
0,72
0,7
0,68
SGO
TAV
SDYE
MLA
a

Supplementary material S1: Picture of the manifold device used for PLC measurements.



Discussion générale-Perspectives

V) Discussion générale – Perspectives

V-a) Caractérisation avec ou sans contrainte hydrique des populations de frênes étudiées

Au cours de nos expérimentations, l'hypothèse centrale de ce travail : la vigueur hybride, ne s'est pas manifestée par la supériorité des populations hybrides sur celles parentales (*F.excelsior* ou *F.angustifolia*). Dans des conditions hydriques optimales aucune population de frêne hybride, pour aucune variable, ne s'est montrée « supérieure » par rapport à *F.excelsior* et/ou *F.angustifolia*. Ici les hybrides sont plutôt intermédiaires comme ce qui avait été mesuré par Araujo-Calçada (rapport M2 EBE 2009). La population hybride de Tavaux étant plutôt proche de *F.excelsior* alors que la population hybride de Saint-Dyé est plus proche de *F.angustifolia*. Par contre le résultat novateur de nos travaux est que nous avons pu relier la morphologie, le comportement écophysiologique à la composition génétique de nos populations hybrides, qui est fonction du taux d'introgression.

Cependant les avantages des hybrides pourraient aller au-delà de la simple « vigueur hybride ». En premier lieu, en assurant une variabilité génétique qui pourrait servir d'assurance contre des dépérissements forestiers massifs, par des échanges de gènes réguliers (rôle dans la dynamique évolutive du complexe d'espèces).

En effet la tolérance à la sécheresse chez *F.excelsior* est bien renseignée (Besnard & Carlier 1990, Marigo & Peltier 1996, Cochard et al., 1997, Lemoine et al., 2001) alors que de récents travaux ont bien mis en évidence la tolérance de *F.angustifolia* (Jaeger et al. 2009) à des épisodes de crues. Les populations hybrides pourraient donc posséder à la fois la tolérance à la sécheresse de *F.excelsior* et une tolérance aux épisodes de crues de *F.angustifolia*. Ces arbres hybrides auraient donc un avantage certain, dans des environnements fluctuants tel que ceux prédit dans un futur proche (IPCC 2007).

Par nos travaux, nous avons pu obtenir un début de réponse sur cet intérêt que pourrait revêtir les hybrides de frêne en populations naturelles, nous avons pu voir au chapitre I que la population de Tavaux semble être celle qui récupère le mieux d'un épisode de contrainte hydrique modéré, alors que, au chapitre II, la population hybride de Saint-Dyé, semble plus résistante à des stress hydriques forts puisqu'elle maintient des valeurs plus élevées d'échange gazeux (*A*, *gs*). Les deux populations hybrides présentent également des

comportements intermédiaires face à une contrainte hydrique. Elles seraient donc moins sujettes à la fois à un risque de dysfonctionnement hydraulique ou de famine carbonée que les espèces parentales. Cependant dans ces deux cas le faible échantillonnage n'a pas permis d'avoir la puissance statistique nécessaire pour avoir des conclusions définitives sur ces deux populations hybrides. Un échantillonnage plus important permettra sans doute de résoudre ce problème.

De plus, les fréquents croisements entre *F.excelsior* et *F.angustifolia,* qui pourraient se renforcer à cause du changement climatique, permettraient éventuellement de stabiliser la zone de tension entre *F.excelsior et F.angustifolia* en permettant l'émergence d'un hybride « type », plutôt qu'une mosaïque d'individus possédant des taux d'introgression variables comme c'est le cas à l'heure actuelle. Cette mosaïque de génotypes (ou d'individus) possibles rendent la caractérisation de leurs réponses difficile, ce qui a été notre cas dans cette thèse, en raison d'une forte variabilité et d'un possible biais d'échantillonnage (cf. Fig. 5.). Ce biais, qui est renforcé quand nous mesurons un faible nombre d'individus, comme ici, peut fausser l'image que nous avons de chaque population hybride.

Notre thèse apporte des tendances et des éclairages sur le comportement de différentes populations, représentant un gradient éco-génétique, du complexe d'espèce frêne face à une contrainte hydrique. Nous allons dans cette partie discuter plus en detail les résultats obtenus dans chaque experimentation par rapport au statut des populations (*F.excelsior*, *F.angustifolia* ou hybride) et essayer d'en dégager des enseignements généraux quant à leur comportement en situation de contrainte hydrique.
Notre première expérimentation s'est focalisée sur les échanges gazeux et l'efficacité d'utilisation de l'eau. Nous avons dans un second temps suivi l'expression de gènes via une approche cDNA-AFLP. La contrainte hydrique fut légère (Ψ_{pd} : -0,9 MPa) mais néanmoins suffisante pour induire une réponse à la fois sur les échanges gazeux et au niveau de l'expression génétique (ARNm). Durant cette contrainte nous avons pu mettre en évidence un comportement diffèrent entre nos populations de frênes.

Les deux populations de *F.excelsior* testés dans cette expérimentation montrent un fonctionnement photosynthétique « constant », qui ne semble pas être affecté par la

contrainte hydrique. Les valeurs moyennes d'échange gazeux sans contrainte hydrique (moyenne et erreur standard, *A* La Preste : 9,09 ± 0,42 SGO : 10,48 ± 0,44 µmol CO_2 m^2 s^{-1} et *gs* La Preste : 0,12 ± 0,008 SGO : 0,13 ± 0,006 mol H_2O m^2 s^{-1}) ou avec contrainte hydrique (*A* La Preste : 8,13 ± 0,09 µmol CO_2 m^2 s^{-1} Saint gobain : 6,5 ± 0,15 et *gs* La Preste 0,09 ± 0,008 Saint gobain : 0,07 ± 0,02 mol H_2O m^2 s^{-1}) ne diffèrent pas statistiquement (pour toutes les variables *A*, *gs*, *WUEi*) après une levée de la contrainte hydrique durant 3 jours (valeurs *A* La Preste : 9,75 ± 0,012 Saint gobain : 9,97± 0,02 µmol CO_2 m^2 s^{-1} et *gs* La Preste : 0,13 ± 0,006 Saint Gobain : 0,16 ± 0,023 mol H_2O m^2 s^{-1}). Leur *WUEi* ne varie que peu (moyenne de *WUEi* d'environ 85 à 105 µmol CO_2 mol H_2O), et nous ne trouvons pas de réelles différences (*A*, *gs,* ou *WUEi*) entre les populations de *F.excelsior* de montagne (La Preste) et celles de plaine (Saint Gobain).

Concernant les populations hybrides étudiées, nous n'avons pas mis en évidence un meilleur fonctionnement sous contrainte hydrique, que ce soit par rapport à *F.excelsior* (Saint Gobain) ou *F.angustifolia* (La Mole). En fait leur fonctionnement sous contrainte hydrique reste intermédiaire, les deux populations hybrides étant plus affectées par la contrainte hydrique que celle de *F.excelsior,* mais moins que ceux de *F.angustifolia*.

Cependant la population hybride de Saône (Tavaux) réagit mieux au bout d'une période de réarrosage de 3 jours que celle de Loire puisque ses valeurs d'échange gazeux sont comparables à celles qu'elles étaient avant l'application d'une contrainte hydrique,(*gs* Tavaux : 0,18 ± 0,017 mol H_2O m^2 s^{-1} avant contrainte hydrique, et Tavaux 0,20 ± 0,08 mol H_2O m^2 s^{-1} après réarrosage) ce qui n'est pas le cas des hybrides de Loire (*gs* : Saint-Dyé : 0,21 ± 0,05 mol H_2O m^2 s^{-1} avant contrainte hydrique et Saint-Dyé 0,14 ± 0,05 H_2O m^2 s^{-1} après réarrosage).

Contrairement à *F.excelsior* (Saint Gobain), les deux populations de *F.angustifolia* (La Mole et Mas Larrieu) testées ici, sont affectées par une contrainte hydrique légère. Leur photosynthèse ainsi que leur conductance stomatique sont grandement réduites, alors que leur *WUEi* sous contrainte augmente fortement (valeurs moyenne *WUEi* avant contrainte Mas Larrieu : 58,37 ± 3,82 Nidolerès : 58,94 ± 9,64 µmol CO_2 mol H_2O, *WUEi* pendant contrainte Mas Larrieu : 123 ± 6,22 Nidolerès : 131 ± 6,91 µmol CO_2 mol H_2O). Cette augmentation de *WUEi* indique une capacité à dépenser moins d'eau (*gs*) pour une

assimilation (*A*) donnée sous contrainte hydrique (i.e. dépenser moins de molécules d'eau par molécules de carbone gagné).

Cependant, bien que *F.angustifolia* améliore son fonctionnement sous contrainte hydrique (*WUEi* augmente), la contrainte hydrique a un effet plus durable chez *F.angustifolia*, car les valeurs de *A* et *gs* ne reviennent pas à leurs valeurs de départ même après une période de 3 jours sans restriction d'apport d'eau (valeurs *A* avant contrainte Mas Larrieu : 15,11 ± 0,68 Nidolerès : 13,46 ± 0,95 µmol CO_2 m² s^{-1} et *gs* Mas Larrieu : 0,27 ± 0,02 Nidolerès : 0,29 ± 0,05 mol H_2O m² s^{-1} valeurs après réhydratation *A* Mas Larrieu : 12,64 ± 0,02 Nidolerès : 11,41 ± 0,03 µmol CO_2 m² s^{-1} et *gs* Mas Larrieu : 0,18 ± 0,02 Nidolerès : 0,13 ± 0,02 mol H_2O m² s^{-1}).

Au final on peut résumer le comportement de *F.excelsior* vis-à-vis d'une contrainte hydrique comme plutôt isohydrique (potentiel de base similaire quelles que soient les conditions hydriques) (Tardieu 1993) et celui de *F.angustifolia* comme anisohydrique (potentiel hydrique et transpiration variable suivant les conditions hydriques) (Tardieu & Simmoneau 1998).

Le fait d'être isohydrique pour une plante présente des avantages évidents, cela permet d'éviter que le potentiel de xylème (ψ_x) atteigne des valeurs critiques dans un environnement fluctuant (VPD, eau du sol,…etc.), et donc par conséquent cela prévient tout risque d'embolie. Ceci est d'autant plus vrai pour les organismes ligneux chez lesquels la récupération d'évènements d'embolie peut revêtir un cout énergétique très élevé (Lovisolo et al., 2008). On observe plutôt une tendance à l'isohydrie chez les espèces arborées (Bucci et al., 2005, Fisher et al., 2006).

Les avantages de l'anisohydrie sont moins évidents puisque les plantes sont plus exposées à un risque accru de cavitation (potentiel de xylème ψ_x trop négatif). Cependant l'avantage de ce mode de contrôle du contenu en eau de la plante, est de conférer un comportement plus opportuniste et donc permet de maximiser les échanges gazeux quand les conditions sont les plus favorables (e.g. milieu tropical Kumagai & Porporato 2012), ou en cas de stress environnemental modéré (Pou et al., 2012). Par ailleurs il a été mis en évidence chez plusieurs espèces l'existence de nombreux cycles de récupération journalière de l'embolie (e.g. *Plantago major L.* Milburn 1974, *Fraxinus americana* L., *Acer rubrum* L., *Picea rubens*

Sarg. Zwieniecki & Holbrook 1998, Clearwater & Clark 2003, *Simarouba glauca* D.C. Brodribb & Holbrook 2004). Ce type de comportement hydrique est présent chez certains arbres l'amandier (*Prunus dulcis* L.) et le chêne de Palestine (*Quercus calliprinos* L. Wartinger et al., 1990, Klein et al., 2013) mais n'est pas systématique (Cochard et Delzon 2013). Enfin, il semblerait que ce comportement anisohydrique confère une meilleure tolérance à une contrainte hydrique (capacité à maintenir ses stomates ouverts plus longtemps), comme l'a montré Mereu et al. (2009) sur une espèce arborée du milieu méditerranéen (Filaire à large feuille *Phylerria latifolia* L.).

Concernant les populations hybrides étudiées, elles adoptent une stratégie plutôt intermédiaire entre isohydrie et anisohydrie pour faire face à une contrainte hydrique entre les deux stratégies extrêmes de *F.excelsior* et de *F.angustifolia*. Cependant ce comportement « intermédiaire » semble être la résultante de l'hybridation. Néanmoins, il existe un continuum entre un comportement isohydrique et anisohydrique au sein d'une même espèce (Turner et al., 1984). De plus cette catégorisation des plantes peut être réversible, ainsi il a été montré que sous différentes conditions, et même pendant la saison de végétation, la vigne (*Vitis vinifera* L.) peut avoir des comportements isohydrique ou anisohydrique (Chaves et al., 2010).Ces comportements semblent donc être dépendant des conditions environnementales auxquelles la plante est ou a été préalablement exposée (e.g. trait d'histoire de vie) (Lovisolo et al., 2010).

Pour conclure, les populations de *F.angustifolia* et la population de Loire sont les plus sensibles à un risque de limitation d'entrée de carbone car ce sont ces populations qui sont le plus affectées en termes d'échanges gazeux par une contrainte hydrique. De plus, même après 3 jours de disponibilité en eau importante, elles ne récupèrent pas intégralement leurs valeurs d'échanges gazeux sans contrainte hydrique.

V-b) Risque hydraulique des populations de frênes étudies

Après avoir obtenus des indications sur les comportements sur de jeunes plants avec une contrainte hydrique légère (Ψ_{pd} moyen min -0,9 MPa), nous avons voulu nous intéresser à une contrainte hydrique plus forte pour induire des phénomènes de cavitation sur des arbres parmi les trois catégories que nous voulions examiner (*F.excelsior*, *F.angustifolia* et des arbres issus de populations hybrides).

Le degré de cavitation a été mesuré via la perte de conductivité hydraulique (PLC) du xylème foliaire. Nous avons concentré notre étude sur quatre populations (*F.excelsior* : Saint Gobain*, F.angustifolia* : La Mole, et les mêmes populations hybrides que précédemment). Seuls les résultats de la contrainte hydrique maximale (Ψ_{pd} : - 4MPa) vont être discutés.

D'après nos résultats la population de *F.excelsior* semble très sensible à l'embolie, puisque elle atteint des valeurs moyennes de PLC de 70% (71,30 ± 9,45 %). Les populations hybrides sont de nouveaux intermédiaires au niveau de l'embolie les valeurs de PLC sont proche de 40% en moyenne (Tavaux : 44,23 ± 5,59 % Saint Dyé : 42,09 ± 11,69 %). Les individus de *F.angustifolia* semblent quant à eux plus résistants à l'embolie, car même au plus fort de la contrainte hydrique, ils n'atteignent que des valeurs de 20% en moyenne (22,11 ± 11,16 %). *F.angustifolia* est donc plus résistant à l'embolie que ce nous attendions (espèce bien que méditerranéenne vivant dans des zones à forte disponibilité en eau i.e. près des cours d'eau).

Pour conclure il est surprenant de voir, étant donné son écologie, *F.angustifolia* moins sensible que *F.excelsior* à la perte de conductivité hydraulique (forêts de ripisylve : Marigo et al., 2000). Ces résultats peuvent s'interpréter soit (i) par une moindre sensibilité à la perte de conductivité hydraulique qui reste à confirmer (ii) ou un phénomène de re-remplissage des vaisseaux de xylème qui serait plus performant chez *F.angustifolia* que chez *F.excelsior.* Cela reste néanmoins à démontrer de manière formelle chez ces espèces et avec des méthodologies adaptées, car il s'agirait vraisemblablement d'un artefact de mesure (Cochard & Delzon 2013).

Nous avons pu mettre en évidence des comportements physiologiques différents entre *F.excelsior* et *F.angustifolia* vis-à-vis d'une contrainte hydrique. Ces différences de comportement physiologique semblent être dûes à des ajustements métaboliques, plus qu'à des différences génétiques ou d'équipement photosynthétique. Nous ne sommes pas allés plus en avant pour expliciter sur quelles bases métaboliques ces différences de comportement écophysiologique sous contrainte résidaient. Cela reste à déterminer par de futures études sur le complexe d'espèce frêne.

Sur ces aspects de contraintes hydriques, il reste difficile malgré nos expérimentations de conclure sur une différence de résistance à une contrainte hydrique chez ce complexe d'espèce à l'aide des populations échantillonnées. Ceci en raison de certaines mesures acquises lors de nos deux expérimentations qui sont contradictoires, (e.g. une relative résistance de *F.excelsior* à la contrainte hydrique dans le chapitre I et une grande sensibilité de *F.excelsior* à la perte de conductivité hydraulique dans le chapitre II). Pour ce dernier point, l'organe sur lequel a été mesuré la perte de conductivité hydraulique (feuille) peut être sujette à caution, car il existe des exemples où les arbres préfèrent sacrifier leur feuilles pour éviter un phénomène d'embolie généralisé (e.g. Rood et al., 2000). Si les pourcentages de perte de conductivité diffèrent largement entre branche/tronc et feuilles, cela pourrait remettre en cause nos conclusions.

Ces résultats obtenus sur la perte de conductivité hydraulique lors d'une contrainte hydrique forte sont d'autant plus surprenants que les deux espèces sont proches sur le plan anatomique (Wheeler 2011, Inside Wood database). Ces différences de résistance à une perte de conductivité hydraulique ne semblent donc pas basées sur des différences anatomiques (Hacke et al., 2001). Une caractérisation anatomique fine à l'échelle microscopique pourrait néanmoins permettre d'apporter des éléments de réponse sur cette différence de sensibilité à l'embolie.
Ceci pourrait être intéressant car il semblerait que l'anatomie du bois de *F.angustifolia* possèdent une certaine plasticité, par exemple confronté à un excès d'eau les vaisseaux de xylème sont modifiés (aire de la section des vaisseaux de xylème : Ballesteros et al., 2010).

V-c) Généralisation sur les aspects de contrainte hydrique-limites des choix méthodologiques

Les réponses à une contrainte hydrique impliquent toutes les échelles (organisme, organe, cellules…). Cependant, même les réponses à une contrainte hydrique à l'échelle cellulaire restent actuellement néanmoins difficiles à expliciter (Pinheiro & Chaves 2010) en raison du feedback et de l'activation ou de l'inactivation de certaines voies métaboliques (Krasensky & Jonak, 2012). Il a été montré par exemple que le fonctionnement stomatique dépend d'une combinaison multiple d'hormones (auxine, cytokines, éthylène, acide salicylique) et du degré de leurs interactions respectives (Acharya & Assmman 2009,

Wilkinson & Davies 2010). Et il semblerait que même l'acide abscissique, hormone largement impliquée dans le cadre d'une réponse à une contrainte hydrique, peut avoir un rôle « d'agent double » en induisant une réponse positive (maintenance de synthèse des aquaporines) (Parent et al., 2009) et une réponse négative (fermeture des canaux des aquaporines) (Hose et al., 2000). La compréhension de l'homéostasie cellulaire sous contrainte hydrique commence tout juste à émerger (Pinheiro & Chaves 2010).

Comme détaillé en introduction de ce manuscrit, les réponses à une contrainte hydrique peuvent être très complexes à explorer et ce, même sur des organismes modèles (i.e. *Arabidopsis thalianna* Rizhsky et al., 2004). Par ailleurs, il subsiste un manque de comparabilité entre les différentes études qui se sont intéressées aux réponses d'organismes à une contrainte hydrique (Jones 2007, Pinheiro & Chaves 2010).

Ces réponses à des évènements de sècheresse sont par ailleurs encore plus difficiles à appréhender pour des organismes comme les arbres forestiers qui sont par leurs caractéristiques (longévité, taille,…) des organismes moins étudiés que les herbacées (Linhart 1999). De plus les organismes modèles (*Arabidopsis thaliana* L.) ne peuvent être utilisés comme organisme de « substitution » pour étudier leur réponses à une sécheresse, certains mesures anatomiques étant liées à la taille des organismes considérées (e.g. vaisseaux de xylème Tixier et al., 2013). Pour renforcer ce manque de prédictibilité de la réponse à la sécheresse des arbres forestiers, certains épisodes de sècheresse continuent à affecter les arbres plusieurs années après l'évènement initial (Bigler et al., 2007, McDowell 2008).

De plus nous ne pouvons prétendre avoir reproduit exactement en conditions contrôlées les contraintes hydriques de nature climatique que peuvent subir les arbres forestiers, ce qui limite la portée de nos résultats. Dans la réalité du terrain, la limitation de la disponibilité en eau du sol est généralement liée à d'autres types de contraintes (température élevés, ensoleillement, UV, VPD[21], etc…) qui se surimposent à la contrainte hydrique seule (Passioura 2007, De Boeck et al., 2010). Ceci rend en général un évènement de sècheresse climatique unique, de par l'intensité différentielle des composantes de l'évènement de sécheresse, et par conséquent difficile à reproduire expérimentalement,

[21] Vapour Pressure Deficit ou Déficit de pression de vapeur (DPV) est la différence entre la quantité d'humidité dans l'air ambiant par rapport à la quantité d'humidité que l'air ambiant peut contenir lorsque celui-çi en est saturé.

quand plus de deux facteurs interviennent (e.g. lumière et déficit hydrique : Mittler 2006). De plus, la période de végétation (débourrement, floraison, etc…) durant laquelle la plante va subir une contrainte hydrique est parfois plus déterminante que l'intensité de la contrainte hydrique elle-même (Passioura 2007).

Il en découle que l'extrapolation de nos résultats reste à être établie car nous avons travaillé sur des arbres jeunes (6 mois et 3 ans) qui ne reflètent peut être pas le comportement physiologique d'arbres adultes, comme l'ont montré des études sur les différences de photosynthèse entre arbres adultes et jeunes plants (Thomas & Wienner, 2002, Ishida et al., 2005). Cette hypothèse d'un fonctionnement physiologique diffèrent entre adultes et jeunes plants peut être renforcé dans notre cas d'étude par le fait que l'on observe une inversion du nombre de folioles chez les deux espèces de frênes à différents stades de maturité (i.e. *F.excelsior* a moins de foliole au stade plant que *F.angustifolia* alors qu'au stade adulte *F.excelsior* a plus de folioles que *F.angustifolia*).

V-d) Aspects novateurs de notre étude

Le travail effectué ici est novateur sur plusieurs aspects de par l'interdisciplinarité du projet, car nous avons pu mettre en évidence un lien étroit entre la morphologie, les caractéristiques écophysiologiques, la réponse à une contrainte hydrique et le degré d'introgression respectif de chaque population ainsi que l'expression de certaines séquences génétiques. Ces séquences correspondent à des gènes qui sont liés à certaines protéines clefs du métabolisme (Protéine ribosomale 60S, sous unité 1B de la Rubisco), et certaines pourraient être liées à la réponse à une contrainte hydrique tels des Ferrédoxine NADP+ réductase qui jouent un rôle dans la dernière étape de la chaîne de transfert d'électrons (Ferrédoxine ➔ NADP+) lors de la photosynthèse (Lintala et al., 2009).

À notre connaissance notre étude est la plus complète proposée sur les réponses à une contrainte hydrique chez le frêne. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir de différences significatives entre populations de frêne sur la majorité des traits que nous avons étudiée. Ce projet a fait naitre des synergies entre deux disciplines : l'écophysiologie et la génétique et devrait permettre, dans de futures études, de faire émerger des problématiques ainsi que des résultats novateurs.

Les cinq nouvelles séquences déposées dans Genbank® sont intéressantes à plusieurs titres, car elles correspondent à des séquences qui sont spécifiques à deux populations de frêne hybride (Saint-Dyé : E41MseC-285, E41MseC-356, Tavaux E41MseC-372) et à *F.angustifolia* (La Mole : E41MseC-266, E41MseC-446 cf. Chapitre I).
En plus de renforcer l'arsenal de détection des évènements d'hybridation chez le frêne, ces séquences de cDNA pourront éventuellement permettre un suivi dynamique de l'hybridation de *F.angustifolia* chez *F.excelsior,* en détectant l'introgression de *F.angustifolia* dans les populations naturelles de frênes.

V-e) Comportement et dynamique des espèces de frênes et leur hybrides dans une perspective de changement climatique

Ce qui est attendu avec le changement climatique à venir, est une remontée en latitude de la zone hybride telle qu'elle existe actuellement en France au vu des variables climatiques qui limitent *F.angustifolia* (température minimum, Gérard et al., 2012). Parallèlement à cette remontée, *F.angustifolia* devrait conquérir plus d'habitats écologiques qu'il n'occupe actuellement du fait de sa plus grande compétitivité lors des premières années (croissance) et du caractère plastique qu'il a montré lors des expérimentations de contrainte hydrique que nous avons menées.

Le climat étant un des principaux facteurs limitant l'hybridation (Fernandez-Manjarrés et al., 2006, Gérard et al., 2012), cette remontée de *F.angustifolia* plus au nord aura également pour conséquence la formation de nouvelles populations de frênes hybrides par contact avec des populations (ou génotypes) n'ayant auparavant pas connu d'évènements d'hybridation, et donnant lieu à leur tour à de nouvelles ressources génétiques.

Il reste difficile à l'heure actuelle de prévoir comment *F.angustifolia* va se comporter vis-à-vis d'un déficit hydrique, au vu de la faible quantité d'informations (écologique) disponibles pour cette espèce (e.g. distribution géographique Gérard et al., 2012). D'après nos résultats *F.angustifolia* semble relativement plastique et tolérant à une contrainte hydrique forte (valeurs de PLC a - 4 MPa cf. Chap. II), même s'il met plus de temps à retrouver un fonctionnement physiologique « normal » que *F.excelsior* une fois la contrainte hydrique

terminée (cf. Chap. I). Un exemple de sa plasticité écologique se manifeste en Australie où *F.angustifolia* a été introduit et s'est répandu à partir de plantations urbaines. Il est à l'heure actuelle considéré comme espèce invasive dans le sud de l'Australie, où il est qualifié de « Desert ash ».

Concernant les populations de frênes hybrides nous avons observé des caractères intermédiaires pour les populations étudiées. À l'échelle de la France il existe une mosaïque de populations hybrides de frêne. De plus il est impossible d'établir à l'heure actuelle de quelle génération sont issus les hybrides de frêne que nous avons utilisés (i.e. F1 ou autre génération ?). Car si les séquences microsatellites disponibles sont efficaces pour détecter l'hybridation au niveau populationnel, elles le sont beaucoup moins au niveau individuel (Gérard, 2006 Thèse), en raison de fréquents rétrocroisements et de la persistance d'individus hybrides dans certaines localités (e.g. Vallée de la Loire, Gérard et al., 2006) produisant à leur tour de nouveaux hybrides. Une étude théorique a montré qu'il fallait jusqu'à plus de 70 marqueurs pour détecter efficacement les événements d'introgression avec rétrocroisement (Rhymer & Simberloff 1996), alors que nous ne disposons actuellement que de 16 marqueurs SSR pour le frêne. Enfin, il semble impossible, avec les outils dont nous disposons actuellement, de définir précisément et correctement les individus composant les zones hybrides de frênes (e.g. taux d'introgression) et ceci pour plusieurs raisons. D'une part, l'inconnue concernant la génération d'hybridation citée plus haut et d'autre part parce que cette zone d'hybridation est dynamique et que la production d'individus hybrides, par chevauchement de la phénologie de floraison de *F.excelsior* et *F.angustifolia* (Gérard et al., 2006), produit des individus pouvant exprimer une très grande gamme de phénotypes (Rieseberg & Ellstrand 1993). Les individus hybrides sont de plus capables d'exprimer des phénotypes « cryptiques » (Thomasset et al., 2012) ressemblant morphologiquement très fortement aux deux espèces de frênes (*F.excelsior* et *F.angustifolia*).

Cependant, ce dernier point pourrait se révéler un atout, car un groupe d'arbres issus de populations hybrides maximisant la variabilité génétique (Buerkle et al. 2000, Reiseberg et al., 2003, Mallet 2007), a probablement une variété de réponses face à une même intensité de contrainte hydrique. Cette gamme de réponses possibles en relation avec la diversité de

phénotypes que l'on peut rencontrer chez les individus hybrides pourrait servir « d'assurance » dans un environnement fluctuant (Pautasso 2011, Bijlsma & Loeschcke 2012) et vis-à-vis des pathogènes émergents (Keesing et al., 2010).

Mis à part le critère de levée de dormance des graines pour détecter l'hybridation, la plupart des variables morphologiques testées ici ont données des valeurs intermédiaires (densité stomatique, LMA, croissance, nombre de folioles…), le critère morphologique le plus déterminant reste à priori le nombre de dents sur les folioles (Fernandez-Manjarrés, communication personnelle), bien qu'aucun seuil précis pour ce critère ne puisse être déterminé pour déceler l'hybridation, et qu'il faille se contenter d'intervalles de nombre de dents sur les folioles. Il est donc nécessaire d'associer des mesures morphologiques à des marqueurs moléculaires pour détecter clairement l'hybridation. Comme dans notre cas, l'hybridation peut être la résultante de nombreux rétrocroisements pouvant masquer morphologiquement l'hybridation (hybrides cryptiques Thomasset et al., 2012).
Concernant les populations de frêne hybride testées nous n'avons pas mis en évidence une vigueur hybride pour les variables écophysiologiques testées (hauteur finale, croissance radiale, nombre d'entrenœuds, Root-Shoot ratio, densité stomatique, LMA…). Cependant les graines de frênes hybrides présentent une absence de latence de germination (caractéristique de *F.excelsior*) et devrait leur conférer une fitness supérieure par rapport aux *F.excelsior* « purs » dans les premières années de croissance.

V-f) Perspectives méthodologiques

Pour ce qui est des perspectives résultantes de ce travail, nos résultats montrent que dans des conditions hydriques optimales les frênes montrent un fonctionnement photosynthétique diffèrent pour les espèces parentales *F.excelsior et F.angustifolia.* Nos travaux montrent également que ces deux espèces, ainsi que les hybrides n'ont pas de différences au niveau du photosystème II (pour la résistance à la contrainte hydrique). Ces différences d'assimilation reposent sur des différences de *gs* et peut être également dans le métabolisme de la photosynthèse (e.g. vitesse maximale de carboxylation : V_{cmax}, vitesse max de transport d'électron : J_{max}, etc…). De futures études centrées sur les performances photosynthétiques des frênes (*F.excelsior*, *F.angustifolia* ou hybride) permettraient d'examiner ce point.

À l'origine de notre projet nous souhaitions caractériser le complexe d'espèce frêne par une approche protéomique qui aurait été une bonne manière, d'ajouter le chainon manquant entre la génétique et l'écophysiologie. Nous avons cependant dû faire face à de mauvais rendements d'extraction des protéines (présence de tanins dans les feuilles qui précipitent les protéines extraites, Kostova & Iossifova, 2007, ainsi qu'à un certain aléa dans le processus d'extraction (rendements aléatoires), ce qui ne nous a pas permis de mener cette analyse à bien. Des progrès méthodologiques dans l'extraction des protéines permettront certainement d'acquérir des résultats sur cet aspect de notre problématique.
De manière plus générale on pourrait également essayer de caractériser, via un suivi dynamique de l'installation d'une contrainte hydrique, un seuil de fermeture stomatique en fonction du potentiel hydrique pour chaque population de frênes (i.e. courbes $gs = F(\psi_{pd})$. Une bonne corrélation devrait être trouvée entre le degré d'introgression de *F.angustifolia* et la tardiveté de la fermeture stomatique durant une contrainte hydrique. On pourrait préconiser également de tester la relation entre la concentration en acide abscissique dans le xylème, et la fermeture stomatique car une corrélation a pu être établie entre ces deux variables biologiques sur d'autres espèces herbacées (*Trifolium subterraneum* L. Socias et al., 1997).

Nous n'avons pas non plus suivi de manière quantitative l'activité enzymatique de la rubisco sous différentes contraintes. Peut-être existerait-il des différences au sein du complexe d'espèce frêne pour cette enzyme clé de la photosynthèse ? Ces mesures enzymatiques seraient interressantes car il semblerait que le fonctionnement de la Rubisco puisse conférer une résistance à une contrainte hydrique (Xu et al., 2013).
D'autres enzymes impliquées dans le métabolisme sous stress oxydatif peuvent également engendrer des différences de résistance à la sécheresse, telles que la Superoxide Dismutase (SOD), l'Ascorbate Peroxydase (APx), la Glutathionne Réductase (GR) et la catalase qui pourraient également être suivies (Cruz de Carvalho 2008). Ce suivi enzymatique permettra certainement, à terme, de lever les incertitudes physiologiques concernant les différences de comportements entre *F.excelsior* et *F.angustifolia* observés dans cette thèse.

La régulation d'expression de gènes associés à certaines protéines, telles les aquaporines via la régulation des flux d'eau, pourraient également jouer un rôle clé dans la résistance à une contrainte hydrique. Les aquaporines sont des protéines transmembranaires qui modifient la perméabilité des parois cellulaires en influant sur les entrées/sorties d'eau dans la cellule (Maurel et al., 2008). Elles agissent comme des canaux qui s'ouvrent et se ferment en faisant varier leur état de phosphorylation (pour une revue détaillée voir Maurel et al., 2008). La néosynthèse des aquaporines est aussi un moyen rapide d'ajuster les pertes en eau de la plante, car elles seraient corrélées avec la conductance mésophylienne comme le montre une étude chez le riz (*Oryza sativa L.* : Hanba et al., 2004). Cette fonction régulatrice des pertes d'eau, a été également démontrée pour des arbres forestiers comme le noyer (*Juglans regia* L.) sur lequel a été montrée une corrélation nette avec la conductance hydraulique foliaire (K_{leaf}) (Cochard et al. 2007). Certains auteurs considèrent même que les aquaporines peuvent faire changer le type de comportement d'une plante, en cas de contrainte hydrique, d'isohydrique à anisohydrique (Sade et al., 2008).

Un axe supplémentaire de ce travail serait non plus de travailler avec des hybrides issus de populations naturelles mais avec des hybrides issus de croisements contrôlés. De tels croisements ont pu être réalisés avec succès expérimentalement (Morand-Prieur et al., 2002) et des arbres greffés avec ces croisements ont été plantés au jardin commun sur le campus de l'université d'Orsay donnant la possibilité d'explorer les réponses à la sécheresse sur des hybrides de génération F1.

Cependant, cela nécessite de mettre en œuvre des techniques d'application d'une contrainte hydrique à l'échelle de la parcelle (tel par exemple un dispositif d'exclusion des pluies) pour pouvoir manipuler correctement la contrainte hydrique en parcelles expérimentales, car le sol est un milieu interfacique extrêmement hétérogène (Perkins et al., 2013).

Le panel de méthodologies de biologie moléculaire disponible pour étudier des espèces non modèle reste limité. Durant les premières étapes de ce projet nous avons dû nous orienter vers le cDNA-AFLP, car c'était la méthodologie la plus adaptée en termes de rendement mais aussi de coût, pour pouvoir faire une étude transcriptomique sur des organismes non-modèle (Vuysteke et al., 2007, Korpelainen et al., 2010).

Un projet de séquençage du génome de *F.excelsior* est actuellement en cours (R. Buggs 2013). Il devrait permettre d'avoir accès à de nouvelles techniques prometteuses en biologie moléculaire (RT-qPCR, 454 pyrosequençage, shotgun, etc…). Celles-ci devraient ouvrir la voie à des analyses plus fines, qui permettront certainement de donner des clefs sur les bases génétiques des comportements observés au niveau écophysiologique. Étant donné la proximité génétique des deux espèces (Arca et al., 2012) il y aurait certainement des possibilités d'applications pour *F.angustifolia* et les hybrides de frênes.

Cependant mis à part les limitations méthodologiques auxquelles nous avons dû être confrontés, de nombreux incidents ont émaillé les envois d'échantillons vers la société Eurofins® Scientific basé à Rennes. Le transporteur (DHL) a plusieurs reprises renvoyé les échantillons sans justification crédible. Ceci à du impacter la qualité des échantillons de cDNA envoyés congelés. Il est bien connu que des cycles de congélation-décongélation impactent la qualité des cDNA. Il reste cependant difficile de juger dans quelles proportions ces renvois de colis et la décongélation associée des échantillons ont compromis la qualité de nos échantillons et le reste de l'expérimentation cDNA-AFLP.

De plus nous avons dû faire face à de fréquents problèmes d'amplification des marqueurs isolés. Notamment quand il a fallu choisir les marqueurs à séquencer, sur les 20 choisis nous n'avons pu en séquencer que 11, alors mêmes que ces 20 marqueurs étaient supposé être ceux ayant la meilleure qualité. Nous ne pouvons exclure les problèmes de colis cités plus haut dans la responsabilité de ces problèmes d'amplification, et il reste difficile d'évaluer si nous aurions pu avoir plus de marqueurs et surtout plus de marqueurs sequençables. De manière générale, on aurait pu s'attendre à de meilleurs résultats pour cette expérimentation cDNA-AFLP à la fois en termes qualitatifs et en termes quantitatifs.
Néanmoins, les nouveaux marqueurs séquencés lors de ces travaux devraient permettre une amélioration de la distinction des hybrides dans les populations naturelles. Il reste cependant difficile de savoir si cela sera suffisant pour atteindre un degré de discrimination individuel. Mais plus important encore, les séquences déposées dans GenBank® sont caractéristiques de *F.angustifolia* et de deux populations hybrides (Loire : Saint Dyé et Saône : Tavaux), la Loire où *F.angustifolia* est également présent. Ces séquences devraient donc pouvoir jouer le rôle de « marqueur de l'introgression » de *F.angustifolia*

dans le genome de *F.excelsior* et permettre, via des échantillonnages réguliers, (e.g. sur une base annuelle) de suivre l'évolution de la zone hybride, qui est une zone de tension entre les deux espèces (*sensu* Barton & Hewitt, 1985) principalement déterminée par le climat, les précipitations d'été limitant la production de graines de *F.angustifolia*, alors que les températures estivales élevées limitent *F.excelsior* (Gérard et al., 2012).

V-g) Perspectives sur l'étude de la résistance à la cavitation chez le frêne

Pour ce qui est de l'étude de la résistance à la cavitation chez le frêne, il pourrait être pertinent d'établir des courbes de vulnérabilité plus complètes (pourcentage de perte de conductivité en fonction du potentiel de base). Ces courbes de vulnérabilité permettent de caractériser la résistance à la contrainte hydrique pour une espèce donnée (Melcher et al., 2012) et semblent donner des réponses sur les capacités d'espèces arborées, appartenant au même genre à faire face à une contrainte hydrique (Poot & Veneklaas 2013).Ces courbes peuvent être générées à l'aide d'une technique de centrifugation sur laquelle est basé le CAVITRON® développée par H.Cochard (Cochard et al., 2005). Le complexe d'espèce frêne (*F.excelsior*, *F.angustifolia* et hybrides), devrait être testé dès qu'une solution technique sera disponible pour mesurer des espèces arborées ayant des vaisseaux de xylème de plus de 2 m de long (Cochard 2002, Cochard et al., 2010). De ces courbes devraient découler des informations plus précises sur le comportement des frênes face à une contrainte hydrique. Le type de courbes (sigmoïdes ou exponentielles) pourra également être indicatif de la physiologie des frênes confrontée à une contrainte hydrique (Cochard et al., 2010).

V-h) Intérêt de l'hybridation pour la conservation

Enfin, un nouveau pathogène fongique ascomycète et émergent (*Chalara fraxinea*, sous sa forme anamorphique[22] (Kowalski 2006), designé sous le nom d'espèce *Hymenoscyphus pseudoalbidus* sa forme téléomorphe[23] (Gross et al., 2012) est apparu récemment dans les peuplements forestiers de frênes. Les premiers signalements ont eu lieu en Pologne (Kowalski 2006). La quasi-totalité des travaux sur ce pathogène ont d'abord

[22] Forme reproductrice asexuée

[23] Stade de reproduction sexuée

eu lieu sur *F.excelsior.* La sensibilité de *F.angustifolia* semble être également avérée (Kirisits et al., 2010) ainsi que celle à un autre pathogène fongique du genre *Phytophthora* (Akilli et al., 2013). En revanche, celle des frênes hybrides n'a pas à notre connaissance été testée. Pourtant certains travaux montrent que certains arbres hybrides issus de croisements interspécifiques résistent mieux que les espèces dont ils sont issus pour des pathogènes fongiques, comme par exemple pour les hybrides d'Ormes (*Ulmus sp* L.) avec la graphiose (Solla et al., 2005) ou pour le platane (*Platanus sp* L.) pour le chancre coloré du platane (*Ceratocystis fimbriata f. sp. Platani*). (Vigouroux et al., 2006, Pilotti et al., 2009). Il serait donc intéressant de tester la resistance des hybrides naturels de frêne à ces deux pathogènes fongiques emergeants. Cette possible sensibilité du complexe d'espèce frêne devrait etre evaluée, car elle pourrait avoir un effet amplificateur sur les risques de mortalité à grande échelle, comme l'ont par ailleurs très bien souligné McDowell et al., 2008 (cf. Fig. 2.2).

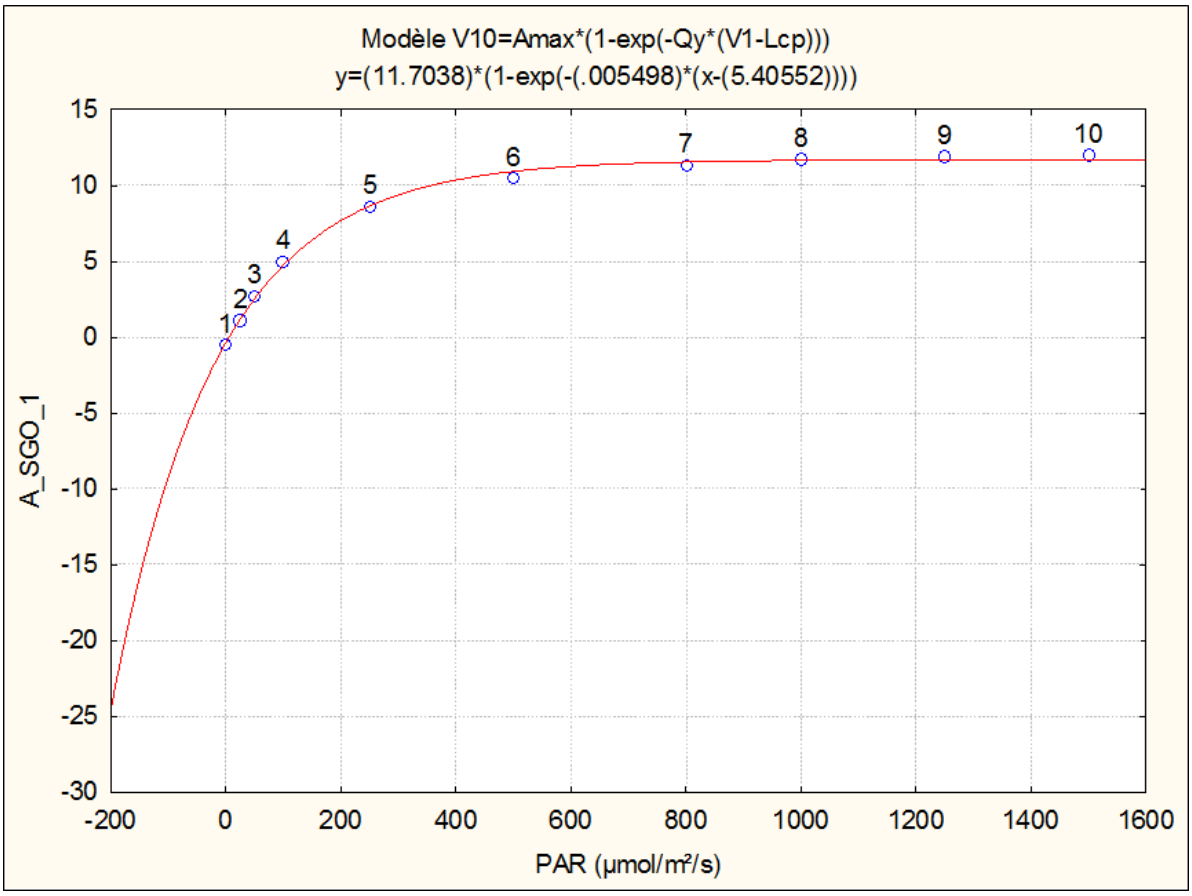
Conclusion

Cette thèse propose des pistes sur le comportement des deux espèces de frênes européens dans différents *scenarii* de contrainte hydrique, ainsi que pour deux populations hybrides connaissant des conditions climatiques différentes (Vallée de la Loire et de la Saône). De ces travaux, émerge le constat d'un comportement différent de ces populations hybrides, qui est en lien avec leur degré d'introgression et leur morphologie. Cependant, la généralisation des caractéristiques de fonctionnement écophysiologiques mesurées sur quelques individus à l'échelle d'une population reste complexe à prédire à une échelle plus fine (i.e. individuelle), étant donné la variabilité de phénotype (liée au degré d'introgression) que l'on observe au niveau des arbres hybrides. De manière générale l'issue des événements d'hybridation reste dans une large mesure imprédictible *in natura* étant donné l'occurrence de flux de gènes asymétrique (Gérard et al., 2006) et les conditions climatiques nécessaires pour l'hybridation.

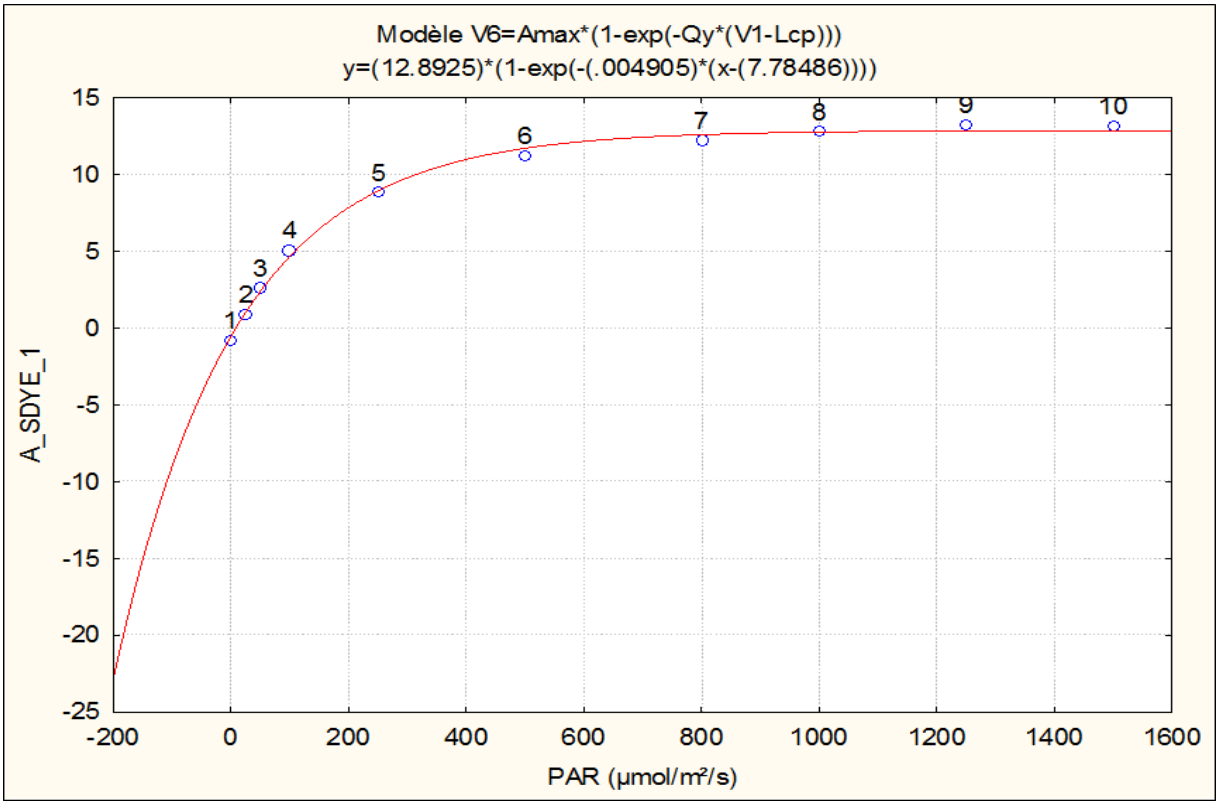
Notre thèse apporte donc des éléments de réponses à la croisée de disciplines scientifiques et de thématiques complexes, comme l'hybridation et les *scenarii* de contrainte hydrique. Cette thèse a surtout permis de « défricher » nos connaissances sur un complexe d'espèces forestières peu étudiés et leur réponses à une contrainte hydrique expérimentale. Cela a permis de mettre en avant l'intérêt de l'approche interdisciplinaire mais aussi et surtout d'ouvrir la voie aux travaux qu'il reste à accomplir d'un point de vue écophysiologique et génétique pour éclairer les problématiques abordées dans cette thèse : D'une part la complexité des processus d'hybridation (et la question associée de la définition d'*une* espèce, que je ne traite pas ici) et d'autre part la complexité de la réponse d'un arbre à une contrainte hydrique.

Annexes

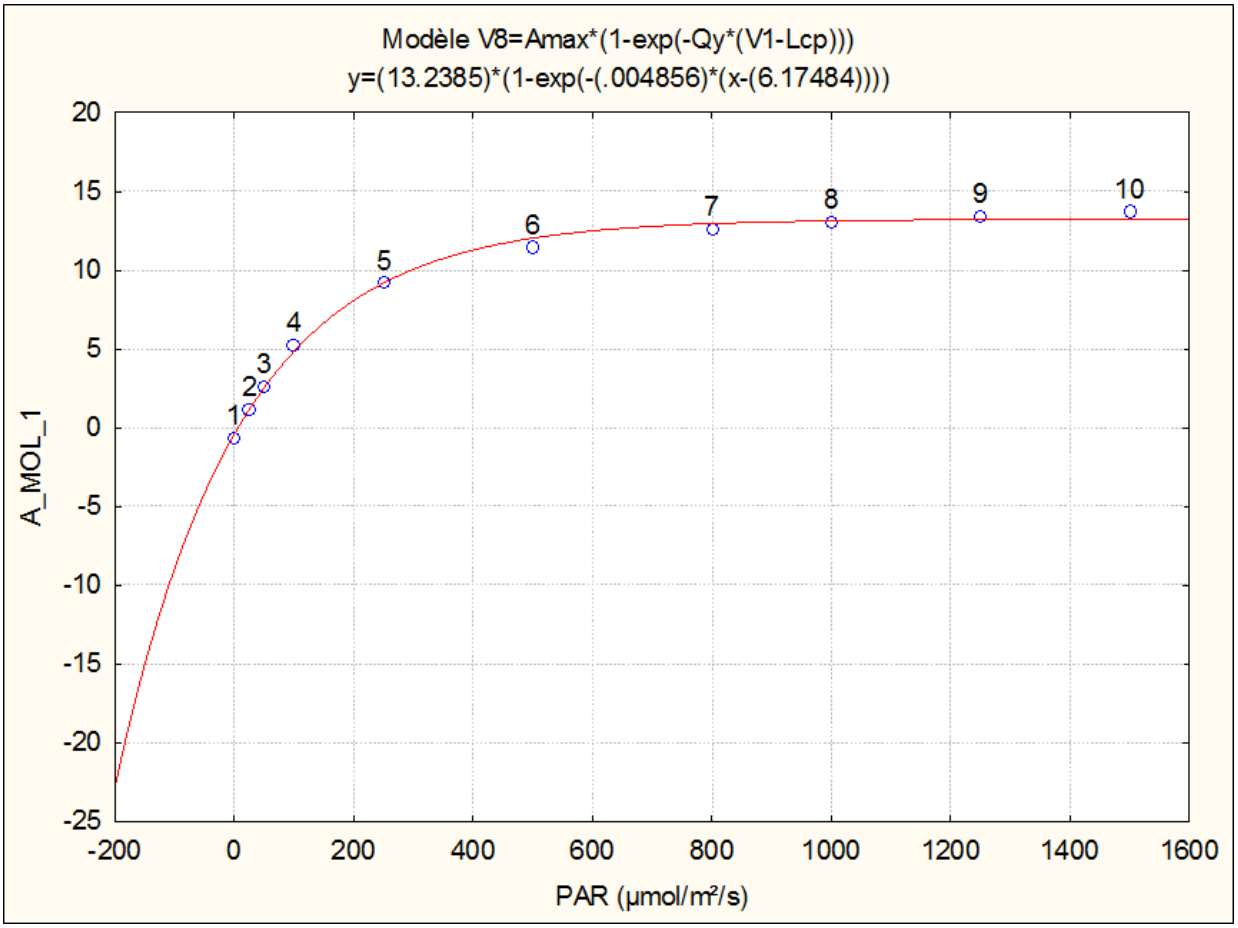
Annexe1 : Courbes A-PAR pour 3 populations de frêne : Saint Gobain (SGO : *F.excelsior*), Saint Dyé (SDYE : Hybride Loire) et La Mole (MOL : *F.angustifolia*). Les paramètres des ajustements réalisés à l'aide du logiciel SAS® sont donnés dans les tableaux sous les courbes. Chaque courbe a été realisée sur un seul individu.



	Estimat.	Erreur	valeur t	niveau p	Conf. In	Conf. Su	R^2	r
Amax	11,70381	0,136848	85,52429	0,000000	11,38021	12,02740	**0,99761**	0,99880
Qy	0,00550	0,000321	17,14301	0,000001	0,00474	0,00626		
Lcp	5,40552	2,943165	1,83663	0,108881	-1,55396	12,36500		

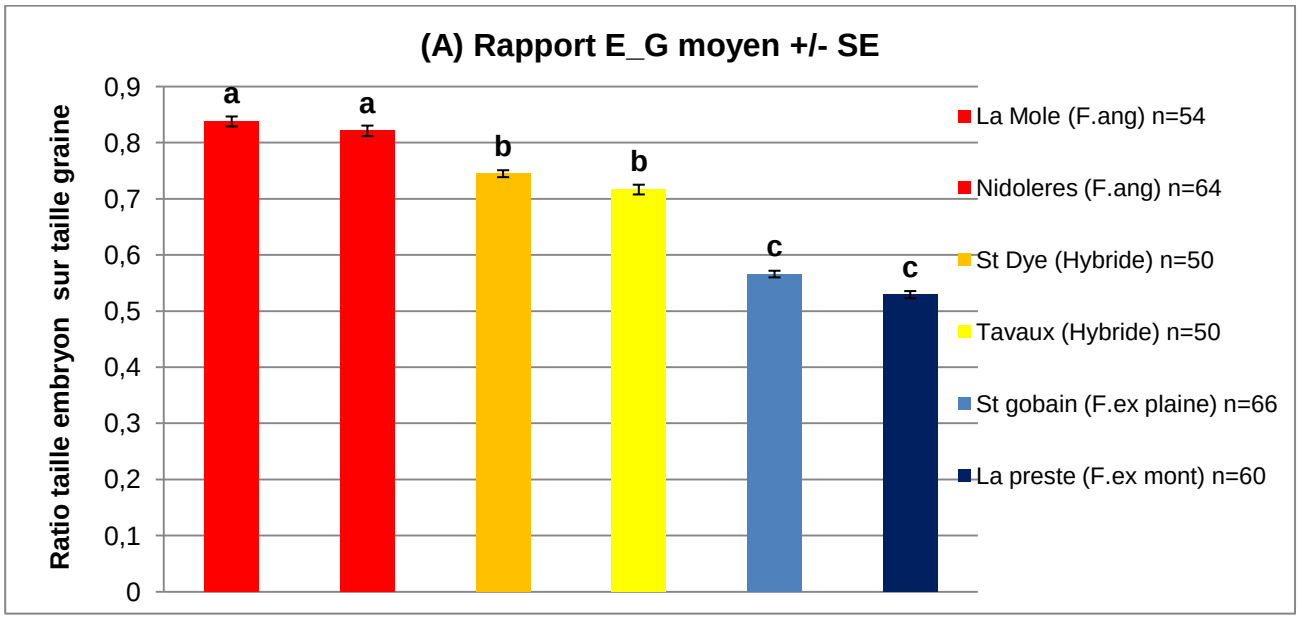


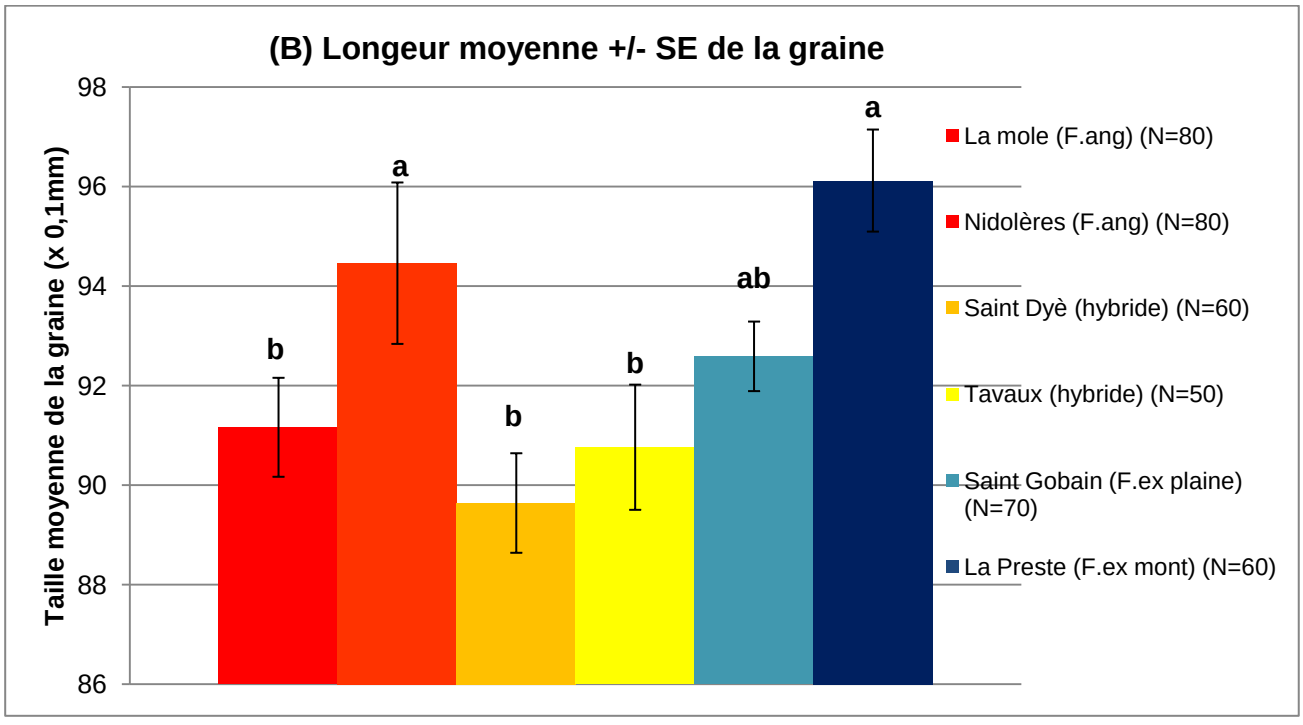
	Estimat.	Erreur	valeur t	niveau p	Conf. In	Conf. Su	R^2	r
Amax	12,89248	0,194339	66,34030	0,000000	12,43294	13,35202	**0,99646**	0,99823
Qy	0,00491	0,000354	13,87030	0,000002	0,00407	0,00574		
Lcp	7,78486	3,870165	2,01151	0,084178	-1,36662	16,93635		

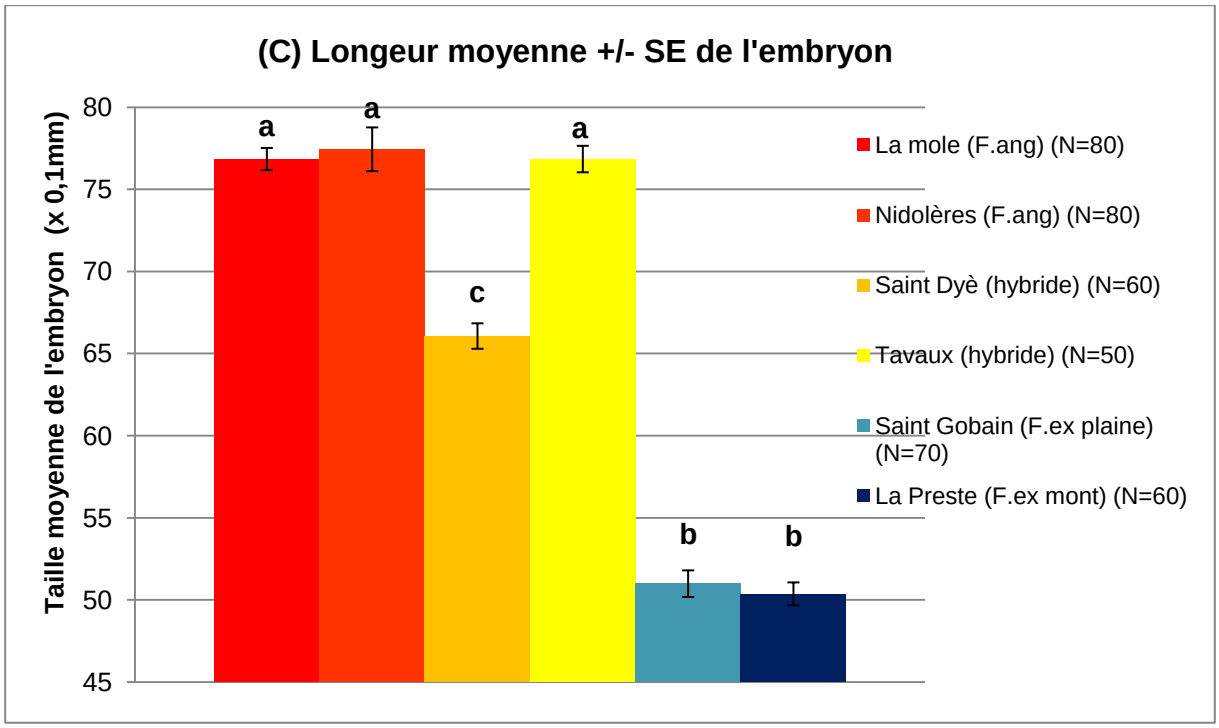


	Estimat.	Erreur	valeur t	niveau p	Conf. In	Conf. Su	R^2	r
Amax	13,23852	0,199508	66,35573	0,000000	12,76676	13,71028	**0,99644**	0,99822
Qy	0,00486	0,000352	13,80634	0,000002	0,00402	0,00569		
Lcp	6,17484	3,971311	1,55486	0,163929	-3,21582	15,56549		

Annexe 2 : Données mesurées sur les graines cultivées in vitro. (A) Rapport Taille embryon sur taille graine. (B) Longueur moyenne de la graine (C) Longueur moyenne de l'embryon. Les différentes lettres indiquent des différences significatives (*P*-values < 0,05, test d'appariement de Wilcoxon).






(C) Longeur moyenne +/- SE de l'embryon
Taille moyenne de l'embryon (x 0,1mm)
80
75
70
65
60
55
50
45
a
a
c
a
b
b
La mole (F.ang) (N=80)
Nidolères (F.ang) (N=80)
Saint Dyè (hybride) (N=60)
Tavaux (hybride) (N=50)
Saint Gobain (F.ex plaine) (N=70)
La Preste (F.ex mont) (N=60)

Références Bibliographiques

Site Web

NOAA: http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/ consulté le 14/04/2013.

Articles scientifiques

1. Acharya B.R., & Assmann S.M. (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant molecular biology*, **69**, 451–462.

2. Aggarwal R.K., Allainguillaume J., Bajay M.M., Barthwal S., Bertolino P., Chauhan P. et al. (2010) Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2010-30 September. *Molecular ecology resources*, **11**, 219–222.

3. Allen C.D., Macalady A.K., Chenchouni H., Bachelet D., McDowell N., Vennetier M., et al. (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, **259**, 660–684.

4. Akilli S., Ulubaş Serçe Ç., Katırcıoğlu Y.Z., & Maden S. (2013) Phytophthora dieback on narrow leaved ash in the Black Sea region of Turkey. *Forest Pathology*, **43**, 252–256.

5. Arca M., Hinsinger D.D., Cruaud C., Tillier A., Bousquet J., & Frascaria-Lacoste N. (2012) Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar fraxinus. *PloS one*, **7**, e34089.

6. Arnold (1997) Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press

7. Balandier P., & Dupraz C. (1999) Growth of widely spaced trees. A case study from young agroforestry plantations in France. *Agroforestry Systems*, **43**, 151–167.

8. Ballesteros J., Stoffel M., Bollschweiler M., Bodoque J.M., & Díez-Herrero A. (2010) Flash-flood impacts cause changes in wood anatomy of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus angustifolia* and *Quercus pyrenaica*. *Tree physiology*, **30**, 773–781.

9. Barton N.H., & Hewitt G.M. (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature,* **341**, 497-503.

10. Barton N.H., & Hewitt G.M. (1985) Analysis of hybrids zones. *Annual Review of Ecology*, **16**, 113-148.

11. Barton N.H. (1979) The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, **43**, 341–359.

12. Benito-Garzón M., Alía R., Robson T. M., & Zavala M.A. (2011) Intra-specific variability and plasticity influence potential tree species distributions under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, **20**, 766–778.

13. Besnard G., & Carlier G. (1990) Potentiel hydrique et conductance stomatique des feuilles de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) du Haut-Rhône français. *Annals of forest science*, **47**, 353–365.

14. Bessiéres F. (1992) La conduite des peuplements de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) et de merisier (*Prunus avium* L.). *Revue Forestière Française* **XLIV** n° spécial : Les feuillus précieux, 115-120.

15. Bigler C., Gavin D.G., Gunning C., & Veblen T.T. (2007) Drought induces lagged tree mortality in a subalpine forest in the Rocky Mountains. *Oikos*, **116**, 1983–1994.

16. Bijlsma R., & Loeschcke V. (2012) Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, **5**, 117–129.

17. Bogeat-Triboulot M.B., Brosché M., Renaut J., Jouve L., Le Thiec D., Fayyaz P., … Dreyer, E. (2007) Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles,

ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant physiology*, **143**, 876–92.

18. Bonan G.B. (2008) Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science,* **320**, 1444–1449.

19. Bossel H. (1986) Dynamics of forest dieback: systems analysis and simulation. *Ecological Modeling*, **34**, 259-288.

20. Brachet S., Jubier M.F., Richard M., Jung-Muller B., Frascaria-Lacoste N. (1999) Rapid identification of microsatellite loci using 5′ anchored PCR in the common ash Fraxinus excelsior. *Molecular Ecology*, **8**, 160–163.

21. Bréda N., & Badeau V. (2008) Forest tree responses to extreme drought and some biotic events: Towards a selection according to hazard tolerance?. *Comptes Rendus Geoscience*, **340**, 651–662,

22. Bréda N., Huc R., Granier A., & Dreyer E. (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science*, **63**, 625–644.

23. Briffa K.R., Van Der Schrier G., & Jones P.D. (2009) Wet and dry summers in Europe since 1750. *International Journal of Climatology*, **29**, 1894–1905.

24. Brodribb T., & Holbrook N. (2004) Diurnal depression of leaf hydraulic conductance in a tropical tree species. *Plant, Cell & Environment*, **27**, 820–827.

25. Bucci S.J., Goldstein G., Meinzer F.C., Franco A.C., Campanello P., & Scholz F.G. (2004) Mechanisms contributing to seasonal homeostasis of minimum leaf water potential and predawn disequilibrium between soil and plant water potential in Neotropical savanna trees. *Trees*, **19**, 296–304.

26. Buerkle C., Morris R.J., Asmussen M., & Rieseberg, L.H. (2000) The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity*, **84**, 441–451.

27. Burgarella C., Lorenzo Z., Jabbour-Zahab R., Lumaret R., Guichoux E., Petit R.J. et al. (2009) Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity*, **102**, 442–452.

28. Cavender-Bares J., & Bazzaz F.A. (2000) Changes in drought response strategies with ontogeny in Quercus rubra: implications for scaling from seedlings to mature trees. *Oecologia*, **124**, 8–18.

29. Ciais P., Reichstein M., Viovy N., Granier A., Ogée J., Allard V., et al. (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, **437**, 529–533.

30. Chapin F.S., Matson P.A., Mooney H.A. (2002) Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer, New York, 436 pp.

31. Chaves M.M., Zarrouk O., Francisco R., Costa J.M., Santos T., Regalado P., et al. (2010) Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of botany*, **105**, 661–676.

32. Chaves M.M., Maroco J.P., Periera S. (2003) Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology,* **30**, 239–264.

33. Chaves M.M. (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth, *Annals of Botany*, **89**, 907–916.

34. Chevin L.M., Lande R., & Mace G.M. (2010) Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS biology*, **8**, e1000357.

35. Choat B., Jansen S., Brodribb T.J., Cochard H., Delzon S., Bhaskar R., et al. (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature*, **491**, 4–8.

36. Churkina G., Running S.W. (1998) Contrasting climatic controls on the estimated productivity of global terrestrial biomes. *Ecosystems*, **1**, 206-215.

37. Classens H. (2002) Les cahiers forestiers de gembloux. *Cahiers forestiers de gembloux*, **20**.

38. Clearwater M.J., & Clark C.J. (2003) In vivo magnetic resonance imaging of xylem vessel contents in woody lianas. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 1205–1214.

39. Cochard H. & Delzon S. (2013) Hydraulic failure and repair are not routine in trees. *Annals of Forest Science*, **70**, 659–661.

40. Cochard H., Venisse J.S., Barigah T.S., Brunel N., Herbette S., Guilliot A. et al. (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant physiology*, **143**, 122–33.

41. Cochard H., Damour G., Bodet C., Tharwat I., Poirier M., & Améglio T. (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum*, **124**, 410–418.

42. Cochard H. (2002) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell & Environment*, **25**, 815–819.

43. Cochard H., Peiffer M., Le Gall K., & Granier A. (1997) Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L.: impacts on water relations. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 655-663.

44. Cornic G., Le Gouallec J.L., Briantais J.M., and Hodges M. (1989) Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C3 plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Elatostema repens*(Lour.)Hall f. *Planta* **177,** 84-90.

45. Cornic G, Papageorgiou I., and Louason G. (1987) Effect of a rapid and a slow drought cycle followed by rehydration on stomataland non-stomatal components of leaf photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *J Plant Physiol,* **126**, 309-318.

46. Cowan I.R., Farquhar G.D. (1977) Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **31**, 475-505.

47. Crispo E. (2007) The Baldwin effect and genetic assimilation: revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution international journal of organic evolution*, **61**, 2469–2479.

48. Cruz de Carvalho, M.H. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, **3**, 156–165.

49. Crutzen, P.J., Stoermer, E.F. (2000) The 'Anthropocene'. *Global Change Newsletter* **41**, 16–18.

50. Darwin C. (1859) On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, 1st edn. John Murray, London.

51. De Dios Sánchez R., Benito-Garzón M., & Sainz-Ollero H. (2006) Hybrid Zones Between Two European Oaks: a Plant Community Approach. *Plant Ecology*, **187**, 109–125.

52. De Boeck H.J., Dreesen F.E., Janssens I., & Nijs I. (2010) Climatic characteristics of heat waves and their simulation in plant experiments. *Global Change Biology*, **16**, 1992–2000.

53. Delzon S., Douthe C., Sala A., & Cochard H. (2010) Mechanism of water-stress induced cavitation in conifers: bordered pit structure and function support the hypothesis of seal capillary-seeding. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 2101–2111.

54. Dobrowolska D., Hein S., Oosterbaan A., Wagner S., Clark J., & Skovsgaard J.P. (2011) A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. *Forestry*, **84**, 133–148. 55. Dungey H.S. (2001) Pine hybrids a review of their use performance and genetics. *Forest ecology and management*, **148**, 243–258.

56. Dunn S., & Flavin C. (2002) Moving the climate change agenda forward. *State of the World*.

57. Fallour-Rubio D., Guibal F., Klein E.K., Bariteau M., & Lefèvre F. (2009) Rapid changes in plasticity across generations within an expanding cedar forest. *Journal of evolutionary biology*, **22**, 553–563.

58. FAO (2006) Global forest resources assessment 2005—progress towards sustainable forest management. FAO Forestry Paper No. 147. Rome.

59. Fernandez-Manjarres J.F., Gerard P.R., Dufour J., Raquin C., & Frascaria-Lacoste N. (2006) Differential patterns of morphological and molecular hybridization between Fraxinus excelsior L. and Fraxinus angustifolia Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular ecology*, **15**, 3245–3257.

60. Fisher R., Williams M., Do Vale R.L., Da Costa A.L., & Meir P. (2006) Evidence from Amazonian forests is consistent with isohydric control of leaf water potential. *Plant, cell & environment*, **29**, 151–65.

61. Fischer D.G., Hart S.C., Whitham T.G., Martinsen G.D., Keim P. (2004) Ecosystem implications of genetic variation in water-use of a dominant riparian tree. *Oecologia*, **139**, 288–297.

62. Fischer E.M., Seneviratne S.I., Luthi D., Schar C. (2007) Contribution of land-atmosphere coupling to recent European summer heat waves. *Geophysical Research Letters* **34**, L06707.

63. FRAXIGEN (2005) Ash Species in Europe: Biological Characteristics and Practical Guidelines for Sustainable Use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford: UK, pp 128.

64. Frich P., Alexander L., Della-Marta P., Gleason B., Haylock M., Klein Tank A., & Peterson T. (2002) Observed coherent changes in climatic extremes during the second half of the twentieth century. *Climate Research*, **19**, 193–212.

65. Galiano L., Martínez-Vilalta J., & Lloret F. (2011) Carbon reserves and canopy defoliation determine the recovery of Scots pine 4 yr after a drought episode. *The New phytologist*, **190**, 750–759.

66. Ghalambor C.K., McKay J.K., Carroll S.P., & Reznick D.N. (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, **21**, 394–407.

67. Giorgi P., & Lionello F. (2008) Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change*, **63**, 90–104.

68. Gérard P., Temunovic M., Sannier J., Bertolino P., Dufour J., Frascaria-lacoste N., & Fernández-Manjarrés J. F. (2012) Chilled but not frosty: understanding the role of climate in the hybridization between the Mediterranean *Fraxinus angustifolia* Vahl and the temperate *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae). *Journal of Biogeography*, **40**, 835-846.

69. Gérard P.R., Fernández-Manjarrés J.F., & Frascaria-lacoste N. (2006) Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Molecular ecology*, **15**, 3655–3667.

70. Gérard Pierre. (2006) Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière : l'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior* L. et *Fraxinus angustifolia*) 177 p. Thèse de doctorat : Engref.

71. Grant R.F., Black T., Gaumont-Guay D., Klujn N., Barr G., Morgenstern K., et al. (2006) Net ecosystem productivity of boreal aspen forests under drought and climate change: Mathematical modelling with Ecosys. *Agricultural and Forest Meteorology*, **140**, 152–170.

72. Grimm V., & Wissel C. (1997) Babel, or the ecological stability discussions: an inventory and analysis of terminology and a guide for avoiding confusion. *Oecologia*, **109**, 323–334.

73. Gross B.L., & Rieseberg L.H. (2005) The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *The Journal of heredity*, **96**, 241–252.

74. Gross A., Zaffarano P.L., Duo A., & Grünig C.R. (2012) Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen Hymenoscyphus pseudoalbidus. *Fungal genetics and biology,* **49**, 977–986.

75. Guicherd P., Peltier J.P., Gout E., Bligny R., & Marigo G. (1997) Osmotic adjustement in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees*, **11**,155–161.

76. Gunderson C.A., Edwards N.T., Walker A.V., O'Hara K.H., Campion C.M., & Hanson P.J. (2012) Forest phenology and a warmer climate - growing season extension in relation to climatic provenance.*Global Change Biology*, **18**, 2008–2025.

77. Hacke U.G., & Sperry J.S. (2003) Limits to xylem refilling under negative pressure in *Laurus nobilis* and *Acer negundo*. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 303–311.

78. Hacke U.G., Sperry J.S., Pockman W.T., Davis S.D., & McCulloh K.A. (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia*, **126**, 457–461.

79. Hacke U.G., Stiller V., Sperry J.S., Pittermann J., &. McCulloh K.A. (2001) Cavitation fatigue. Embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant physiology*, **125**, 779–786.

80. Hanba Y.T., Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T., Kasamo K., Terashima I. et al. (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO(2) conductance and CO(2) assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant & cell physiology*, **45**, 521–529.

81. Hampe A., & Petit R.J. (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology letters*, **8**, 461–467.

82. Hamzeh M., Sawchyn C., Périnet P., & Dayanandan S. (2007) Asymmetrical natural hybridization between *Populus deltoides* and *P. balsamifera* (Salicaceae) *Canadian Journal of Botany*, **85**, 1227–1232.

83. Harrison R.G. (1990) Hybrids zones: windows on evolutionary process. Oxford Surv. *Evol. Biol*. **7**, 69-128.

84. Hartmann H., (2011) Will a 385 million year-struggle for light become a struggle for water and for carbon? - How trees may cope with more frequent climate change-type drought events. *Global Change Biology*, **17**, 642–655.

85. Hennig W. (1965) Phyllogenetic systematics. *Annual review of entomology*, **10**, 97–116.

86. Henry, P. et Gouyon P.H. (2003) Précis de génétique des populations. Coll Sciences sup. Dunod.

87. Herbette S., Wortemann R., Awad H., Huc R., Cochard H., & Barigah T.S. (2011) Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree physiology*, **30**,1448–1455.

88. Heschel M.S., Paige K.N. (1995) Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia *Ipomopsis aggregate*. *Conservation Biology*, **9**,126–133.

89. Hewitt, G.M. (1988) Hybrids zones-Natural Laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and evolution,* **3**,158-187.

90. Hey J., Fitch W.M., & Ayala F.J. (2005) Systematics and the origin of species: an introduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6515–6519.

91. Hölscher D. (2004) Leaf traits and photosynthetic parameters of saplings and adult trees of co-existing species in a temperate broad-leaved forest. *Basic and Applied Ecology*, **172**, 163–172.

92. Hose E., Steudle E., & Hartung W. (2000) Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta*, **211**, 874–882.

93. Heuertz M., Fineschi S., Anzidei M., Pastorelli R., Salvini D., Paule L. et al. (2004) Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular ecology*, **13**, 3437–3452.

94. Huntington T.G. (2006) Evidence for intensification of the global water cycle: Review and synthesis *Journal of Hydrology*, **319**, 83–95.

95. IPCC 2007. Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, UK and NY, USA: Cambridge University Press.

96. Irvine J., Perks M.P., Magnani F., & Grace J. (1998) The response of Pinus sylvestris to drought: stomatal control of transpiration and hydraulic conductance. *Tree physiology*, **18**, 393–402.

97. Ishida A., Yazaki K., & Hoe A.L. (2005) Ontogenetic transition of leaf physiology and anatomy from seedlings to mature trees of a rain forest pioneer tree, *Macaranga gigantea*. *Tree physiology*, **25**, 513–522.

98. Jaeger C., Gessler A., Biller S., Rennenberg H., & Kreuzwieser J. (2009) Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. *Journal of experimental botany*, **60**, 4335–4345.

99. Johannsen, W. (1911) The Genotype Conception of Heredity. *The American Naturalist*, **45**,129 -159.

100. Jones H.G. (2007) Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of experimental botany*, **58**, 119–130.

101. Jones M.M., Turner N.C., Osmond C.B., (1981) Mechanisms of drought resistance. In Paleg L.G., Aspinall D. (Eds), The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. *Academic Press Australia Publication* 15-37.

102. Kirisits T., Matlakova M., Mottinger-Kroupa S., Halmschlager E., & Lakatos F. (2010) *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). *Plant Pathology*, **59**, 411–412.

103. Keesing F., et al. (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, **468**, 647–652.

104. Klein T., Shpringer I., Fikler B., Elbaz G., Cohen S., & Yakir D. (2013) Relationships between stomatal regulation, water-use, and water-use efficiency of two coexisting key Mediterranean tree species. *Forest Ecology and Management*, **302**, 34–42.

105. Kleunen van M., & Fischer M. (2007) Progress in the detection of costs of phenotypic plasticity in plants. *The New phytologist*, **176**, 727–730.

106. Korpelainen H., & Kostamo K. (2011) An improved and cost-effective cDNA-AFLP method to investigate transcription-derived products when high throughput sequencing is not available. *Journal of biotechnology*, **145**, 43–6.

107. Kostova I., & Iossifova T. (2007) Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*, **78**, 85–106.

108. Kowalski T. (2006) *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology*, **36**, 264–270.

109. Kramer P.J. (1980) Drought, Stress and the Origin of Adaptations. *Adaptation of plants to water and high temperature stress* (eds Turner NC, Kramer PJ). John Wiley & Sons, New-York.

110. Krasensky J., & Jonak C. (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, **63**, 1593–1608.

111. Krausse H., & Weis E. (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis research*, **157**, 1984, 139–157.

112. Kremer A., Ronce O., Robledo-Arnuncio J.J., Guillaume F., Bohrer G., Nathan R. et al. (2012) Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology letters*, **15**, 378–392.

113. Krutovskii K.V., & Bergmannt F. (1995) Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst, and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity*, **74**, 464–480.

114. Kumagai T., & Porporato A. (2012) Strategies of a Bornean tropical rainforest water use as a function of rainfall regime: isohydric or anisohydric?. *Plant, cell & environment*, **35**, 61–71.

115. Kyselý J. (2009) Recent severe heat waves in central Europe: how to view them in a long term prospect?. *International Journal of Climatology*, **109**, 89–109.

116. Leadley P., Pereira H.M., Alkemade R., Fernandez-Manjarrés J.F., Proença V., Scharlemann J.P.W., Walpole, M.J. (2010) Scénarios de biodiversité : Projections des changements de la biodiversité et des services écosystémiques pour le 21e siècle. Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique, Montréal. *Cahier technique n°50*, 55 pages.

117. Lefort F., Brachet S., Frascaria-Lacoste N., Edwards K.J., Douglas G.C. (1999) Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the Olives family. *Molecular Ecology*, **8**, 1088–1090.

118. Lemoine D., Peltier J., & Marigo G. (2001) Comparative studies of the water relations and the hydraulic characteristics in *Fraxinus excelsior*, *Acer pseudoplatanus* and *A. opalus* trees under soil water contrasted conditions. *Annals of forest science*, **58**, 723–731.

119. Lexer C., Buerkle C.A., Joseph J.A., Heinze B., & Fay M.F. (2007) Admixture in European Populus hybrid zones makes feasible the mapping of loci that contribute to reproductive isolation and trait differences. *Heredity*, **98**, 74–84.

120. Lexer C., Heinze B., Alia R., and Rieseberg L.H. (2004) Hybrid zones as a tool for identifying adaptive genetic variation in outbreeding forest trees: lessons from wild annual sunflowers (Helianthus spp.). *Forest Ecology and Management* **197**, 49–64.

121. Limousin J.M., Rambal S., Ourcival J.M., Rocheteau A., Joffre R., & Rodriguez-Cortina R. (2009) Long-term transpiration change with rainfall decline in a Mediterranean *Quercus ilex* forest. *Global Change Biology*, **15**, 2163–2175.

122. Linhart Y.B. (1999). Variation in woody plants: molecular markers, evolutionary pro- cesses and conservation biology. *Molecular Biology of Woody Plants,* **64**, 341–374.

123. Lintala M., Allahverdiyeva Y., Kangasjärvi S., Lehtimäki N., Keränen M., Rintamäki E. et al. (2009) Comparative analysis of leaf-type ferredoxin-NADP oxidoreductase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **57**, 1103–1115.

124. Lovisolo C., Perrone I., & Carra A. (2010) Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level. *Functional Plant Biology*, **37**, 98–116.

125. Lovisolo C., Perrone I., Hartung W., & Schubert A. (2008) An abscisic acid-related reduced transpiration promotes gradual embolism repair when grapevines are rehydrated after drought. *The New phytologist*, **180**, 642–651.

126. Luers A. (2005) The surface of vulnerability: An analytical framework for examining environmental change. *Global Environmental Change*, **15**, 214-223.

127. Lumsden L.F., & Bennett A.F. (2005) Scattered trees in rural landscapes: foraging habitat for insectivorous bats in south-eastern Australia. *Biological Conservation*, **122**, 205–222.

128. Mallet J. (2007) Hybrid speciation. *Nature*, **446**, 279–283.

129. Manning A.D., Fischer J., & Lindenmayer D.B. (2012) Scattered trees are keystone structures – Implications for conservation. *Biological Conservation*, **132**, 311–321.

130. Marie-Pierre J., Didier A., & Gérard B. (2006) Patterns of ash (*Fraxinus excelsior* L.) colonization in mountain grasslands: the importance of management practices. *Plant Ecology*, **183**, 177–189.

131. Marigo G., Girel J., Peltier J., & Pautou G. (2000) Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsio*r L. *Trees*, **15**, 1–13

132. Marigo G., & Peltier J.P. (1996) Analysis of the diurnal change in osmotic potential in leaves of *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Experimental Botany*, **47**, 763–769.

133. Martínez-Vilalta J., Lloret F., & Breshears D.D. (2012) Drought-induced forest decline: causes, scope and implications. *Biology letters*, **8**, 689–691.

134. Matesanz S., Gianoli E., & Valladares F. (2010) Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1206**, 35–55.

135. Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., & Santoni V. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual review of plant biology*, **59**, 595–624.

136. Mayr E. (1942) Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist. Isbn: 9780674862500, Columbia biological series, ed. at Columbia university; general editor, L. C. Dunn, HARVARD University Press.

137. McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., et al. (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist*, **178**, 719-739.

138. McDowell N.G. (2011) Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality *Plant physiology*, **155**, 1051–1059.

139. Meehl, G.A., Stocker, C.M., Bowker, T.F., Collins, C.M., Bowker, W.D.,Friedlingstein, C.M., Bowker, P., Gaye, C.M., Bowker, A.T., Gregory,C.M., Bowker, J.M. et al. (2007) Global Climate Projections. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panelon Climate Change (eds S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

140. Meehl G.A., & Tebaldi C. (2004) More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science*, **305**, 994–997.

141. Meehl G.A., Karl T., Easterling D.R., Changnon S., Pielke R., Jr, Changnon D. et al. (2000) An introduction to trends in extreme weather and climate events: observations, socioeconomic impacts,

terrestrial ecological impacts, and model projections. *Bulletin of the American Meteorological Society*, **81**, 413–416.

142. Melcher P.J. Holbrook N.M., Burns M.J. Zwieniecki M.A., Cobb, A.R., Brodribb T.J., Choat B., Sack L. (2012) Measurements of stem xylem hydraulic conductivity in the laboratory and field. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 685-694.

143. Mendoza I., Zamora R., & Castro J. (2009) A seeding experiment for testing tree-community recruitment under variable environments: Implications for forest regeneration and conservation in Mediterranean habitats. *Biological Conservation*, **142**, 1491–1499.

144. Mereu S., Salvatori E., & Fusaro L. (2009) An integrated approach shows different use of water resources from Mediterranean maquis species in a coastal dune ecosystem. *Biogeosciences*, **6**, 2599–2610.

145. Milburn B.Y.J., & Mclaughlin M.E. (1974) Studies of cavitation in isolated vascular bundles and whole leaves of *Plantago major* L. *New Phytologist*, **73**, 861–871.

146. Millennium Ecosystem Assessment (2005) Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.

147. Misson L., Limousin J.M., Rodriguez R., & Letts M.G. (2010) Leaf physiological responses to extreme droughts in Mediterranean *Quercus ilex* forest. *Plant, cell & environment*, **33**, 1898–1910.

148. Mittler R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, **11**, 15–19.

149. Morand-Prieur M.E., Raquin C., Shykoff J.A., & Frascaria-Lacoste N. (2003) Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 949–953.

150. Morand-Prieur M.E., Vedel F., Raquin C., Brachet S., Sihachakr D., & Frascaria-Lacoste N. (2002) Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular ecology*, **11**, 613–617.

151. Morjan C.L., & Rieseberg L.H. (2004) How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular ecology*, **13**, 1341–1356.

152. Mottet A., Julien M.P., Balent G., & Gibon A. (2007) Agricultural land-use change and ash (*Fraxinus excelsior* L.) colonization in Pyrenean landscapes: an interdisciplinary case study. *Environmental Modeling & Assessment*, **12**, 293–302.

153. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum,* **15**, 473–479.

154. Neary D.G., Ice G.G., & Jackson C.R. (2009) Linkages between forest soils and water quality and quantity. *Forest Ecology and Management*, **258**, 2269–2281.

155. Newton R.J., Funkhouser E.A., Fong F., Taeur C.G. (1991) Molecular and physiological genetics of drought tolerance in forest species. *Forest Ecology and Management,* **43**, 225-250.

156. Nilsson S., & Schopfhauser W. (1995) The Carbon-sequestration potential of a global afforestation program. *Climatic Change*, **30**, 267–293.

157. Osakabe Y., Kajita S., & Osakabe K. (2011) Genetic engineering of woody plants: current and future targets in a stressful environment. *Physiologia plantarum*, **142**, 105–17.

158. Papadopulos S.T., Price Z., Devaux C., Hipperson H., Smadja C.M., Hutton I. et al. (2013) A comparative analysis of the mechanisms underlying speciation on Lord Howe Island. *Journal of evolutionary biology*, **26**, 733–745.

159. Papi R.M., Spanos K.A., & Kyriakidis D.A. (2012) Genetic variation of Fraxinus angustifolia natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research*, 1**31**, 1151–1161.

160. Parent B., Hachez C., Redondo E., Simonneau T., Chaumont F., & Tardieu F. (2009) Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant physiology*, **149**, 2000–2012.

161. Passioura J. (2007) The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of experimental botany*, **58**, 113–117.

162. Pautasso M. (2011) Challenges in the conservation and sustainable use of genetic resources. *Biology letters*.

163. Percival G.C., Keary I.P., & AL-Habsi S. (2006) An assessment of the drought tolerance of Fraxinus genotypes for urban landscape plantings. *Urban Forestry & Urban Greening*, **5**, 17–27.

164. Perkins L.B., Blank R.R., Ferguson S.D., Johnson D.W., Lindemann W.C., & Rau B.M. (2013) Quick start guide to soil methods for ecologists. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **15**, 237–244.

165. Petit R.J., & Hampe A. (2006) Some Evolutionary Consequences of Being a Tree. *Annual Review of Ecology*, *Evolution, and Systematics*, **37**, 187–214.

166. Picard J.F. (1982) Contribution à l'étude de la biologie et de la fructification du frêne commun (*Fraxinus excelsior* L.). *Revue Forestière Française* XXXIV **2**, 97–107.

167. Pilotti M., Brunetti A., Tizzani L., & Marani O. (2009) *Platanus* × *acerifolia* genotypes surviving to inoculation with *Ceratocystis platani* (the agent of canker stain): first screening and molecular characterization. *Euphytica*, **169**, 1–17.

168. Pinheiro C., & Chaves M.M. (2011) Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of experimental botany*, **62**, 869–82.

169. Pluess A.R., & Weber P. (2012) Drought-adaptation potential in *Fagus sylvatica*: linking moisture availability with genetic diversity and dendrochronology *PloS one*, **7**, e33636.

170. Poot P., & Veneklaas E.J. (2012) Species distribution and crown decline are associated with contrasting water relations in four common sympatric eucalypt species in southwestern Australia. *Plant and Soil*, **364**, 409–423.

171. Pou A., Medrano H., Tomàs M., Martorell S., Ribas-Carbó M., & Flexas J. (2012) Anisohydric behaviour in grapevines results in better performance under moderate water stress and recovery than isohydric behaviour. *Plant and Soil*, **359**, 335–349.

172. Rafalski J.A., Vogel J.M., Morgante M., Powell W., Andre C., & Tingey S.V. (1996) Generating and using DNA markers in plants in Non Mammalian Genomic Analysis: a Practical Guide (eds Birren B,Lai E), 75 –134, Academic Press, New York

173. Raj S., Bräutigam K., Hamanishi E.T., Wilkins O., Thomas B.R., Schroeder W. et al. (2011) Clone history shapes Populus drought responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 12521–12526.

174. Rameau J.C., Mansion D., Dumé G. (1989) Flore Forestière Française, guide écologique illustré, Tome 1 : plaines et collines : 1785 p. Institut pour le Développement Forestier.

175. Raquin C., B Jung-Muller J., Dufour & Frascaria-Lacoste N. (2002) Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl). *Annals of Forest Science*, **59**, 219–224.

176. Reeve H., & Sherman P. (1993) Adaptation and the goals of evolutionary research. *Quarterly Review of Biology*, **68**,1–32.

177. Rhymer J.M., Simberloff D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology,* **27**, 83–109.

178. Richardson A.D., Keenan T.F., Migliavacca M., Ryu Y., Sonnentag O., & Toomey M. (2013) Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system. *Agricultural and Forest Meteorology*, **169**, 156–173.

179. Rickleffs R.E. 1990. Ecology (3rd Edition). New York: W.H. Freeman & Co Ltd.

180. Rieseberg L.H., & Willis J.H. (2007) Plant speciation. *Science*, **317**, 910–914.

181. Rieseberg L.H., Raymond O., Rosenthal D.M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T. et al. (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, **301**, 1211–1221.

182. Rieseberg L.H., Baird S.J., & Gardner K. (2000) Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant molecular biology*, **42**, 205–224.

183. Rieseberg L.H., Archer M., & Wayne R. (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, **83**, 363–372.

184. Rieseberg L.H. (1997) Hybrid origin Of Plant Species, *Annual Review of Ecology and Systematics,* **28,** 359-389.

185. Rieseberg L.H., Ellstrand N.C. (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences,* **12**, 213–241.

186. Rieseberg L.H. (1991) Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (*Asteraceae*): evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany,* **78**, 1218–1237.

187. Rizhsky L., Liang H., & Shuman J. (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant physiology*, **134**, 1683–1696.

188. Rood S.B., Patiño S., Coombs K., & Tyree M.T. (2000) Branch sacrifice: cavitation-associated drought adaptation of riparian cottonwoods. *Trees*, **14**, 248–257.

189. Sade N., Vinocur B.J., Diber A., Shatil A., Ronen G., Nissan H., et al. (2009) Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SlTIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion?. *The New phytologist*, **181**, 651–661.

190. Schmalhausen II. (1949) Factors of Evolution: the Theory of Stabilizing Selection. Philadelphia, PA, USA: Blakiston.

191. Schroeder H., Hoeltken M., & Fladung M. (2012) Differentiation of Populus species using chloroplast single nucleotide polymorphism (SNP) markers--essential for comprehensible and reliable poplar breeding. *Plant biology*, **14**, 374–81.

192. Schulze E.D., Robichaux R.H., Grace J., Rundel P.W., Ehleringer J.R. (1987) Plant Water Balance. *BioScience*, **37**, 30-37.

193. Seehausen O. (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in ecology & evolution*, **19**, 198–207.

194. Sheffield J., Wood E.F. (2007) Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climate Dynamics*, **31**, 79-105.

195. Shull G. (1948) What Is 'Heterosis'? *Genetics*, **33**, 439–446.

196. Smith M.D. (2011) The ecological role of climate extremes: current understanding and future prospects. *Journal of Ecology*, **99**, 651–655.

197. Socias X., Correia M.J., Chaves M., & Medrano H. (1997) The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *Journal of experimental botany*, **48**, 1281–1288.

198. Solla A., Bohnens J., Collin E., Diamandis S., Franke A., Gil L., et al. (2005). Screening European elms for resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Sci*, **51**, 134–141.

199. Sperry J.S., (2013) Cutting-edge research or cutting-edge artifact? An overdue control experiment complicates the xylem refilling story. *Plant, Cell and Environment*, **36**, 1916-1918.

200. Sperry J.S., Hacke U.G., Oren R., Comstock J.P. (2002) Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment*, **25**, 251-263.

201. Steffen W., Grinevald J., Crutzen P., & McNeill J. (2011) The Anthropocene: conceptual and historical perspectives. *Philosophical transactions Series A*, *Mathematical, physical, and engineering sciences*, **369**, 842–867.

202. Sterl A., Severijns C., Dijkstra H., Hazeleger W., Jan van Oldenborgh G., van den Broeke M., et al. (2008) When can we expect extremely high surface temperatures? *Geophysical Research Letters*, **35**, L14703.

203. Stöhr A., & Lösch R. (2004) Xylem sap flow and drought stress of Fraxinus excelsior saplings. *Tree physiology*, **24**,169–80.

204. Tardieu F. (1993) Will increases in our understanding of soil-root relations and root signaling substantially alter water flux models?. *The Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B* **341**, 57–66.

205. Tardieu F., & Simonneau T. (1998) Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany,* **49**, 419–432.

206. Temunović M., Franjić J., Satovic Z., Grgurev M., Frascaria-Lacoste N., & Fernández-Manjarrés J.F. (2012) Environmental heterogeneity explains the genetic structure of Continental and Mediterranean populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl. *PloS one*, **7**, e42764.

207. Thabeet A., Vennetier M., Gadbin-Henry C., Denelle N., Roux M., Caraglio Y. et al. (2009) Response of *Pinus sylvestris* L. to recent climatic events in the French Mediterranean region. *Trees*, **23**, 843–853.

208. Thiel D., Nagy L., Beierkuhnlein C., Huber G., Jentsch A., Konnert M. et al. (2012) Uniform drought and warming responses in Pinus nigra provenances despite specific overall performances. *Forest Ecology and Management*, **270**, 200–208.

209. Thomas S.C., & Winner W.E. (2002) Photosynthetic differences between saplings and adult trees: an integration of field results by meta-analysis. *Tree physiology*, **22**,117–27.

210. Thomasset M., Fernández-Manjarrés J.F., Douglas G.C., Bertolino P., Frascaria-Lacoste N., & Hodkinson T.R. (2012) Assignment testing reveals multiple introduced source populations including potential ash hybrids (*Fraxinus excelsior* × *F. angustifolia*) in Ireland. *European Journal of Forest Research*, **132**, 195–209.

211. Thomasset M., Fernandez-Manjarres J.F., Douglas G.C., Frascaria-Lacoste N., Raquin C., Hodkinson T.R. (2011) Molecular and morphological characterization of reciprocal F1 hybrid ash (*Fraxinus excelsior* x *Fraxinus angustifolia*, Oleaceae) and parental species reveals assymetric character inheritance *International Journal of Plant Science,* **172**, 423–433.

212. Thuiller W., Albert C., Araújo M.B., Berry P.M., Cabeza M., Guisan A. et al. (2008) Predicting global change impacts on plant species' distributions: Future challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **9**, 137–152.

213. Tixier A., Cochard H., Badel E., Dusotoit-Coucaud A., Jansen S., & Herbette S. (2013) *Arabidopsis thaliana* as a model species for xylem hydraulics: does size matter?. *Journal of experimental botany*, **64**, 2295–305.

214. Turner N.C., Schulze E.D., & Gollan T. (1984) The response of stomata and leaf gas exchange to vapour pressure deficits and soil water content I. Species comparisons at high soil water contents. *Oecologia*, **63**, 338–342.

215. Tyree M., Davis S., & Cochard H. (1994) Biophysical perspective of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction?. *IAWA journal*, **15**, 335–360.

216. Tyree M.T., and Sperry J.S. (1989) Vulnerability of Xylem to Cavitation and Embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**,19-36 doi: 10.1146/annurev.pp.40.060189.000315.

217. Ungerer M.C, Baird S.J., Pan J., & Rieseberg L.H. (1998) Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 11757–11762.

218. Urli M., Porté A.J., Cochard H., Guengant Y., Burlett R., & Delzon S. (2013) Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree physiology*, **7**, 1–12.

219. Valladares F., Gianoli E., & Gómez J.M. (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *The New phytologist*, **176**, 749–763.

220. Varone L., Ribas-Carbo M., Cardona C., Gallé A., Medrano H., Gratani L., et al. (2012) Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in seedlings and saplings of Mediterranean species pre-conditioned and aged in nurseries: Different response to water stress. *Environmental and Experimental Botany*, **75**, 235–247.

221. Vico G., Manzoni S., Palmroth S., & Katul G. (2011) Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *The New phytologist*, **192**, 640–52.

222. Vigouroux A., & Olivier R. (2004) First hybrid plane trees to show resistance against canker stain (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani). *Forest Pathology*, **34**, 307–319.

223. Vitasse Y., Bresson C.C., Kremer A., Michalet R., & Delzon S. (2010) Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, **24**, 1211–1218.

224. Vuylsteke M., Peleman J.D., & van Eijk M.J.T. (2007) AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature protocols*, **2**, 1399–1413.

225. Wallander E. (2008) Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*, **49**, 25–49.

226. Wallander E., & Victor A. (2000) Phylogeny and classification of Oleacea based on RPS16 and TRN L-F sequence data. *American journal of botany*, **87**, 1827–1841.

227. Wardle P. (1961) Biological flora of British Isles: *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Ecology*, **49,** 739–751.

228. Wartinger B.Y.A., Heilmeier H., Hartung W., Schulze D.E., Botanik L., & Wurzburg U. (1990) Daily and seasonal courses of leaf conductance and abscisic acid in the xylem sap of almond trees [*Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb] under desert conditions. *New Phytologist*, **116**, 581–587.

229. Way D.A., & Oren R. (2010) Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree physiology*, **30**, 669–688.

230. Wheeler E.A. (2011) InsideWood – A Web resource for hardwood anatomy. *International association of wood anatomists*, **32**, 199–211.

231. White G.F. (1974) Natural Hazards. Oxford, New-York.

232. Wilkins O., Waldron L., Nahal H., Provart N.J., & Campbell M.M. (2009) Genotype and time of day shape the Populus drought response. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **60**, 703–15.

233. Wilkinson S., & Davies W.J. (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment*, **33**, 510–25.

234. Williams G.C. (1966). Adaptation and Natural Selection. Princeton University Press, Princeton.

235. Wolfe A.P., Hobbs W.O., Birks H.H., Briner J.P., Holmgren S.U., Ingólfsson Ó. et al. (2013) Stratigraphic expressions of the Holocene–Anthropocene transition revealed in sediments from remote lakes. *Earth-Science Reviews*, **116**, 17–34.

236. Wortemann R., Herbette S., Barigah T.S., Fumanal B., Alia R., Ducousso A. et al. (2011) Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe *Tree physiology*, **31**, 1175–1182.

237. Xu L., Yu J., Han L., & Huang B. (2013) Photosynthetic enzyme activities and gene expression associated with drought tolerance and post-drought recovery in Kentucky bluegrass. *Environmental and Experimental Botany*, **89**, 28–35.

238. Yeh P.J., & Price T.D. (2004) Adaptive phenotypic plasticity and the successful colonization of a novel environment. *The American Naturalist*, **164**, 531-542.

239. Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. (2000) Plant responses to drought, acclimatation and stress tolerance. *Photosynthetica*, **38**, 171–186.

240. Zhao M., & Running S.W. (2010) Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. *Science*, **329**, 940–943.

241. Zhu K., Woodall C.W. & Clark J.S. (2012) Failure to migrate: lack of tree range expansion in response to climate change. *Global Change Biology*, **18**, 1042–1052.

242. Zwieniecki M.A. Holbrook N.M. (1998) Diurnal variation in xylem hydraulic conductivity in white ash (*Fraxinus americana* L.) red maple (*Acer rubrum* L.) and red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Plant, Cell and Environment*, **21**,1173–1180.

Résumé : Les derniers scénarios du changement climatique, prévoient une élévation de température (Europe, +2 à +4°C en moyenne en 2099, IPCC, 2007) associée à des épisodes extrêmes, sécheresses sévères par exemple. Connaître les potentialités d'adaptation des espèces forestières s'avère crucial afin de comprendre leurs réponses et le devenir des écosystèmes forestiers, dans un futur proche. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à un complexe d'espèces du genre *Fraxinus,* (frêne, Oléacées). En France *F. excelsior* L.*,* et *F. angustifolia,* Vahl, sont des espèces autochtones présentant une plasticité phénotypique et écologique remarquable. L'hybridation, suspectée depuis longtemps a été prouvée en conditions contrôlées et naturelles. Les principales zones documentées sont la vallée de la Saône et de la Loire. Cette hybridation entre les deux espèces de frênes européens, pourrait favoriser l'apparition d'individus (génotypes) plus aptes que les espèces parentales à faire face à un environnement changeant. Notre objectif est de caractériser les potentialités d'adaptations de différentes populations de frêne (espèces parentales et de statut hybride) sous une contrainte abiotique (contrainte hydrique). Pour répondre à cet objectif, nous avons testé les réponses à la fois écophysiologiques et génétique de jeunes plants à une contrainte légère (-0,9 MPa). Une seconde expérimentation, centré sur l'écophysiologie a eu pour objet de mesurer la perte de conductivité hydraulique des frênes, sous une forte contrainte (-4 MPa). Le principal résultat de ces travaux est le comportement souvent intermédiaire et très variable des populations de frênes hybrides testés dans ces 2 expérimentations (*A*, *gs*, *WUEi*, PLC), que ce soit en conditions avec ou sans contrainte hydrique. Ce comportement intermédiaire est en lien avec le degré d'introgression respectif des hybrides de frênes (plus proche de *F.excelsio*r ou de *F.angustifolia*). Ces arbres hybrides pourraient servir aux forestiers de ressources et d'assurance contre des évènements de dépérissement catastrophiques pour les forestiers pour un environnement climatique futur.

Mot clefs : Contrainte hydrique, échange gazeux, cDNA-AFLP, adaptation, conductivité hydraulique, génotypage, *F.excelsior*, *F.angustifolia,* hybrides.

Abstract: The latest climate change scenarios predict a rise in mean temperature in Europe of 2 to 4°C for 2099 (IPCC, 2007), associated with extreme climatic events such as severe droughts. Knowing adaptation capabilities of tree species is crucial for understanding their responses and forest ecosystem fate in the near future. Our study object is a species complex inside the *Fraxinus* genus (ash, Oleaceae). In France, *F. excelsior* and *F. angustifolia* are autochthonous, form natural hybrid populations and show remarkable phenotypic and ecological plasticity. This could promote the emergence of new individuals (genotypes) more able to deal with fluctuating environments. Our objective is to characterise the capability of adaptation of different *Fraxinus* populations, representing the three statuses (*F.excelsior*, *F.angustifolia* and hybrids) under abiotic constraints (water constraint). To solve this issue, we examine in a low water constraint experiment (-0.9 MPa) ecophysiological and genetic response, using saplings. A second and more severe water constraint experiment (-4 MPa) was used to investigate ash response to the loss of hydraulic conductivity. The most noticeable result was an intermediate and highly variable behaviour of hybrid ash populations in the two experiments (*A*, *gs*, *WUEi*, PLC) linked with they respective introgression degree (closer to *F.excelsio*r or *F.angustifolia*). This hybrid trees could be used by foresters as a resource and insurance against catastrophic forest stand decline, for a future climate.

Keywords: Water constraint, gas exchange, cDNA-AFLP, adaptation, hydraulic conductivity, genotyping, *F.excelsior, F.angustifolia*, hybrids.