



HAL
open science

Plasticité phénotypique et architecture génétique de la croissance et de la densité du bois du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.)

Hélène Lagraulet

► **To cite this version:**

Hélène Lagraulet. Plasticité phénotypique et architecture génétique de la croissance et de la densité du bois du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.). *Ecologie, Environnement*. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0085 . tel-01227850v1

HAL Id: tel-01227850

<https://theses.hal.science/tel-01227850v1>

Submitted on 12 Nov 2015 (v1), last revised 17 Nov 2015 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS SPÉCIALITÉ
ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE, FONCTIONNELLE ET DES COMMUNAUTES

Par Hélène, LAGRAULET

Plasticité phénotypique et architecture génétique de la croissance et de la densité du bois du pin maritime (*Pinus pinaster Ait.*)

Sous la direction de Christophe PLOMION
Et le co-encadrement de Jean-Marc GION

Soutenue le 27 Avril 2015

Membres du jury :

M. AMEGLIO, Thierry
M. THIS, Patrice
M. RATHGEBER, Cyrille
M. ROUPSARD, Olivier
M. SEGURA, Vincent
M. ALARD, Didier
M. GION, Jean-marc
M. PLOMION, Christophe

DR INRA Clermont-Ferrand
DR INRA Montpellier
CR INRA Nancy
Chercheur CIRAD Costa Rica (HDR)
CR INRA Orléans
PR Université de Bordeaux
Chercheur CIRAD Bordeaux
DR INRA Bordeaux

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Co-encadrant
Directeur de thèse

Titre : La croissance du pin maritime (*Pinus pinaster Ait.*) en réponse à l'environnement: variabilité phénotypique et architecture génétique.

Résumé

Evaluer l'effet du climat sur la croissance des arbres forestiers, et notamment leur capacité de production de biomasse en situation de contrainte hydrique, passe par la quantification du niveau de plasticité phénotypique des individus et de la diversité génétique des populations au sein de l'espèce étudiée. Le pin maritime, plante pérenne d'intérêt économique majeur en Aquitaine, largement étudiée au niveau génétique et écophysio-logique, est un excellent modèle biologique pour mener à bien ce type d'étude. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié la variabilité phénotypique de nombreux caractères liés à la croissance du pin maritime au jeune âge, en fonction de contraintes abiotiques essentiellement liées à la disponibilité en eau. Nous avons par ailleurs documenté l'architecture génétique de ces traits en termes de nombre, position sur une carte génétique et effet des gènes majeurs (QTL) qui contrôlent une partie de cette variabilité phénotypique.

Dans le cadre de travaux de cette thèse, nous avons utilisé deux dispositifs expérimentaux: l'un composé de trois familles F1 issues de croisements contrôlés de parents d'origines géographiques contrastées (Corse, Landes et Maroc), l'autre d'une famille F2 issue de l'autofécondation d'un hybride Corse x Landes. Le premier essai comprenait 1500 individus semés en 2007 sur lesquels la hauteur et le diamètre ont été mesurés annuellement de 2010 à 2014. Nous avons également noté l'évolution de la phénologie du débourrement apical pendant deux années consécutives (2012 et 2013). Enfin, la dynamique de la croissance radiale de 239 génotypes (répartis sur deux des trois familles) a été suivie en continu pendant trois années (2011-2013) grâce à un dispositif unique de capteurs de déplacement continu (microdendromètres). Le second essai comprenait 500 arbres semés en 1998 et dont le carottage au niveau du tronc début 2011 a permis d'établir le profil microdensitométrique sur 7 années consécutives (2004-2010). En parallèle, le génotypage des descendants des 4 croisements a été réalisé grâce à l'aide de biopuces à ADN, ce qui a permis de construire des cartes génétiques. L'analyse conjointe de l'information phénotypique et génotypique a permis d'identifier des QTL pour l'ensemble des caractères et d'étudier leur stabilité en fonction des conditions environnementales et du fond génétique.

Cette étude a montré que le débourrement est variable en années en fonction des contraintes de températures et du fond génétique. Tout comme la croissance primaire et secondaire, le débourrement est contrôlé par de nombreux QTL à effets modérés qui varient en fonction de l'environnement climatique et du fond génétique. Le suivi de la dynamique saisonnière de la formation du bois a également montré une interaction QTL x environnement révélant que la densité du bois est régulée par différents gènes ou le même jeu de gènes régulé de façon différentielle en fonction du climat. Enfin, la dernière partie de cette étude a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la variabilité intra-spécifique des fluctuations journalières du tronc et son interaction avec des variables environnementales. L'étude a mis en évidence que ces traits de réponse aux variations de l'environnement varient entre individus et en fonction du fond génétique. La recherche de QTL liés aux traits de micro-variation journalière (amplitude maximale de contraction journalière d'une part et différence entre deux maxima successifs d'autre part) a été réalisée dans le cadre d'une analyse *post-hoc* permettant de construire *a posteriori* un gradient environnemental et ainsi de quantifier la variabilité phénotypique et l'architecture génétique de ces deux traits de réponse à la contrainte hydrique.

L'analyse comparée des phénotypes, couplée à une caractérisation fine de l'environnement permet d'apporter un nouveau regard sur le déterminisme génétique et environnemental de la croissance du pin maritime au jeune âge et des interactions entre ces deux facteurs.

Mots clés : génétique moléculaire, écophysio-logie, cartographie génétique, QTL

Title: Growth of Maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in response to its environment: phenotypic variability and genetic architecture.

Abstract

Evaluating the impact of climate change on current plantations supposes the evaluation of their phenotypic plasticity and their genotypic diversity within the species, under abiotic pressure. Maritime pine is a perennial species of major economical interest in the french Aquitaine region. Wildly studied genetically and ecophysiologicaly, maritime pine is a very good biological model to see that type of study to the end. In this thesis, we intend to study various traits related to maritime pine growth under abiotic constraints, according to the following approaches: (1) evaluation of the phenotypic variability and (2) dissection of the genetic architecture of the traits (number, location and effects of QTLs). The comparison between environmental and phenotypic data will allow us to appreciate the phenotypic plasticity of individuals. Afterwards, studying the genetic architecture of these traits and its variability according to the genetic background of individuals and environmental conditions will allow us to assess the stability of detected QTLs.

We used 4 progenies of maritime pines: 3 controlled crosses of parents originated from contrasted ecotypes (Corsica, Landes and Morocco) and 1 controlled cross from a second generation of self-pollination (F2). Micro-cores were extracted from the individuals of the F2 population and microdensity profiles were established through 7 consecutive years. Total height and diameter of each individual were measured once a year on the 3 others crosses, from 2010 to 2014. Dynamics of apical bud burst was also followed on the same individuals in 2012 and 2013. Finally, dynamics of radial growth were monitored on a sub-sample of 239 individuals (spread in 2 of the 3 controlled crosses) during 3 years thanks to a unique device of microdendrometers.

At the same time, all individuals (from the 4 crosses) were genotyped with several DNA bioarrays of molecular markers, allowing the building of genetic maps. The confrontation of phenotypic and genotypic data enabled to identify genome areas involved in the genetic architecture behind the traits and to study their stability according to environmental conditions and the genetic background of individuals.

This study showed that bud burst varies from year to year, depending on the conditions of temperature and of the genetic background of individuals. Same way as growth, bud burst is controlled by many QTLs of moderate effect, varying according to climatic conditions and the genetic background of individuals. The monitoring of seasonal dynamics of wood formation also showed a QTL x environment interaction revealing that wood density is regulated by different genes or the same set of genes, differentially regulated in response to the climate. The last part of the study puts forwards, for the first time, the variability of radius daily fluctuations within a full-sib family and its interaction with environmental variables.

This study shows for the first time that these response traits vary between individuals depending on their genetic background. The investigation for QTLs related to daily radius fluctuations under classes of environmental constraints allowed to quantify, for the first time, genotype x environment interactions on for these response traits.

A comparative analysis of the different phenotypes coupled with a fine characterization of the environment brings a new light on the genetic determinism of maritime pine growth at young age and especially its interaction with the environment.

Keywords: molecular genetics, ecophysiology, genetic mapping, QTL

Avant-propos

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont été menées au sein de l'UMR Biodiversité Gènes et Communautés (BioGeCo). Cette thèse a été financée par la Région Aquitaine (Contrat Conseil Régional d'Aquitaine n°20111203004), le métaprogramme « Adaptation de l'agriculture et de la forêt au changement climatique » (INRA-ACCAF) et le département « Ecologie des forêts, prairies et milieux aquatiques » (EFPA) de l'INRA. Les frais de fonctionnement ont été couverts par un projet FEDER (ABIOGEN project, no. Presage 32973) et le 7ème programme structurant de l'Union Européenne FP7/2007-2013 (projets NOVELTREE no. 211868 et PROCOGEN no. 289841). Les données climatiques ont également été fournies par le réseau de centrales « CLIMATIK » de l'INRA.



Unité de recherche

B i o G e C o



Biodiversité, gènes & communautés

UMR 1202 BIOGECO - INRA / Université Bordeaux 1 / Site de Recherches Forêt Bois de Pierroton /
69 route d'Arcachon 33612 CESTAS Cedex – France

Sommaire

I. INTRODUCTION	9
I.I LES FORÊTS FACE AU CHANGEMENT CLIMATIQUE (CC)	9
I.II ADAPTER LES FORÊTS AU CC POUR ASSURER LEUR PRODUCTIVITÉ	17
I.III CROISSANCE DES ARBRES FORESTIERS: DES MÉCANISMES BIOLOGIQUES AUX MODÈLES À L'ÉCHELLE DU PEUPLEMENT	23
I.IV LE PIN MARITIME: UNE FORTE VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE, UN ATOUT FACE AU CC	34
I.V ENJEUX POUR LE FUTUR: APPRÉHENDER LA PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE	40
II OBJECTIF DE LA THÈSE	43
III MATÉRIELS ET MÉTHODES	46
III.I POPULATIONS ÉTUDIÉES ET CARACTÉRISTIQUES DES SITES EXPÉRIMENTAUX	46
III.II CARACTÈRES ÉTUDIÉS	50
III.III DONNÉES ENVIRONNEMENTALES	60
III.IV DONNÉES GÉNOTYPIQUES	60
III.V CARTOGRAPHIE GÉNÉTIQUE	66
III.VI MÉTHODE DE DÉTECTION DES QTL	70
IV PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE ET ARCHITECTURE GÉNÉTIQUE DU DÉBOURREMENT ET DE LA CROISSANCE AU JEUNE ÂGE CHEZ LE PIN MARITIME (PINUS PINASTER AIT.).	74
V GENETIC ARCHITECTURE OF PHENOTYPIC PLASTICITY IN TREES: WOOD FORMATION IN MARITIME PINE AS A STUDY CASE.	109
VI FLUCTUATIONS JOURNALIÈRES DU TRONC ET DE LA CROISSANCE RADIALE DU PIN MARITIME: VARIABILITÉ PHÉNOTYPIQUE, DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE ET ENVIRONNEMENTAL ET ARCHITECTURE GÉNÉTIQUE.	137
VII. CONCLUSION GÉNÉRALE	188
VIII. RÉFÉRENCES	194
IX. ANNEXES	214

I. Introduction

Ce premier chapitre vise à fournir au lecteur un cadre contextuel aux recherches effectuées dans le cadre de cette thèse. Il présente l'impact du changement climatique sur les forêts et les enjeux (économiques et agronomiques) qui s'y rattachent. Il donne également des éléments pour comprendre les mécanismes liés à la croissance des arbres, en lien avec les variations de l'environnement. Il s'appuie enfin sur l'exemple du pin maritime dans le massif des Landes de Gascogne pour introduire le concept central de cette thèse : la plasticité phénotypique et l'interaction génotype x environnement.

I.I Les forêts face au Changement Climatique (CC)

I.I.I Changement Climatique: état des lieux et prédictions

Selon la définition de la convention-cadre des Nations Unies sur le Changement Climatique (CCNUCC), les changements climatiques correspondent à des changements du climat qui sont attribués directement ou indirectement à une activité humaine altérant la composition de l'atmosphère mondiale et qui vient s'ajouter à la variabilité naturelle du climat observée au cours de périodes comparables. D'après le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) le réchauffement du système climatique est sans équivoque. Depuis les années 1950 le climat subit des changements majeurs. L'atmosphère et l'océan se sont réchauffés, les couvertures de neige et de glace ont diminué, le niveau des mers s'est élevé et les concentrations des gaz à effet de serre ont augmenté (5^{ème} Rapport du GIEC, 2013). Les modèles de reconstitution du climat présentent un réchauffement progressif depuis les années 80, qui en fait la période de 30 ans la plus chaude qu'ait connu l'hémisphère Nord depuis 1400 ans. Les températures de surface ont augmenté de 0,75°C depuis le début du 20^{ème} siècle, l'augmentation la plus rapide ayant eu lieu ces dernières décennies (Hurrell and Trenberth, 2010). L'utilisation de combustibles fossiles et les émissions dues aux changements d'utilisation des sols ont entraîné une augmentation des concentrations atmosphériques de dioxyde de carbone, de méthane et de protoxyde d'azote. Cette augmentation avoisine les 40% depuis l'époque préindustrielle. Les gaz à effet de serre (GES) ont aujourd'hui atteint un niveau sans précédent depuis au moins 800 000 ans (GIEC, 2013).

De nouvelles émissions de GES impliqueront une poursuite du réchauffement et des changements affectant toutes les composantes du système climatique. Selon les modèles de prédiction du climat futur, à la fin du XXI^e siècle, l'augmentation de la température à la surface du globe sera comprise entre +1,5 °C et +2,6°C, par rapport à l'époque allant de 1850 à 1900.

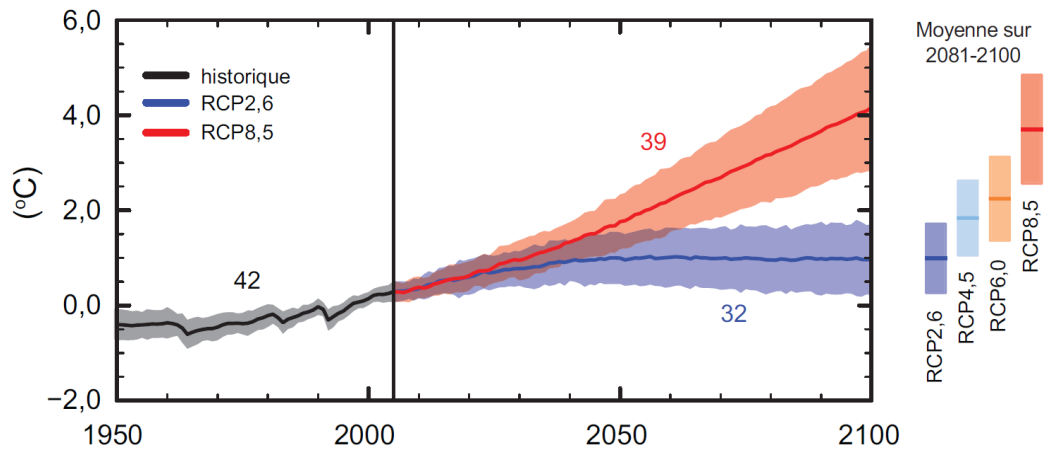


Figure 1. Séries chronologiques simulées à partir de plusieurs modèles CMIP5 de 1950 à 2100 pour: l'évolution des anomalies de température annuelle moyenne du globe en surface par rapport à la période 1986-2005. Les séries chronologiques des projections et une mesure de l'incertitude (parties ombrées) sont présentées pour les scénarios RCP2,6 (en bleu) et RCP8,5 (en rouge). Le noir (couleur grise) représente l'évolution historique modélisée à l'aide des forçages historiques reconstruits. Les moyennes et incertitudes associées sur la période 2081-2100 sont fournies pour tous les scénarios RCP sous forme de bandes verticales de couleur. Le nombre de modèles CMIP5 utilisés pour calculer la moyenne multimodèle est indiqué.

Les modèles prévoient aussi que le réchauffement se poursuivra après 2100. Il continuera à présenter une variabilité interannuelle à décennale et ne sera pas uniforme d'une région à l'autre (GIEC, 2013).

Les projections à l'échelle régionale ou globale de l'humidité du sol et des périodes de sécheresse demeurent relativement incertaines. Les projections concernant la fin du XXI^e siècle indiquent qu'un risque accru de sécheresse est probable dans la zone méditerranéenne, dans le sud-ouest des États-Unis et en Afrique Australe. Il est également prévu que l'évolution de la circulation atmosphérique de Hadley, qui redistribue l'énergie accumulée à l'équateur vers les plus hautes latitudes dans les deux hémisphères, entraîne une élévation des températures de surface et l'assèchement des sols d'ici la fin du XXI^e siècle (scénario RCP8.5, GIEC 2013, Figure 1).

Une autre conséquence de cette perturbation du climat est la multiplication des phénomènes extrêmes. Par exemple, les principaux aléas naturels auxquels la forêt des Landes de Gascogne sera confrontée en 2050 vont également évoluer :

- tempête : le massif landais a été confronté à deux tempêtes en 10 ans. Des recherches ont été et sont menées sur la vulnérabilité des forêts et la gestion du risque tempête en forêt. Cependant, selon les analyses d'Hervé Le Treut (CNRS), l'impact du changement climatique sur l'occurrence et l'intensité des tempêtes dans les Landes de Gascogne n'est pas clairement établi et en l'état actuel des modèles climatiques, rien ne permet de conclure à un accroissement de l'occurrence des tempêtes à l'horizon 2050 dans les Landes de Gascogne (prospective Massif des Landes de Gascogne, 2012).
- incendies : le degré de sensibilité au feu des Landes de Gascogne en 2040 serait en augmentation et équivalent à celui de la zone Sud-Est actuellement, du fait du changement climatique.
- attaques sanitaires : le massif landais pourrait éprouver une plus grande sensibilité aux parasites opportunistes. En effet, les insectes sont favorisés par une augmentation de ces températures; de plus, les capacités d'adaptation des parasites sont généralement supérieures à celles de leurs hôtes, ce qui pourrait se traduire par des évolutions rapides du cortège parasitaire des pins dans les Landes. Enfin, la probabilité d'arrivée de nouveaux parasites, par exemple le nématode du pin, est très forte.
- sécheresse: les Landes de Gascogne vont probablement subir des déficits hydriques estivaux et des engorgements hivernaux plus longs alors que ces contraintes sont déjà marquées sur le massif landais (prospective Massif des Landes de Gascogne, 2012).

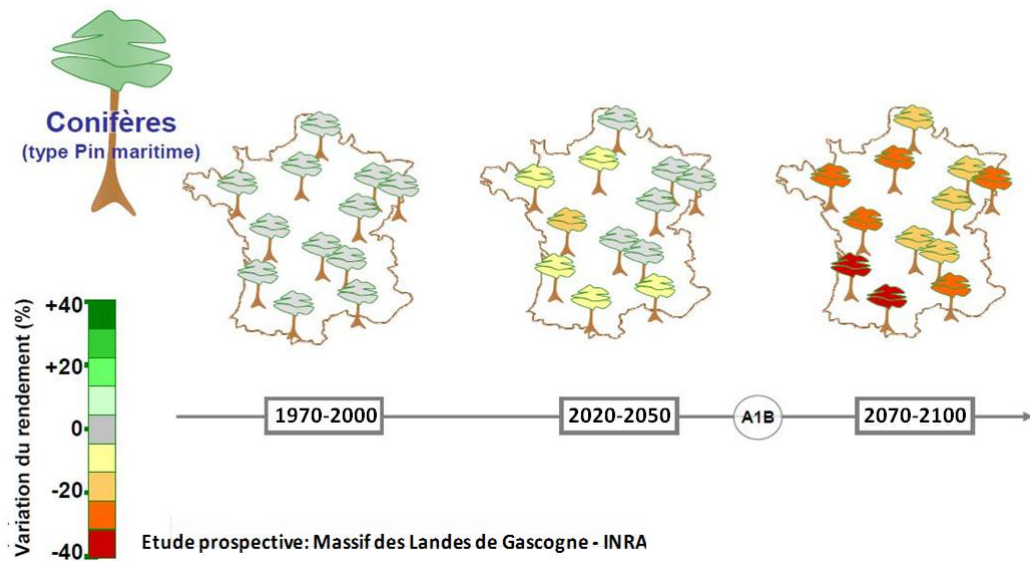
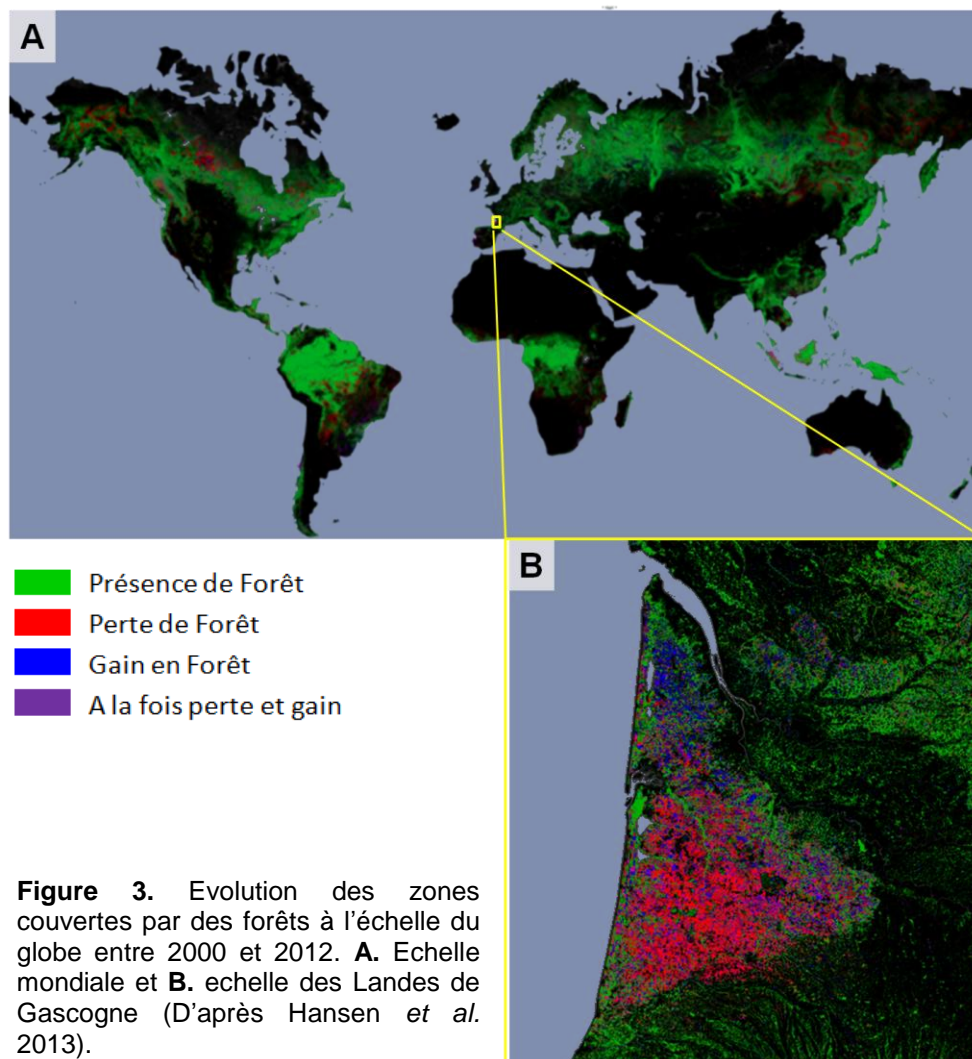


Figure 2. Evolution du rendement du pin maritime en France : modèle GRAECO ; méthode scénario climatique AB (source A. Bosc, 2011)



I.I.II Impact du CC sur les forêts

I.I.II.I Impacts biologiques

Ces bouleversements climatiques ne sont pas sans conséquences sur les organismes de la biosphère. Chez les plantes, ils peuvent agir directement sur la physiologie, en influençant la période de croissance, le débourrement et la floraison (Peñuelas and Filella 2001). Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence des changements phénologiques en réponse au changement climatique récent (Parmesan and Yohe 2003). A titre d'exemple, en écosystème méditerranéen, les feuilles de la plupart des arbres à feuilles caduques émergent en moyenne 16 jours plus tôt et tombent 13 jours plus tard qu'il y a 50 ans (Peñuelas and Filella 2001). Les variations géographiques de la date de débourrement répondent également à des clines à la fois latitudinaux et altitudinaux (Steiner *et al.* 1979 ; Worrall 1983; Ducouso *et al.* 1996; Ducouso *et al.* 1997; Schlarbaum et Bagley 1981; Germain 1992). Les pressions de sélection pour la date de débourrement, exercées sur une essence forestière, sont essentiellement de deux ordres: abiotiques (ex. gelées tardive pour le chêne sessile, Ducouso *et al.* 1996; Liepe 1993) et biotiques (ex. insectes défoliateurs pour le chêne pédonculé, (Crawley et Akhteruzzaman 1988; Tikkanen et Tiitto 2003).

Le changement climatique constitue une menace directe pour les écosystèmes forestiers, les populations tributaires des forêts et la société dans son ensemble, car il a un impact négatif sur la production des forêts. Bien que les écosystèmes forestiers soient, par nature, dynamiques, la rapidité des changements prévus sera probablement très supérieure à la capacité d'adaptation naturelle des écosystèmes forestiers. Le scénario "moyen" (A1B) du GIEC prévoit pour le Sud-Ouest de la France, une hausse des températures de près de 1,5°C, et une diminution d'environ 10% des précipitations qui entraîneraient une baisse estimée à -10 % de rendements à l'horizon 2050 et jusqu'à - 40 % après 2070 (Figure 2). En utilisant des images satellitaires et du calcul informatique dématérialisé, les chercheurs ont cartographié la couverture mondiale de la forêt ainsi que les gains ou perte entre 2000 et 2012. En 12 ans, 2,3 millions de km² de forêt ont été perdus et 800000 km² replantés (Hansen *et al.* 2013, Figure 3). Dans certaines zones, le changement climatique aura cependant des effets positifs sur les forêts, par exemple en prolongeant la saison de végétation; mais ceci reste hypothétique car les bioagresseurs pourraient perturber ces effets positifs.

I.I.II.II Impacts économiques

Les modifications physiologiques ont également un impact économique quand on considère la production de biomasse. L'augmentation du CO₂ atmosphérique et de la température devraient améliorer les rendements dans les zones de hautes latitudes, tandis que l'augmentation de température associée à la diminution des précipitations dans les faibles latitudes constitue

une menace pour le développement durable de ces régions (IPPC 2007). L'augmentation du nombre de jours à forte température en été et l'adoucissement des hivers entrainera d'une part une hausse des rendements dans les régions froides, mais d'autre part une baisse et une augmentation du risque d'incendies dans les régions chaudes. Les invasions de pathogènes risquent d'être également plus fréquentes. L'augmentation des fréquences de précipitations violentes risque d'accroître l'érosion des sols, la verse de certaines cultures, voire même de rendre impossible les cultures sur des terres détrempées. L'augmentation des cyclones risque d'entraîner des pertes de récoltes et la dégradation des forêts par déracinement. Enfin, l'augmentation de la fréquence des phénomènes d'élévation extrême du niveau de la mer pourra augmenter la salinité des eaux d'irrigation, des estuaires et des systèmes d'eau douce (IPCC, 2007).

Dans les zones tempérées, le réchauffement climatique pourrait avoir des conséquences positives sur la productivité des forêts à condition que les ressources hydriques ne soient pas limitées d'après Boisvenue et Running (2006). Par contre, sur le tiers des terres émergées où l'approvisionnement en eau est limité, le réchauffement climatique pourrait avoir de graves conséquences en termes de baisse de croissance, voire de mortalité. De plus, les épisodes climatiques extrêmes, tels que l'occurrence plus fréquente et plus intense de sécheresses, risquent de concerner la majorité des forêts mondiales, qui pourront voir leur croissance réduire, et leur santé menacée à cause de l'augmentation de la pression due aux champignons pathogènes (Desprez-Loustau *et al.* 2006) et insectes ravageurs (prospective Massif des Landes de Gascogne, 2012).

Ces prédictions sont au centre des préoccupations mondiales car le bois est un produit commercial dont l'impact économique est majeur. Il est exploité par l'homme depuis des millénaires pour ses propriétés mécaniques, thermiques et énergétiques. Il est utilisé de manière industrielle ou artisanale pour répondre à divers besoins. Le marché du bois et de ses produits dérivés tient une place importante au niveau international. En 2013, la FAO évalue que les forêts mondiales ont produit 3,8 milliards de m³ de bois pour une valeur marchande 257 milliards de dollars, soit 2,5% de la totalité des échanges internationaux (mémento FCBA 2013 ; FAO, 2013). Le secteur forestier contribue également à la création de nombreux emplois au niveau mondial. Le secteur forestier structuré emploie 13,2 millions de personnes dans le monde; le secteur bois au sens large en emploie au moins 41 millions selon la FAO (FAO, 2014). De plus, Les produits forestiers contribuent fortement à donner un abri à au moins 1,3 milliard de personnes, soit 18% de la population mondiale. Compte tenu de l'accroissement de la population mondiale et des nouvelles voies de valorisation du bois (production d'énergie verte notamment), la demande en bois devrait connaître une augmentation dans les années à venir. En 2030, les études prédisent une augmentation de la consommation globale de bois de 65% par rapport au niveau de 2005 (FAO Carle et Holmgren, 2008).

La raréfaction progressive des ressources en combustibles liquides place également le bois au centre des questions de recherche liées à la production de biocarburants.

Pour le moment, l'approvisionnement en bois reste très dépendant de l'exploitation des forêts naturelles. Aujourd'hui, la surface totale de forêt sur la planète est estimée à un peu plus de 4 milliards d'hectares (ha). D'après une étude de l'ITTO (International Tropical Timber Organization) réalisée en 2006, la forêt plantée productive couvre environ 187 millions d'ha, ce qui représente 5% des surfaces forestières mondiales. Néanmoins, la forêt de production assure environ 50% de la production de bois rond (FAO 2007). Développer les forêts de plantations permettrait de diminuer la pression de prélèvement sur les forêts primaires en augmentant la quantité de bois disponible par unité de surface. Certaines filières de l'industrie du bois sont aujourd'hui très dépendantes des plantations forestières pour leur approvisionnement. La majorité de la pâte à papier (95%) et des panneaux de particule (85%) produits dans les régions occidentales est basée sur l'utilisation de bois issu de plantations industrielles. Si la part du bois issu de ces plantations reste faible dans le cas de la production de panneaux de contreplaqué et de planches (environ 20%), elle est en constante augmentation. Le développement au niveau européen de nouvelles filières dans le domaine du bois énergie, devrait encore accroître le développement de la forêt plantée pour répondre aux nouveaux besoins en matière d'énergie verte. Selon Libby (FAO 2002), cette évolution repose sur un ensemble de composantes qui permettent à cette sylviculture d'être beaucoup plus productive et donc plus rentable que la forêt naturelle. Les niveaux de productivité des forêts plantées sont de l'ordre de 15 à 40 m³/ha/an selon les espèces plantées, contre 4 m³/ha/an estimés en moyenne pour la forêt naturelle (Libby FAO 2002). Deux leviers de cette intensification de la production de bois sont étudiés au sein de l'INRA. D'une part, l'innovation en matière de sylviculture et d'autre part l'amélioration génétique du matériel végétal.

I.II Adapter les forêts au CC pour assurer leur productivité

L'homme peut favoriser la productivité des plantations forestières par le biais de l'optimisation des pratiques culturales (itinéraires techniques) et la mise en place de programmes d'amélioration génétique pour la sélection des meilleurs génotypes pour la production de bois. Différentes échelles d'action (massif forestier, bassin versant, parcelle, arbre) peuvent être combinées, afin d'apporter des solutions aux différents risques, mais également pour tirer parti de certains bénéfices du changement climatique. Quand l'effet du changement climatique est bénéfique pour les fonctions de production de la forêt (dans le nord de la zone tempérée par exemple) la gestion forestière peut réduire l'effet des facteurs limitants par exemple en optimisant la gestion des intrants. Parallèlement, dans les zones où on prédit une raréfaction des ressources en eau (sud de la zone tempérée et zone méditerranéenne par exemple), augmenter la résistance des écosystèmes à la sécheresse et aux incendies en utilisant des mélanges d'espèces, en gérant le sous-bois ou la fermeture du couvert peut être une bonne stratégie (Loustau *et al.* 2005). L'exploitation de la variabilité génétique naturelle des populations d'arbres forestiers permet quand à elle de créer des variétés améliorées permettant de garantir un certain niveau de productivité.

I.II.I Le levier sylvicole de l'intensification durable

De nombreuses études ont cherché à classer les systèmes de culture selon un ou deux axes principaux : l'axe économique, où les systèmes sont classés selon leur niveau de productivité, l'utilisation des produits et la rentabilité (Speidel *et al.* 1969, Dummel 1970, Arano and Munn 2006); ou l'axe écologique, où les catégories dépendent du degré de modification des conditions naturelles (Pro Silva 1999 ; Seymour and Hunter 1999 ; Gamborg and Larsen 2003 ; MCPFE 2003). Il existe également des réserves peu ou pas anthropisées gérées de manière extensive pour rester au plus proche des conditions naturelles (Montigny and MacLean 2006, Gamborg and Larsen 2003). Un des problèmes lié à cette classification c'est qu'elle ne prend pas en compte la variabilité de pratiques existantes pour les forêts de plantation.

Pourtant, dans le cas des forêts plantées, le choix d'un système de gestion adapté est essentiel car il peut avoir des conséquences majeures à la fois sur sa durabilité et sur le plan économique. Certains paramètres sont au-delà de ce que peut contrôler le gestionnaire forestier comme par exemple les conditions climatiques locales, les caractéristiques intrinsèques des espèces ou encore les conditions du marché et de la demande. Le principal objectif de ce type de forêt est de produire le maximum de produits commercialisables dans un temps de rotation court même si les questions écologiques sont aujourd'hui de plus en plus centrales dans les systèmes de gestion.

Pour atteindre les objectifs de production, le raisonnement de l'itinéraire technique est essentiel. Un itinéraire sylvicole représente l'ensemble des interventions à réaliser dans un cycle de production (et dans des types de peuplements donnés) pendant une durée déterminée. En fonction de l'âge et du type de peuplement, plusieurs opérations sont nécessaires au cours de la vie d'une forêt :

- Le dépressage s'applique surtout aux forêts de conifères où les arbres du peuplement ont été plantés ou semés avec une forte densité. Au bout de quelques années, ils sont très serrés et se concurrencent pour la lumière et les éléments du sol. Il est alors nécessaire de réduire la densité afin de permettre aux arbres dominants de pousser dans de bonnes conditions.
- La taille de formation est une opération qui se pratique sur les feuillus et notamment les feuillus précieux. Elle consiste à donner une forme de qualité à l'arbre. C'est dans le but d'obtenir un bois de qualité supérieure en éliminant les grosses branches pouvant donner des nœuds et en améliorant la rectitude du tronc.
- L'élagage consiste à couper au ras du tronc et sur une hauteur donnée toutes les branches mortes ou vives afin d'améliorer la qualité du bois en évitant les nœuds. Ce sont surtout les résineux qui sont concernés par cette opération qui se fait parfois naturellement, les branches meurent et tombent d'elles-mêmes par manque de lumière (on parle d'élagage naturel).
- Le dégagement consiste à éliminer la végétation concurrente qui gêne la bonne croissance des jeunes arbres.

Un plan de gestion est également nécessaire pour atteindre les objectifs fixés et identifier les moyens à mettre en œuvre pour les atteindre. Lorsque l'objectif principal retenu est la production de bois deux problèmes se posent :

- le choix des critères d'exploitabilité. Il s'agit en général d'un diamètre ou d'une circonférence à atteindre à un âge fixé pour une station donnée.
- le choix d'un régime d'éclaircie permettant d'atteindre l'objectif fixé.

Ces choix fondamentaux sont déterminés par des exigences qui tiennent le plus souvent à :

- soit la maximisation des revenus ou mieux la maximisation du taux de rendement interne des investissements réalisés ;
- soit la maximisation de la production de bois d'une catégorie donnée ;

- soit encore la recherche de l'accroissement moyen annuel maximum

Il s'agit également de mettre en place des techniques de gestion durable des plantations forestières. La gestion durable de la forêt est un concept clé qui décrit les pratiques modernes de gestion des forêts qui reconnaît l'importance de prendre en compte l'équilibre entre les facteurs sociaux, écologiques et économiques comme recommandé au niveau Européen par la conférence sur la protection des forêts de 2003 (Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe , MCPFE 2003). Les certifications forestières permettent d'assurer aux consommateurs que les produits à base de bois (parquet, meubles, papier) qu'ils achètent proviennent d'une forêt qui est aménagée et exploitée de façon durable et responsable.

Cette démarche est basée sur deux types de certifications. La certification forestière, dite certification FM, qui permet d'attester du bon respect par l'exploitant forestier des référentiels de gestion forestière définis. La certification "chaîne de contrôle " (chain of custody), dite certification COC, qui concerne chaque maillon de la filière et qui garantit la traçabilité du produit.

Pour appuyer cette garantie, la certification forestière se fait par des tierces parties indépendantes, les organismes de certifications, qui contrôlent le respect des critères définis. Deux types de certifications coexistent aujourd'hui :

- Forest Stewardship Council (FSC) : www.fsc.org
- Programme for the Endorsement of Forest Certification schemes (PEFC) : www.pefc-france.org

Le système de certification FSC est l'un des plus connus à travers le monde. Cette reconnaissance est établie selon dix critères qui s'appliquent de façon uniforme à un niveau mondial.

Le programme de reconnaissance des certifications forestières (PEFC) initialement à portée européenne possède aujourd'hui une envergure mondiale. Ce schéma international permet le développement de référentiels nationaux de certification des forêts répondant aux diverses problématiques environnementales et sociales localement rencontrées. En France, cette certification est soutenue par France Nature Environnement.

I.II.II Amélioration génétique

Il est difficile de prédire la capacité de réponse des arbres en place aux changements du climat prédits pour les années à venir. En revanche, la diversité génétique intraspécifique des arbres est un facteur essentiel qui favorise la biodiversité globale de l'écosystème et lui permet de se maintenir au fil des siècles. De façon générale, on constate une très forte variabilité génétique chez les espèces forestières (Hamrick *et al.*, 1992) et, en particulier, à l'intérieur des populations (Nybom, 2004). Dans le cadre des programmes d'amélioration génétique, c'est la variabilité au sein de l'espèce qui est mise à profit afin de créer des variétés présentant les caractères d'intérêt pour le sylviculteur. En effet, le gain génétique (par cycle de sélection) pour un caractère est estimé par la réponse à la sélection. Ainsi, les conditions favorables pour obtenir un gain génétique important par cycle de sélection sont les suivantes :

- Le critère de sélection doit être fortement héritable, c'est-à-dire qu'une part importante de la variabilité observée doit être d'origine génétique
- Le sélectionneur doit choisir une intensité de sélection élevée (peu d'individus retenus par rapport à la taille de la population initiale)
- La variabilité du caractère sélectionné dans la population initiale doit être importante.

Puisque les gains génétiques ne seront possibles que s'il y a de la variabilité génétique dans la population de base, il apparaît important d'évaluer, pour l'ensemble de ces nouveaux critères de sélection, la variabilité dans les populations locales mais aussi dans d'autres provenances de l'aire de répartition d'une l'espèce.

Le niveau de diversité populationnelle est variable d'une espèce à l'autre, il peut aussi varier entre individus d'une même espèce du centre aux marges de son aire de distribution. Toutefois, les exemples historiques de transfert de matériel forestier ont montré que cette diversité génétique était souvent suffisante pour permettre des évolutions adaptatives fortes en un nombre réduit de générations (CRGF). Ayant la certitude que des changements environnementaux majeurs vont survenir, il est important de tirer le meilleur parti de ce potentiel adaptatif. Dans le cas des forêts plantées on pourrait sélectionner les génotypes qui permettent de maintenir (à minima) la production selon les contraintes prédites.

L'amélioration génétique repose sur la valorisation de la variabilité génétique naturelle. L'hétérogénéité des génotypes, le régime de reproduction préférentiellement allogame (Hamrick *et al.* 1992) et des tailles de population généralement grandes explique la forte diversité génétique des espèces forestières (favorise l'apparition de mutations et leur conservation dans le temps). Parmi les

espèces forestières, les programmes d'amélioration s'intéressent préférentiellement aux arbres ayant des caractéristiques de croissance intéressantes. Parmi les genres les plus plantés dans le monde, les conifères représentent plus de 50% des surfaces. Le genre *Pinus* totalise à lui seul 32% des surfaces (*P. taeda*, *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. caribea*...). Les feuillus représentent 37% des plantations avec quatre genres majeurs : *Eucalyptus* (8%), *Acacia* (5%), *Tectona* (4%) et *Populus* (3%) (FAO, States of the world's forests 2007). Les programmes d'amélioration génétique ont vu le jour dans les années 1960. Ils ont été basés sur une première étape de sélection massale en populations autochtones (ex Pin maritime en France) ou introduites (ex *Eucalyptus* au Brésil et au Congo, Martin et Cossalter, 1976).

Les dispositifs expérimentaux mis en place doivent également permettre de déterminer, pour les caractères cibles de la sélection, la part des effets génétiques et environnementaux impliqués dans le contrôle de leur variation (héritabilité des caractères et composantes de la variance). L'estimation de la part de variabilité génétique des traits permet de sélectionner les meilleurs génotypes utilisables en sortie variétale. Les gains génétiques réalisés sur plusieurs générations permettent d'atteindre des bénéfices importants dès les premiers cycles de sélection. Li *et al.* (1999) rapportent des gains de volume de 26 à 35% (volume de bois récolté) réalisés après 2 cycles d'amélioration génétique de *Pinus taeda* dans le sud des Etats Unis. L'objectif principal des programmes d'amélioration étant l'augmentation de la productivité, ils sont majoritairement basés sur des caractères de croissance tels que la hauteur totale ou la circonférence. La résistance aux bioagresseurs est également prise en compte car elle peut, chez certaines espèces (comme le peuplier), s'avérer être un critère déterminant pour la productivité. Des caractères morphologiques, tels que la rectitude du tronc ou la branchaison, sont également pris en compte dans certains cas où ils constituent des facteurs dépréciant la qualité du bois (par exemple pour le bois de sciage chez le pin maritime). L'amélioration génétique pour la croissance présente cependant deux contraintes majeures : d'une part une héritabilité faible à moyenne avec un fort effet de l'environnement sur la variation du phénotype notamment au jeune âge, et d'autre part de faibles corrélations juvénile-adulte ne rendant la sélection des meilleurs génotypes possible qu'au tiers de la durée de rotation : 12 ans chez le pin maritime, 5 ans chez le peuplier et 3 ans chez l'eucalyptus en condition subtropicale.

I.II.III les forêts: un atout pour atténuer le CC?

Les forêts peuvent jouer un rôle important dans l'atténuation du changement climatique. On estime que 17,4% des émissions de GES (IPCC 2007) proviennent du secteur forestier, dans une large mesure à cause de la déforestation. En contrepartie, les forêts offrent un potentiel considérable pour la fixation du carbone. D'après les estimations, les puits de carbone présents dans les forêts de la planète fixent plus d'un quart des émissions annuelles de carbone (Pan *et al.* 2011). Les options d'atténuation offertes dans le secteur comprennent les mesures qui réduisent les émissions de GES, accroissent le taux d'absorption des GES présents dans l'atmosphère (notamment par des activités de boisement, de reboisement, de remise en état des forêts et des modifications des pratiques de gestion des forêts) et l'utilisation de produits forestiers certifiés durables pour remplacer les matériaux à coefficients d'émissions élevés.

Les engagements et accords nationaux concernant l'architecture internationale d'appui à l'atténuation et à l'adaptation, relèvent de la Convention-cadre des Nations Unies sur le changement climatique (CCNUCC) et de son protocole de Kyoto. En raison de leur rôle important dans l'atténuation du changement climatique, les forêts tiennent une place prépondérante dans les négociations en cours sur les engagements futurs des pays au titre de la convention et à l'issue de la première période d'engagement du Protocole de Kyoto. Les négociations de la CCNUCC concernant la comptabilisation des émissions de gaz à effet de serre, l'utilisation des terres, les changements d'affectation des terres et la foresterie (UTCATF) dans les pays développés, et les mesures d'atténuation basées sur les forêts dans les pays en développement ont attiré l'attention des hauts fonctionnaires des gouvernements. Elles ont également débouché sur la promesse d'injecter de nouvelles ressources importantes pour financer des activités forestières d'atténuation dans les pays en développement. Les informations disponibles sur ces questions sont cependant insuffisantes pour quantifier l'impact écologique, social et économique du changement climatique récent sur les forêts.

I.III Croissance des arbres forestiers: des mécanismes biologiques aux modèles à l'échelle du peuplement

I.III.I Modélisation de la production forestière

Prévoir l'impact du changement climatique sur la productivité des forêts implique l'utilisation de modèles capables d'appréhender des processus de fonctionnement complexes et interconnectés. Différents types de modèles ont été développés en fonction des objectifs à atteindre. Les modèles de croissance et production les plus anciens prédisent la croissance annuelle à partir de mesures en plein champ (hauteur, diamètre, température, pluviométrie... Schober 1975; Dhôte 1990, 1991, Meredieu 2003). Ils permettent d'apprécier la croissance des arbres, à l'échelle de la parcelle, au cours d'un cycle de vie mais ne prennent pas en compte l'influence des variations environnementales au cours de la saison. Ces modèles continuent à être développés et améliorés. Ils sont des plus utiles dans la gestion sylvicole, et permettent aussi de prédire la production à moyen terme.

Le changement climatique stimule la croissance radiale (Becker *et al.* 1994) et apicale des forêts tempérées (Dhôte and Hervé, 2000). Durant les 20 dernières années, plusieurs modèles biophysiques ont été développés pour simuler les flux hydriques et de carbone à l'échelle du peuplement. Ils représentent les échanges de matières et d'énergie entre la canopée et l'atmosphère en intégrant les flux de CO₂ et de vapeur d'eau. Ces modèles basés sur des processus physiologiques permettent d'intégrer le fonctionnement de la canopée de l'échelle instantanée à l'échelle journalière voire décadaire (Baldocchi 1992; Caldwell *et al.* 1986; Leuning *et al.* 1995; Sands 1995 ; Wang and Leuning 1998 ; Williams *et al.* 1996). Ces modèles ne permettent cependant toujours pas de prédire les variations intra-annuelles de croissance ou de production de biomasse.

Les modèles basés sur les processus écologiques ou biogéochimiques sont quant à eux centrés sur les variations journalières et saisonnières des flux hydriques et de carbone. Ils prédisent les échanges de carbone au sein de la plante, d'un organe à l'autre (Mohren, 1987 pour *Pseudotsuga*; McMurtrie *et al.* 1990 pour *Pinus radiata*), et peuvent prendre en compte des processus de minéralisation des sols pour prédire la dynamique de formation de la matière organique (Running and Coughlan, 1988; Korol *et al.* 1991; Running and Hunt, 1993; Hoffmann, 1995; Bossel, 1996). Etant donné que les processus hydrauliques conditionnent l'effet du stress hydrique sur la photosynthèse (Schulze, 1986) de même que la dynamique du carbone et des nitrates (Parton *et al.* 1987), certains de ces modèles sont couplés avec des modules d'allocation du carbone et une simulation du cycle de l'eau. Les modèles intègrent souvent de nombreux paramètres, ce qui impliquent des mesures au champ très détaillées (conductance stomatique, surface foliaire, structure des tissus conducteurs...) pour pouvoir les estimer (Boulet *et al.* 2000). Ils ne prennent cependant pas en compte les variations microclimatiques au sein de la canopée.

De nombreuses études ont évalué l'effet du changement climatique sur les productions des écosystèmes forestiers à l'échelle du peuplement (Kirschbaum, 1999; Grant and Nalder, 2000), au niveau régional (Coops and Waring 2001; Häger *et al.* 1999; Joos *et al.* 2002; Minkkinen *et al.* 2002; Nabuurs *et al.*, 2003) et à l'échelle globale (Cramer *et al.* 1999, 2001; Kicklighter *et al.* 1999; Sellers *et al.* 1997; White *et al.* 2000). Comprendre l'impact du climat et de la gestion sylvicole sur la production de bois et le stockage du carbone implique cependant de coupler les modèles mécanistes basés sur les processus écophysologiques et les connaissances empiriques sur la forêt (Johnsen *et al.* 2001; Mäkelä *et al.* 2000). Il est ainsi possible d'améliorer les prédictions sur la production des forêts dans un environnement qui change. La mise en relation des modèles « processus » et empiriques est en cours depuis plusieurs années grâce à des données à l'échelle du peuplement comme la surface terrière, le volume ou encore la dominance apicale (Bartelink 2000 ; Landsberg and Waring 1997; Mäkelä 1988; Sievänen and Burk 1993; Valentine *et al.* 1997).

Le projet CARBOFOR (Loustau *et al.* 2005) a permis de tester les modèles biophysiques CASTANEA, GRAECO et ORCHIDEE pour simuler l'équilibre du carbone, de l'eau et les produits forestiers au cours d'une rotation forestière complète. Cette étude a mis en évidence la nécessité de travailler sur des modèles qui prennent en compte à la fois les processus écophysologiques et les modèles de croissance classiques. L'étude de Davi (2005) met également en évidence que la prise en compte de la variation des coefficients d'allocations entre sites et au cours du temps améliore significativement la prédiction de la croissance.

De manière générale, les modèles prédisent une augmentation de la production forestière jusqu'à 2030-2050 suivie d'un plateau ou d'une phase descendante en 2070-2100 qui variera selon les zones géographiques. La partie Nord de la zone tempérée sera plus propice à la production de bois que la partie sud et que la zone méditerranéenne. Dans ces dernières, les ressources limitées en eau masquent l'effet du réchauffement sur la production de biomasse. L'étude de Loustau *et al.* 2005 estime que la productivité des forêts va augmenter dans le Nord de la France de manière croissante de l'ouest vers l'est alors que dans le sud de la zone atlantique, la productivité va diminuer avec le changement climatique.

Les variations de la production forestière, évaluée selon différents schémas de gestion et conditions environnementales, s'expliquent par l'effet conjoint de l'augmentation du CO₂ atmosphérique, de la disponibilité en eau et du fait que la sensibilité des peuplements aux variations climatiques diminue avec l'âge. Cette interaction entre le climat, la concentration de l'air en CO₂, la teneur du sol en azote, la disponibilité en eau et la gestion sylvicole est une question majeure pour l'optimisation des modèles.

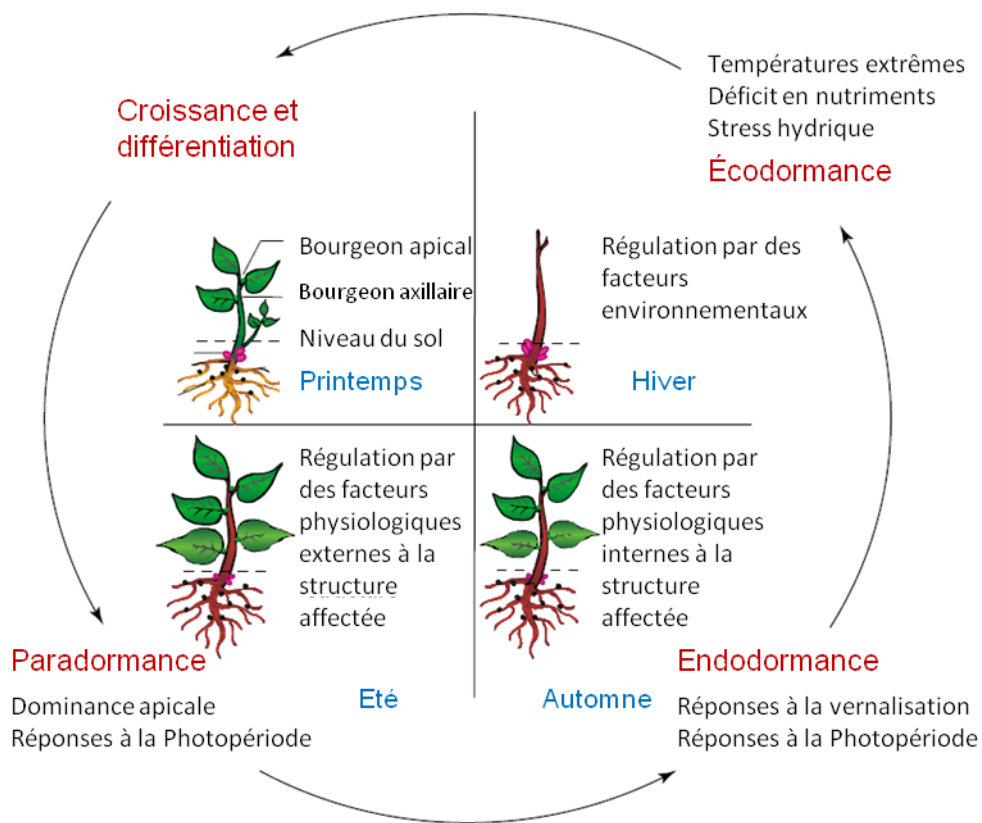


Figure 4. Représentation schématique du cycle saisonnier des arbres caducifoliés en climat tempéré. Les signaux environnementaux permettant l'entrée et la sortie des trois types de dormance sont indiqués. (D'après Horvath *et al.* 2003).

La connaissance de la croissance des peuplements, et la faculté de la prévoir en fonction des conditions climatiques environnantes, du potentiel génétique de ces peuplements et de leur conduite sylvicole, apparaissent également comme un élément essentiel de la planification forestière. Les avancées rapides en matière de génomique permettent notamment d'améliorer la compréhension des mécanismes complexes liés à la croissance et l'adaptation des forêts. Une grande part de la variabilité génétique contrôlant la croissance et l'adaptation des forêts reste cependant à découvrir pour pouvoir intégrer les données génomiques aux modèles de prédiction (Plomion *et al.* 2014).

I.III.II Cycle annuel des arbres forestiers en zone tempérée

La gestion de la production de biomasse lignocellulosique implique notamment de considérer le cycle de développement des arbres au sein de la saison de végétation. Le débourrement en particulier joue un rôle critique dans l'initiation de la saison de végétation, dont la longueur détermine en grande partie la croissance annuelle de l'arbre. Au-delà de la productivité, la date de débourrement conditionne également les dégâts dus aux gelées tardives qui peuvent être infligés à l'arbre et, par là même, causer un retard de croissance, des défauts de croissance de la tige, voire menacer la survie de l'arbre (Chuine et Beaubien 2001).

La date de débourrement des essences forestières sous climat tempéré peut être modélisée grâce à trois paramètres majeurs, à savoir les températures chaudes printanières, les températures froides hivernales et la photopériode (Chuine et Cour 1999 ; Hunter et Lechowicz 1992 ; Kramer 1994). De plus, de nombreux autres facteurs ne sont pas pris en compte ou sont encore inconnus. Cependant, la température à elle seule (températures froides hivernales et/ou températures chaudes printanières) permet de modéliser avec une bonne précision (variations observées de l'ordre de quelques jours) la date de débourrement de la plupart des essences forestières de la zone tempérée (Chuine et Cour, 1999). On peut donc considérer, en première approche, que le régime thermique précédant le débourrement (périodes hivernale et printanière) est le principal facteur environnemental déterminant la date de débourrement (Figure 4). Vers la fin de la période active de croissance et de photosynthèse, les arbres forestiers se préparent à la saison hivernale et à la saison de végétation suivante par la formation de bourgeons écailleux aux environs des mois d'Août et Septembre : c'est l'entrée en dormance. La dormance est une stratégie de survie qui permet à la plante de subsister durant des périodes défavorables à la croissance. En 1987, Lang (Lang 1987) décrit la dormance de la manière suivante: « La dormance est l'arrêt temporaire de croissance visible de toute structure de la plante contenant un méristème ». A partir de cette définition, il a divisé la dormance en trois catégories :

- l'écodormance: l'arrêt d'activité est imposé par des facteurs environnementaux et la croissance est possible lorsque les conditions redeviennent favorables.
- la paradormance: l'arrêt de croissance est provoqué par un autre organe de la plante, distinct et éloigné du tissu dormant (ex. paradormance apicale : le méristème apical de la plante inhibe la croissance de l'ensemble des bourgeons axillaires).
- l'endodormance: l'arrêt de croissance est lié à des facteurs endogènes au tissu dormant et la croissance est impossible, même en présence de conditions favorables.

Du point de vue cellulaire, la dormance est liée à un arrêt des divisions cellulaires au sein du méristème apical. Devitt et Stafstrom (1995) ont émis l'hypothèse que les cellules des bourgeons dormants étaient arrêtées en trois stades du cycle cellulaire : au cours de la phase G1, à la transition entre les phases G1 et S, ou encore entre les phases S et G2. Par la suite, Gutierrez *et al.* (2002) ont montré que, dans la plupart des cas, les cellules contenues dans les bourgeons végétatifs sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, avant la phase S.

La structure même du bourgeon permet de préserver les tissus des dégâts causés par le gel grâce à la formation d'écailles à la périphérie et à l'apparition de poils à la surface des écailles permettant une meilleure imperméabilité de la structure. Le bourgeon peut être défini comme un axe court portant une série très dense de primordiaux foliaires produits par le méristème apical sous-jacent. Le méristème apical est formé durant l'embryogénèse. Il constitue la partie centrale du bourgeon où l'activité doit être régulée. On peut y distinguer une zone centrale, composée de cellules indéterminées, et une zone périphérique, source de cellules pour les organes en formation, comme les jeunes feuilles. L'anatomie de cette structure principale peut fortement varier entre espèces mais également au sein d'une même espèce en fonction de l'âge, de la position sur le rameau ou des conditions physiologiques (Brown, 1971). Deux types de bourgeons sont à distinguer : les bourgeons apicaux et les bourgeons axillaires. Les bourgeons axillaires proviennent du méristème apical et, le plus souvent, n'ont pas d'activité d'élongation durant l'année où ils sont formés (Richards et Larson, 1981). Les bourgeons apicaux, eux, vont libérer une portion de tige feuillée, ou unité de croissance, au printemps, qui va s'allonger progressivement durant quelques dizaines de jours. Lorsque la pousse annuelle est formée de plusieurs unités de croissance, on parle de croissance polycyclique.

Les organes de l'année suivante sont préformés dans le bourgeon avant l'entrée en phase d'endodormance. Cette phase de dormance au sein de structures protectrices est indispensable à la préservation des tissus exposés, sans cela, au gel (Levins, 1969). L'année suivante, au cours du printemps, après que l'endodormance ait été levée par les températures froides, le développement des feuilles, fleurs et bourgeons apicaux est à nouveau possible sous certaines conditions de température et de photopériode, c'est la phase d'écodormance. Du point de vue du développement, l'occurrence de ces différentes étapes est loin d'être triviale. En effet, le débourrement des ébauches

foliaires doit avoir lieu le plus tôt possible, afin de maximiser l'activité photosynthétique et, dans le même temps, les feuilles doivent être protégées des gelées tardives qui les endommageraient et donc réduiraient les capacités de photosynthèse (Ducouso *et al.* 1996 pour le chêne). Il en est de même pour la croissance de la tige. Une fois le débourrement réalisé, l'arbre va croître durant quelques semaines puis connaître à nouveau une période de cessation d'activité avant de réaliser une seconde pousse. Sous des climats tempérés, cette seconde pousse a lieu en Juin pour les essences de feuillus (pousse de la Saint Jean). Sur des individus jeunes, la même succession peut se reproduire en Août et parfois même en Septembre. D'autres espèces ne réalisent qu'un seul cycle dans l'année. Au final, comme la longueur de la saison de végétation est définie par l'intervalle entre la date de débourrement et la date de mise en place du bourgeon, ces deux événements phénologiques ont une importance capitale pour la productivité d'une essence forestière.

I.III.III Croissance et formation du bois

Durant les premiers stades du développement de la plante, seuls les méristèmes apicaux (méristèmes primaires) vont participer à la production de nouvelles cellules. Ces cellules sont nécessaires à la formation et à la croissance des différents organes primaires de la plante (tiges, racines, feuilles). Cette phase est appelée croissance primaire et a lieu chez tous les végétaux. Chez les arbres, la phase de croissance primaire est poursuivie par une autre phase, appelée croissance secondaire, qui va leur permettre d'augmenter la circonférence des tiges et des racines. Cette croissance secondaire est initiée à partir de méristèmes secondaires, appelés cambium vasculaire et cambium cortical ou phellogène. Si l'on examine le développement des organes d'une plante depuis le haut de la tige jusqu'au bas des racines, on peut observer tous les différents stades qui conditionnent la mise en place et la croissance du xylème secondaire à partir des tissus primaires. Le méristème apical ou méristème primaire, situé à l'extrémité des tiges et des racines, est composé de cellules indifférenciées appelées cellules « initiales ». En se divisant, ces cellules assurent le renouvellement du méristème avec la création d'une nouvelle cellule indifférenciée, et le développement d'un nouvel organe avec la création d'une cellule amenée à se différencier pour devenir une cellule spécialisée.

Chez les arbres, les tissus vasculaires primaires sont organisés en îlots, généralement disposés en cercle au sein de la tige et séparés par des cellules parenchymateuses qui forment les régions interfasciculaires. Ces îlots regroupent le procambium (méristème primaire à la base de la mise en place des tissus vasculaires primaires), le xylème primaire et le phloème primaire. L'organisation entre les différents tissus d'un îlot est variable selon les espèces de plantes mais dans la majorité des cas, les tissus sont disposés en couches parallèles; on parle d'organisation collatérale

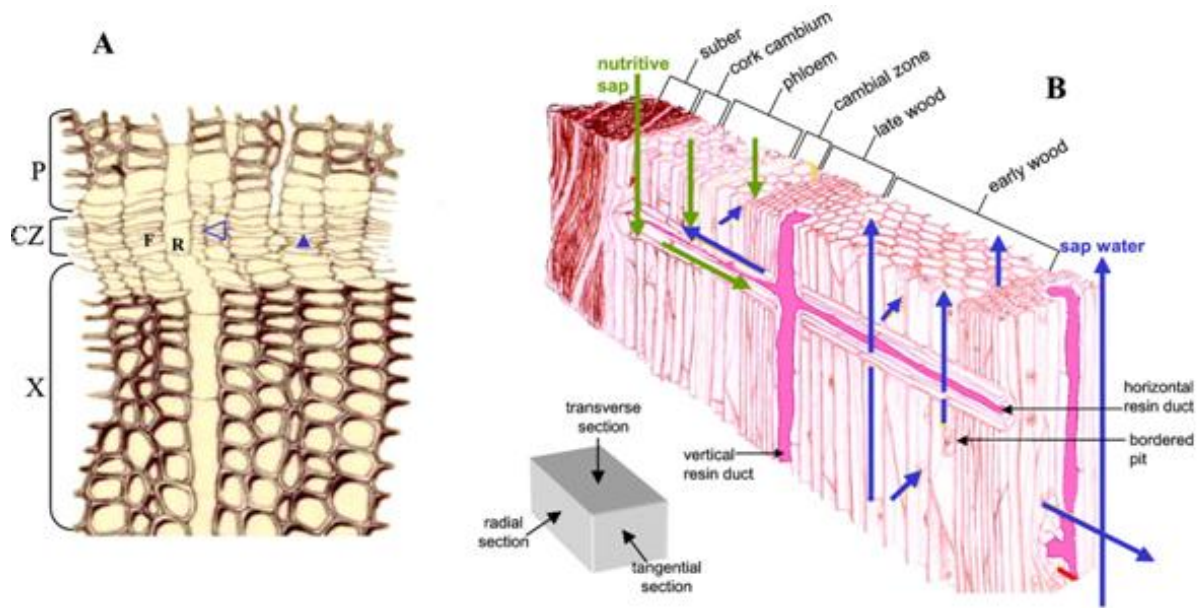


Figure 5. A. Dessin d'une section transversale de la zone cambiale de pin maritime (*Pinus pinaster*) montrant des cellules initiales fusiformes (F) et un rayon ligneux (R) dans la zone cambiale (cambial zone (CZ)). X, différenciation centripète du xylème montrant des cellules en cours d'élongation, intermédiaires et matures. P, différenciation centrifuge du phloème montrant des cellules en cours d'élongation, intermédiaires et matures. La pointe de flèche vide indique le sens de dépôt de la paroi radiale (division anticlinale). La tête de flèche pleine indique le sens de dépôt de la paroi tangentielle (division péricline). **B.** Schéma en 3D du bois de pin maritime montrant l'homogénéité de la structure du xylème des conifères (d'après Plomion *et al.* 2001).

(Yé *et al.* 2002). Le cambium vasculaire est composé de deux types de cellules initiales interconvertibles qui diffèrent par leur taille et leur forme et créent les cellules mères du xylème majoritairement par division péricline vers l'intérieur du cylindre cambial et les cellules mères du phloème vers l'extérieur. Les cellules du xylème sont produites en quantité plus importante que les cellules du phloème. Les initiales fusiformes, allongées, vont donner côté xylème, le système cellulaire axial qui comprend les trachéides et les cellules qui leurs sont associées, les fibres et les cellules du parenchyme axial. Les initiales de rayon vont être elles, toujours côté xylème, à la base du système radial composé des cellules du parenchyme de rayon (Mellerowicz *et al.* 2001) (Figure 5).

La formation du bois (croissance secondaire) chez les plantes ligneuses est un processus majoritairement coordonné par un programme génétique de développement. Cependant, des facteurs externes de types biotiques (attaque par des pathogènes) et abiotiques (température, photopériode, vent, ...) vont affecter la structure finale du matériau au niveau de l'arbre à différentes échelles. Ainsi, au sein d'un arbre, on peut distinguer différents types de bois qui ont chacun des propriétés particulières au niveau anatomique, chimique et physique (Plomion *et al.* 2001). La différenciation des cellules du bois est liée à la saison de végétation. Chez les conifères, les trachéides du bois initial (de printemps) ont une paroi fine, un fort diamètre et une section transversale carrée qui permet de forts débits de sève brute ascendante. Le cerne d'accroissement annuel est ainsi constitué du cumul du bois initial (formé au printemps) et du bois final (formé durant l'été). L'aspect très différent des trachéides de fin de saison de végétation et des trachéides de début de saison rend les limites de cernes généralement facilement identifiables, surtout chez le Pin maritime, le passage du bois initial au bois final étant généralement rapide. Les trachéides du bois final (d'été) possèdent elles des parois épaisses, un faible diamètre et une section rectangulaire. La lignification de ces cellules est intimement liée à leur fonction (Mc Millian, 1968; Megraw, 1985 ; Mott *et al.* 2002). Les trachéides ayant un rôle de transport de la sève sont lignifiés en quelques semaines, puis meurent. Les cellules de soutien se lignifient plus lentement et restent longtemps vivantes. Les autres cellules du bois (10%) constituent, d'une part, les canaux résinifères, et, d'autre part, des rayons orientés non plus verticalement comme les fibres et les trachéides, mais horizontalement de l'écorce vers la moelle. Ces derniers servent à stocker des réserves, à conduire la sève de l'extérieur vers l'intérieur du tronc et des branches, et jouent un rôle lors de la transformation du bois d'aubier en bois de coeur (duraminisation).

Chez les conifères, le bois est constitué à 90% de trachéides, le reste étant composé de rayons parenchymateux et de cellules parenchymateuses longitudinales, et parfois de conduits résinifères chez certaines espèces. La sève brute monte dans la plante via le xylème et la sève élaborée (enrichie en sucres issus de la photosynthèse) redescend via le phloème. La sève peut aussi

être transportée radialement par les rayons et tangentiellement par les ponctuations (Figure 5). Il est important de noter que différentes directions sont nécessaires à l'observation de la structure du bois : transversale, radiale et tangentielle (Plomion *et al.* 2001).

Il existe également un bois de réaction différent du bois dit « normal ». Le bois de réaction (bois de tension chez les angiospermes ou bois de compression chez les gymnospermes) est généralement formé en réponse à l'orientation non verticale de la tige qui peut elle-même être causée par différents stress environnementaux. La mise en place du bois de réaction permet à l'arbre de retrouver une position verticale plus favorable à sa croissance. Le bois de réaction est généralement plus dense et présente une composition chimique différente de celle du bois normal (dit « opposé »)(Yeh *et al.* 2005).

I.III.IV Les critères de qualité du bois

Dans le cas du bois, matière première dévolue à de multiples usages, la qualité (aptitude à satisfaire un besoin) doit répondre aux attentes des différents acteurs de la filière forêt-bois. Les productions peuvent être destinées à l'industrie du bois d'œuvre ou à l'industrie de la trituration (pâte, papier, panneaux) ou encore au secteur du bois énergie. Ces trois grands types de valorisation présentent des cahiers des charges spécifiques, qui prennent en compte des propriétés du bois communes ou spécifiques. L'industrie papetière s'intéresse à la composition chimique du bois et à la résistance des fibres. L'industrie du bois d'œuvre recherche quand à elle essentiellement l'homogénéité du bois, les propriétés mécaniques et la qualité de la branchaison (liée à la présence de noeuds dans le bois). Ces attentes impliquent de travailler sur des caractères complexes au niveau anatomique et chimique. La densité du bois, de par son influence sur les propriétés mécaniques du matériau et ses relations avec la plupart des caractéristiques papetières est sans aucun doute le caractère clé de la qualité du bois (Zobel et Jet 1995). De plus, sa variabilité intra-arbre (proportion de chaque type de bois) est avec la rectitude du fût une composante essentielle de l'homogénéité du bois. Les performances des fibres utilisées dans une application précise (bois d'œuvre, pâte, matériaux composites) dépendent de plusieurs paramètres incluant leurs propriétés intrinsèques: composition chimique, propriétés physiques individuelles, interactions fibres-fibres... Ces propriétés sont sous la dépendance de différents facteurs dont le génotype, les effets environnementaux, l'âge de l'arbre et leurs interactions. L'amélioration de la qualité des fibres et donc plus généralement du bois ne sera donc pleinement efficace que lorsque les effets de ces différents facteurs auront été étudiés et quantifiés. La qualité du bois peut donc être résumée sous la forme d'une équation multifactorielle conditionnelle :

$$QB = f(\text{chimie, propriétés physiques...} / G, E, A, I)$$

où G est l'effet du génotype, E l'effet de l'environnement, A l'effet de l'âge et I les interactions entre ces différents facteurs.

L'orientation des microfibrilles de cellulose dans la paroi est également un caractère de première importance. Son rôle dans la résistance des fibres et des propriétés mécaniques du bois a été largement mis en évidence. En ce qui concerne spécifiquement le bois d'œuvre, la propriété mécanique majeure recherchée concerne la rigidité du bois, une raideur importante garantissant une faible déformation en flexion. L'angle du fil du bois qui influence directement la stabilité dimensionnelle, et indirectement la qualité des sciages est aussi un caractère de premier ordre. Les critères de branchaison (nombre de verticilles et de branches par verticille, diamètre et angle d'insertion des branches) sont importants, tant d'un point de vue mécanique (Module de Rupture : MOR) qu'esthétique (présence de nœuds). Enfin, de par leur importance dans la qualité de la pâte et des panneaux de process (thermoformage, interactions bois-polymères, etc.), la composition chimique et notamment les teneurs en lignines, cellulose et extractibles ainsi que la morphologie des fibres (longueur, diamètre, masse linéique) constituent des caractères d'intérêt majeur.

Chaque critère de qualité bois implique le développement de techniques de mesures spécifiques dont voici trois exemples :

- La rectitude du fût est mesurée au travers de l'écart à la verticalité basale (mesurée en cm ou simplement « appréciée » par une note).
- La densité du bois et son hétérogénéité peuvent être estimées à partir des carottes de bois dont les sections sont radiographiées aux rayons X pour établir des profils de microdensitométrie : les variations des niveaux de gris sur la radiographie sont alors liées à la densité des trachéides et à l'épaisseur de leur paroi. En routine la densité est mesurée par infradensité, résistographe ou pilodyn dans les programmes d'amélioration qui nécessitent la mesure de milliers d'arbres.
- Les méthodes de caractérisation de la branchaison existent mais sont très longues et difficiles à analyser. Il en est de même pour les méthodes de mesure du module d'élasticité (Launey *et al.* 2002).

De nombreux autres critères tels que la morphologie des fibres, l'angle du fil du bois, la composition chimique du bois ou les propriétés physiques de la pâte à papier et du papier sont toujours à l'étude pour permettre de développer les techniques de mesure fiables et applicables à un grand nombre d'échantillons (le proche infra-rouge pour la composition chimique du bois par exemple).

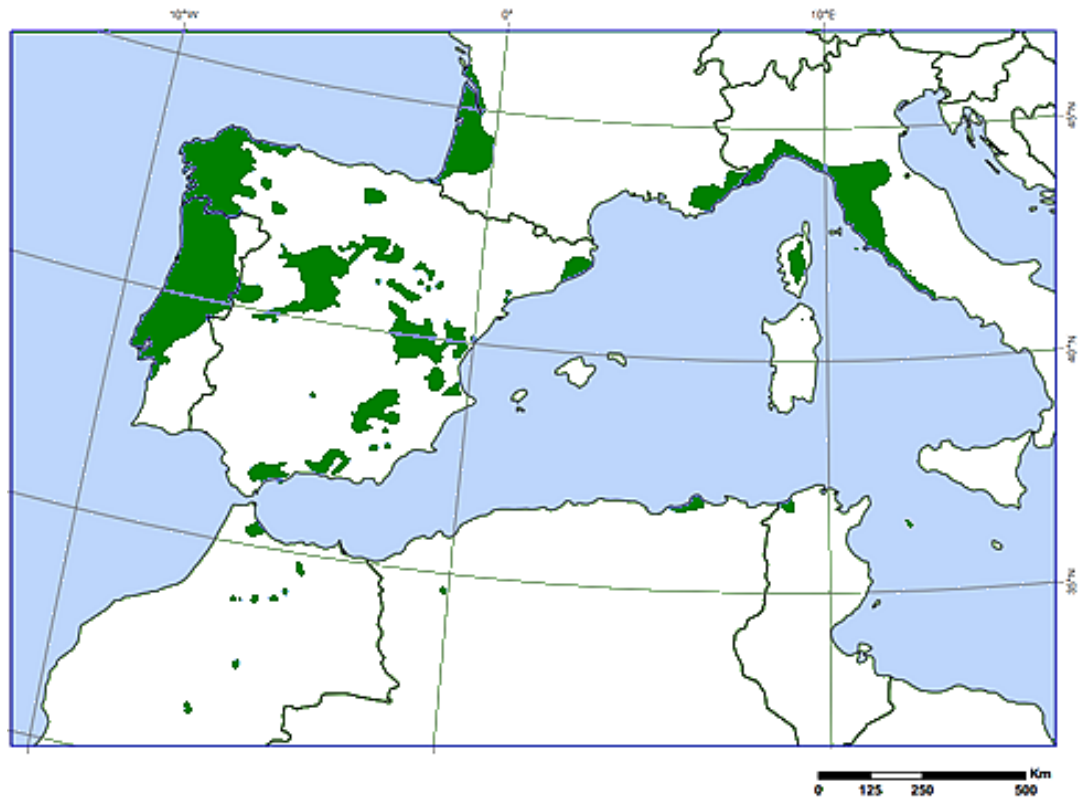


Figure 6. Aire de distribution naturelle du pin maritime (*Pinus pinaster*). (D'après EUFORGEN 2009, www.euforgen.org).

I.IV Le pin maritime: une forte variabilité génétique, un atout face au CC

I.IV.I Aire de distribution et intérêt économique

Le Pin maritime (*Pinus pinaster* Aiton) est une plante supérieure de type Cormophytes (Trachéophytes), Embranchement des Spermaphytes (Phanérogames) et Sous- Embranchement des Gymnospermes. Il appartient à l'ordre des Coniférales (Conifères), la Famille des Pinacées (ou Abietaceae), Genre *Pinus* et sous-genre *Pinus*. En 200 millions d'années, le genre *Pinus* a colonisé l'ensemble de l'hémisphère Nord, en se différenciant en une centaine d'espèces adaptées à des niches écologiques très diverses (Richardson, 1998). Le pin maritime a une aire de distribution naturelle très fragmentée qui s'étend du Nord-Ouest de la France à la Tunisie en passant par l'Espagne, le Portugal, le Maroc, la Corse et l'Italie, tout autour du bassin méditerranéen occidental (Figure 6). Cette aire naturelle de répartition couvre des conditions climatiques très variables, de 100 mm de précipitation à Oria (en Espagne) jusqu'à plus de 1000 mm à Tova (en Corse), et des environnements pédologiques allant du sable aux sols rocheux. Paquereau (1964) a montré que le Pin maritime était déjà présent dans son aire actuelle depuis le Subatlantique (1400 ans BP). Cette espèce a aussi été introduite avec succès dans d'autres parties du monde : au Chili (100 000 ha), en Australie (500 000 ha), en Afrique du Sud (40 000 ha), en Grèce (10 000 ha), en Nouvelle-Zélande (3000 ha) et en Argentine. Ces introductions témoignent à la fois de l'intérêt économique de l'espèce mais aussi de sa capacité d'adaptation à des environnements variés.

En France, le pin maritime s'étend sur une surface de 1 million d'hectares (7% de la surface forestière), dont 0.8 million d'hectares dans le massif des Landes de Gascogne, l'une des plus grandes forêts cultivées d'Europe. Bien que les tempêtes Martin de 1999 et Klaus de 2009 aient diminué de moitié le stock de bois sur pied (la récolte annuelle passant de 8.9 en 2007 à 6.8 millions de m³ en 2012), le massif des Landes de Gascogne assure encore près de 20% de la production nationale de bois (mémento FCBA 2014). Le Pin maritime est un résineux peu exigeant en termes de nutrition minérale, capable de s'adapter aux sols pauvres. C'est une espèce pérenne d'une longévité moyenne de 200 ans dont les arbres adultes peuvent atteindre 35 m de haut. La forme des houppiers de pin maritime est conique et s'étaie lorsque l'arbre vieillit. Le pin maritime possède des aiguilles appariées, épaisses et rigides d'une couleur vert foncé et des bourgeons ovoïdes allongés, non résineux à écailles frangées. Ses cônes ovoïdes ou coniques, de 10 à 20 cm de long, sont plus ou moins sérotineux et persistants.

Depuis les années 50, la sylviculture préconisée dans le massif landais inclut un travail mécanique du sol, une fertilisation phosphatée à la plantation (appliqué sur moins de la moitié des

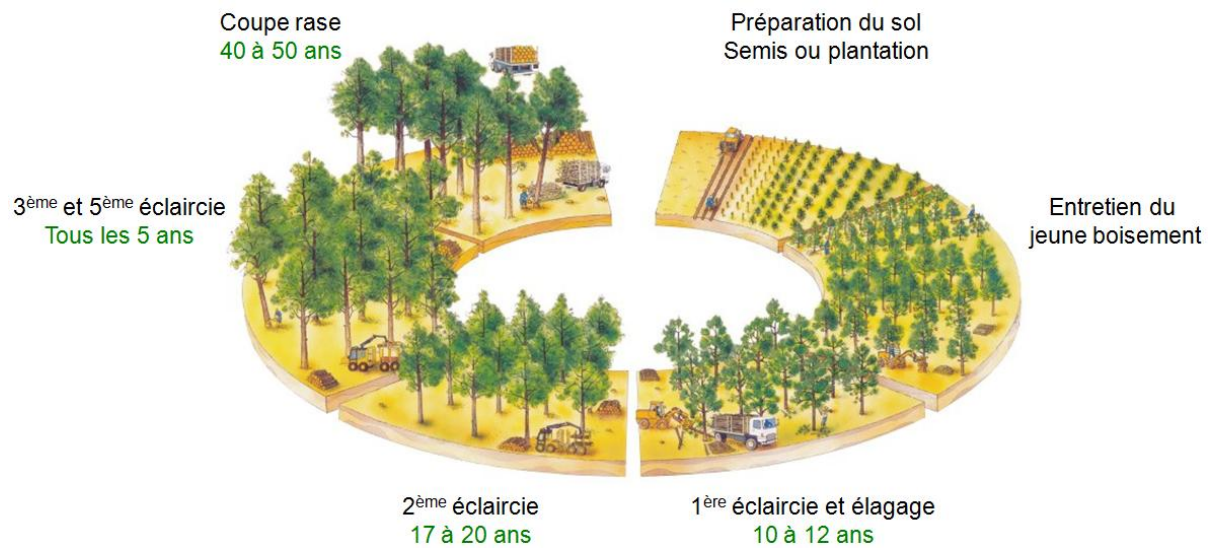


Figure 7. Schéma classique de culture du pin maritime (site Internet de la DDAF Landes).

surfaces), le débroussaillage mécanique voire chimique de la strate herbacée dans un itinéraire sylvicole comprenant quatre éclaircies et une coupe rase (Lesgourgues *et al.* 1997). Une révolution de pin maritime représente 40 à 55 ans (Figure 7). La principale contrainte pour l'espèce dans les Landes de Gascogne vient des caractéristiques du sol. Il s'agit d'un podzol constitué de dépôts sableux d'origine éolienne du Quaternaire datant du Pléistocène et de l'Holocène. Il possède une texture grossière pauvre en ressources minérales assimilables, une faible réserve utile en eau, et une nappe phréatique superficielle affleurant en hiver (hydromorphie). Son pH varie entre 3,5 et 5,5, avec une moyenne autour de 4.5 (Guinaudeau *et al.* 1963; Trichet), ce qui le classe dans la catégorie des sols très acides (Duchaufour 1995). Il possède également une contrainte supplémentaire qui se matérialise sous la forme d'une accumulation compacte de sesquioxydes métalliques formant un horizon induré à forte concentration en aluminium et fer, constituant ainsi un obstacle chimique et physique à la pénétration racinaire. Cet horizon, appelé localement alios, se situe à une profondeur variable de 0,2 à 1 m (Righi 1977). La faible épaisseur de sol prospecté par les racines est un facteur limitant la réserve en eau du sol disponible et aggrave le déficit hydrique du sol pendant la période estivale (Choisnel 1985).

I.IV.II Ennemis naturels – Pathologie

Les ennemis naturels du Pin maritime sont nombreux du fait de son implantation géographique ancienne. Les dégâts les plus importants (75% des signalements au Département Santé des Forêts) sont causés par 10 ravageurs ou pathogènes : Armillaire (*Armillaria ostoyae*), sténographe (*Ips sexdentatus*), chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*), Fomès (*Heterobasidion annosum*), pissode (*Pissodes castaneus*), rouille courbeuse (*Melampsora pinitorqua*), érodé (*Orthotomicus erosus*), hylésine (*Tomicus piniperda*), pyrale du tronc (*Dioryctria sylvestrella*) et hylobe (*Hylobius abietis*). En plus de ce cortège parasitaire naturel du pin maritime, il faut ajouter la punaise *Leptoglossus occidentalis* (introduit), et les menaces d'introduction que représentent le *Fusarium* (*Fusarium circinatum*) et le nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*).

I.IV.III Croissance intra-annuelle

Les premiers suivis de croissance annuelle sur des arbres ont été réalisés grâce à des observations histologiques de prélèvement de bois à différentes dates (Demounem, 1979). Les diamètres et rayons des arbres étaient aussi mesurés à intervalles réguliers avec des pieds à coulisse ou des microdendromètres à ruban. Les microdendromètres électroniques ont par la suite permis de suivre la dynamique radiale en continu. Ces études ont montré que le fonctionnement du cambium n'était pas uniforme pendant la saison de végétation. Il existe de nombreuses observations de

succession d'arrêt/reprise de périodes d'activité plus ou moins intenses. Ces périodes sont notamment liées à d'autres phénomènes de croissance réalisés en parallèle (tels que l'allongement de la pousse et des aiguilles) mais aussi aux variations climatiques. Une contrainte hydrique durant la première partie de la période végétative fait notamment apparaître un ralentissement du fonctionnement cambial (faux cerne de printemps). L'eau du sol de manière générale influence à la fois l'intensité de la production ligneuse (largeur de cerne) et la qualité du bois formé (proportion de bois initial/final). Dans le massif landais la période de croissance radiale du pin maritime s'étend en moyenne de fin mars à fin octobre (Demounem *et al.* 1970) avec des cycles d'activité entrecoupés de phases de repos dont le nombre varie selon les années et les conditions climatiques (Broquedis *et al.* 1976 ; David 1974 ; Destremau *et al.* 1976 ; Lemoine 1975 ; 1979).

Les dispositifs électroniques d'enregistrement permettent aujourd'hui de suivre la croissance tout au long de l'année à l'aide de capteurs fixés sur les arbres (Bouriaud *et al.* 2005). Cette technique offre également l'avantage de pouvoir être utilisée sur plusieurs années successives sans altérer les tissus comme dans le cas de prélèvements histologiques. Elle permet d'observer les variations intra-annuelles du cycle de croissance radiale et de les mettre en lien avec les variables climatiques. L'influence du macroclimat sur la croissance peut être étudiée sur une grande échelle spatiale de façon synchrone sur tous les arbres et donne ainsi la possibilité d'identifier des années caractéristiques (Fritts, 1976). Les études dendroclimatologiques s'appuient sur ce principe pour reconstituer des séries climatiques passées en utilisant l'information des séries de cernes.

I.IV.IV Diversité génétique du pin maritime et changement climatique

Les connaissances actuelles sur la variabilité génétique du pin maritime reposent sur l'étude de caractères morphologiques tels que la hauteur, le diamètre ou la rectitude ainsi que des caractères adaptatifs comme le débourrement ou la tolérance au stress hydrique. Des mesures en plantations comparatives de provenances, couplées à différents marqueurs moléculaires permettent d'apprécier cette variabilité, du gène au phénotype.

D'une manière générale, tous les auteurs qui ont étudié des populations de pin maritime (Bouvarel, 1960 ; Hopkins, 1960 ; Sweet et Thulin, 1962 ; Illy, 1966 ; Resch, 1974 ; Kremer et Roussel, 1986 ; Baradat et Marpeau-Bezard, 1988 ; Petit, 1988 ; Bahrman et al, 1992) décrivent une variabilité génétique importante. A l'échelle de l'aire naturelle, très morcelée, une forte différenciation entre populations a été mise en évidence (Debazac 1964, Harfouche *et al.* 1995). Les populations françaises se rattachent soit au groupe atlantique (Aquitaine, Bretagne), soit au groupe méditerranéen (sud-est, Corse) sur la base de marqueurs moléculaires (ADN mitochondrial et chloroplastique, microsatellites et AFLPs nucléaires, ainsi que terpènes et isozymes) (Raffin 2005).

Il existe également une variabilité génétique intra-zone géographique. Le littoral aquitain présente une plus grande diversité génétique mais une moindre différenciation entre peuplements comparé à la Corse (Harfouche 1995, Mariette *et al.* 2001). Au plan phénotypique et adaptatif, on distingue en tests comparatifs : (i) la provenance landaise avec une bonne plasticité, une forte croissance, tolérante au froid et de forme médiocre (sinuosité du tronc); (ii) les provenances de Corse, avec une croissance moyenne et une excellente rectitude du tronc. De plus, un gradient longitudinal est observé pour la résistance à *Matsucoccus feytaudi*, les provenances de l'ouest étant tolérantes à cet insecte, tandis que celles de l'est sont sensibles (sud-est de la France, Corse et Italie). La provenance marocaine de Tamjout est complètement résistante à cette cochenille (Harfouche 1995).

Le changement climatique pourrait constituer une menace nouvelle sur la diversité génétique du pin maritime. La combinaison de plusieurs facteurs : l'aggravation des sécheresses estivales en zone méditerranéenne et dans le sud-ouest de la France, la pression de certains pathogènes ou ravageurs (processionnaire du pin favorisée par les hivers doux, scolytes se multipliant sur les arbres déjà affaiblis), et l'augmentation du risque incendie (aujourd'hui bien géré dans le sud ouest), sur des échelles de temps très courtes (quelques décennies) pourraient faire peser un risque accru sur des peuplements occupant le plus souvent des stations déjà difficiles. L'utilisation des connaissances sur la variabilité génétique présente au sein de l'aire de distribution du pin maritime permet cependant la sélection de provenances (combinées dans des hybrides interprovenances) adaptées aux attentes actuelles de la filière et à l'évolution du climat.

I.IV.V Amélioration génétique du pin maritime

Pour répondre à l'accroissement des besoins en bois de l'industrie, les forêts cultivées sont gérées de manière à optimiser la production de biomasse. Le programme d'amélioration du pin maritime suit cette logique et cherche à augmenter la productivité par unité de temps en réduisant les cycles d'exploitation de 50-60 ans à 35-40 ans.

Le programme d'amélioration du pin maritime en est à sa troisième génération, ce qui en fait un des programmes les plus avancés au monde pour un résineux. La première variété issue des vergers à graines (VF1 des vergers de Saint-Sardos, Sore, Cabanac, Lavercantière) ont permis d'atteindre un gain génétique de 15 % en volume et rectitude. Le gain génétique espéré pour la seconde variété (VF2 des vergers de Mimizan, Hourtin, Saint Augustin, Vaquey) est de 30 % en volume et rectitude. Le gain génétique attendu sur le volume est de 40 à 45% pour les prochaines variétés VF3 en cours de multiplication (en référence aux témoins non améliorés) (Rapport interne du Groupe d'Intérêt Scientifique «Groupe pin maritime du futur »).

La sélection s'intéresse à la productivité mais aussi à la qualité du produit, notamment via la rectitude du fût. La flexuosité entraîne une hétérogénéité du bois et des produits dérivés, due à la présence de bois de compression qui dévalue l'utilisation de la bille de pied en bois d'œuvre (rendement au sciage), et provoque une diminution des qualités physiques du matériau et une baisse de rendement en pâte. Le gain génétique est aujourd'hui de 30% sur la rectitude et devrait passer à 35% pour les prochaines variétés, et au-delà de 40% pour la variété d'hybrides « Landes x Corse », toujours en référence aux témoins non améliorés (document rédigé par le groupe « Pin maritime du futur »).

Un gain génétique peut aussi être obtenu en exploitant la diversité génétique des provenances de l'aire de répartition du pin maritime. Il existe en effet des génotypes associés à une croissance plus rapide qui peuvent être sélectionnés pour réaliser des croisements. La provenance corse est particulièrement intéressante pour la qualité de la branchaison et la rectitude du tronc et peut être croisée avec la provenance landaise plus sinueuse par exemple. Les provenances les plus performantes en croissance sont également associées à une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau (N'Guyen-Queyrens *et al.* 1998). La provenance marocaine a montré une croissance variable selon les sites étudiés et pousse en moyenne très lentement en hauteur (Alia *et al.* 1995 ; Harfouche et Kremer, 2000). Les provenances ibériques montrent une résistance à la salinité du milieu (Na^+) moins bonne que la provenance landaise, ce qui se traduit par une croissance radiale plus faible lors des années de stress climatique. La comparaison de l'héritabilité de la croissance radiale et en hauteur a montré que les accroissements en diamètre ont une héritabilité plus stable au cours du temps que les accroissements annuels en hauteur (Costa et Durel 1996). Aussi, la croissance en diamètre est centrale dans les indices de sélection.

I.V Enjeux pour le futur: appréhender la plasticité phénotypique

Les plantes peuvent répondre aux changements de leur environnement sur plusieurs générations par la sélection de caractères favorables (effet de la sélection naturelle), mais lorsque la variation de l'environnement se produit sur une échelle de temps plus courte que la durée de vie de la plante, la survie sera déterminée par sa plasticité phénotypique (Bradshaw 1965). Un phénotype (P) varie d'une part en fonction de la valeur génétique des individus (G) (sous le contrôle d'un certain nombre de gènes), d'autre part sous l'influence de l'environnement (E) et enfin selon l'interaction entre ces deux facteurs. On peut donc modéliser un phénotype selon l'équation suivante :

$$P = G + E + G \times E$$

Quand un phénotype (trait) est observé pour deux génotypes et deux environnements, le trait peut être constant quelles que soient les conditions ou peut être affecté de différentes manières (Figure 8). Tout d'abord, le phénotype peut varier selon le génotype, sans influence des variations environnementales (Figure 8D). L'expression du trait peut être affectée par un type d'environnement mais de manière identique entre génotype (Figure 8E). Le trait peut aussi varier en fonction d'un effet cumulé du génotype et de l'environnement (Figure 8F). Enfin, l'environnement peut aussi influencer sur le phénotype de manière complexe, qui ne fait pas que s'ajouter à l'effet du génotype. Cette capacité d'un génotype donné à prendre plusieurs valeurs phénotypiques pour un trait donné en fonction des conditions environnementales est appelée plasticité phénotypique (Bradshaw 1965; Bradshaw 2006). Ce type d'interaction peut s'exprimer chez deux génotypes pour un environnement donné (Figure 8A). De même un environnement peut avoir un effet opposé selon les génotypes (Figure 8B).

Parce que les plantes sont des organismes sessiles, la plasticité est un processus adaptatif majeur dans un grand nombre de situations. Les mécanismes impliqués dans la plasticité sont variés. D'une part, le phénotype peut représenter une plage continue de modification dépendante de l'intensité du stimulus de l'environnement. D'autre part, le caractère peut ne présenter qu'une modification discrète (deux états phénotypiques). Le stimulus provoquant ces modifications peut être direct ou indirect et les mécanismes entraînant des modifications dépendent des caractéristiques propres à l'environnement considéré (Bradshaw 1965; Callahan et al, 1997). La variabilité de la plasticité phénotypique pour un trait peut elle même être sous contrôle génétique (Pigliucci 1996; DeWitt et al 1998; Schlichting et Smith, 2002; de Jong 2005) lorsque l'interaction génotype x environnement est significative.

Interaction génotype x environnement

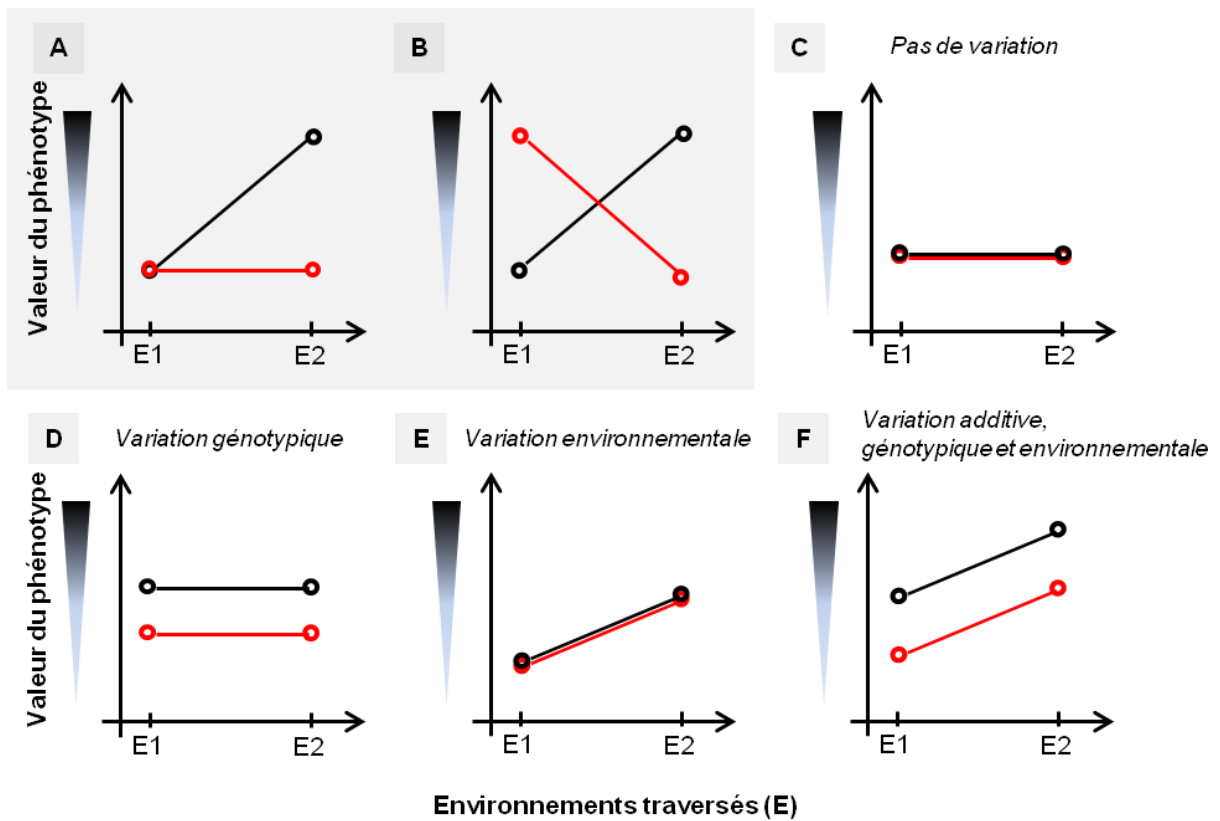


Figure 8. Types de variation phénotypique en fonction des génotypes et des environnements traversés. Un phénotype peut varier selon le génotype ou l'environnement et parfois une interaction complexe entre les deux facteurs des changements inattendus du phénotype. **A** et **B** Exemples d'interactions génotype x environnement (GxE). Deux génotypes indiqués par des lignes et des points rouge et noir, montrent que les phénotypes diffèrent quand ils traversent des environnements différents. Les cas suivants sont présentés, de **C** à **F** : **(C)** absence de variation, **(D)** variation génotypique seule, **(E)** variation environnementale seule et **(F)** variation génétique et environnementale cummulées, sans interaction. (D'après Grishkevich et Yanai 2013).

La génétique quantitative s'appuie sur ce principe pour estimer la part relative des facteurs génétiques ou environnementaux sur le déterminisme d'un caractère quantitatif. Sur le plan sélectif (au sein des programmes d'amélioration) l'estimation du contrôle génétique des caractères à travers l'estimation de paramètres tels que l'héritabilité, du moins de sa composante additive, est centrale puisqu'elle détermine la part de variance qui pourra être transmise à la génération suivante. Les nouvelles techniques de génotypage et de séquençage contribuent à caractériser les mécanismes génétiques mis en jeu dans la variation phénotypique. On peut ainsi associer les données phénotypiques aux données génotypiques en population afin d'identifier des zones génomiques associées à la variation d'un caractère (Quantitative Trait Loci, QTL). Le nombre, la position et l'effet des QTL, peuvent être quantifiés et projetés sur une carte génétique, quand la structure de population le permet.

L'intérêt actuel dans l'étude de la plasticité phénotypique réside dans la nécessité de prédire les réponses des populations au changement climatique (Potvin et Tousignant 1996; Rehfeldt *et al.* 2001). Dans le cas des forêts plantées issues de variétés améliorées, une meilleure compréhension de la plasticité phénotypique et de son contrôle génétique permettrait d'identifier des traits plus héréditaires, en isolant la part de variation due aux interactions génotype x environnement. Une meilleure compréhension de la plasticité phénotypique permettrait ainsi d'augmenter les gains génétiques par la sélection.

II Objectif de la thèse

De nombreuses études ont été menées sur le déterminisme génétique et environnemental de différents caractères quantitatifs chez les arbres forestiers (cf. Cornelius 1994 pour une synthèse) notamment grâce à la mise en place de tests de descendances et de provenances. C'est le cas de la phénologie du débourrement (Adams *et al.* 1993 pour le Douglas ; Celton *et al.* 2011 pour le pommier ; Frewen *et al.* 2000 pour le peuplier ; Vitasse *et al.* 2009 pour le chêne), de la croissance primaire et secondaire (Conkle 1973 pin *ponderosa*, Mátyás 1994 , 1996; O'Neill *et al.* 2007, 2008 plusieurs espèces; Rehfeldt 1999 chez *Pinus contorta*, Thomson and Parker 2008, Thomson *et al.* 2009 chez le pin gris, Ukrainetz *et al.* 2011 pour l'épicéa), et des propriétés du bois (Montes 2009 pour *Prosopis africana*, Pot *et al.* 2002 et Lepoittevin *et al.* 2012 pour le pin maritime, Rozenberg et Cahalan 1997 pour *Picea abies*; Worral 1975 pour le sapin *Douglas*). Ces études nous apprennent que la part de variance génétique est plutôt faible (de 20 à 30% de la variabilité phénotypique totale) pour les traits de croissance utilisés classiquement en sélection (hauteur totale, diamètre), modérée pour les propriétés du bois (20-40%) et plutôt élevée pour le débourrement (50-80%).

La prédiction du phénotype en fonction du génotype est une question centrale en biologie et surtout en génétique quantitative pour des applications en sélection végétale et animale. Les avancées en termes de génotypage haut-débit ont permis de caractériser la variabilité structurale des génomes, et ont ainsi facilité le développement de méthodes de prédiction génomique des valeurs génétiques (revue par Isik 2014, pour les arbres). En parallèle de ces méthodes de prédiction statistique, il est nécessaire de poursuivre des recherches à la fois sur la fonction des gènes majeurs et les réseaux de gènes impliqués dans le contrôle génétique des caractères d'intérêt (via des approches de génétique directe ou reverse et de génomique fonctionnelle), ainsi que sur le fonctionnement physiologique des organismes qui met en relation de façon intégrée des phénotypes (observés de la cellule à l'organisme) et des environnements dans lesquels ils sont amenés à se développer. Les chercheurs de l'équipe Ecologie et Génomique Fonctionnelle (au sein de laquelle cette thèse a été réalisée) mènent des travaux sur ces deux axes de recherche, car les connaissances sur les processus moléculaires et physiologiques devraient permettre à terme d'améliorer les modèles de prédiction.

Les travaux qui sont présentés dans ce manuscrit relèvent du second axe. Le fil directeur consiste à étudier de la façon la plus précise possible la dynamique de croissance au stade jeune dans des environnements variables pour analyser la plasticité des traits et révéler son contrôle génétique à travers l'analyse des interactions Génotype x Environnement (GxE). Pour ce faire nous avons adopté une approche multi-échelles de l'environnement (annuelle à sub-horaire) qui permet de définir des périodes contrastées et ainsi d'étudier la dynamique de croissance dans un environnement changeant. L'échelle "annuelle" est utilisée pour étudier l'interaction G x E pour le débourrement et les accroissements en diamètre et en hauteur (chapitre IV). L'échelle mensuelle est prise en compte pour analyser l'interaction G

x E sur l'accumulation de biomasse, à travers l'étude de la plasticité de la densité du bois formé au printemps et en été (chapitre V). Enfin, l'étude fine du fonctionnement hydrique (caractérisé par les micro-variations radiales du tronc) nous a amené à considérer des mesures à l'échelle du nyctémère et donc à caractériser l'environnement à l'échelle horaire (chapitre VI). La variabilité génétique présente entre pleins frères F1 et F2 issus de croisement biparentaux et d'autofécondation apporte la dimension génétique à l'étude des interactions G x E, notamment au travers l'analyse de l'interaction QTL x E qui a nécessité la construction de cartes génétiques.

Nous apportons donc des éléments de compréhension tant au niveau de la variabilité phénotypique des traits de croissance au jeune âge, que de leur architecture génétique dans des environnements contrastés vis-à-vis de la disponibilité en eau. Dans le cadre du changement climatique, la connaissance du contrôle génétique de la plasticité phénotypique ouvre des perspectives pour la gestion durable des forêts et notamment pour la sélection de génotypes/variétés capables de maintenir leur niveau de production.

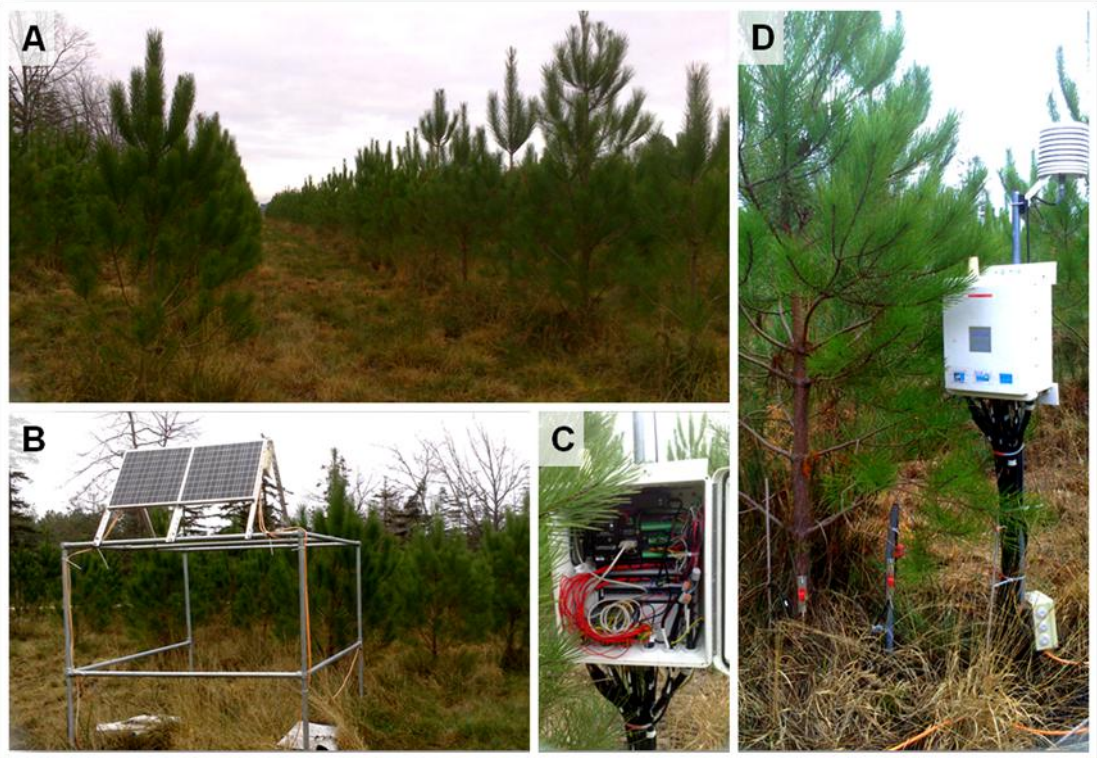


Figure 1. Photographies de la plantation de Cestas-Pierroton prises en 2012 (population de cartographie F1, arbres de 5 ans). **A.** organisation des rangs. **B.** Panneaux solaires qui alimentent le système de mesures des microdendromètres (ici, 2 panneaux sur les 4 présents au total). **C.** Intérieur d'une centrale d'acquisition des données de microvariation radiale. **D.** (de gauche à droite) Position d'un capteur sur un arbre suivi, capteurs témoins sur support inerte, extérieur d'une centrale d'acquisition des données de microvariation radiale.

III Matériels et méthodes

Ce chapitre est consacré à la description des différents caractères observés/mesurés (phénotypes) dans les dispositifs suivis et des méthodes d'analyses mises en œuvre pour les exploiter. Chaque phénotype faisant l'objet d'un chapitre de résultats dédié, ce chapitre est une introduction générale aux matériels et méthodes spécifiques, développés dans chacun des chapitres suivants. Deux sites expérimentaux ont contribué à l'étude de la variabilité phénotypique de la croissance du pin maritime en fonction des conditions environnementales, par l'observation de caractères complémentaires.

III.I Populations étudiées et caractéristiques des sites expérimentaux

L'étude de la croissance du pin maritime a été réalisée à partir de 4 descendance de pin maritime. Les paragraphes suivants donnent les caractéristiques de ces croisements.

III.I.I Trois familles de pleins-frères (F1) de pins maritimes (Site de Cestas-Pierroton)

Ce dispositif situé sur le domaine expérimental de l'INRA de Cestas-Pierroton a permis de suivre la croissance radiale en continu, de même que la dynamique de débourrement de jeunes pins. Ce dispositif a été mis en place dans le cadre du projet FEDER Abiogen (N° 32973), qui porte sur l'analyse de l'architecture génétique de la dynamique de croissance du Pin maritime (Bordeaux) et de l'Eucalyptus (Pointe-Noire, Congo). Chaque dispositif permet le suivi en continu des micro-variations du rayon sur 240 arbres grâce à des micro-dendromètres, de même qu'un suivi en parallèle de variables environnementales comme la température ou l'humidité de l'air et du sol. Si ce type de suivi dynamique n'est pas nouveau chez les arbres (Impens *et al.* 1965, Garnier *et al.* 1986, Downes *et al.* 1999, Simonneau *et al.* 1993), sa mise en place à grande échelle (240 individus suivis par dispositif) n'avait jamais été réalisée auparavant.

Le projet Abiogen a fait l'objet de deux thèses : la présente sur pin maritime et une autre sur l'Eucalyptus soutenue en 2014 par Jérôme Bartholomé (Bartholomé 2014). Le détail de la mise en place de l'essai pin maritime et de l'optimisation technique associée est disponible dans la thèse de J Bartholomé ; il ne sera donc pas repris ici. Le dispositif « pin maritime » est situé sur le domaine de l'unité expérimentale de l'INRA de Pierroton, sur la commune de Cestas (44° 44.156', 0° 46.447'). Les graines ont été semées puis élevées en pépinière en mai 2007 avant plantation (fin 2007).

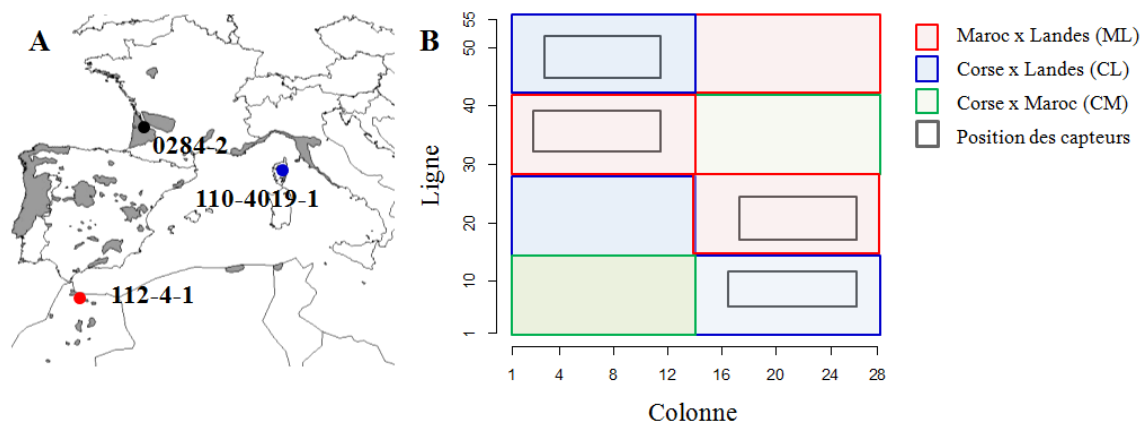


Figure 2. A. origine géographique des arbres utilisés comme parents dans les croisements de pleins-frères. L'aire de distribution naturelle du Pin maritime est représentée en gris (selon Burban *et al.* 2004). B. Représentation schématique du plan d'expérience (ligne, colonne). La position des placettes équipées de capteurs est représentée en noir.

Tableau 1. A. Caractéristiques des parents choisis pour les croisements. **B.** Description des croisements réalisés.

A

Code clone	Provenance	Mère	Père	Critère
0284-2	Landes	arbre "+" 0284, domaine de Marcheprime	inconnu, en forêt	Choisi pour sa bonne croissance
110-4019-1	Corse	arbre 19 de la Restonica, récolte INRA février 1971, descendance testée au Bray (33) en 1971	inconnu, en forêt	Choisi pour sa bonne rectitude
112-4-1	Maroc	Provenance Jbel Berkane bulk récolte INRA 1972, descendance testée à l'Hermitage (33) en 1972	inconnu, en forêt	Choisi au hasard dans une provenance choisie pour sa faible croissance

B

Croisement (cross)	Mère	Père	Effectif (arbres vivants en 2014)
Corse x Landes, CL	110-4019-1	0284-2	588
Maroc x Landes, ML	112-4-1	0284-2	588
Corse x Maroc, CM	110-4019-1	112-4-1	364

Il comprend 1541 pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) d'âge identique (c'est-à-dire de 5 à 7 ans sur la période 2011-2013) organisés en 28 rangs parallèles de 55 pins chacun (Figure 1). La densité de plantation est de 1250 arbres par hectare (4x2m). Le couvert était toujours ouvert à la fin de l'expérience donc la compétition entre arbre pour la ressource lumineuse a été considérée comme négligeable. L'essai est composé de pleins frères de pin maritime issus de croisements contrôlés de trois génotypes parentaux d'origine géographique différente (Figure 2A) : Corse (C, accession 10_4019_1, Gorges de la Restonica, 42.261303, 9.088933, 1710 m d'altitude), Landes (0284_2, 44.6915, -0.8541) et Maroc (112_4_1, Jbel Berkane, rift occidental, 34.44, 03.47, 1770 m d'altitude).

Ces trois écotypes ont été choisis pour leurs caractéristiques intrinsèques principales (Tableau 1A). La provenance landaise présente un fort taux de croissance en hauteur, l'écotype Corse offre une bonne rectitude du fût et le marocain une bonne résistance à la sécheresse (Debazac 1964, Harfouche *et al.* 2003). Les individus de chaque croisement ont été répartis de manière aléatoire au sein de placeaux de 196 et 182 plants, eux-mêmes organisés en "carré latin" dans une parcelle d'un hectare environ. L'essai est divisé en 8 blocs : 3 blocs correspondent au croisement Corse x Landes (CL, 588 individus), 3 autres correspondent au croisement Maroc x Landes (ML, 588 individus) et les 2 derniers au croisement Corse x Maroc (CM, 364 individus) (Figure 2B et Tableau 1A et B). Les écotypes Corse, Landes et Maroc sont caractérisés respectivement par une évapotranspiration potentielle annuelle de 790, 955 et 1,055 mm, une somme de précipitations annuelle de 817, 800 et 348 mm et une température annuelle moyenne de 15, 16 et 17 °C.

III.I.II Une famille F2 (Site de Lacanau de Mios)

Le dispositif situé à Lacanau de Mios (Gironde, France, Figure 3) a permis quant à lui d'étudier la dynamique saisonnière de la formation du bois grâce à des profils microdensitométriques. Il est situé sur une parcelle de landes humide. Les graines autofécondées (F2) proviennent d'un seul arbre hybride (H12), issu du croisement contrôlé d'un génotype landais (accession L146, d'Arengosse, utilisé comme mère) et d'un génotype corse (accession C10, de Corte, utilisé comme père). La densité de plantation de l'essai est de 1250 arbres par hectare (4 x 2 m). Il comporte 477 individus plantés en 1998 et élevés en pépinière pendant un an avant d'être transférés en plein champ. Les arbres étaient âgés de 7 à 13 ans pendant la période considérée pour les mesures phénotypiques retrospectives (2004-2010).



Figure 3. Photographies de la plantation de pin maritime de Lacanau de Mios prise en 2011 (population de cartographie F2, arbre de 14 ans). **A.** organisation des rangs. **B.** Exemple de phénotypes contrastés pour la rectitude (arbres sinueux et droit côte à côte).

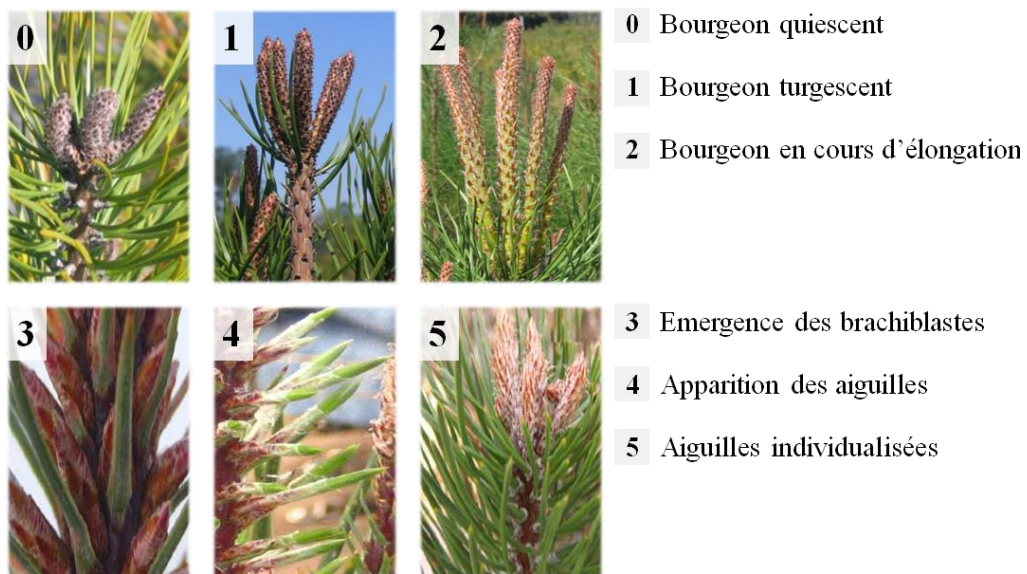


Figure 4. Description des stades phénologiques de débourrement du bourgeon apical de pin maritime.

Les stations météo (Météo-France) les plus proches de ces provenances ont été utilisées pour décrire le climat d'origine des parents de l'hybride H12 : Sabres pour la provenance landais et Corte pour la provenance Corse. D'après les données de 1995 à 2010, le site de Sabre est soumis à une somme de précipitation annuelle supérieure à celle de Corte (1108 mm contre 818 mm) ; à l'opposé l'évapotranspiration potentielle mensuelle moyenne (ETP) est significativement supérieure à Corte (80 mm contre 68 mm à Sabres), en particulier pendant la période de croissance (Mai à Août).

III.II Caractères étudiés

III.II.I Croissance annuelle : familles F1

Des mesures de la croissance des arbres (hauteur, diamètre) ont été réalisées chaque année depuis 2009 dans la période hivernale (décembre, quand la croissance est fortement ralentie) par les techniciens de l'unité expérimentale et moi-même. Elles permettent de faire un point sur la croissance de l'arbre à la fin de chaque saison de végétation. Le diamètre des individus a été mesuré à 20 cm au dessus du sol avec un pied à coulisse à la fin des saisons de végétation 2010 et 2011 (Décembre) puis avec un mètre ruban en décembre 2012 et 2013. La mesure de la hauteur totale des individus a été réalisée aux mêmes dates à l'aide de perches graduées (précision ~1cm). Ces mesures ont été utilisées pour calculer les accroissements annuels 2011, 2012 et 2013 (accroissement en diamètre et en hauteur).

III.II.II Cinétique de débourrement : familles F1

Plusieurs séries de mesures ont été réalisées, pour la première fois au sein de l'unité, afin de suivre l'initiation du cycle de croissance primaire des arbres du dispositif de Cestas-Pierroton depuis 2011. Les mesures de 2012 et 2013 ont été à la base de deux stages, (Sébastien Mane, Master 1 et Hervé Rabillé, Licence 3) que j'ai encadrés. L'aide de l'UE de Pierroton a également été déterminante.

Le stade de développement phénologique global des arbres (sur l'ensemble des bourgeons du houppier) a été noté deux fois par semaine, de l'initiation du cycle de croissance (mars) à la formation des aiguilles matures (juin) sur les 3 croisements F1 décrits précédemment. Cette notation a été effectuée en 2011 sur les 250 arbres suivis pour la croissance radiale, puis en 2012 et 2013 sur l'ensemble des arbres du dispositif (1512 arbres). Cette notation permet d'apprécier la dynamique temporelle de débourrement du bourgeon apical. Les étapes de débourrement sont classées en cinq stades (Figure 4). La phase à laquelle se trouve le bourgeon est estimée visuellement par le notateur,

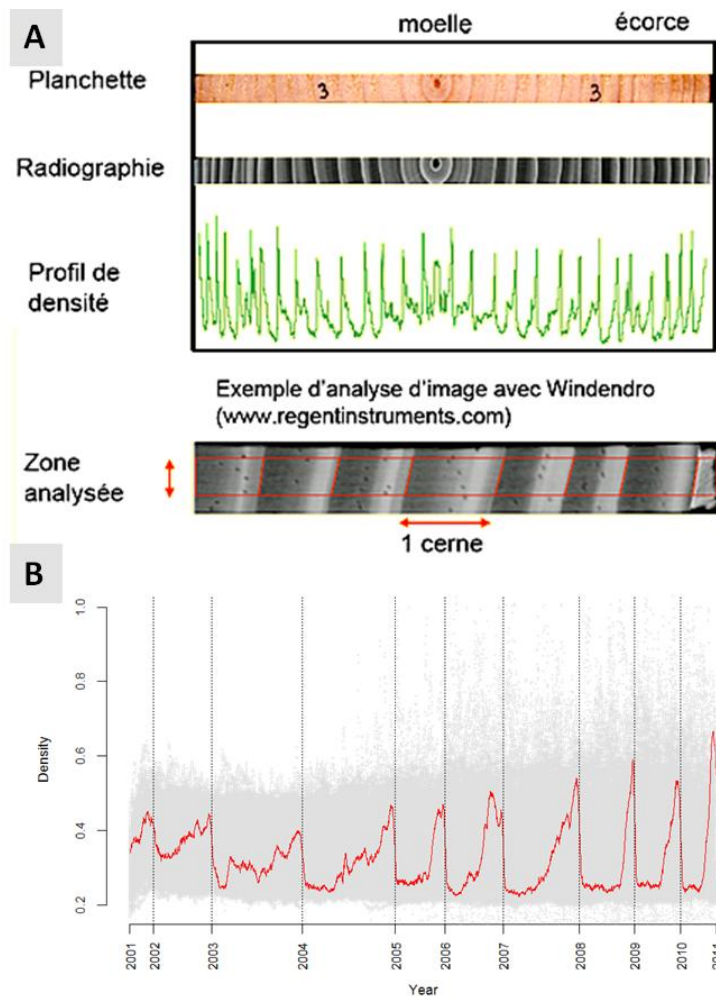


Figure 5. A. Planchette de bois, image radiographique et profil de densité obtenu pour un individu donné (d'après un poster de Didier Bert, 2008). **B.** Données densitométriques de la population F2 (points gris clair) et exemple de profil individuel pour l'arbre numéro 20 (courbe rouge) au cours de 10 années consécutifs (2001 à 2011).

Tableau 2. Variables extraites des profils de densité du bois des géotypes F2 et utilisés en analyse QTL.

Variable disponible pour chaque cerne	Définition	Unité
L	Largeur de cerne	mm
mBI	Densité moyenne du bois initial	kg.m-3
mBF	Densité moyenne du bois final	kg.m-3
pBF	Pourcentage de bois final	%

en se basant sur des critères morphologiques caractéristiques de chaque stade. La phase 0 correspond au bourgeon en dormance. La phase 1 correspond à la levée de dormance : le bourgeon se réhydrate et gonfle. En phase 2, le bourgeon est complètement allongé et sa base est devenue chlorophyllienne (de couleur verte) ; ce stade traduit la reprise de l'histogénèse. En phase 3, les brachyblastes (rameaux très courts qui porteront chacun une paire d'aiguilles à la fin de leur développement) commencent à émerger et à s'individualiser. Ils comportent, encore enfermées dans une membrane appelée pellucide, les ébauches des 2 aiguilles qui vont bientôt commencer à croître. À la phase 4, les jeunes aiguilles émergent hors du pellucide et commencent à s'allonger. La phase 5 n'est atteinte que lorsque les aiguilles ont atteint leur longueur définitive. En pratique, il est difficile de repérer la fin de l'élongation des aiguilles, et le stade 5 n'est donc pas pris en compte dans notre étude. À chaque date de mesure, le notateur attribue un stade global à chaque arbre, en considérant la moyenne des stades atteints par l'ensemble de ses bourgeons. Ainsi, tout au long de la campagne de mesure, un stade allant de 0 à 4 est attribué à chacun des 1512 arbres du test pour chaque jour de mesure. La date d'entrée dans chaque stade a ensuite été extraite pour chaque arbre, de même que la durée du cycle de débourrement. Cette dernière variable correspond au nombre de jours entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4. Ces données sont ensuite converties en degrés jours cumulés (au dessus de 10°C) à partir du premier jour de l'année afin de prendre en compte les propriétés climatiques de chaque année. Les données peuvent ainsi être comparées d'une année à l'autre.

III.II.III Densité du bois : famille F2

Sur le dispositif de Lacanau de Mios, l'âge des arbres (12 ans en 2010) a permis un prélèvement de carotte pour établir des profils de densité du bois. Une carotte transversale a donc été prélevée sur chaque arbre du dispositif de Lacanau de Mios à hauteur de poitrine (1,30 m). Après extraction de la résine (traitement à l'alcool) et séchage (afin d'atteindre 12% d'humidité maximum). Chaque échantillon a été radiographié (rayons-X) à la plateforme GenoBois de Pierroton (ce travail a été effectué par Frédéric Lagane, Figure 5A). Les radiographies ont ensuite été numérisées et analysées selon la méthode décrite par Polge (1966). Les profils densitométriques ainsi obtenus (Figure 5B) ont permis d'extraire la série de variables décrite dans le Tableau 2 (travail réalisé par Frédéric Lagane et Laurent Bouffier) et ainsi d'étudier les caractéristiques du bois de printemps, du bois d'été et du cerne entier des individus testés. Seules les données de 2004 à 2010 ont été conservées. Les premiers cernes ont été exclus en raison de la forte hétérogénéité de la densité du bois dans les premières années de croissance. Un exemple de courbe de densité du bois est présenté dans la Figure 5B pour l'arbre 20.

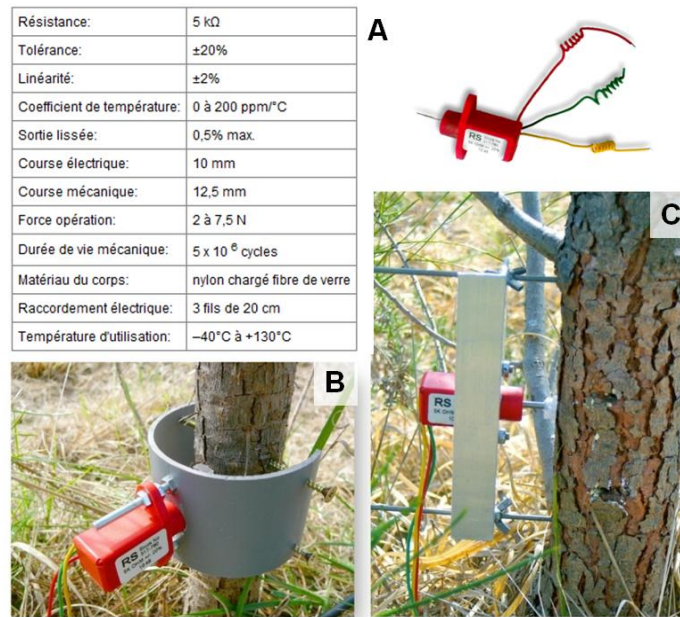


Figure 6. A. Descriptif technique du capteur de position linéaire et des deux types de supports utilisés dans l'expérience : B. support plastique et C. support aluminium (photos : Didier Bert).

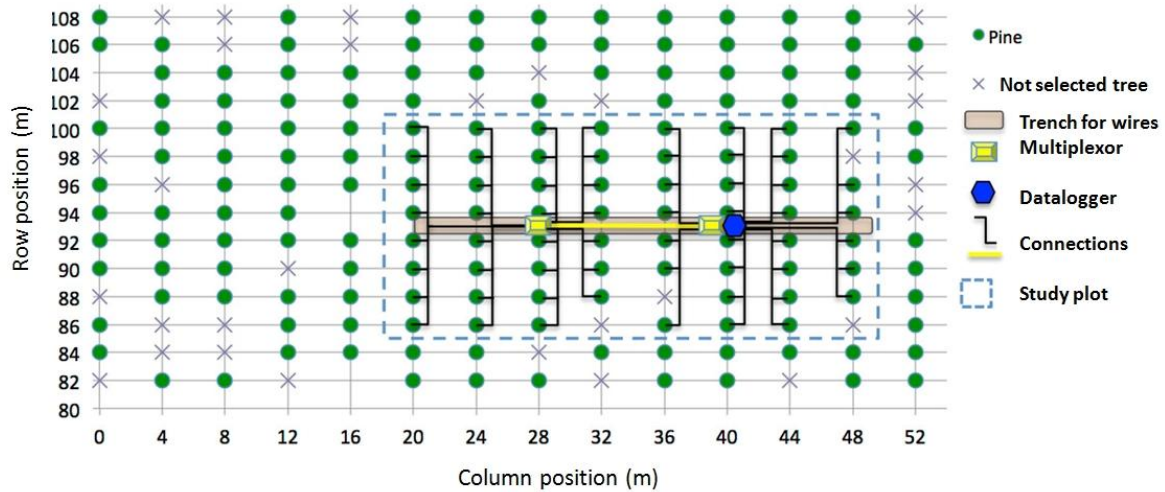


Figure 7. Carte schématique d'un lot d'arbres (croisement Maroc x Landes) montrant la position des arbres et la placette équipée de capteurs (dendromètres).

III.II.IV Suivi de la croissance radiale en continu : familles F1

Des capteurs de déplacement linéaire (dendromètres) ont été installés sur 239 arbres du dispositif de Cestas-Pierroton en Février 2011, à 20 cm au dessus du sol, sur la partie est des troncs (dû à un vent majoritairement en provenance de l'ouest) - Ce travail a été réalisé par Jérôme Bartholomé, Didier Bert, Raphaël Dulhoste et moi-même - Le capteur utilisé est un potentiomètre linéaire LM10 (résistance variable à trois bornes, Radiospare Components, Oxford, UK, caractéristiques en Figure 6A). Les arbres ont été sélectionnés au sein des placeaux selon leur distance à la centrale d'acquisition des données. Soixante arbres voisins ont été sélectionnés par placeau et constituent une parcelle de mesure. La position de ces parcelles de mesure est indiquée par des rectangles noirs dans la Figure 2B. Chaque parcelle comprend une centrale d'acquisition et deux multiplexeurs (CR1000, Campbell Scientific Ltd. France, Campbell Park Road, 80 Hathern Road, Shepshed, Leicestershire, LE12 9GX, UK, Figure7 et Figure1C), alimentés par des panneaux solaires (Figure 1B). Une mesure de tension variable, est faite au niveau de chaque capteur au niveau du multiplexeur. Une mesure de tension générale est effectuée de manière globale pour l'ensemble des capteurs d'un même multiplexeur (les capteurs sont branchés en parallèle). Le ratio entre ces deux tensions est calculé et enregistré ; il constitue la mesure brute du signal. A l'origine, les dendromètres étaient montés sur un support semi-cylindrique en PVC maintenus sur le tronc par des vis (Figure 6B, saison de croissance 2011). Les supports plastiques ont par la suite été remplacés par des supports droits en aluminium qui sont à la fois plus solides et plus adaptés à la croissance rapide des arbres (saisons de croissance 2012 et 2013). Le support aluminium est fixé à l'arbre par deux tiges en acier inoxydable et maintenu par des écrous papillon (Figure 6C).

Une mesure de tension est effectuée par le système toutes les 20 secondes et une moyenne de ces valeurs est enregistrée dans la centrale toutes les 5 minutes (soit 288 valeurs par arbre, par jour, Tableau 3). Les données étudiées dans le cadre de ce travail portent sur la période de Mars 2011 à Février 2014. Le système est toujours en fonctionnement aujourd'hui.

III.II.IV.I Automatisation de la récupération des données

Une phase d'optimisation importante a été nécessaire pour obtenir des données exploitables et surtout pour automatiser la procédure. Le système étant toujours en fonctionnement, l'automatisation de certaines phases de traitement des données permet aujourd'hui aux utilisateurs de l'essai de progresser dans les analyses plus rapidement. Concernant le suivi global du système, deux recalages des capteurs par année sont nécessaires pour rester dans la course de la tige métallique (1 avant la reprise de la croissance et 1 autre au milieu de la croissance annuelle). En 2012 et 2013, ces opérations ont été réalisées par Didier Bert, Raphaël Segura, Hervé Rabillé et moi-même. Cet essai nécessite par ailleurs une gestion des données issues des centrales. Il est composé

Tableau 3. Extrait d'un fichier de sortie de la centrale d'acquisition des données pour le plateau 3.

TIMESTAMP	BattV_P3	AirTC_P3	RH_P3	T_SOIL_P3_15cm	SWC_15cm_1_P3	Vref_MUX_A3	X09_Y33	X09_Y34	X09_Y35
<i>TS</i>	<i>Volts</i>	<i>°C</i>	<i>%</i>	<i>°C</i>			<i>mV</i>	<i>mV</i>	<i>mV</i>
14/08/2012 00:15		15.47	100	23.31	0.039	2366	4276	2909	2852
14/08/2012 00:20		15.43	100	23.3	0.039	2366	4278	2912	2852
14/08/2012 00:25		15.38	100	23.3	0.039	2366	4280	2914	2854

Avec...

- BattV: Tension disponible dans la batterie du plateau
- AirTC: Température de l'air au niveau de la centrale
- RH: Pourcentage d'humidité relative au niveau de la centrale (Relative humidity)
- T_SOIL: température du sol, mesurée à trois profondeurs (15, 30 et 45cm)
- SWC: Réserve en eau du sol (Soil Water Content), mesurée en 4 positions (2 à 15cm, puis à 30 et 45cm)
- Vref_MUX: Tension aux bornes du multiplexeur (2 par plateau)
- X_Y: Mesure de tension du capteur (désigné par sa position relative dans le dispositif)

de 4 centrales CR-1000, qui représentent chacune une parcelle de mesure. La configuration des centrales d'acquisition de données se fait par l'intermédiaire du logiciel Campbell® LoggerNet® (Campbell Scientific Ltd. France, Campbell Park Road, 80 Hathern Road, Shepshed, Leicestershire, LE12 9GX, UK) et permet d'obtenir un fichier par jour et par parcelle de mesure (exemple, Tableau 3). Les fichiers journaliers sont ensuite regroupés pour une période donnée et corrigés avant analyse sous R.

L'amplitude de fluctuation journalière en rayon du tronc est bien plus faible (quelques dizaines de μm) qu'une mesure de croissance radiale annuelle (quelques mm). Il est donc primordial d'avoir des outils de mesure très précis pour avoir des données exploitables. Le bruit électrique général du système a été réduit grâce à la mise en place de régulateur de tension aux bornes des centrales (Jérôme Bartolomé et Régis Burlett). La sensibilité du système de mesure aux variations de température a été testée grâce à des capteurs témoins dont la tige mobile a été bloquée. Ces tests ont permis de montrer que la part de variation due à la température sur le système global est négligeable.

Les fichiers journaliers issus des centrales sont assemblés grâce à un programme en Python (combine_datGUI.py, Ecrit en 2013 par Yec'han Laizet) qui concatène l'ensemble du jeu de données. La procédure comprend les étapes suivantes :

- Les pas de temps dupliqués sont ignorés
- Les enregistrements manquants sont remplacés par des valeurs manquantes
- Les valeurs aberrantes (hors de la course du capteur) sont remplacées par une valeur « vide »

Toutes les autres valeurs ont été recalculées en faisant la différence avec la dernière valeur non vide précédemment enregistrée. Cette procédure permet d'obtenir un fichier unique qui rassemble les données des 4 centrales (239 capteurs, données météo décrites dans les parties suivantes) mais aussi de corriger le vecteur temps des erreurs d'enregistrement et les sauts de valeurs dus au recalage des capteurs. L'effet de la température sur les supports de capteurs est corrigé sous R sur la base d'une relation linéaire avec la température de l'air, calculée à partir de capteurs témoins fixés sur une barre inerte en aluminium. La valeur brute de rapport de tension est ensuite convertie en mm (sous R) grâce à une équation linéaire, calibrée pour chaque capteur individuellement au laboratoire. Les données ainsi traitées permettent d'extraire les variables (phénotypes) exploitées dans cette étude. Un script optionnel permet de tracer un graphique individuel du signal de chaque capteur pour vérifier leur fonctionnement et dresse la liste des capteurs qui doivent être recalés (>80% de la course). Toutes ces opérations sont réalisées grâce à des scripts R que j'ai rédigés.

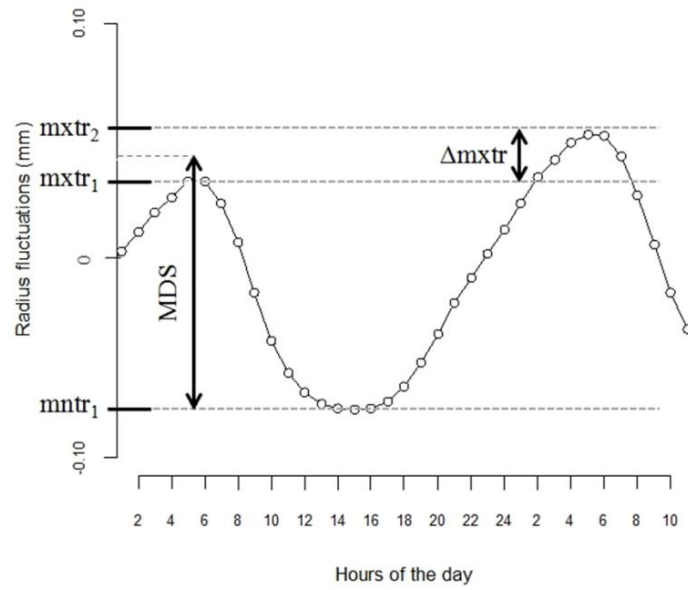


Figure 8. Représentation schématique des fluctuations journalières du rayon. Le maximum (mxtr) et le minium (mntr) journaliers des valeurs de rayon du tronc, l'amplitude maximale de contraction journalière (MDS) et la différence entre deux maxima successifs ($\Delta mxtr$) sont indiqués.

La procédure Python-R est aujourd'hui utilisée par les membres du laboratoire qui continuent de travailler sur le dispositif. Les fichiers de données sont également stockés à l'échelle annuelle (concaténation d'un an de données) sur un serveur en local pour permettre une utilisation ultérieure. Un projet de base de données vient également de démarrer autour des dispositifs instrumentaux possédant des microdendromètres pour garantir la stockage et l'accès aux données dans les années à venir.

III.II.IV.II Traits de microvariation radiale

Deux variables ont été extraites des données de variation journalière du diamètre du tronc (Figure 8): (1) l'amplitude maximale de contraction du tronc (maximum daily shrinkage, MDS), calculée à partir du maximum et du minimum journaliers (nommés maximum et minimum trunk radii, $mxtr$ et mnr , respectivement) ; (2) variation en deux maxima journaliers successifs (day-to-day changes in maximum radius value, $\Delta mxtr$). MDS et $\Delta mxtr$ ont été calculés selon les équations suivantes:

$$MDS = ((mxtr_2 + mxtr_1) / 2) - mntr_1 \quad \text{Eqn 1}$$

$$\Delta mxtr = mxtr_2 - mxtr_1 \quad \text{Eqn 2}$$

Les indices « 1 » et « 2 » correspondent respectivement au jour de mesure et au jour suivant. Ces variables sont classiques pour décrire les variations journalières du diamètre du tronc. Le MDS représente un signal majoritairement hydraulique alors que le $\Delta mxtr$ est le résultat de la combinaison d'une composante hydraulique et de la croissance nette. La moyenne de deux maxima journaliers consécutifs a été utilisée pour estimer la part de variation due à la croissance. Cette valeur a été retranchée du signal hydraulique pour calculer le MDS. Il est important de noter que le $\Delta mxtr$, classiquement utilisé pour représenter la composante journalière de croissance pure, peut prendre des valeurs négatives dans notre étude. Ceci révèle la présence d'un signal hydraulique superposé à la mesure de croissance dans les mesures de $\Delta mxtr$ (see King *et al.* 2012). Par ailleurs 32 jours (sur 1075 au total) ont été exclus du jeu de données (soit 3%) en raison de la présence de données aberrantes (hors de la gamme de mesure des capteurs) associées à un dysfonctionnement électrique.

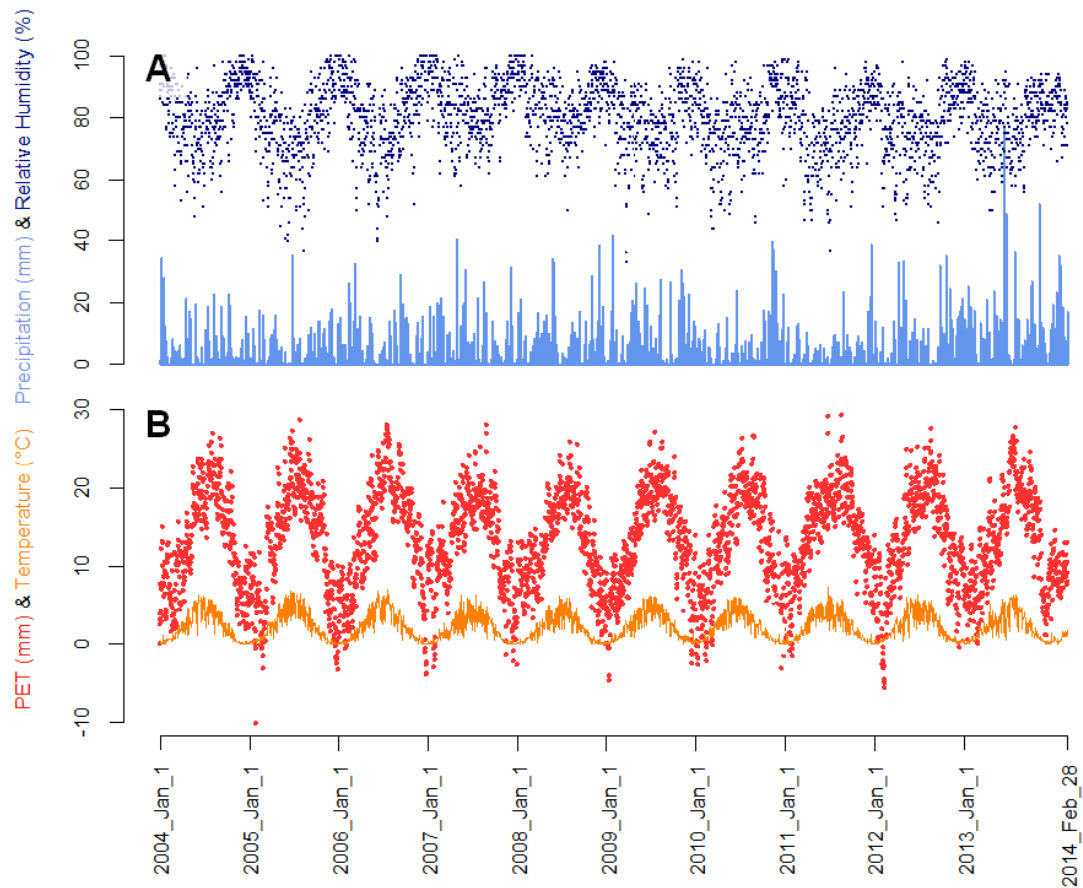


Figure 9. A. Somme de précipitation journalières (mm, barres bleues), humidité relative journalière moyenne (% , points bleu foncé). **B.** Evapotranspiration potentielle journalière de Penman-Monteith (mm, lignes orange) et température journalière moyenne (°C, points rouges).

III.III Données environnementales

Les variables environnementales sont mesurées (ou calculées) par la même station météorologique pour les deux dispositifs (familles F1 et F2). Cette centrale est située à environ 300 m des familles F1, à Cestas (à quelques kilomètres du site F2). De nombreuses variables telles que, la température, l'humidité relative, les sommes de précipitations, le rayonnement global ou la vitesse du vent sont disponibles (ex. Figure 9 pour les années suivies, 2004 à 2014). Ces données sont accessibles sur l'application INRA Climatik (<https://intranet.inra.fr/climatik/do/welcome>).

Sur le dispositif F1, la température et l'humidité relative de l'air sont également mesurées au niveau de chaque centrale avec un pas de temps de 5 min. La réserve volumique en eau du sol (soil water content, SWC) est mesurée sur les 4 placettes de capteurs par 4 sondes réflectométriques (16 sondes en tout, Campbell Scientific CS616). Chaque placette de mesure possède 2 sondes enterrées à 15 cm, une à 30 cm et une autre à 45 cm de profondeur (4 en tout). La capacité d'exploration est considérée comme étant de 15cm de sol pour les sondes à 15 cm et 30 cm et une extrapolation de 70 cm est faite pour la sonde à 45 cm. On obtient ainsi une valeur de réserve volumique calculée pour une épaisseur de sol d'1m (correspondant à l'exploration des racines de pin au jeune âge).

III.IV Données génotypiques

Avec le développement récent des technologies de génotypage à haut débit (Gupta *et al.* 2008, Appleby *et al.* 2009), la diminution des coûts de génotypage permet d'augmenter considérablement le nombre de marqueurs moléculaires et/ou d'individus génotypés. Le choix de marqueurs pertinents et la constitution d'échantillons d'ADN de bonne qualité (et dans la bonne gamme de concentration) restent cependant des étapes cruciales pour la réussite de l'expérimentation.

III.IV.I Préparation des échantillons et extraction d'ADN

Les ADN des individus des deux essais décrits précédemment ont été extraits selon le même protocole. Un lot d'aiguilles est prélevé sur chaque individu et placé dans un tube plastique de 15ml, sur lequel le code de l'arbre est inscrit. Les tubes sont placés dans un congélateur à -80°C pour être stockés à long terme. Un morceau d'aiguille long de 4cm est alors découpé à l'aide d'un ciseau en petits fragments (d'environ 2mm) pour chaque génotype et placé dans des plaques de 96 puits. Des plans sont établis au fur et à mesure de la constitution des plaques pour identifier les individus qui

Encadré 1. Technologie de génotypage Infinium (Illumina)

Le protocole de génotypage Infinium est développé à Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) pour prendre en compte un grand nombre de SNPs en minimisant les contraintes liées à l'incompatibilité des séquences. L'échantillon d'ADN est amplifié à température constante pendant une nuit (Figure, étapes 1 et 2) sans distinction de niveau d'amplification par allèle. Le produit amplifié est ensuite fragmenté par des enzymes. Après précipitation à l'alcool et re-suspension de l'ADN, la puce d'amorces est préparée pour hybridation en chambre à flux traversant; les échantillons d'ADN sont mis en contact avec la puce et incubés pendant la nuit. Les ADN amplifiés et fragmentés se fixent par liaison covalente sur des séquences d'environ 50pb pendant la phase d'hybridation (étape 4). Chaque site de fixation présente un site complémentaire à chaque allèle d'un SNP donné. Après hybridation, la spécificité allélique est donnée par extension enzymatique des bases (étape 5). Les produits ainsi formés sont marqués par fluorescence. L'intensité des pics de fluorescence pour chaque site de fixation est détectée par le programme Illumina BeadArray Reader et sont exportés vers un logiciel d'analyse qui identifie les génotypes.

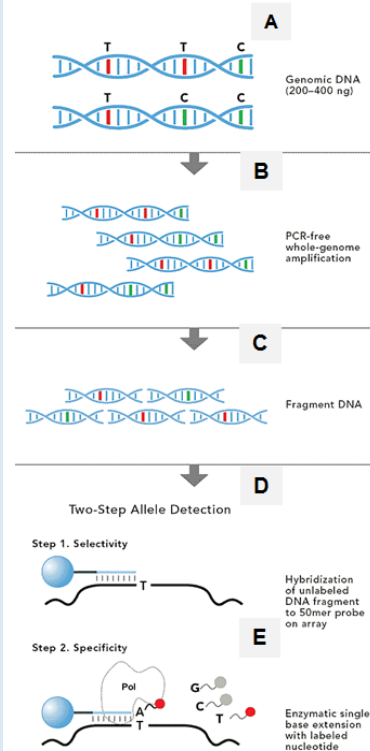


Figure . Etapes clés du protocole Infinium. **A.** Etape1: Echantillon d'ADN source. **B.** Etape 2: amplification d'ADN par PCR. **C.** Etape 3: Fragmentation enzymatique de l'ADN. **D.** Etape 4: Hybridation spécifique des fragments d'ADN. **E.** Etape 5: Extension des bases. Source : <http://technology.illumina.com/technology/beadarray-technology/infinium-hd-assay.html>

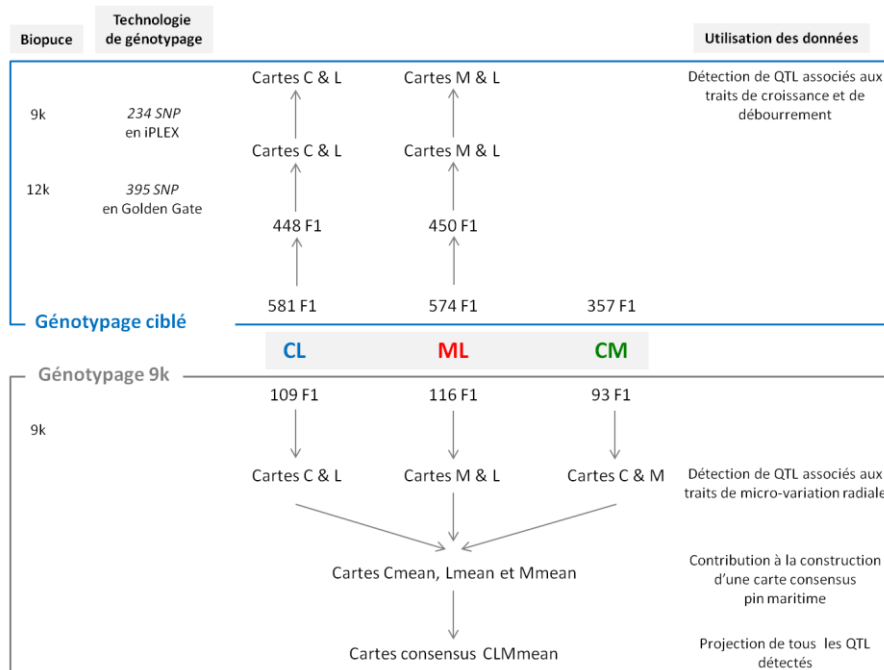


Figure 10. Bilan schématique des différents génotypages effectués sur les individus des croisements Corse x Landes (CL), Maroc x Landes (ML) et Corse x Maroc (CM). Le nombre d'individus, les biopuces utilisées, les techniques de génotypage employées et l'utilisation des données générées sont indiqués. La biopuce décrite dans Chancerel *et al.* (2013) est notée « 12k » et celle décrite dans Plomion *et al.* (2015) est notée « 9k ».

les composent. Les plaques sont finalement placées dans un congélateur à -80°C en prévision de l'extraction.

Les morceaux d'aiguilles encore congelées (30, 40mg environ) sont broyés à l'aide d'un broyeur mécanique (Retsch MM300, Haan, Germany). L'extraction d'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit Invisorb 96 individus pour végétaux, distribué par la société Invitex (GmbH, Berlin, Germany) en suivant le protocole fourni par le fabricant. L'évaluation de la concentration en ADN des échantillons ainsi extraits est réalisée à l'aide d'un spectromètre de type NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) et validée par un test de fluorescence (Quant-IT kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tous les individus dépassant 50 ng/μl d'ADN (selon la mesure de fluorescence) sont conservés pour le génotypage les autres sont ré-extraits jusqu'à atteindre cette concentration.

Au total, j'ai réalisé la récolte d'aiguilles, la mise en plaque et l'extraction d'ADN de 1268 arbres du dispositif F1. Les mêmes opérations avaient été réalisées auparavant sur les arbres du dispositif F2 par Emilie Chancerel.

III.IV.II Génotypage des 3 familles F1: puce 9k et génotypage complémentaire

Le choix des marqueurs pour le génotypage des 3 familles de pleins-frères a été facilité par la conception d'une puce de génotypage de 8949 SNP (puce 9k). La puce 9k Infinium (Illumina, Encadré 1) a été conçue à partir de deux sources de marqueurs de types Single Nucleotide Polymorphism (SNP) : des marqueurs précédemment validés sur des populations de pin maritime et des marqueurs nouvellement synthétisés. La description complète de sa conception est disponible dans l'article disponible en annexe 1. J'ai contribué à la conception de cette puce par le choix de nouveaux marqueurs parmi ceux détectés *in silico* par des algorithmes bioinformatiques. L'ensemble des marqueurs de cette puce a été respectivement testé sur 106, 117 et 94 individus des croisements CL, ML et CM. Les marqueurs polymorphes dans ces croisements ont été utilisés pour concevoir des 6 cartes génétiques parentales (voir chapitre VI).

Le génotypage respectif de 448 et 450 individus des croisements CL et ML a également été réalisé pour valider les analyses QTL sur un nombre plus important d'individus mais aussi pour permettre de valoriser le phénotypage de la cinétique de débourrement réalisée sur l'ensemble des individus de l'essai. Ce génotypage complémentaire repose sur deux technologies.

La première est la technologie des puces GoldenGate (Illumina Inc., San Diego, CA, USA, Encadré 1). Les marqueurs de cette puce ont été choisis parmi ceux décrits dans l'article de Chancerel *et al.* (2013) qui avaient déjà testé le polymorphisme d'une précédente puce Infinium (12k) sur ces 3 descendances. L'information liée à ces SNP a été formatée pour soumission à L'Assay

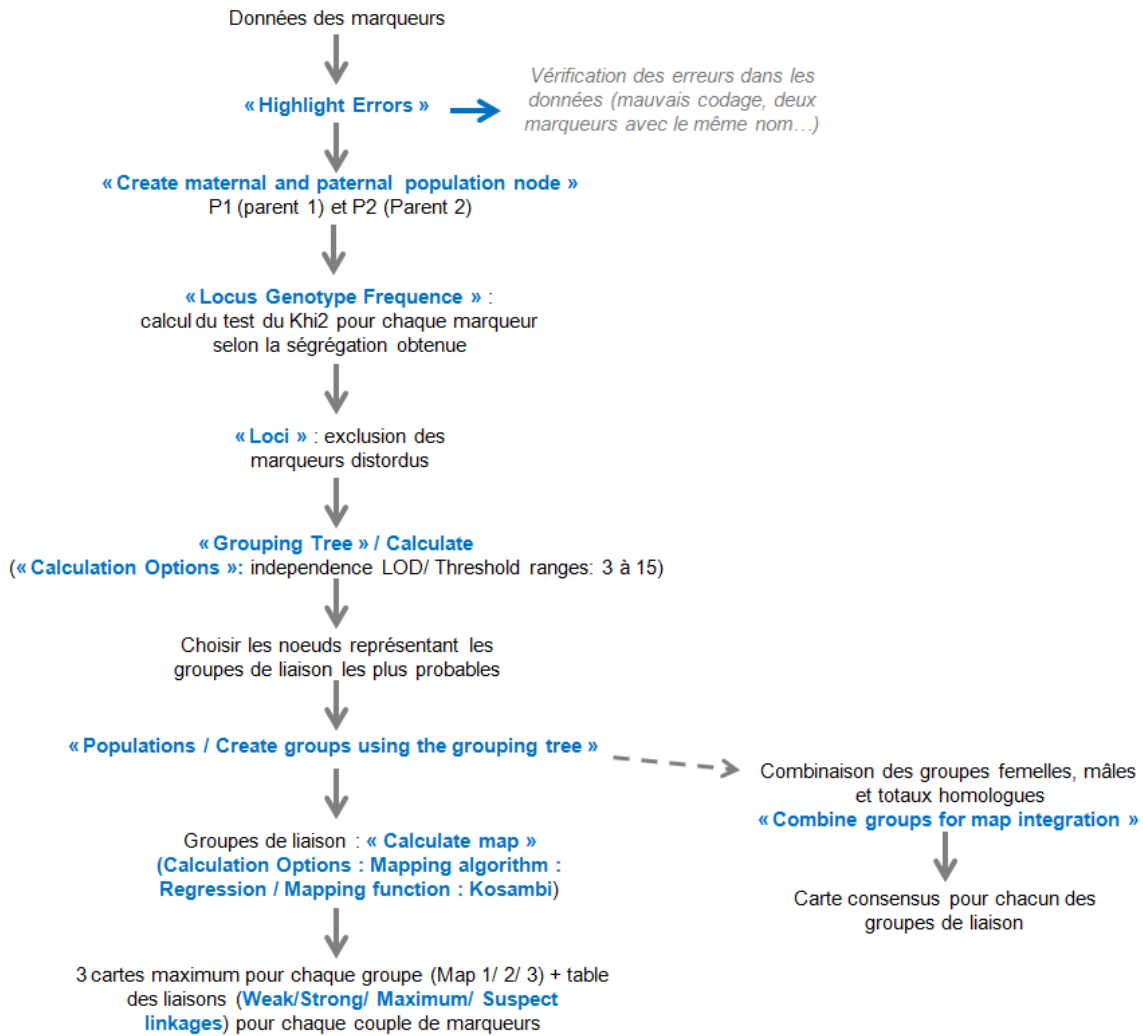


Figure 11. Méthode de construction des cartes génétiques parentales sous JoinMap.

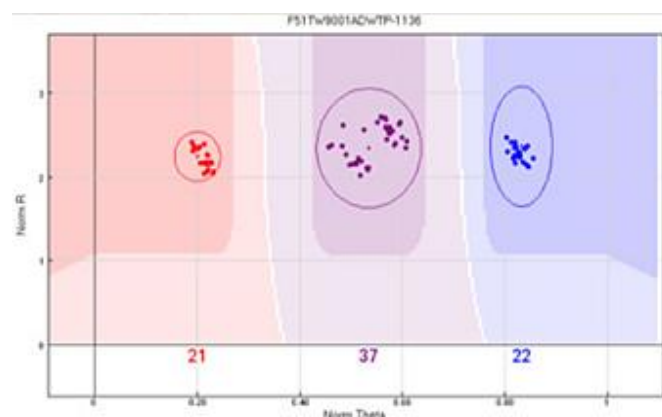


Figure 12. Exemple de représentation de l'information de génotypage d'un SNP par le logiciel Genome Studio. Les classes génotypiques sont représentées par des couleurs différentes (rouge, violet et bleu), le nombre d'individu au sein de chaque classe est indiqué avec la même couleur, en dessous du nuage de points. En abscisse, les valeurs proches de 0 indiquent une homozygotie pour un allele et les valeurs proches de 1, une homozygotie pour l'allele alternatif et une hétérozygotie pour les valeurs intermédiaires. En ordonnée, la somme normalisée des intensités (NormR; Normalized R) des marqueurs fluorescents est représentée. Les marqueurs retenus pour la cartographie dans cette thèse n'ont cependant que deux classe (ségrégation $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$).

Design Tool (ADT; Illumina Inc., San Diego, CA, USA), qui prédit la faisabilité du test en attribuant un score à chaque SNP. Une cartographie de ces marqueurs a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel JoinMap (Stam 1993, Van Ooijen 2011) (Figures 10 et 11). Il s'agissait plus précisément de 384 SNP pour chaque croisement (CL et ML) choisis en fonction de la position de ces marqueurs sur les 12 groupes de liaison de la carte de Chancerel *et al.* (2013) en excluant les marqueurs ayant une note ADT inférieure à 0.6, sur la base des données de la littérature et les expériences précédentes chez le pin maritime. Le génotypage des deux 384-plex a été réalisé selon la technologie VeraCode, GoldenGate (Illumina Inc.) en suivant les instructions fournies par le fournisseur. Trois contrôles négatifs ont été ajoutés à chaque lot pour constituer des plaques de 96 puits. Les données ont par la suite été analysées sous GenomeStudio (Illumina Inc.). Les SNP sont assemblés en cluster selon les classes de génotype attribuées par le logiciel (Figure 12) chaque cluster étant vérifié visuellement avant d'exporter les données. Suite à ce génotypage, de nouvelles cartes ont été réalisées à l'aide du logiciel JoinMap (Stam 1993, Van Ooijen 2011, voir Figure 10 et 11). L'alignement des groupes générés sur la carte décrite dans Chancerel *et al.* (2013) a permis de déterminer des zones à compléter dans les groupes de liaison. C'est alors qu'une seconde technologie de génotypage a été utilisée (Encadré 2). Un jeu d'environ 120 marqueurs par croisement, répartis dans les zones pauvres en marqueurs ont été soumis à la technologie MassARRAY iPLEX de Sequenom (San Diego, CA, USA) pour constituer 6 iplex décrits dans le Tableau 4, soit un ajout de 115 et 111 marqueurs, dont 94 et 85 ont été cartographiés à partir des croisements CL et ML, respectivement. Les génotypages vera-code et iplex ont été pris en charge par la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux (Christophe Boury) où ces deux types de technologies sont disponibles. L'analyse cartographique des données de génotypage ainsi générées, combinée aux données des puces Infinium a permis d'obtenir de nouvelles cartes pour les parents des croisements CL et ML (voir chapitre IV).

III.IV.III Choix des marqueurs pour le génotypage des individus F2

Ces deux types de technologies ont également été utilisées pour génotyper les individus F2 du dispositif de Lacanau de Mios: VeraCode d'Illumina et MassARRAY iPLEX de Sequenom. Le génotypage a été pris en charge par Emilie Chancerel et Christophe Boury au sein de la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux. Le résultat de ces génotypages a permis de générer une carte génétique de l'hybride H12 sur la base de 248 marqueurs (voir chapitre V). Une description détaillée de la procédure de génotypage des individus de la F2 est disponible dans l'article Lavigne *et al.* (in prep) et au chapitre V.

Tableau 4. Nombre de marqueurs constitutifs des iPLEX Sequenom générés pour compléter les cartes génétiques des croisements Corse x Landes (CL) et Maroc x Landes (ML)

croisement	N° du iPLEX	nbr de SNP	Nbr de SNP cartographiés
CL	1	40	115
	2	40	
	3	35	
ML	1	40	111
	2	40	
	3	31	

Encadré 2. Technologie MassArray (Sequenom, San Diego, CA, USA)

Le génotypage de SNPs par la technologie MassArray commence par une amplification PCR de petites (≈ 100 pb) régions d'ADN (ou ADNc complémentaire). Des amorces sens et anti-sens permettent l'amplification de l'ADN testé dans la zone chevauchant la position du SNP d'intérêt. Selon les essais, un multiplex de marqueurs/locus peut en contenir de quelques-uns à 40 marqueurs. Une enzyme de type phosphatase est ensuite utilisée pour éliminer les nucléotides incorporés artificiellement. Un mélange d'amorces d'extension (au moins 1 pour chaque position de SNP testée), de didesoxynucleotides terminaux (iPLEX termination mix) et d'enzyme thermosequenase (iPLEX enzyme) est ajouté sur les ADN amplifiés. Les amorces d'extension sont conçues pour se fixer sur la séquence flanquante de chaque SNP testé. Pendant le passage en thermocycleur qui suit, l'enzyme iPLEX ajoute un nucléotide terminal à chaque amorce d'extension. La différence de masse entre chaque type de nucléotide terminal (4 types) est suffisamment important pour être détectée par le système MassARRAY Analyzer 4. Se basant sur les masses moléculaires (connues) des amorces d'extension et des 4 didesoxynucleotides terminaux, le logiciel d'analyse peut déterminer quel nucléotide a été ajouté à chaque amorce et donc identifier le nucléotide qui se trouve à la position du SNP.

III.V Cartographie génétique

La taille importante des génomes de conifères a longtemps limité les possibilités de séquençage, encourageant plutôt des études sur les séquences exprimées, en vue d'identifier un nombre significatif de gènes (revue par McKay et Dean 2011) et de les cartographier (revue par Ritland *et al.* 2011). Comme d'autres gymnospermes, le génome du pin maritime (*Pinus pinaster Ait.*) est de taille importante à cause de la présence de rétrotransposons (Morse *et al.* 2009). Il cumule 24 Gb/C (Chagné *et al.* 2003) soit 200 fois le génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les approches de cartographie génétique ont été largement utilisées pour caractériser les génomes de ces espèces dans les dernières décennies (Kole 2007 ; Neale and Kremer 2011).

Une carte génétique est une représentation du génome basée sur le taux de recombinaison entre marqueurs moléculaires polymorphes. Leur construction repose sur une descendance en ségrégation issue d'un croisement par reproduction sexuée, ainsi que la caractérisation moléculaire des individus de la descendance (Peterson *et al.* 1988). L'utilisation d'outils d'analyse statistique et de méthodes de calculs mathématiques permet alors d'estimer les distances génétiques entre les marqueurs moléculaires d'un même groupe de liaison, puis de les ordonner à l'intérieur de chaque groupe. Ils permettent de représenter de façon linéaire de l'ordre et de la distance entre marqueurs moléculaires sur la base des événements de recombinaison entre chromosomes homologues qui se déroulent pendant la méiose i.e brassage inter-chromosomique en prophase I de méiose (Crismani *et al.* 2013). Lors de la méiose, des marqueurs situés sur un même chromosome peuvent être séparés s'il se produit un crossing-over dans la région qui les sépare. La probabilité qu'un tel événement se produise est proportionnelle à la distance qui sépare ces marqueurs. La fréquence de recombinaison reflète donc des distances entre marqueurs et l'unité de distance est le centiMorgan (cM). Le taux de recombinaison (θ) entre deux locus (identifiés par des marqueurs moléculaires) par le ratio suivant :

$$\theta = \frac{\text{nombre de gamètes recombinés}}{\text{nombre de gamètes totaux}}$$

Le taux de recombinaison entre locus n'est pas additive, il existe donc différentes fonctions qui permettent de le transformer en distance génétique (cM), afin d'obtenir la propriété d'additivité. La fonction de Kosambi (Kosambi 1943), contrairement à celle d'Haldane (Haldane 1919), tient compte du phénomène d'interférence (réduction de la probabilité d'obtenir deux crossing-over proches l'un de l'autre). Cette différence se répercute au niveau des taux de recombinaison supérieurs 0,15 avec une augmentation de la distance estimée avec la fonction d'Haldane. Ces deux dernières restent les plus utilisées bien que d'autres fonctions aient été développées (Tan and Fornage 2008, Zhao and Speed 1996). Quand le taux de recombinaison est supérieur à 0,5, les

marqueurs sont soit non liés, soit sur le même groupe de liaison mais à une distance de plus de 50 cM. Les études de cartographie montrent que la taille des groupes de liaison varie de 100 à 150 cM malgré des tailles physiques chromosomiques très différentes entre espèces (Chagné *et al.* 2002). Par ailleurs, les taux de recombinaison sur un groupe de liaison sont variables en fonction des régions du génome, qui recombinent plus ou moins (Mezard, 2006) ; les régions centromériques ayant un taux de recombinaison plus faible comparés aux régions télomériques (Drouaud *et al.* 2006). Enfin, les distances estimées entre deux marqueurs sont aussi variables en fonction du sexe (Lagercrantz and Lydiate, 1995; Plomion and Omalley, 1996) et selon l'environnement (Allard 1963 ; Towe et Stadler 1964 ; Lu 1974 ; Ihrke et Kronstad 1975 ; Rose et Baillie 1979 ; Zhuchenko et Korol, 1983 ; Tulsieram et al, 1992b) et le fond génétique (Beavis et Grant, 1991). Des méthodes de fusion des cartes ont également été proposées, pour combiner les cartes génétiques entre elles (Stam 1993 ; Peirce *et al.* 2007 ; Wu *et al.* 2011 ; Ronin *et al.* 2012; Endelman and Plomion 2014) et construire des cartes génétiques consensus. En outre, les cartes génétiques permettent la localisation et le clonage des zones chromosomiques en lien avec la variation de traits quantitatifs (quantitative trait loci, QTL, Price 2006 ; Salvi and Tuberosa 2007 ; Flint *et al.* 2009 ; Wurschum 2012).

Un siècle après la publication de la première carte génétique de *Drosophila melanogaster* (Sturtevant 1913), des cartes génétiques ont été établies pour de nombreux organismes (Botstein *et al.* 1980 pour l'homme ; Koornneef *et al.* 1983 pour *Arabidopsis thaliana* ; Grattapaglia and Sederoff 1994 pour l'Eucalyptus ; Chancerel *et al.* 2013 pour le pin maritime) et sont toujours au centre des projets de recherches en génétique. Différents facteurs influent sur la précision d'une carte génétique, comme le nombre d'individus, le type de population, le nombre de marqueurs moléculaires ainsi que leur type de ségrégation et l'algorithme de cartographie utilisé (Collard *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2006, Ritter *et al.* 1990, Wu *et al.* 2011). De plus c'est principalement le nombre d'évènement de recombinaison capturés par la population de cartographie, en fonction du type de population et du nombre d'individus qui détermine la précision de la carte (Bartholomé *et al.* 2015; Ferreira *et al.* 2006).

Depuis l'avènement des marqueurs moléculaires (Schlotterer, 2004) et les avancées récentes en termes de technologie de génotypage et de bioinformatique qui facilitent la détection d'un grand nombre de nouveaux marqueurs (Kumar *et al.* 2012), les cartes génétiques ont étendues leur champ d'application. Ces avancées ont permis chez les conifères, la construction de cartes génétiques denses sur la base de marqueurs génétiques, pour l'épicéa (Pavy *et al.* 2012) et le pin taeda (Eckert *et al.* 2010). Les progrès constant dans ce domaine rendent aujourd'hui possible de conduire des analyses génétiques avec des milliers de SNP à un coût relativement réduit (Kim and Misra 2007 ;

Mardis 2011). Suite à la validation de SNP sur la base de leur ségrégation Mendélienne dans des populations de cartographie, les SNP deviennent des outils de choix pour les études de génétiques des populations, de génétique de la conservation et pour la sélection génomique. Les cartes génétiques fournissent aussi des éléments de compréhension sur l'évolution des génomes à travers l'analyse de la synténie, colinéarité et des réarrangements chromosomiques entre espèces (Choi *et al.* 2004 ; Krutovsky *et al.* 2004 ; Hudson *et al.* 2012). Ces potentialités sont largement discutées dans l'article de Plomion *et al.* (2015) (en annexe 1).

Dans le cas des arbres forestiers, les populations de cartographie sont issues d'individus fortement hétérozygotes du fait de la très faible domestication et du régime de fécondation préférentiellement allogame. Les descendances F1 et Back cross (BC) sont majoritairement utilisées chez ces espèces. La cartographie de ce type de population peut être effectuée via la stratégie dite de "double pseudo-testcross" (Grattapaglia and Sederoff 1994). Cette stratégie permet de construire une carte génétique pour chaque parent du croisement, par l'utilisation de marqueurs hétérozygotes chez un seul parent et homozygote chez l'autre, ségrégeant ainsi dans la descendance de pleins frères dans les proportions mendéliennes $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$.

Pour les 3 familles de F1, l'analyse de cartographie a été faite avec le logiciel JoinMap v4.1 en utilisant CP (« cross pollinated ») comme type de population. L'ordre des marqueurs et les distances génétiques ont été calculés par l'algorithme de régression en utilisant la fonction de Kosambi et un seuil de LOD > 3 pour la liaison. Le génotypage à l'aide de la puce 9k a permis la construction d'une part, de 6 cartes individuelles (2 parents x 3 croisements) et d'autre part 3 cartes parentales moyennées (Cmean, Lmean, Mean) grâce à la fonction « Combine groups for map integration ». Cette fonction combine les groupes de liaison en faisant la moyenne des fréquences de recombinaison et des LOD scores par paire de marqueurs identiques entre deux groupes homologues (2 minimum par groupe sont requis, voir le manuel de JoinMap, Van Ooijen 2006). Seuls les marqueurs ségrégeants dans des proportions $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$ ont été utilisés. L'information apportée par les marqueurs hétérozygotes chez les 2 parents (ségrégeant dans les proportions $\frac{1}{4} : \frac{1}{2} : \frac{1}{4}$) déprécie grandement la précision du taux de recombinaison entre couples de marqueurs ségrégeant $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$ vs $\frac{1}{4} : \frac{1}{2} : \frac{1}{4}$ (Ritter 1992). Ces marqueurs n'ont donc pas été utilisés dans le cadre de ce travail.

Le package R LPmerge (Endelman et Plomion, 2014) a ensuite été utilisé pour construire une carte composite à partir des groupes de cartes moyennées parentales. LPmerge crée une carte composite en combinant les groupes de cartes représentatives de groupes de liaison similaires entre différentes populations. Le logiciel utilise un programme linéaire (linear programming, LP) qui minimise l'erreur moyenne entre la carte composite et les cartes composantes. Cette minimisation de l'erreur est possible grâce à une équation linéaire qui conserve l'ordre des marqueurs des cartes

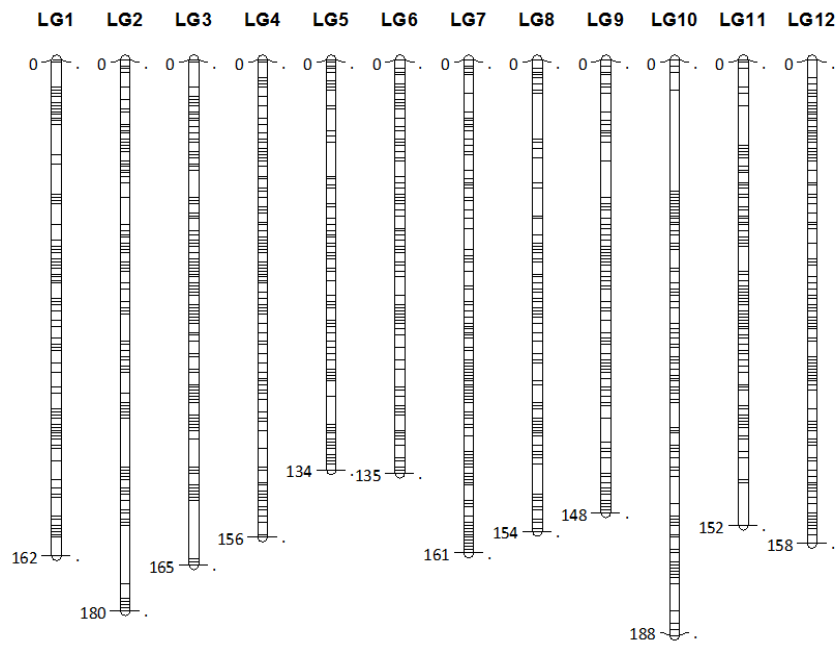


Figure 13. Exemple de carte génétique obtenue dans le cadre de ce travail: carte composite des cartes parentales C, L et M, obtenue grâce au package R LPmerge (Endelman et Plomion, 2014). Les distances génétiques des 12 groupes de liaison sont en cM Kosambi.

sources dans la carte combinée. Quand l'ordre des marqueurs est différent entre les cartes sources, le plus petit jeu de marqueurs possible est supprimé pour résoudre les conflits mathématiques. Une carte composite « CLMmean » qui rassemble le maximum d'information des groupes de cartes parentales a ainsi été générée (Figure 13). Le génotypage complémentaire sur 448 et 450 individus des croisements CL et ML a également permis de construire 4 cartes selon la même méthode.

Pour la famille F2 tous les marqueurs polymorphes ségrègent dans des proportions 1 :2 :1 dans la descendance. L'écart à la ségrégation Mendélienne est testé par un test du χ^2 ($P \leq 0.01$). La procédure de cartographie est celle décrite dans l'article de Chancerel *et al.* (2011). L'analyse a été faite sous JoinMap v4.1 en utilisant F2 comme type de population. L'ordre des marqueurs et les distances génétiques ont été calculés par l'algorithme de régression en utilisant la fonction de Kosambi et un seuil de liaison de $LOD > 3$.

III.VI Méthode de détection des QTL

De nombreuses méthodes ont été proposées pour détecter des QTL et les localiser sur une carte génétique. Les premières considèrent les marqueurs de façon individuelle et utilisent l'analyse de variance à un facteur (Tanksley et al 1983 ; Beckmann et Soller, 1988 ; Soller et Beckmann, 1990). D'autres techniques considèrent des couples de marqueurs adjacents. Weller 1987 ; Lander et Botstein 1989 ; Knapp *et al.* 1990 ; Carbonell *et al.* 1993 ; Haley et Knott 1992 ; Jansen, 1993 ; Martinez et Curnow 1992 ; Moreno-Gonzalez 1992 ; Rodolphe et Lefort 1993). Il est difficile d'estimer le nombre d'individus à caractériser pour détecter un QTL. Pour un backcross le nombre d'individus dont il faut déterminer le génotype est inversement proportionnel à la variance phénotypique expliquée par le QTL (Lander et Botstein 1989). Lorsque l'héritabilité du caractère est moyenne à forte, la mise en place de plans d'expérience contenant des répétitions n'entraînera pas un gain dans la détection des QTL (Soller et Beckman 1990 ; Bradshaw et Foster 1992). Dans le cas des espèces à durée de vie longue comme les espèces forestières, la cartographie repose principalement sur des populations de pleins frères d'effectif plutôt réduit (Koles 2007), ce qui limite le nombre d'évènements de recombinaison disponibles dans la population de cartographie et donc la résolution des cartes (en fonction du type de population et de la taille de l'échantillon, Nelson 2005 ; Ferreira *et al.* 2006) et la puissance statistique de détection des QTL. Ces familles ont été le plus souvent générées dans le cadre des programmes d'amélioration pour estimer des paramètres génétiques. Ainsi, même si le nombre de marqueurs n'est plus un facteur limitant (Sansaloni *et al.* 2010 ; Geraldès *et al.* 2013) pour la construction de cartes génétiques haute-

Chapitre de la thèse	Type de population utilisée	Caractère	Phénotype analysé	Unité	Nbr d'environnements testés	Années étudiées
IV	F1	accd	accroissement en diamètre (différence entre deux "D" successifs)	mm	2	2012 et 2013
		acch	accroissement en hauteur (différence entre deux "H" successifs)	cm	2	2012 et 2013
		lbb	degrés jour cummulés pendant le cycle de débourrement	°C, base 10°C	2	2012 et 2013
		s1	degré jour cummulés à la date d'entrée au stade 1	°C, base 10°C	2	2012 et 2013
		s2	degré jour cummulés à la date d'entrée au stade 2	°C, base 10°C	2	2012 et 2013
		s3	degré jour cummulés à la date d'entrée au stade 3	°C, base 10°C	2	2012 et 2013
		s4	degré jour cummulés à la date d'entrée au stade 4	°C, base 10°C	2	2012 et 2013
V	F2	L	largeur de cerne	mm	7	2004 à 2010
		mBI	densité moyenne du bois de printemps	kg.m-3	7	2004 à 2010
		mBF	densité moyenne du bois d'été	kg.m-3	7	2004 à 2010
		pBF	pourcentage de bois d'été	%	7	2004 à 2010
VI	F1	Δ mxtr	différence entre 2 maxima journaliers successifs	μ m	32 *	2011 à 2013
		mDs	amplitude de contraction journalière du tronc	μ m	32 *	2011 à 2013

Tableau 5. Variables testées en analyse QTL dans les chapitres de résultats du manuscrit. Les variables sont triées par chapitre. Les environnements testés correspondent aux années de mesure (une valeur par année) sauf dans le cas des variables dendrométriques (Δ mxtr et mDs), pour lesquelles les environnements (*) correspondent à des catégories de jours, triés selon leur valeur moyenne d'ETP et de Ψ sol (voir chapitre VI pour une description complète).

densité chez les espèces forestières, il est encore possible d'améliorer la qualité des cartes avec un nombre d'individus plus important, comme viennent de le démontrer Bartholomé *et al.* (2015) chez l'eucalyptus.

Les données de génotypage et les cartes génétiques présentées dans le paragraphe précédent ont été analysées conjointement aux variables phénotypiques pour détecter des zones génomiques associées à la variation d'un caractère (Quantitative Trait Loci, QTL). L'analyse QTL cherche à caractériser l'architecture génétique de caractères quantitatifs : c'est-à-dire le nombre de régions du génome impliquées dans la variation du trait ainsi que leurs positions et leurs effets. Si le lien entre variation génétique (comme celle d'un marqueur moléculaire) et variation phénotypique est statistiquement significatif, on met en évidence un QTL au niveau du marqueur considéré. Partant d'une analyse simple marqueur (analyse de variance à un facteur), l'analyse QTL a évolué vers des méthodes plus en plus complexes : i/ "l'interval mapping" (IM) (Broman 2001, Zou et Zeng 2009) utilisant l'information de la carte génétique pour positionner les QTL le long du génome ii/ le "composite interval mapping" (CIM), (Jansen et Stam 1994, Zeng 1994) et iii/ le "multiple interval mapping" (MIM) (Kao *et al.* 1999), qui prennent compte des cofacteurs (marqueurs significativement associés au caractère) ce qui permet une meilleure estimation de la localisation et de l'effet des QTL. Comme pour toutes les analyses statistiques, la taille de l'échantillon est un facteur critique. Pour des petites tailles d'échantillon il convient de maîtriser le risque de détecter les faux positifs. Il faut aussi rappeler le risque de ne pas détecter de QTL à effet faible et donc de surestimer l'effet de ceux détectés (effet "Beavis", Beavis 1998).

L'ensemble des données a été traité suivant une procédure identique : (1) une analyse dite « simple » environnement, ou l'environnement peut-être une année de mesure ou un jour aux caractéristiques environnementales particulières, (2) une analyse « multi-environnement », qui teste l'effet combiné de ces environnements. Les analyses réalisées sont présentées dans le Tableau 5.

III.VI.I Méthode simple environnement

Dans cette étude, les différentes analyses QTL en simple environnement ont été réalisées avec le package R *qtl* (Broman et Sen 2009, Broman *et al.* 2003). La méthode CIM a été utilisée en fixant un seuil de significativité à 10% au niveau du génome. Le taux d'erreur de type I au niveau du génome a été calculé avec 1000 permutations (Chruchill et Doerge 1994). Les intervalles de confiance (95%) autour des QTL ont été calculés avec la fonction *bayesint*.

III.VI.II Méthode multi-environnement

Pour chaque variable, l'effet environnement a également été quantifié et testé de manière globale par le modèle multi-environnements du logiciel MultiQTL (Korol *et al.* 1998). En réduisant la variance environnementale, ce modèle QTL multi-environnement augmente le pouvoir de détection des QTL à effet faible (Jansen *et al.* 1995). Il permet également d'isoler les QTL stables dans les environnements testés et de tester l'interaction QTL x Environnement. Ce modèle développé par Jansen *et al.* (1995) ne requiert pas l'indépendance entre individus dans les différents environnements. La détection de QTL en multi-environnements dans cette étude repose sur un modèle dans lequel chaque année (ou saison) de mesure est considérée comme un environnement différent pour les variables de croissance annuelle, de débourrement et microdensitométriques (voir Tableau 5). Une étude poussée de la variation des QTL en fonction des variations journalières de l'environnement est également menée pour les traits de microvariation radiale (voir chapitre VI). Dans cette dernière partie les environnements sont caractérisés à l'échelle de la journée en fonction des mesures climatiques pour permettre d'aborder la variation des QTL en fonction de l'environnement en intra-annuel, au cours de la saison de végétation (voir le chapitre VI) pour une description détaillée).

IV Plasticité phénotypique et architecture génétique du débourrement et de la croissance au jeune âge chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.).

IV.I Introduction

Le réchauffement climatique actuel se différencie des précédentes périodes de réchauffement que la Terre a connues par la vitesse à laquelle les changements ont lieu et par son origine anthropique (GIEC 2013). La phénologie étant un caractère très sensible à la température (Sparks and Menzel 2002, Walther 2004), l'augmentation récente de la température de l'air a conduit à de forts changements de la phénologie du débourrement chez les espèces d'arbres tempérés (Kalcsits *et al.* 2009). La croissance, fortement associée à la durée de la saison de végétation des arbres et donc à leur date de débourrement, en est donc elle aussi affectée (Penuelas and Filella 2001), ainsi que l'architecture de l'arbre, la production et la qualité du bois (Rohde *et al.* 2000). Enfin, les modifications climatiques ont des conséquences majeures sur le maintien des espèces forestières (Saxe *et al.* 2001) et pourraient entraîner une modification importante de la distribution et de la composition des forêts européennes dans les décennies à venir (Jarvis 1998; Walker *et al.* 1999).

Différents types de modèles sont aujourd'hui utilisés pour prédire l'impact du changement climatique sur la phénologie des arbres (Hänninen 1990; Kramer 1995; Chuine *et al.* 1999). Le débourrement est principalement contrôlé par des réponses complexes liées aux températures froides et chaudes (Howe *et al.* 2003). Chez certaines espèces d'arbres tempérés, la date de débourrement peut aussi être contrôlée par la photopériode, en interaction avec les besoins en températures chaudes (Laube *et al.* 2014). Une grande majorité des études montre que l'augmentation actuelle de la température avance la date de débourrement et augmente ainsi le risque d'exposition des jeunes feuilles au gel. Par exemple, une avancée de 16 jours de la date de débourrement a été observée chez des espèces caduques de Méditerranée ces 50 dernières années (Penuelas and Filella 2001). Cependant, chez certaines espèces possédant un fort besoin en températures froides, des températures hivernales plus élevées pourraient retarder le débourrement (Heide 2003).

Le succès de l'adaptation des populations d'arbres aux variations de l'environnement dépend notamment de leur niveau de diversité génétique et de leur plasticité phénotypique (Wagner 1997,

Kawecki and Ebert 2004, Savolainen *et al.* 2007, Elzinga 2007, Donnelly 2012). La diversité génétique d'une population est issue de processus évolutifs faisant intervenir les mutations génétiques, les flux de gènes et la dérive génétique, les phénotypes avantageés étant ensuite sélectionnés par des processus de sélection naturelle (Lindner *et al.* 2010). La plasticité phénotypique est la capacité d'un organisme à modifier sa physiologie, sa morphologie ou son développement en réponse à des variations environnementales (Fordyce 2006, Whitman and Agrawal 2009), de façon relativement rapide et réversible. La date de débourrement est généralement vue comme une adaptation pour diminuer le risque de dommages dus au gel tout en maximisant la durée du cycle de végétation (Kramer 1985 ; Luquez *et al.* 2008). Des études ont montré que l'amplitude et la variabilité génétique du débourrement et de l'initiation de la croissance apicale sont très variables entre provenances chez les arbres forestiers (ex: Scotti *et al.* 2004). Des expériences en tests de provenances ont montré que le débourrement est fortement corrélé à la latitude d'origine des populations (par exemple chez le peuplier, Luquez *et al.* 2008 ; Ingvarsson *et al.* 2006 ; Hall *et al.* 2007 ; Rohde *et al.* 2011; et aussi synthétisé pour de nombreuses espèces forestières par Aitken *et al.* 2008). De plus, les espèces des latitudes les plus élevées sont plus sensibles aux variations de la photopériode que celles des régions plus au sud (Howe *et al.* 1995). Cependant, la variation génétique de la phénologie du débourrement a été peu étudiée chez le pin maritime. Une seule étude à notre connaissance rapporte sur la variabilité inter provenances (Desprez-Loustau et Dupuis, 1994). Par ailleurs aucune étude chez cette espèce ne documente l'architecture génétique de ce trait adaptatif. La croissance en hauteur des espèces d'arbres forestiers a également été beaucoup étudiée en tests de descendance et de provenances, montrant des héritabilités moyennes à faibles comparées à celles des traits de débourrement (revue dans Kremer 1994) et une différenciation également importante entre provenances (ex: Li et Adams 1993 pour *Douglas fir*, Derory *et al.* 2010 pour *Quercus petraea*).

La cartographie de QTL (Quantitative trait locus) est un outil efficace pour identifier les régions qui contrôlent une partie de la variabilité phénotypique des caractères quantitatifs (Neale et Ingvarsson 2008 ; Gailing *et al.* 2009 ; Tuskan *et al.* 2006). La détection de QTL chez le pin sylvestre et le peuplier a montré que le débourrement est contrôlé par un nombre réduit de locus à effet majeur (jusqu'à 45% de variance expliquée par les QTL) (Hurme *et al.* 2000, Bradshaw and Stettler 1995; Frewen *et al.* 2000). Chez le sapin de Douglas, les traits de phénologie sont contrôlés par un nombre également réduit de QTLs (5–10), mais ceux-ci ont un effet modéré (5–10% de variance expliquée par le QTL) (Jermstad *et al.* 2001, 2003). L'effectif relativement faible des familles utilisées dans ces études entraîne cependant une surestimation des effets détectés (Beavis 1998).

Dans ce chapitre, nous étudions la variabilité du débourrement et de la croissance (radiale et en hauteur) chez le pin maritime (*Pinus pinaster Ait.*), un arbre d'intérêt économique majeur dans les

Landes de Gascogne et pour le sud-ouest du bassin méditerranéen. Les objectifs de notre étude sont multiples : (1) estimer le niveau de variation phénotypique du débourrement (i.e initiation de la croissance apicale) au sein de trois croisements de plein-frères de pins maritimes et entre ces croisements issus de géotypes appartenant à des écotypes contrastés, (2) comprendre l'influence des facteurs climatiques sur cette variabilité et quantifier les interactions géotype x environnement, (3) étudier les corrélations entre les traits de débourrement et de croissance, (4) décrire l'architecture génétique de ces traits en estimant le nombre, l'effet et la localisation de QTLs et enfin (5) évaluer la stabilité des QTL détectés dans deux fonds génétiques différents au cours de deux années successives.

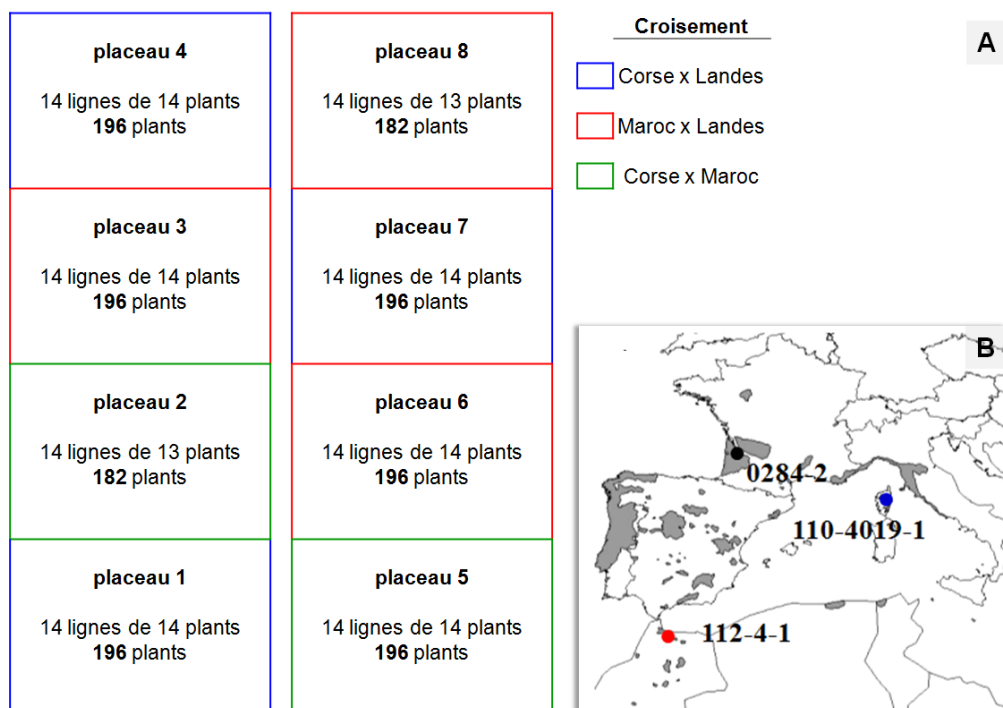


Figure 1. A. Représentation schématique du plan d'expérience comprenant trois familles de pleins frères réparties en blocs d'environ 200 génotypes. **B.** Origine géographique des arbres utilisés comme parents dans les trois croisements testés. L'aire de distribution naturelle du Pin maritime est représentée en gris (selon Burban *et al.* 2004).

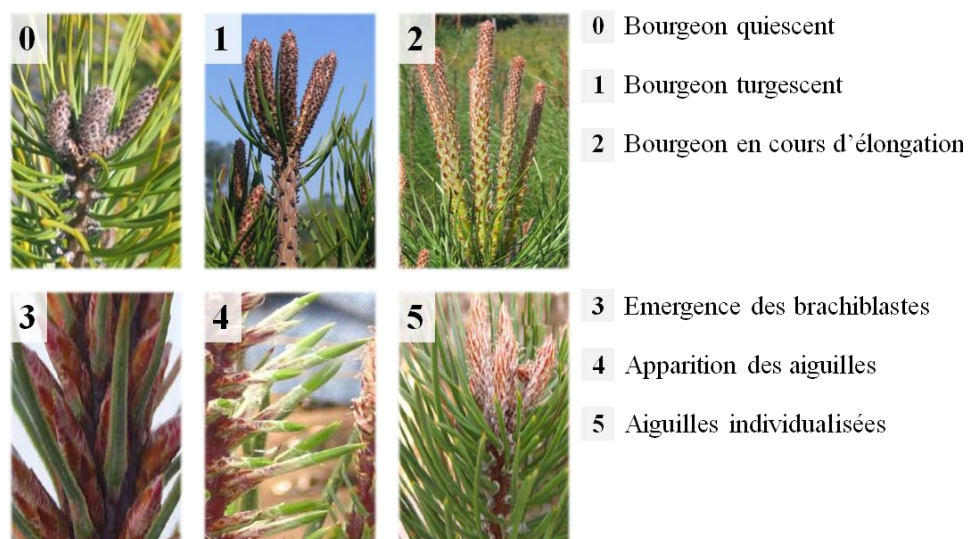


Figure 2. Description des stades phénologiques de débournement du bourgeon apical du pin maritime

IV.II Matériels et méthodes

IV.II.I Matériel végétal et site expérimental

Le site expérimental est celui situé sur le domaine expérimental de l'INRA de Pierroton, sur la commune de Cestas. La description de l'essai est fournie dans le chapitre matériel et méthodes (chapitre II). Il comprenait 1541 pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.), issus du croisement contrôlé de trois écotypes contrastés (Corse, Landes et Maroc) et d'âge identique au moment des mesures en 2012 et 2013 (6 et 7 ans). La structure de l'essai est rappelée à la Figure 1A et 1B.

IV.II.II Phénotypage

IV.II.II.I Cinétique de débourrement

La cinétique de débourrement a été suivie en 2012 et 2013 sur tous les arbres du dispositif. Le stade de développement phénologique global des arbres (ensemble des derniers bourgeons) a été noté deux fois par semaine, de l'initiation du cycle de croissance (en Mars) à la formation des aiguilles matures en Juin, selon la méthode décrite au chapitre II. Cette notation permet d'apprécier la dynamique temporelle de débourrement du bourgeon apical. Les étapes de débourrement sont classées en cinq stades, rappelés à la Figure 2.

À chaque date de mesure, le notateur attribue un stade global à chaque arbre, en considérant la moyenne des stades atteints par l'ensemble de ses bourgeons. Ainsi, tout au long de la campagne de mesure, un stade allant de 0 à 4 est attribué à chaque arbre pour chaque jour de mesure. La date d'entrée dans chaque stade est ensuite extraite pour chaque arbre, de même que la durée du cycle de débourrement. Cette dernière variable correspond au nombre de jours entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4. Ces données sont ensuite converties en degrés jours cumulés (en base 10°C) à partir du premier jour de l'année afin de prendre en compte les propriétés climatiques de chaque année (un nombre de jour = un nombre de degrés jours cumulés différent en fonction des conditions climatiques de l'année). Les données peuvent ainsi être comparées d'une année à l'autre. Dans les analyses qui suivent, seuls les individus toujours vivants en décembre 2013 ont été considérés, soit 1512 arbres.

IV.II.II.II Traits de croissance annuelle

La croissance des arbres (hauteur et diamètre) de l'essai a été mesurée chaque année depuis 2010 (les arbres étaient alors âgés de 2 ans) pendant la période hivernale, quand la croissance est fortement ralentie. Le diamètre des individus a été mesuré à 20 cm au dessus du sol à l'aide d'un pied à coulisse à la fin des saisons de végétation en Décembre 2011, puis avec une mètre ruban en

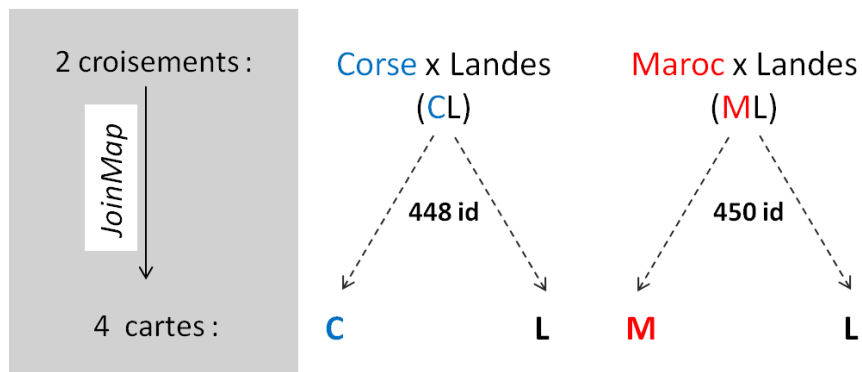


Figure 3. Méthode de construction des cartes génétiques des deux descendance de pleins frères (Corse x landes, Maroc x Landes) génotypées à l'aide de marqueurs SNP. Les parents Corse, Landes et Maroc sont représentés en bleu, noir et rouge, respectivement. Les noms des cartes générées sont indiqués sur la partie droite de la figure. La partie gauche de la figure indique le nombre total de cartes générés ainsi que le logiciel utilisé (dans le cadre blanc).

décembre 2012 et 2013. La mesure de la hauteur totale des individus a été réalisée aux mêmes dates à l'aide d'une perche graduée. Ces mesures ont été utilisées pour calculer les accroissements annuels 2012 et 2013 (accroissement en diamètre et en hauteur). Dans les analyses qui suivent, seuls les individus toujours vivants en décembre 2013 ont été considérés, soit : 581, 574 et 357 individus pour les croisements CL, ML et CM respectivement (1512 arbres au total).

IV.II.III Génotypage et cartographie génétique

898 arbres des croisements CL et ML ont été génotypés. Une analyse de liaison a été effectuée sur 448 et 450 individus des croisements CL et ML, respectivement afin de détecter des QTL avec une grande précision. L'analyse de liaison a été faite selon la méthode décrite dans Grattapaglia and Sederoff (1994). Des cartes génétiques ont été générées pour chaque parent testé (C, L et M), dans chaque configuration de croisement ; soit 4 cartes : C et L dans le croisement CL, M et L dans le croisement ML (voir Figure 3).

Deux lots de marqueurs de type SNP ont été utilisés pour génotyper les descendants.

- (1) Les marqueurs de la puce 12k décrite dans Chancerel *et al.* (2013) avaient été testés sur 40 individus de chaque croisement pour identifier des marqueurs polymorphes. Un sous jeu de marqueurs a alors été choisi pour constituer des biopuces de 384 SNP spécifiques des croisements CL et ML. Les marqueurs ont été sélectionnés pour saturer au mieux le génome, en se basant sur leur position sur la carte décrite dans Chancerel *et al.* (2013). Suite au génotypage par la technique Vera code (Illumina Inc.) 210 et 185 marqueurs ont été utilisés pour les croisements CL et ML respectivement.
- (2) Un jeu de marqueurs SNP de la puce 9k sélectionnés également en fonction de leur position sur les cartes décrites au chapitre VI (115 et 119 SNP pour les croisements CL et ML, respectivement) et complémentaires des marqueurs générés par la technologie Vera Code, a permis de constituer des multiplex compatibles avec la technologie iPlex.

Ces deux lots de marqueurs ont été combinés pour réaliser l'analyse de liaison ; soit 325 SNP pour le croisement CL et 304 SNP pour le croisement ML. Les SNP et des individus comportaient respectivement moins de 3% et 2% de valeurs manquantes. La procédure de cartographie est décrite au chapitre II. Seuls les marqueurs ségrégeant selon un ratio 1/2 :1/2 ont été pris en compte à l'exception des marqueurs possédant une distorsion significative selon un test de χ^2 ($p=0.001$). Les groupes de liaison ont été nommés LG (« linkage group ») et numérotés de 1 à 12 selon leur homologie avec les groupes décrits dans Chancerel *et al.* (2011 et 2013).

Une carte composite (CLMmean) issue du génotypage des mêmes populations a été utilisée pour représenter les résultats d'analyse QTL décrits plus bas (cf description de la carte CLMmean au chapitre VI).

IV.II.IV Données environnementales

La température et la pluviométrie ont été mesurées par une centrale météorologique positionnée à environ 300 m de l'essai, au pas de temps de 1 h. Ces données sont disponibles en accès restreint sur l'application INRA Climatik (<https://intranet.inra.fr/climatik/do/welcome>). La température moyenne et la somme de précipitations journalières ont ainsi été calculées à l'échelle journalière en 2012 et 2013. Les degrés-jour (en base 10°C) ont également été calculés à partir de la température journalière moyenne en 2012 et 2013 et cumulés au fil du temps. En base 10° signifie qu'on considère que les degrés « utiles » pour la plantes sont ceux qui sont au dessus de 10° (seuil arbitraire).

IV.II.V Analyses statistiques

IV.II.V.I Estimation des composantes de la variance à partir des croisements de pleins frères

Des statistiques descriptives ont été générées sur tous les caractères mesurés sur les trois croisements (moyenne, écart type, coefficient de variation), ainsi qu'une analyse de corrélation de Pearson. La plasticité phénotypique des individus sur les deux années testées (2012 et 2013) a également été analysée en comparant le classement des individus entre les deux années, pour chaque trait (représentation graphique et tests de rang). Les arbres sont classés de 1 à n (n variant selon le trait), des valeurs les plus faibles vers les valeurs les plus fortes (ex. pour les stades de débourrement, l'arbre classé 1 est celui qui entre dans le stade avec le moins de °C/Jour cumulés et pour l'accroissement en hauteur, l'arbre classé 1 est celui qui a le plus faible accroissement annuel). Les classements des individus sont reliés par des lignes (normes de réaction) entre 2012 et 2013 pour mettre en évidence les changements de classement.

Un modèle mixte a également été implémenté avec R (R-packages lme4, Bates *et al.* 2013 and lmerTest, Kuznetsova *et al.* 2013, R core development team 2013) prenant en compte la structure de dépendance des données pour les effets fixes et aléatoires. L'effet environnemental (représenté par l'année, an), l'effet du croisement (cross) ainsi que leurs interactions ont été estimés pour tous les caractères. L'effet du génotype (individu, id) a été considéré comme aléatoire.

Tableau 1. Variables analysée dans le cadre de cette étude. Les environnements testés correspondent aux années de mesure 2012 et 2013 (une valeur par année).

Variable	Description	Unité
s1	<i>degré jour cumulés à la date d'entrée au stade 1</i>	°C , base 10°C
s2	<i>degré jour cumulés à la date d'entrée au stade 2</i>	°C , base 10°C
s3	<i>degré jour cumulés à la date d'entrée au stade 3</i>	°C , base 10°C
s4	<i>degré jour cumulés à la date d'entrée au stade 4</i>	°C , base 10°C
lbb	<i>degrés jour cumulés pendant le cycle de débourrement</i>	°C , base 10°C
accd	<i>accroissement en diamètre (différence entre deux "D" successifs)</i>	mm
acch	<i>accroissement en hauteur (différence entre deux "H" successifs)</i>	cm

$$Y = X.\beta + Z.u + \varepsilon$$

Avec,

- Y: vecteur des observations (ici accd, acch, lbb, s1, s2, s3 et s4, voir description au Tableau 1)
- β : vecteur des effets fixes (ici an, cross et an*cross).
- u: vecteur des effets aléatoires (effet individuel)
- ε : vecteur des résidus
- X et Z: matrices qui lient les observations Y aux effets β et u, respectivement.

Les variances ont été estimées pour les facteurs aléatoires (variance génétique au sein des pleins-frères et variance résiduelle).

L'effet individuel également été testé formellement dans des modèles linéaires à un seul facteur (id) pour chaque caractère étudié.

$$Y = id.\beta + \varepsilon$$

IV.II.V.II Tests de colinéarité entre cartes

Des tests de corrélations ont été effectués sur les positions des marqueurs des groupes homologues sur les 4 cartes (position du marqueur sur la carte1 en abscisse, position du marqueur sur la carte 2 en ordonnée) pour vérifier la colinéarité entre les cartes. Le même test a été réalisé avec la carte consensus CLMmean construite à partir d'un génotypage à haute densité sur les mêmes croisements (description complète au chapitre VI). La confirmation de la colinéarité entre marqueurs des cartes (et avec ceux de la carte consensus notamment) a permis une projection des QTL sur une carte génétique unique.

IV.II.V.III Détection de QTL

Dans cette étude, les différentes analyses QTL en simple environnement ont été réalisées avec le package R qtl (Broman et Sen 2009, Broman *et al.* 2003) sur les 898 individus génotypés des deux croisements CL et ML présentés précédemment. La méthode de CIM (composite Interval Mapping) a été utilisée en fixant un seuil de significativité à 10% au niveau du génome. Le taux d'erreur de type I au niveau du génome a été calculé avec 1000 permutations (Churchill et Doerge 1994). Les intervalles de confiance (95%) autour des QTL ont été calculés avec la fonction bayesint. Pour chaque variable, l'effet environnement a également été quantifié dans chaque environnement et testé de manière globale par le modèle multi-environnements du logiciel MultiQTL (Korol *et al.* 1998). La détection de QTL en multi-environnements dans cette étude repose sur un modèle dans lequel chaque année de mesure est considérée comme un environnement différent pour les variables testées (Tableau 1).

Tableau 2. Bilan des 5 cartes génétiques utilisées dans cette étude. Le nombre de marqueurs, la taille (en cM) et la distance moyenne entre deux marqueurs adjacents (en cM) sont indiqués pour chaque groupe de liaison (LG) et pour l'ensemble des douze groupes (dernière colonne). La carte CLMmean (présentée en rouge) est décrite en détails au chapitre VI.

cross	parent	n	LG	1	2	3	4	5	5'	6	7	8	8'	9	9'	10	11	12	Total
CLMmean			Taille du groupe (cM)	164	152	179	162	157		136	161	154		143		185	163	154	1911
			Nombre de SNP	187	200	205	186	181		203	236	184		137		194	184	211	2308
			Distance entre deux SNP (cM)	0,9	0,7	0,9	0,9	0,9		0,7	0,7	0,8		1,0		1,0	0,9	0,7	0,8
CL	C	448	Taille du groupe (cM)	118	80	126	62	120		63	104	81		112		186	89	131	1271
			Nombre de SNP	13	10	13	9	10		10	11	10		8		10	17	17	138
			Distance entre deux SNP (cM)	9,1	8,8	9,7	6,9	12,0		6,3	9,4	9,0		13,9		18,6	5,2	7,7	9,7
ML	L	448	Taille du groupe (cM)	149	165	158	165	195		108	122	148		137		170	123	152	1792
			Nombre de SNP	21	16	19	16	17		12	15	16		18		9	15	13	187
			Distance entre deux SNP (cM)	7,4	11,0	8,8	11,0	12,2		9,8	8,1	9,9		8,1		21,3	8,8	12,7	10,8
ML	M	450	Taille du groupe (cM)	53	131	66	18	92	42	98	61	25	11	30	55	74	78	79	913
			Nombre de SNP	4	9	5	3	5	4	8	6	3	3	7	4	6	5	7	79
			Distance entre deux SNP (cM)	17,8	16,3	16,4	9,0	23,1	14,0	14,0	12,2	12,3	5,6	5,0	18,3	14,9	19,6	13,2	14,1
ML	L	450	Taille du groupe (cM)	165	164	166	135	81		135	119	91		134		88	121	138	1547
			Nombre de SNP	29	19	24	16	12		20	15	14		21		13	20	13	225
			Distance entre deux SNP (cM)	5,9	9,1	7,2	9,0	7,4		7,1	8,5	7,0		6,7		7,3	6,4	11,5	7,3

Tableau 3. Comparaison des positions de marqueurs dans les 4 cartes générées dans cette étude et la carte consensus 9k (CLMmean, cf Chapitre VI). Le nombre de marqueurs communs entre deux cartes est indiqué en dessous de la diagonale du tableau (chiffres en noirs). Les chiffres au dessus de la diagonale indiquent les coefficients de corrélation pour les positions de marqueurs (en bleu). Les coefficients <0.2 sont notés comme non significatif (NS).

	C_CL	CLMmean	L_CL	L_ML	M_ML
C_CL		0,94	NS	NS	NS
CLMmean	114		0,92	0,99	0,91
L_CL	0	155		0,42	NS
L_ML	2	184	127		NS
M_ML	19	46	0	0	

IV.III Résultats

IV.III.I Construction des cartes génétiques

IV.III.I.I Croisement CL

Suite au génotypage par les 325 SNP, le nombre de marqueurs suivant était disponible pour le croisement CL : 138 SNP (parent C femelle) et 187 SNP (parent L mâle), cartographiés avec le logiciel JoinMap, sur 12 groupes de liaison (« linkage group », LGs, Tableau 2). Le nombre de marqueurs cartographiés par groupes de liaison est de 8 à 17 pour C et de 9 à 21 pour L, avec une moyenne de 12 marqueurs par LG pour C et 16 pour L. La longueur des groupes de liaison varie de 62 à 186 cM pour C et de 108 à 195cM pour L avec une valeur moyenne de 106 cM pour C et 149 cM pour L.

IV.III.I.II Croisement ML

Le nombre de marqueurs suivant était disponible pour le croisement ML : 79 SNP (informatifs pour le parent M femelle) et 225 SNP (parent L mâle), répartis sur les 12 groupes de liaison (« linkage group », LGs, Tableau 2). Le parent M présentant des groupes de liaison fragmentés (LGs 5, 8 et 9), les chiffres suivants correspondent aux données assemblées au sein des 12 groupes de liaison attendus (nombre haploïde de chromosomes du pin). Le nombre de marqueurs cartographiés par groupes de liaison est de 3 à 11 pour M et de 12 à 29 pour L, avec une moyenne de 5 marqueurs par LG pour M et 18 pour L (Tableau 2). La longueur des groupes de liaison varie de 18 à 131 cM pour M et de 81 à 166cM pour L avec une valeur moyenne de 61 cM pour M et 128 cM pour L.

IV.III.II Distribution des marqueurs sur les 4 cartes génétiques

Le Tableau 3 présente les résultats de comparaison entre cartes. Le nombre de marqueurs communs entre deux cartes varie de 0 à 184 (Tableau 3, en dessous de la diagonale). Les paires de cartes ayant moins de 20 marqueurs communs correspondent majoritairement aux parents d'un croisement commun (ex. C et L de CL) car seuls les marqueurs spécifiques de l'un des parents ont été cartographiés. Les autres comparaisons ayant peu de marqueurs communs correspondent aux cartes du parent M avec un des autres car il comporte moins de marqueurs que les autres dès le départ. Les tests de régression sur les positions de marqueurs entre deux cartes (Tableau 3, au dessus de la diagonale) montrent comme attendu, une colinéarité faible pour les 4 cartes parentales mais la régression avec la carte CLMmean est excellente (>0.90). La carte CLMmean est donc un outil robuste pour la projection des QTL détectés sur chaque carte parentale et la comparaison des QTL détectés dans les deux fonds génétiques CL et ML (c'est-à-dire corse versus marocain).

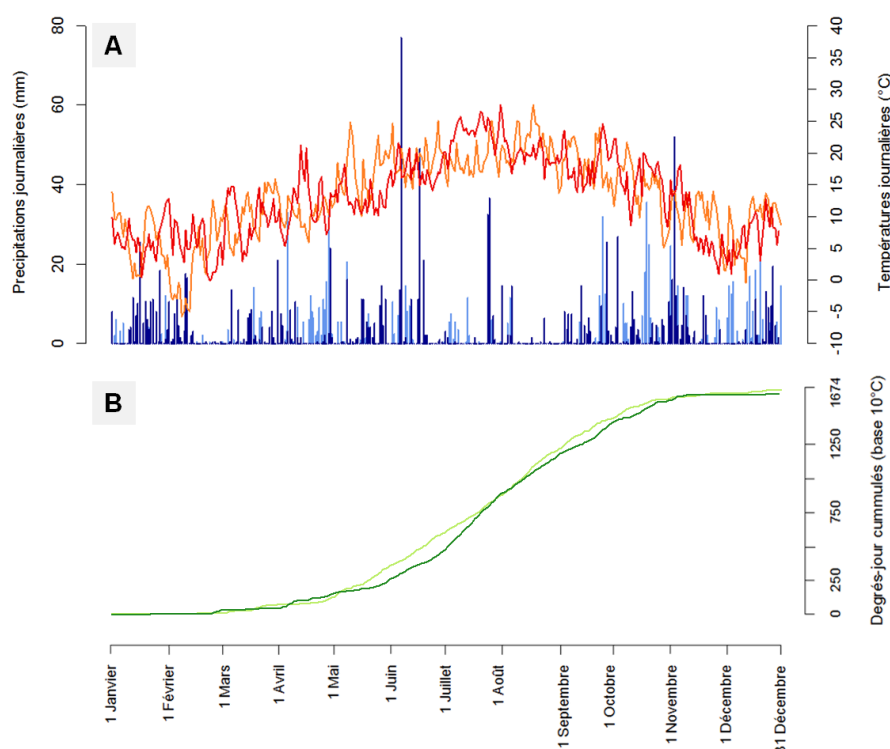


Figure 4. Conditions météorologiques pour 2012 (courbes claires : bleu clair, orange et vert clair) et 2013 (courbes foncées : bleu foncé, rouge et vert foncé). Les valeurs journalières des paramètres suivants sont indiquées : **A.** somme de précipitations (mm, en bleu), température moyenne (°C, courbes orange et rouge), **B.** degrés-jour cumulés en base 10°C (°C, courbes vertes).

Tableau 4. Données météorologiques pour les deux années suivies (2012 et 2013). La valeur moyenne, l'écart-type, le minimum et le maximum sont indiqués pour la température journalière (°C), les précipitations journalières (mm) et les degrés-jour cumulés (en base 10°C).

		moyenne		écart-type	min	max
			±			
Température (°C)	2012	13,2	± 6,6	-5,7	27,5	
	2013	13,1	± 6,4	-0,1	27,6	
Précipitations journalières (mm)	2012	2,5	± 5,4	0,0	35,5	
	2013	3,4	± 7,5	0,0	77,0	
Degrés-jour cumulés (base 10°C)	2012	724,7	± 656,3	3,9	1674,8	
	2013	692,5	± 648,7	0,0	1640,1	

Tableau 5. Statistiques descriptives des traits de croissance (accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm) et de débourrement (degrés-jour cumulés au cours du cycle, lbb, base 10°C, entrée en stade, s1 à s4, degrés-jour en base 10°C) pour tous les individus suivis dans les trois croisements. La valeur moyenne, l'écart-type, le minimum, le maximum et le coefficient de variation (CV) sont indiqués.

Trait	2012						2013					
	Moyenne	sd	min	max	CV	Moyenne	sd	min	max	CV		
s1	84	± 2	82	93	0,03	71	± 4	70	106	0,05		
s2	89	± 3	86	128	0,04	109	± 6	87	116	0,05		
s3	102	± 8	86	128	0,07	118	± 4	106	124	0,04		
s4	126	± 3	111	137	0,02	124	± 2	114	124	0,01		
lbb	43	± 4	25	51	0,08	53	± 3	18	54	0,06		
accd	23,1	± 4,2	4,5	39,8	0,18	25,8	± 5,4	5,1	72,3	0,21		
acch	85	± 23	14	191	0,27	92	± 28	10	250	0,31		

IV.III.III Deux années climatiques contrastées

Les années climatiques 2012 et 2013 ont été caractérisées par un suivi des températures (°C), des précipitations et des degrés-jours cumulés en base 10°C. Les températures journalières moyennes et maximales des deux années sont similaires (autour de 13°C et 28°C respectivement) mais l'année 2012 possède une période de températures négatives (jusqu'à -5,7°C de moyenne journalière) en Février, absente en 2013 (Figure 4A et Tableau 4). Les sommes de précipitations journalières sont plus importantes en 2013 (3,4 mm contre 2,5mm pour 2012) avec un pic à 77mm en Juin 2013. Les degrés-jours cumulés sur l'année sont équivalents entre 2012 et 2013 (1675°C et 1640°C respectivement) mais la courbe d'accumulation (Figure 4B) montre des patrons contrastés avec notamment une accumulation de degrés-jours très inférieure dans la période du 15 Mai au 30 Juillet 2013, période qui correspond justement au débourrement.

IV.III.IV Variation des traits de débourrement

La cinétique de débourrement a été suivie pour les 1512 arbres phénotypés en 2012 et 2013. Les stades de débourrement décrits dans le matériel et méthodes ont d'abord été étudiés sans distinction de croisement (Tableau 5, Figure 5 et courbes noires Figure 6). Les quantités de degrés-jours (DJ, base 10°C) cumulés depuis le 1^{er} janvier de l'année, nécessaires pour entrer dans les stades de 1 à 4 sont notées de s1 à s4. La quantité de DJ cumulés entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4 est notée lbb (« length of bud burst »). Les quantités de DJ nécessaires pour l'entrée des arbres des stades de 1 à 4 en 2012 sont de 84 DJ, 89 DJ, 102 DJ et 126 DJ avec une quantité moyenne de DJ cumulés pendant le cycle de 42 DJ (126DJ-84DJ=42DJ). Les quantités de degrés-jours nécessaires pour l'entrée des arbres des stades de 1 à 4 en 2013 sont de 71 DJ, 109 DJ, 118 DJ et 124 DJ avec une quantité moyenne de DJ cumulés pendant le cycle de 53 DJ. On peut noter une variabilité individuelle (évaluée par les coefficients de variation) relativement faible pour tous les stades, de 1% pour le stade s4 en 2013 à 7% pour le stade s3 en 2012. On peut cependant noter que la distribution des valeurs est très différente entre années pour un même trait. Par exemple la distribution des données de s1 bimodale en 2012 et unimodale en 2013. Ceci témoigne de la nature perfectible des mesures : la notation par classes et deux passages par semaines sont imparfaits et ne permettent pas toujours d'obtenir une distribution normale même si on en s'approche.

La variation des traits de débourrement a ensuite été analysée par année et pour chaque croisement séparément (Tableau 6 et Figure 6 et 7). La comparaison des années 2012 et 2013 montre une entrée en stade 1 décalée de 10J en 2013 et équivalente entre croisements (entre 84 DJ

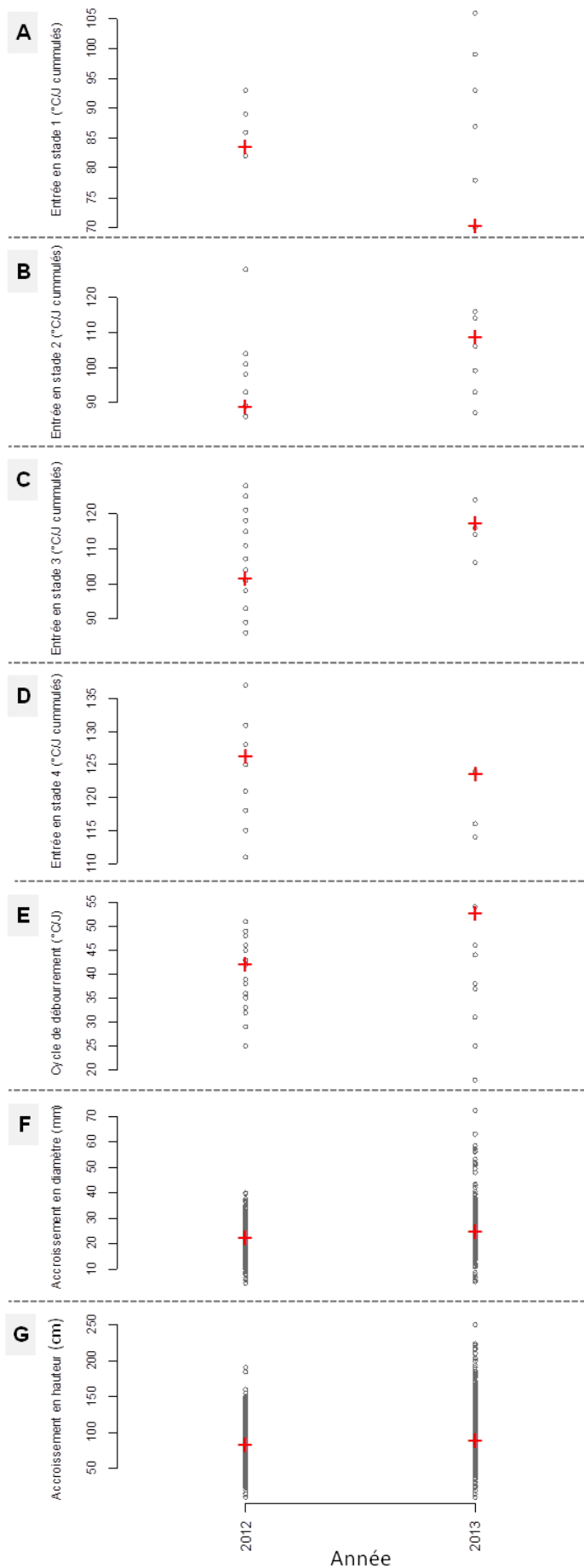


Figure 5. Données phénotypiques pour les années 2012 et 2013: les cercles gris représentent les valeurs de chaque individus et moyennes annuelles sont représentées par des croix rouges.

De **A** à **G**: entrées en stades 1 à 4 (en °C/Jour cummulés depuis le premier janvier de l'année en cours), cycle de débourement (en °C/Jour cummulés entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4), accroissement en diameter (mm), accroissement en hauteur (cm).

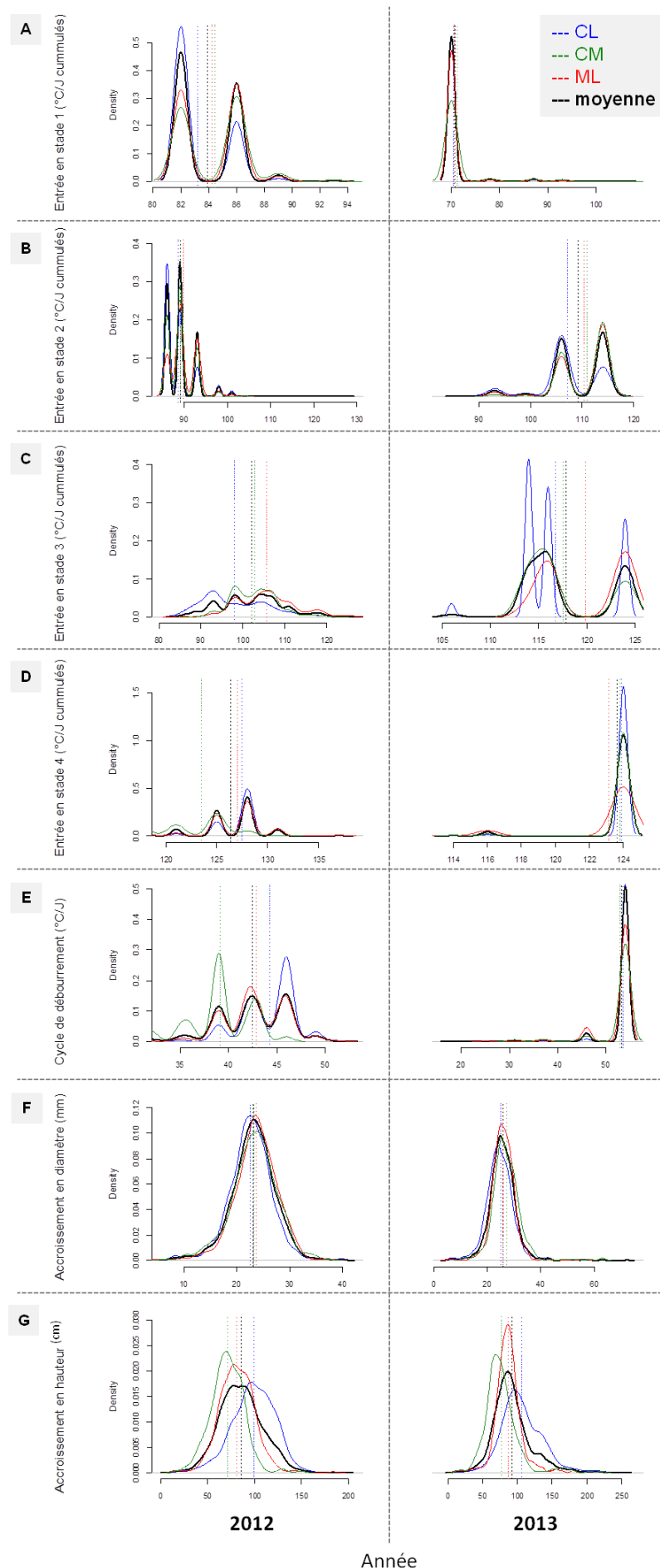


Figure 6. Courbes de distribution des données phénotypiques pour les années 2012 et 2013: les courbes bleues, rouges, vertes et noires correspondent aux valeurs des croisements CL, ML, CM et aux moyennes respectivement. Les lignes pointillées de mêmes couleurs indiquent les valeurs moyennes par croisement et la moyenne générale.

De **A** à **G**: entrées en stades 1 à 4 (en °C/Jour cummuls depuis le premier janvier de l'année en cours), cycle de débourrement (en °C/Jour cummuls entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4), accroissement en diamètre (*mm*), accroissement en hauteur (*cm*).

Tableau 6. Statistiques descriptives des traits de croissance (accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm) et de débourrement (degrés-jours cumulés au cours du cycle, lbb, base 10°C, entrée en stade, s1 à s4, degrés-jours en base 10°C) pour tous les individus suivis. La valeur moyenne, l'écart-type, le minimum, le maximum et le coefficient de variation (CV) sont indiqués pour chaque croisement de pleins-frères : Corse x Landes, Maroc x Landes et Corse x Maroc, notés CL, ML et CM, respectivement.

		2012					2013				
		moyenne	écart-type	min	max	CV	moyenne	écart-type	min	max	CV
s1	CL	83	± 2	82	93	0,02	70	± 3	70	106	0,04
	CM	84	± 2	82	93	0,03	71	± 5	70	106	0,06
	ML	84	± 2	82	93	0,03	71	± 3	70	106	0,05
s2	CL	89	± 4	86	128	0,04	107	± 6	87	116	0,05
	CM	89	± 3	86	104	0,03	111	± 4	93	116	0,04
	ML	90	± 3	86	104	0,03	110	± 5	93	116	0,05
s3	CL	98	± 8	86	121	0,08	117	± 4	106	124	0,04
	CM	103	± 5	89	121	0,05	118	± 4	114	124	0,03
	ML	106	± 7	86	128	0,06	120	± 4	114	124	0,04
s4	CL	127	± 2	121	137	0,02	124	± 1	114	124	0,01
	CM	123	± 3	111	131	0,03	124	± 1	114	124	0,01
	ML	127	± 3	118	137	0,02	123	± 3	114	124	0,02
lbb	CL	44	± 3	35	51	0,06	54	± 3	18	54	0,05
	CM	39	± 3	25	46	0,09	53	± 4	31	54	0,08
	ML	43	± 3	25	51	0,07	53	± 3	25	54	0,06
accd	CL	22,6	± 4,1	8,0	39,8	0,18	24,8	± 5,9	5,7	72,3	0,24
	CM	23,2	± 4,4	6,4	36,9	0,19	27,2	± 5,9	10,8	63,0	0,22
	ML	23,6	± 4,1	4,5	37,6	0,17	25,9	± 4,3	5,1	57,3	0,16
acch	CL	99	± 23	15	191	0,23	106	± 30	10	250	0,28
	CM	71	± 17	15	149	0,25	77	± 25	14	221	0,33
	ML	81	± 19	14	184	0,23	87	± 19	10	181	0,22

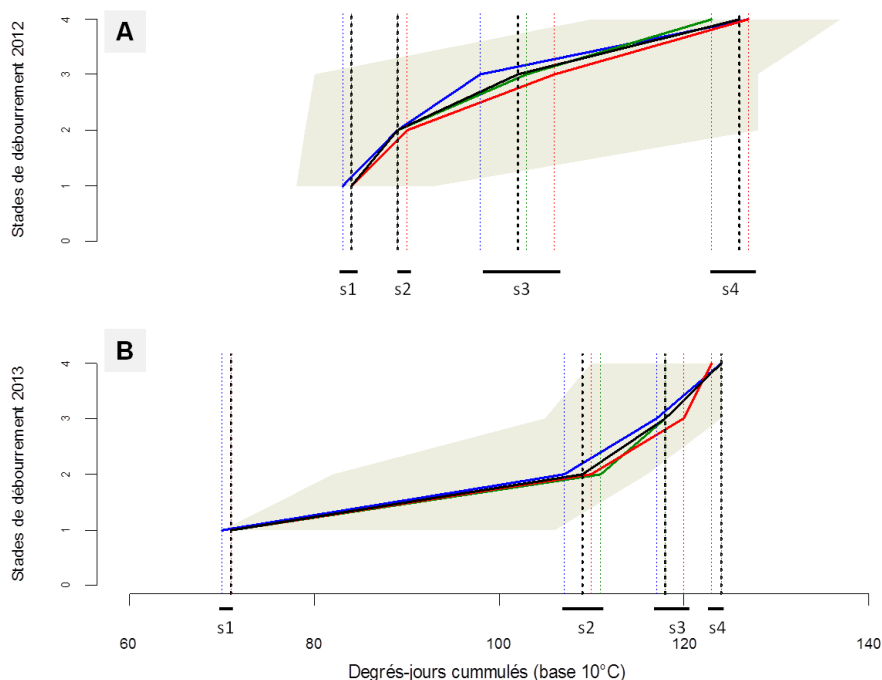


Figure 7. Variation phénotypique de la cinétique de débourrement dans trois croisements de pleins-frères de pin maritime pour les années 2012 (A) et 2013 (B). Les stades de débourrement sont notés de 1 à 4 (s1, s2, s3 et s4) selon la méthode décrite dans le matériel et méthodes. Les valeurs d'entrée dans chaque stade sont représentées en degrés-jours cumulés (en base 10°C, abscisse). La ligne noire et la zone grisée représente les valeurs prises par les individus des trois croisements confondus. Les valeurs moyennes d'entrée en chaque stade (en degrés-jours cumulés en base 10°C) sont indiquées en bleu, rouge et vert pour les croisements Corse x Landes, Maroc x Landes et Corse x Maroc, respectivement. Les plages de somme de degrés-jours nécessaire pour l'entrée en chaque stade sont indiquées par des segments noir épais, avec l'indication du stade concerné, pour les deux années suivies (2012, A et 2013 B).

et 71 DJ). Un décalage majeur entre année est également observable pour l'entrée en stade 2: 90 DJ sont nécessaires en 2012 contre 110 DJ en 2013 en moyenne sur les trois croisements (Figure 6 et 7). Par la suite un écart en DJ équivalent est nécessaire pour l'entrée en stade 3 pour les deux années (11 DJ en moyenne sur 3 croisements) alors que la transition vers le stade 4 est plus rapide (en termes de degrés-jours cumulés nécessaires) en 2013 qu'en 2012 (23 DJ en 2012 contre 5 DJ en 2013 en moyenne sur les 3 croisements). Au final les trois croisements présentent des patrons similaires en moyenne et les différences entre année sont majeurs (voir par exemple la bimodalité de s_1 en 2012 absente en 2013, Figure 6 ou la concavité des normes de réaction à la figure 7: concave en 2012, convexe en 2013). Le cycle (lbb) entier nécessite en moyenne 10DJ de plus en 2013 qu'en 2012 chez les trois croisements (Tableau 6 et Figure 6 et 7). Les coefficients de variation sont globalement très faibles pour tous les stades et pour les trois croisements (coefficients de variation allant de 1% à 9%) au cours de ces 2 années.

Les effets du croisement, de l'année climatique et leur interaction ont été testés en effets fixes dans des modèles mixtes, adaptés à chaque trait de débourrement (Tableau 7A). Les effets croisement (cross), année climatique (an) et leur interaction (cross : an) sont très significatifs pour tous les phénotypes testés à l'exception de l'effet croisement pour le stade 3. De même les carrés moyens calculés dans le modèle montrent que l'effet année explique une part majeure de la variance expliquée par le modèle. La variance de l'effet individuel a également été comparée par rapport à la variance résiduelle (Tableau 7B). On observe une variance individuelle moyenne à faible pour tous les traits (de 3% à 30% de variance résiduelle avec une variance proche de 0 par rapport à la variance résiduelle pour le stade 4.) Il est important de noter que l'effet individuel est non significatif pour les phénotypes de débourrement quand il est testé seul dans les modèles (Tableau 7C).

IV.III.V Variation des traits de croissance

La croissance des 1512 arbres phénotypés (581, 574 et 357 pour les croisements CL, ML et CM respectivement) a été suivie en 2012 à 2013 pour les accroissements en diamètre (accd, mm) et en hauteur (acch, cm). Les accroissements sont calculés en faisant la différence entre deux mesures successives de diamètre et de hauteur (ex. accd 2012 = D2012-D2011). A contrario des variable de débourrement, les accroissements annuels en diamètre et en hauteur présentent des distributions normales. Les accroissement annuels en diamètre sont en moyenne de 23,1 mm et 25,8mm avec des coefficients de variation de 18% et 21% en 2012 et 2013, respectivement. Les accroissements annuels en hauteur sont en moyenne de 85cm et 92cm avec des coefficients de variation classiques de 27% et 31% en 2012 et 2013, respectivement (Tableau 5 et Figure 5).

Tableau 7. A. Modèles mixtes appliqués aux traits de débourrement (degrés-jours cumulés au cours du cycle, lbb, base 10°C, entrée en stade, s1 à s4, degrés-jours en base 10°C) et de croissance (accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm). L'année (an), le croisement (cross) et leur interaction (cross : an) constituent les effets fixes des modèles. **B.** Variance de l'effet aléatoire individu (id) dans les modèles précédents. **C.** Modèles linéaires appliqués aux mêmes variables testant l'individu en effet fixe.

A	Phénotype	Effet fixe	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Denom	Pr(>F)	
s1	cross	2	1465.0	732.5	28.811	1009.7	6.783.10 ⁻¹³		
	an	1	4111.0	4111.0	119.699	1015.0	<10 ⁻¹⁶		
s2	cross:an	2	1648.9	824.4	28.797	1009.7	6.877.10 ⁻¹³		
	cross	2	22585	11292	13.428	1005.9	1.757.10 ⁻⁰⁶		
	an	1	843928	843928	3366.693	1019.6	<10 ⁻¹⁶		
s3	cross:an	2	4274	2137	13.441	1006.1	1.735.10 ⁻⁰⁶		
	cross	2	2805	1403	1.7511	936.76	0.1741		
	an	1	1003863	1003863	8547.5269	921.20	<10 ⁻¹⁶		
s4	cross:an	2	251	126	1.7474	937.47	0.1748		
	cross	2	20495	10248	64.017	1777	<10 ⁻¹⁶		
	an	1	32115	32115	360.101	1777	<10 ⁻¹⁶		
lbb	cross:an	2	17610	8805	63.984	1777	<10 ⁻¹⁶		
	cross	2	2553	1277	49.83	883.96	<10 ⁻¹⁶		
	an	1	40100	40100	3503.60	874.23	<10 ⁻¹⁶		
accd	cross:an	2	877	438	49.80	884.20	<10 ⁻¹⁶		
	cross	2	938.8	469.4	16.714	1967.4	6.344.10 ⁻⁰⁸		
	an	1	13063.4	13063.4	679.672	1967.2	<10 ⁻¹⁶		
acch	cross:an	2	473.7	236.9	16.691	1967.4	6.487.10 ⁻⁰⁸		
	cross	2	361357	180679	36.642	1947.7	<10 ⁻¹⁶		
	an	1	1473231	1473231	1843.989	1945.6	<10 ⁻¹⁶		
			cross:an	2	34386	17193	36.703	1947.7	<10 ⁻¹⁶

B	Phénotype	Effet	Variance	Écart-type	% Variance id/résiduelle
s1	id	2	±	1	26
	Residual	7	±	3	
s2	id	2	±	2	15
	Residual	17	±	4	
s3	id	8	±	3	30
	Residual	26	±	5	
s4	id	0	±	0	<1
	Residual	5	±	2	
lbb	id	0	±	1	3
	Residual	10	±	3	
accd	id	4	±	2	23
	Residual	19	±	4	
acch	id	70	±	8	16
	Residual	444	±	21	

C	Effet fixe	DL	Somme Sq	Moyenne Sq	valeur F	Pvalue(>F)
lbb	id	1493	29536	19.783	0.2867	NS
	Résiduelle	1083	74741	69.013		
s1	id	1511	23273	15.403	0.1628	NS
	Résiduelle	1335	126300	94.607		
s2	id	1511	46335	30.665	0.1391	NS
	Résiduelle	1393	307103	220.462		
s3	id	1515	67140	44.317	0.255	NS
	Résiduelle	1247	216677	173.759		
s4	id	1509	11058	7.3278	0.8034	NS
	Résiduelle	1248	11382	9.1206		
accd	id	1510	42498	28.144	1.2733	1.484e-06
	Résiduelle	1493	33001	22.104		
acch	id	1508	1306716	866.52	1.9344	2.2e-16
	Résiduelle	1475	660748	447.97		

La variation des traits de croissance a également été analysée par année et pour chaque croisement séparément (Tableau 6 et Figure 6). Les accroissements en diamètre sont similaires (autour de 23 mm à 25 mm par an) mais les accroissements en hauteur sont contrastés (106 cm pour le croisement CL contre 77 cm pour CM et intermédiaire avec 87 cm pour ML en 2013 et avec le même classement en 2012). Les coefficients de variation varient entre 14% et 33% et restent stables entre années (Figure 6).

Les effets du croisement, de l'année climatique et leur interaction ont été testés en effets fixes dans des modèles mixtes (Tableau 7A). Les effets croisement (cross), année climatique (an) leur interaction (cross : an) sont très significatifs pour les 2 caractères. La comparaison des carrées moyens montrent également que l'effet année explique une part de variance 3 à 100 fois supérieure à celles expliquée par les effets croisement et interaction croisement x année. La variance de l'effet individuel a également été testée comme effet aléatoire dans les modèles (Tableau 7B). On trouve un effet individuel moyen pour les accroissements avec une variance individuelle de l'ordre de 23% de la variance résiduelle pour l'accroissement en diamètre et seulement 16% pour l'accroissement en hauteur. L'effet individuel est cependant très significatif quand il est testé en facteur fixe unique (Tableau 7C).

IV.III.VI: Corrélations entre traits de débourrement et de croissance et plasticité phénotypique

La matrice de corrélation de Pearson entre les traits de croissance et de débourrement montre que les corrélations significatives sont similaires entre les données 2012 et 2013 (Tableau 8 et Figure 8). La structure de la matrice est également conservée entre croisement (données non présentées). Logiquement, le nombre de degrés-jours cumulés pendant le cycle de débourrement (lbb) est négativement corrélé au nombre de DJ nécessaires pour l'entrée en stade 1 (-0.55 et -0.87 en 2012 et 2013, respectivement) et positivement corrélé au nombre de DJ nécessaires pour l'entrée en stade 4 (0.79 et 0.47 en 2012 et 2013, respectivement). Par ailleurs, l'entrée en stade 1 est négativement corrélée aux accroissements en 2012 (-0.38 et -0.47 pour accd et acch respectivement) et la tendance se confirme pour les autres stades en 2012 mais aussi en 2013: plus les arbres sont tardifs moins ils sont performants pour la croissance. Certes, les corrélations entre ces traits sont moins fortes en 2013 mais on peut noter que les accroissements 2013 sont corrélés aux accroissements 2012 (0.20 et 0.33 pour accd et acch respectivement).

Les traits de débournements sont globalement faiblement corrélés entre 2012 et 2013 (voir Figure 8) indiquant encore une fois le fort effet du climat sur les traits liés au débourrement. L'observation des changements de classement des individus entre 2012 et 2013 (Figure 9) montre

Tableau 8. Matrice des coefficients de corrélation de Pearson entre les données annuelles de débourrement et de croissance en 2012 et 2013, pour les 1512 arbres phénotypés (accroissement en diamètre, *accd*, mm, accroissement en hauteur, *acch*, cm, degrés-jours cumulés au cours du cycle, *lbb*, base 10°C, entrée en stade, *s1* à *s4*, degrés-jours en base 10°C). Seul les coefficients significatifs (*p*value <0.01) sont indiqués. Les coefficients de corrélations sont indiqués en noir et les *s* valeurs non significatives sont notées NS (non significatif).

	accd_2012	acch_2012	lbb_2012	s1_2012	s2_2012	s3_2012	s4_2012	accd_2013	acch_2013	lbb_2013	s1_2013	s2_2013	s3_2013	s4_2013
accd_2012														
acch_2012	0,40													
lbb_2012	0,10	0,37												
s1_2012	-0,38	-0,47	-0,55											
s2_2012	-0,20	-0,25	-0,10	0,42										
s3_2012	-0,15	-0,34	NS	0,37	0,30									
s4_2012	-0,17	0,11	0,79	NS	0,18	0,19								
accd_2013	0,20	NS	NS	-0,11	-0,08	NS	-0,12							
acch_2013	0,10	0,33	0,21	-0,13	-0,10	-0,21	0,16	0,15						
lbb_2013	0,19	0,18	NS	-0,17	-0,18	-0,13	NS	NS	0,12					
s1_2013	-0,35	-0,27	-0,07	0,24	0,23	0,13	0,08	NS	-0,11	-0,87				
s2_2013	-0,17	-0,29	-0,08	0,22	0,17	0,31	NS	-0,09	-0,25	NS	0,11			
s3_2013	-0,12	-0,15	NS	0,17	0,12	0,29	0,11	-0,12	-0,18	NS	0,08	0,33		
s4_2013	NS	NS	NS	NS	NS	-0,13	NS	NS	NS	0,47	NS	NS	0,11	

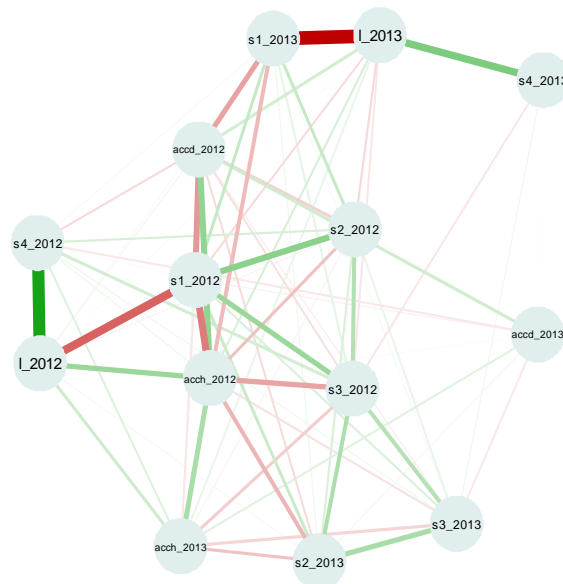


Figure 8. Réseau de corrélations de Pearson entre les données annuelles de débourrement et de croissance en 2012 et 2013, pour les 1512 arbres phénotypés (accroissement en diamètre, *accd*, mm, accroissement en hauteur, *acch*, cm, degrés-jours cumulés au cours du cycle, *lbb* (noté *l*), base 10°C, entrée en stade, *s1* à *s4*, degrés-jours en base 10°C). Seul les coefficients significatifs (*p*value <0.01) sont indiqués. Les corrélations négatives sont en rouge, les corrélations positives en vert, et l'épaisseur dépend de l'intensité de la relation entre les variables.

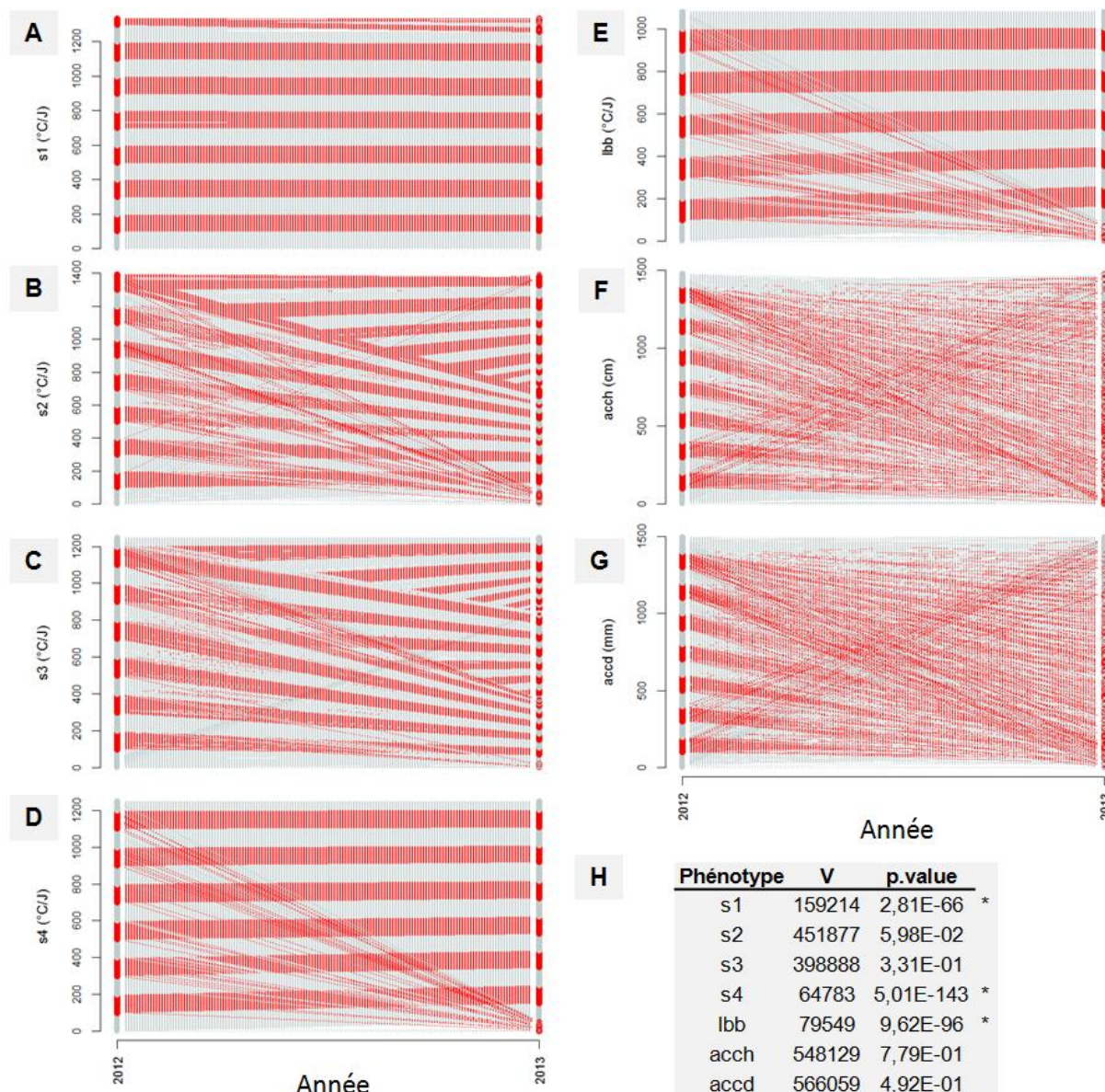


Figure 9. Mise en évidence des variations de classement des individus pour chaque phénotype testé en 2012 et 2013. De **A** à **G**: entrées en stades 1 à 4 (notés s1 à s4, en °C/Jour cummulés depuis le premier janvier de l'année en cours), cycle de débourrement (lbb, en °C/Jour cummulés entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4), accroissement en diamètre (accd, mm), accroissement en hauteur (acch, cm). Les arbres sont classés 1 à n (n variant selon le trait), des valeurs les plus faibles vers les valeurs les plus fortes (ex. pour les stades de débourrement, l'arbre classé 1 est celui qui entre dans le stade avec le moins de °C/Jour cummulés et pour l'accroissement en hauteur, l'arbre classé 1 est celui qui a le plus faible accroissement annuel). Les classements des individus sont reliés par des lignes entre 2012 et 2013 pour mettre en évidence les changements de classement. Les valeurs de classement sont regroupées par groupes de 100 individus (groupement arbitraire) et colorées alternativement en rouge et gris pour mieux visualiser les trajectoires. **H.** Tests signés de Wilcoxon (échantillons appariés) appliqués aux classements 2012 et 2013 pour chaque phénotype. La valeur du test (V) et la p-value associée sont indiquées. Les p-value <0.05 indiquent que les deux séries ne sont pas statistiquement différentes et sont indiquées par des étoiles.

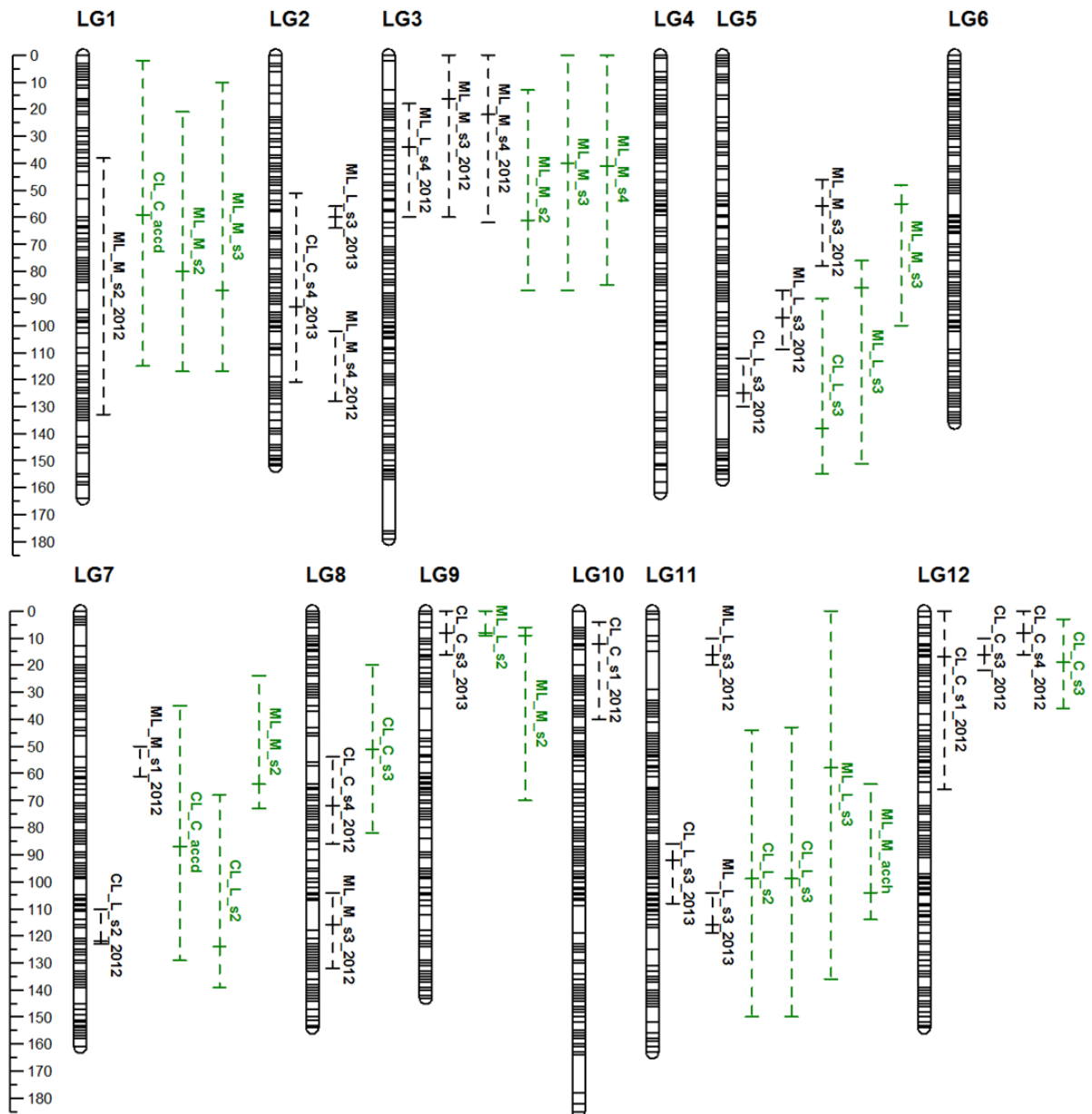


Figure 10. QTL (Quantitative Trait Loci) détectés pour les traits de croissance et de débournement : accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm, degrés-jours cumulés au cours du cycle, lbb, base 10°C et entrée en stade, s1 à s4, degrés-jours en base 10°C. Les groupes de liaison sont notés LG et représentent les chromosomes du pin maritime (de 1 à 12). Les groupes présentés ici sont ceux de la carte consensus (CLMmean) décrite dans le chapitre VI. La longueur des groupes (en cM) est indiquée en bas à gauche. Les QTL sont projetés sur les groupes consensus, à droite du groupe. La position pour le pic de LOD et l'intervalle de confiance à 95% du QTL sont indiqués par une ligne pointillée et un tiret horizontal, respectivement. Le nom du QTL est composé comme suit : nom du croisement (CL ou ML), nom du parent (C, L ou M), nom du phénotype, années de mesure (2012 ou 2013). Les QTL détectés en environnement simple et en multi-environnement sont représentés en noir et vert respectivement (voir détails dans le matériel et méthodes).

une plasticité moyenne à faible pour les traits de débourrement (Figure 9 A à E) avec des classements très conservés pour les stades 1, 4 et la durée du cycle (s1, s4 et lbb, Figure 8 A, D et E) et des changements modérés pour les stades 2 et 3 (s2 et s3 et Figure 9 B et C). On observe au contraire une plasticité forte pour les accroissements avec des changements de classements importants, significatif d'après le test de rank signé de Wilcoxon (Figure 9 F, G et H). Ces tendances sont par ailleurs confirmées dans chaque croisement (données non présentées).

IV.III.VII QTL des traits de débourrement

La détection de QTL a été réalisée sur les données de génotypage/phénotypage propres à chaque croisement. Les QTL ont ensuite été projetés sur la carte consensus CLMmean pour observer les co-localisations de QTL entre parents, croisements et années. Etant donné que la détection de QTL a été faite séparément pour chaque parent et au sein de chaque croisement, plusieurs QTL peuvent correspondre aux mêmes gènes. Deux QTL seront considérés comme communs si l'intervalle de confiance du premier contient le pic de LOD du deuxième QTL. Les intervalles de confiance étant souvent très larges autour des QTL on pourrait également considérer que des QTL situés sur le même chromosome sont communs même si leur position est décalée sur le chromosome. Seuls des modèles à 1 QTL ont été appliqués ici car dans tous les cas, les profils de LOD montraient des pics uniques.

La détection de QTL par la méthode simple environnement donne un total de 22 QTL, à un seuil de détection de 10% génome, pour les traits de débourrement repartis sur 10 LG (LG1, LG2, LG3, LG5, LG7, LG8, LG9, LG10 et LG11) (Figure 10 en noir et Tableau 9). Les QTL expliquent une part de variance faible qui varie de 1% à 4%. L'analyse de ces traits en multi-environnement a permis de détecter 17 QTL (Figure 10 en vert et Tableau 10). Nous détaillons ci-dessous la liste des QTL détectés par groupe de liaison :

- LG1: 1 QTL de s2 en 2012 est détecté pour le parent M du croisement ML. Ce QTL est confirmé par la détection multi-environnements et colocalise avec un QTL lié à s3 pour le parent M de croisement ML.
- LG2: 3 QTL sont détectés, 2 pour s4 (pour C dans le croisement CL et M dans le croisement ML) et 1 pour s3 (pour L dans le croisement ML). Ces QTL semblent éloignés les uns des autres.
- LG3: il possède un point chaud dans lequel on observe 2 QTL pour s4 (pour L et M dans le croisement ML) et 1 QTL pour s3 détectés sur les données de 2012. Ces QTL sont confirmés par la détection multi-environnements et colocalisent avec un QTL pour s2, s3 et s4 sur le parent M de ML.
- LG5: on peut noter deux zones de QTL pour les données de s3 en 2012. Les 2 QTL sont liés au parent L (dans les croisements CL et ML, avec des optimums légèrement décalés) et 1 QTL est détecté pour le parent M dans le croisement ML. Ces QTL sont confirmés par la détection multi-environnements.

Tableau 9. QTL détectés en selon la méthode simple environnement (voir matériel et méthode) pour les traits de débourrement et de croissance : degrés-jours cumulés au cours du cycle, lbb, base 10°C et entrée en stade, s1 à s4, degrés-jours en base 10°C accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm. Pour chaque QTL, les informations suivantes sont présentées : croisement (Croisement CL ou ML), nom du parent (Parent C, L ou M), nom du phénotype, années de mesure (Année, 2010 à 2013, selon les phénotypes, voir tableau 2), nombre d'observation (NBr obs), groupe de liaison (LG), position du pic de LOD (position, cM), intervalle de confiance bayésien à 95% (BCI, cM), valeur du pic de LOD, p-value à 10% génome (Pvalue) et pourcentage de variance expliqué par le QTL (%var).

Croisement	Parent	Phénotype	Année	Nbr obs	LG	position (cM)	BCI (cM)	LOD	Pvalue(Chi2)	%var
ML	M	s2	2012	449	1	133	[38,34-132,6]	3,03	1,85E-04	3
ML	L	s3	2013	282	2	160	[156-164]	3,26	4,25E-03	3
ML	M	s4	2012	445	2	128	[102,15-128,15]	2,95	5,40E-02	1
CL	C	s4	2013	431	2	93	[50,92-121,2]	2,60	5,18E-02	1
ML	M	s3	2012	450	3	16	[0-60]	5,16	5,48E-05	4
ML	L	s4	2012	445	3	34	[17,53-59,53]	2,95	1,13E-03	2
ML	M	s4	2012	445	3	22	[0-62]	3,38	3,15E-04	3
CL	L	s3	2012	448	5	125	[112-130]	3,71	8,32E-05	3
ML	L	s3	2012	450	5	97	[87,17-109,17]	3,33	1,89E-04	3
ML	M	s3	2012	450	5	56	[46-78]	3,24	1,36E-03	2
ML	M	s1	2012	424	7	61	[50-61]	3,39	4,47E-04	3
CL	L	s2	2013	438	7	122	[110-122]	3,68	1,13E-04	3
ML	M	s3	2013	450	8	116	[103,89-131,89]	2,79	1,02E-02	1
CL	C	s4	2012	448	8	72	[54,19-86,19]	3,61	2,38E-04	3
CL	C	s3	2013	431	9	8	[0-16]	3,00	1,13E-02	1
CL	C	s1	2012	375	10	12	[4-40]	3,19	1,26E-04	4
ML	L	s3	2012	450	11	16	[10-20]	3,36	1,06E-04	3
CL	L	s3	2013	431	11	92	[86-108]	3,25	1,10E-04	3
ML	L	s3	2013	282	11	116	[104-119]	3,40	9,21E-04	4
CL	C	s1	2012	375	12	17	[0-66]	3,17	1,33E-04	4
CL	C	s3	2012	448	12	16	[10-22]	5,06	1,40E-06	5
CL	C	s4	2012	448	12	8	[0-16]	2,88	2,70E-04	3

Tableau 10. QTL détectés en selon la méthode multi-environnement (voir matériel et méthode) pour les traits de débourrement et de croissance : degrés-jours cumulés au cours du cycle, lbb, base 10°C et entrée en stade, s1 à s4, degrés-jours en base 10°C accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm. Pour chaque QTL, les informations suivantes sont présentées : croisement (Croisement CL ou ML), nom du parent (Parent C, L ou M), nom du phénotype, groupe de liaison (LG), position du pic de LOD (position, cM), intervalle de confiance à 95% (CI, cM), valeur du pic de LOD, p-value à 1% chromosome (p-value).

Croisement	Parent	Phénotype	LG	Position (cM)	CI (95%)	LOD	p-value (H1:H0)
CL	C	accd	1	59	[2-115]	4.50	0.0115
ML	M	s2	1	80	[21-117]	6.46	0
ML	M	s3	1	87	[10-117]	6.45	0.015
ML	M	s2	3	61	[12-87]	4.26	0.012
ML	M	s3	3	40	[0-87]	5.55	0.001
ML	M	s4	3	40	[0-85]	4.74	0.001
CL	L	s3	5	138	[90-185]	7.33	0
ML	M	s3	5	55	[48-100]	5.29	0.011
ML	L	s3	5	85	[76-151]	4.19	0.002
CL	C	accd	7	87	[35-129]	5.84	0.01
CL	L	s2	7	124	[69-139]	4.02	0.007
ML	M	s2	7	63	[24-73]	4.34	0.001
CL	C	s3	8	51	[20-82]	4.19	0.004
ML	M	s2	9	9	[6-69]	5.78	0.001
ML	L	s2	9	8	[0-9]	4.93	0.006
ML	M	acch	11	104	[64-114]	6.19	0
CL	L	s2	11	99	[44-150]	3.89	0.011
CL	L	s3	11	99	[43-150]	4.37	0.003
ML	L	s3	11	58	[0-136]	5.07	0
CL	C	s3	12	19	[3-36]	7.12	0

LG7: il porte 1 QTL pour s2 pour le parent L dans le croisement CL en 2012, confirmé en multi-environnements. Il porte également un QTL lié à s1 pour le parent M dans le croisement ML, qui n'est pas confirmé en multi-environnements mais coïncide avec un QTL pour s2 sur le même parent (M de ML). LG8: on observe la présence d'1 QTL lié à s3 en 2012 pour M dans ML et 1 QTL pour s4 en 2012 pour C dans le croisement CL. Ce dernier QTL colocalise avec un QTL pour le stade s3 sur le même parent (C de CL) en multi-environnements. LG9: il porte 1 QTL pour le stade s3 en 2013 (C de CL) qui colocalise avec 2 QTL détectés en multi-environnements pour le stade s2 dans le croisement ML (parents L et M). LG10: 1 QTL est détecté pour le stade s1 en 2012 pour le parent C de CL sur le LG10. LG11: on observe 2 QTL liés au stade s3 en 2013 (pour le parent L dans les 2 croisements), confirmés en multi-environnements. Ces QTL colocalisent avec un QTL lié à s2 pour le même parent (L) en multi-environnements. 1 QTL pour s3 est détecté sur les données de 2012 pour le parent L dans le croisement ML dans une autre région; l'intervalle de confiance autour du QTL lié à s3 dans le croisement ML en multi-environnements est certainement augmenté par la présence de ce deuxième QTL. LG12: il comporte un point chaud détecté pour le parent C du croisement CL pour les données de 2012. Ces QTL sont en lien avec les stades s1, s3 et s4 mais seul le QTL lié au stade s3 est confirmé en multi-environnements.

IV.III.VIII QTL des traits de croissance

La méthode simple environnement n'a pas permis de détecter de QTL pour les traits d'accroissements à un seuil de détection de 10% génome (Tableau 9).

L'analyse des accroissements en multi-environnement a cependant permis de détecter 3 QTL (Figure 9). 2 QTL sont détectés pour l'accroissement en diamètre (accd) sur les groupes de liaison LG1 et LG7 chez le parent C du croisement CL et 1 QTL est détecté pour l'accroissement en hauteur (acch) pour le parent M du croisement ML sur le le LG11 (Tableau 10). Ces trois locus sont communs avec des QTL de débourrement : accd avec s2 et s3 sur le LG1, accd avec s1 2012 et s2 sur le LG7, acch commun avec s2 et s3 sur LG11. Leurs intervalles de confiance sont également très importants.

IV.IV Discussion

Dans ce chapitre, nous avons étudié le niveau de variabilité du débourrement et de la croissance au sein et entre trois descendance de plein-frères (CL, ML et CM) de pins maritimes et testé les interactions génotype x environnement. L'architecture génétique de ces traits a également été étudiée à partir de deux croisements (CL et ML) en fonction de variations environnementales, représentées par des années climatiques contrastées (2012 et 2013), notamment pendant la période du débourrement.

IV.IV.I Cartographie génétique

La construction d'une carte génétique permet d'aborder l'architecture génétique d'un caractère complexe. Le génotypage des 2 croisements de pin maritime étudiés ici a permis de générer des cartes génétiques représentative d'une large fraction du génome en vue de la détection de QTL. En parallèle, La recherche d'une mise en commun des données de cartographie issues du génotypage des croisements CL, ML et CM par la puce 9k a permis déconstruire un outil de représentation commun: la carte CLMmean (cf chapitre VI). Cette carte permet de représenter les positions relatives de 2308 SNP et d'envisager l'analyse des colocalisations de QTL détectés dans des croisements différents, sur la base des marqueurs communs entre cartes. Les tests de régression sur les positions de marqueurs entre les cartes ont montré que l'intégration des SNP génotypés au sein de la carte consensus n'a pas modifié l'ordonnancement et la distance entre marqueurs ; contrairement aux résultats d'études précédentes basées sur d'autres approches et moins de marqueurs communs (Sewell *et al.* 1999 ; Brown *et al.* 2001, 2003 ; Krutovsky *et al.* 2004). La carte CLMmean semble donc être un outil très robuste pour la représentation des positions des QTL détectés dans les 4 cartes parentales de cette étude.

IV.IV.II Déterminisme génétique et environnemental du débourrement et de la croissance

L'observation des données de débourrement a montré que leur distribution ne suit pas toujours une loi normale dans notre essai. Ceci est une conséquence de la méthode de notation en classes et du nombre de passage : un nombre de passage plus important (tous les jours) permettrait de préciser les mesures, voire même d'ajuster un modèle sur les données afin d'obtenir une distribution normale. Nous avons cependant confirmé les résultats obtenus dans ce chapitre par des tests non paramétriques, tant pour les modèles appliqués aux données phénotypiques que pour les modèles de détection de QTL.

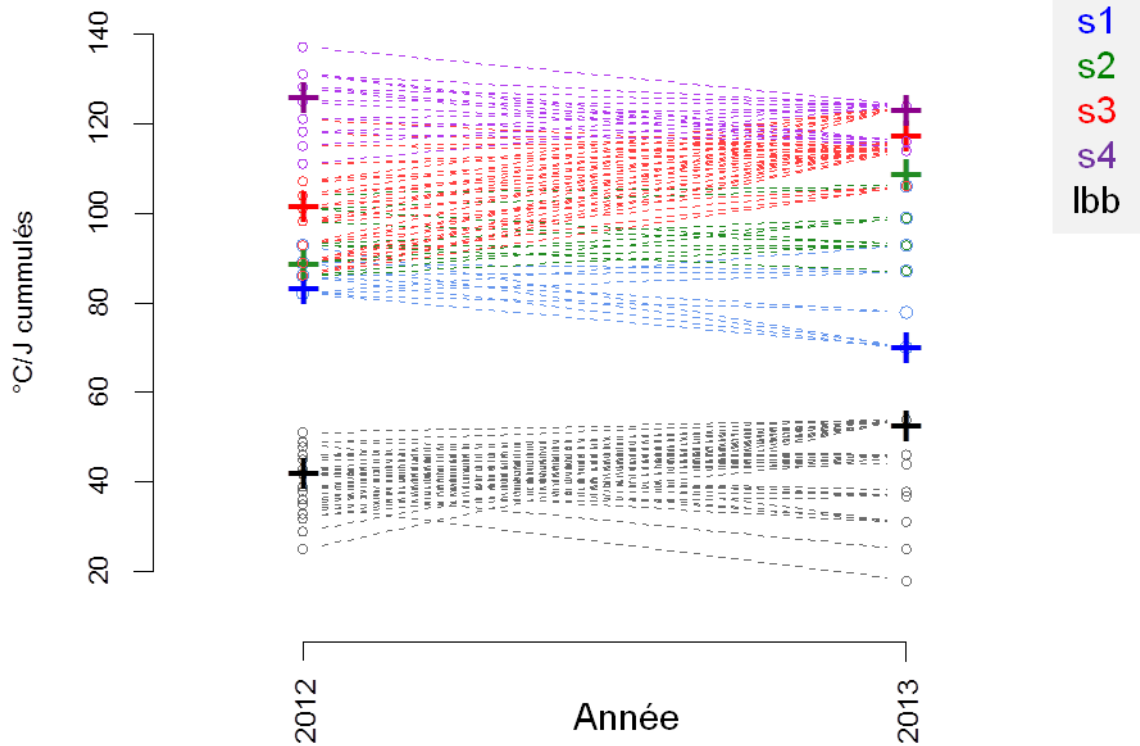


Figure 11. Données phénotypiques pour les années 2012 et 2013: les cercles représentent les valeurs de chaque individu et les moyennes annuelles sont représentées par des croix rouges. Pour les variables : entrées en stades 1 à 4 (en °C/Jour cummulés depuis le premier janvier de l'année en cours) et cycle de débourrement (en °C/Jour cummulés entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4), valeurs s1 en bleu, s2 en vert, s3 en rouge, s4 en violet et lbb en gris.

Dans cette étude, la température a été suivie et convertie en degrés-jours cumulés (en base 10°C) sur deux années climatiques contrastées. Les sommes de précipitations journalières sont plus importantes en 2013 qu'en 2012, avec un pic en début de saison de végétation (écodormance) ce qui a pour conséquence une entrée des bourgeons en turgescence (entrée en stade 1) beaucoup plus précoce en 2013 qu'en 2012. L'année 2012 est aussi caractérisée par une période de températures négatives (jusqu'à -5,7°C de moyenne journalière) en Février (donc en pleine phase d'écodormance), absente en 2013. L'année 2012 cumule donc deux attributs négatifs pour un débourrement précoce! A contrario, l'accumulation de degrés-jours est très inférieure dans la période du 15 Mai au 30 Juillet 2013 par rapport à 2012, période qui correspond au développement des bourgeons et des axes primaires.

La littérature montre que le débourrement d'espèce caducifoliées nécessite une quantité de froid en hiver (appelée « chilling requirement ») pour lever l'endodormance, associée à des températures de printemps dites de « forcing » ou « heat requirement » pour lever l'écodormance (Vitasse 2009). Les données obtenues ici semblent suivre cette logique, en tout cas pour la phase de forcing. En effet, un décalage majeur entre années est observable pour l'entrée en stade 1. Elle est plus précoce en 2013 car les arbres n'ont pas subi de froids tardifs comme en 2012. Par contre, pour l'entrée en stade 2: 89 DJ sont nécessaires en 2012 contre 109 DJ en 2013 en moyenne sur les trois croisements testés car en 2013 la somme des températures est inférieure à celle de 2012. En juin, les plus fortes précipitations de 2013 contribuent certainement à une accélération des passages de s2 à s3 puis de s3 à s4. Au final, cette étude permet pour la première fois de documenter le fort effet du climat sur les traits de débourrement chez le pin maritime au stade jeune (Figure 11). Cette forte plasticité est confirmée par les carrés moyens élevés du facteur année "an" dans le modèle mixte, comparée à ceux associés aux autres effets fixes ("cross" et "cross:an").

Même si les effets "cross" et "an:cross" sont significatifs, ils semblent négligeables par rapport à l'effet environnement, ce que confirme également à la fois 1/ les patrons similaires entre les trois croisements des normes de réaction, 2/ les faibles carrés moyens associés à ses effets fixes, et 3/ la faible part de variance apportée par l'effet individuel dans le modèle mixte par rapport à la variance résiduelle. Au final, cette étude permet de conclure sans équivoque sur un déterminisme largement contrôlé par l'environnement ainsi qu'une plasticité qui ne semble pas sous contrôle génétique fort (cf conservation des rangs à la Figure 9) à contrario de la croissance. L'étude de la variabilité génétique *sensu stricto* pourra être précisée grâce à l'analyse d'un dispositif expérimental plus adapté. Il s'agit d'un test de provenances comprenant 512 génotypes de 35 populations de l'aire naturelle du pin maritime (voir le détail à <https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Recherche/Sites-experimentaux/CLONAPIN>).

Ces arbres ont été clonés en moyenne 8 fois dans le cadre d'une collaboration avec l'INIA et SERIDA en Espagne, élevé en pépinière à Pierroton en 2011, puis plantés sur le domaine en 2012. Ils ont alors été mesurés pour les mêmes traits de débourrement en 2013 (campagne de mesure à laquelle j'ai participé) puis en 2014.

La littérature donne de nombreux exemples de l'effet de l'écotype pour le débourrement. Généralement les populations d'arbres des climats froids débourrent plus tôt que les populations des climats plus chauds lorsqu'on les rassemble sur le même site expérimental. C'est le cas pour la plupart des conifères (Wright, 1976; Morgenstern, 1996; Worrall, 1983 ; Acevedo-Rodriguez *et al.* 2006) et le hêtre (Chmura et Rozkowski, 2002; Von Wuehlisch *et al.* 1995; Vitasse *et al.* 2009b). Mais la tendance inverse est observée chez les chênes, (Kriebel *et al.* 1976; Kremer, 1994; Deans et Harvey, 1995; Ducouso *et al.* 1996; Jensen et Hansen, 2008) pour lesquels les populations du nord de l'aire ou de haute altitude débourrent plus tard que celles du sud ou de basse altitude.

La durée du cycle ($^{\circ}\text{C}/\text{J}$ cumulés entre l'entrée en stade 1 et l'entrée en stade 4) est fortement négativement corrélée à l'entrée en turgescence (-0.55 en 2012, -0.87 en 2013) et positivement corrélée à l'apparition des aiguilles pour les deux années suivies (0.79 et 0.47 en 2012 et 2013 respectivement). Ces corrélations sont dues à la nature même de la variable. L'entrée en turgescence des bourgeons initie le cycle de débourrement, dont la durée dépend ensuite de la quantité de degrés jours cumulés permettant les transitions de stades, jusqu'à l'apparition des aiguilles. Cette durée de cycle est également corrélée positivement à la croissance (surtout en hauteur) des individus notamment en 2012 qui présentait des températures plus favorables de mai à juillet.

La variation phénotypique des traits de croissance est conforme à celle décrite dans la littérature (Debzac 1974 ; Kremer 1981 et Harfouche *et al.* 1995): une forte variabilité (coefficients de variation $> 20\%$) avec des accroissements (surtout en hauteur) contrastés entre familles. Les effets croisement (cross), année climatique (an) et leur interaction (cross : an) sont significatifs mais encore une fois le carré moyen de l'effet année est très important par rapport à celui des deux autres effets. La variance de l'effet individuel est modérée mais contrairement aux traits de débourrement, l'effet individuel seul est significatif lorsqu'il est traité en effet fixe. Par ailleurs, on observe des changements de classement très importants entre les deux années testées, ce qui traduit une forte interaction avec l'environnement. On peut donc conclure raisonnablement à une forte sensibilité à l'environnement de la croissance au jeune âge et un contrôle génétique de cette plasticité. Encore une fois, notre dispositif expérimental reste peu adapté pour estimer la variabilité génétique sensu stricto de la croissance, mais les données de la littérature montrent une forte différenciation des écotypes de pin maritime (Desprez-Loustau et Dupuis 1994).

IV.IV.III Architecture génétique du débourrement et de la croissance

Des études, ayant pour objectif de disséquer l'architecture génétique du débourrement, ont été conduites sur différentes espèces d'arbres avec des effectifs généralement faibles (de l'ordre de la centaine de génotypes, Tableau 12). Dans le cas présent nous avons souhaité appuyer nos résultats sur une analyse menée avec des effectifs plus importants (plus de 400 génotypes par famille) en considérant la variabilité génétique (deux fonds génétiques) et environnementale (deux années).

Les résultats de la littérature indiquent un contrôle de type oligogénique pour le débourrement: avec de 6 à 31 régions du génome détectés selon les espèces étudiées (Frewen *et al.* 2000; Jermstad *et al.* 2003; Tsarouhas *et al.* 2003; Casasoli *et al.* 2004; Scotti-Saintagne *et al.* 2004; Derory *et al.* 2010). Chez le pin sylvestre par exemple 4 QTL ont été détectés avec un pourcentage de variance expliqué variant de 3% à 13% (Hurme *et al.* 2000). Lorsque plusieurs fonds génétiques (chez le douglas par exemple, Jermstad *et al.* 2001) et plusieurs années voire sites d'étude (chez le chêne par exemple, Derory *et al.* 2010) ont été considérés, les résultats montrent que les QTL détectés ne sont pas stables entre conditions. Chez le sapin de Douglas le nombre de QTL qui contrôlent le débourrement varie entre années et entre populations: entre 1 et 5 QTL ont été détectés pour une population donnée, expliquant entre 2% et 12% de la variance phénotypique.

Des études récentes en génomique fonctionnelle ont par ailleurs montré qu'un réseau de gènes complexe est impliqué dans la formation du bourgeon avec des groupes de gènes régulés de manières différentes de l'entrée à la levée de la dormance (Ruttink *et al.* 2007; Ophir *et al.* 2009; Kayal *et al.* 2011). Chez les fagacées (chêne et hêtre) deux études récentes (Lesur *et al.* 2015a, b) ont clairement mis en évidence des réseaux de gènes très différents qui sont activés juste avant et pendant le débourrement. Les QTLs détectés sur des groupes différents du parent CL_C pour les stades s1 à s4 vont dans ce sens (LG10 pour s1, LG 9 pour s3 et LG 8 pour s4). Pour autant d'autres QTL semblent stables entre stades (ex: CL_C_s1,s3,s4_2012 sur le LG12; ML_M_s2, s3, s4 sur le LG3 en multi-environnement, ce qui est cohérent avec les coefficients de corrélation certes faibles mais positifs entre stades, voire entre années. Ces résultats donnent donc l'image d'une architecture génétique complexe avec de nombreux gènes à effets mineurs influant sur le phénotype dont certains sont stables et d'autres spécifiques de tel ou tel stade

Par ailleurs, notre étude a permis de montrer que la majorité des QTL détectés est spécifique d'un des croisements ce qui montre la variabilité de l'architecture génétique des traits de débourrement en fonction du fond génétique (ici corse versus marocain, le père landais étant commun aux deux croisements). De même on observe de nombreux QTL spécifiques de l'année testée, indiquant la sensibilité des QTL aux variations du climat, ce qui est cohérent avec l'analyse du phénotype. L'analyse des données par un modèle multi-environnement montre que certains QTL

Tableau 12. Exemples d'études sur l'architecture génétique du débourrement chez les arbres. Les effectifs utilisés, le nombre de populations testées (nbre de pop), les nombre d'environnements testés (nbre d'environnements) et les résultats obtenus sont indiqués.

Article	Espèce	Effectif (individus)	Nbre de pop	Nbre d'environnement	Résultats
Casasoli <i>et al.</i> 2004	<i>Castanea sativa</i> Mill.	152	1	1 année x 1 site	35 QTL , chaque QTL explique 4.2% à 17.1% de la variance phénotypique.
Celton <i>et al.</i> 2011	<i>Malus</i>	123+271	2	6 années x 1 site	4 QTL, chaque QTL explique 9.9% à 21,6% de la variance phénotypique.
Derory <i>et al.</i> 2010	<i>Quercus petraea</i>	278	1	6 années x 2 sites +1 année x 1site	19 QTL qui expliquent chacun plus de 12% de la variance phénotypique.
Frewen <i>et al.</i> 2000	<i>Populus</i>	334 + 331	2	1 année x 1 site	13 QTL qui expliquent entre 5.9% et 16.8% de la variance phénotypique.
Jermstad <i>et al.</i> 2003	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	224 + 78	2	4 années x 2 sites	33 QTL qui expliquent chacun moins de 8% de la variance phénotypique
Scotti-Saintagne <i>et al.</i> 2004	<i>Quercus robur</i> L.	278	1	1 année x 3 sites	32 QTL qui expliquent de 3% à 11% de la variance phénotypique.
Tsarouhas <i>et al.</i> 2003	<i>Salix iminalis</i> × <i>Salix schwerinii</i>	82	1	2 années	6 QTL qui expliquent de 12% à 24 % de la variance phénotypique.

sont spécifiques de l'une ou l'autre des méthodes de détection. Ce résultat indique à la fois que des effets trop faibles pour être détectés sur une année sont détectables quand on considère plusieurs années et va également dans le sens d'une forte variabilité de l'architecture génétique des traits en fonction des environnements climatiques.

Quant aux traits d'accroissement, les résultats sont assez décevants. L'analyse par année séparées n'a pas permis de détecter de QTL à un seuil de 10% génome pour les accroissements en 2012 et 2013 (diamètre et hauteur). L'analyse des traits de croissance en multi-environnement détecte cependant 3 QTL, communs avec ceux détectés pour les traits de débourrement.

Pour conclure, nous avons pu détecter des QTL impliqués dans le contrôle d'un trait majeur pour l'adaptation du Pin maritime au changement climatique. Le débourrement présente une architecture génétique complexe, avec de nombreux QTL à effets faibles qui présentent une variabilité en fonction du fond génétique et de l'environnement climatique.

V Genetic architecture of phenotypic plasticity in trees: wood formation in maritime pine as a study case.

Abstract

Perennial plants have to face many environmental changes during their long life time. Coupled with their sessile nature, such feature has stimulated phenotypic plasticity as a key adaptation mechanism in these organisms. In temperate regions, within-ring fluctuation and especially the alternation of earlywood EW (tracheids with wide lumen and narrow wall, in conifers) and latewood LW (narrower lumen and thicker wall, i.e. higher density tracheids) is one of the most spectacular expression of such dynamic response to seasonal variation of temperature, day-length and rainfall. The dimension (width, area) and properties (at the anatomical, chemical and mechanical levels) of EW and LW have been shown to be genetically determined, but little has been done to explore the genetic architecture (number, position and effect of major quantitative trait loci, QTL) of this adaptive plastic response.

In this study, we analyzed the seasonal variation of the genetic architecture of vascular cambium activity (inferred from the analysis of cumulative EW and LW radial growth) and tracheid differentiation (inferred by EW and LW density). We used a three-generation inbred pedigree with almost 500 trees to detect QTLs with a high statistical power. Microdensity profiles were generated from incremental cores to estimate EW and LW ring area and density for cambial ages 7 to 12. The Illumina Veracode and MassArray assay technologies were used to genotype the offspring. A saturated linkage map was constructed with JoinMap v4.1 using SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers segregating in the 1:2:1 Mendelian ratio. The composite interval mapping (CIM) and Multiple Interval Mapping (MIM) procedure, implemented in R-qt1 and MultiQTLV2.6, were used for single and multiple annual ring analyses respectively. QTL could be categorized into two groups: i/ co-locating QTLs between EW and LW indicating the presence of key molecular factors involved in xylogenesis regardless of environmental conditions, ii/ specific QTLs for EW or LW, revealing wood formation to be regulated by different genes (trigger by the environment) or the same set of genes responding differentially to seasonal climatic variation. With respect to ring area QTLs, we hypothesized that these genes could control the rate of cambial cell division and duration of daughter cell radial expansion. With respect to ring density, we suggested the presence of genes

controlling the duration of secondary cell wall thickening as well as genes involved in cell death programming. The differential expression analysis of transcripts/proteins in EW versus LW forming tissues will further provide functional information into the nature of the genes controlling in this plastic response.

V.I Introduction

The current interest for phenotypic plasticity lies in the necessity for predicting the populations responses to climate change (Potvin et Tousignant 1996; Rehfeldt *et al.* 2001). For planted forest generated from breeding programs, a better understanding of phenotypic plasticity and of its genetic background could help indentifying traits with a greater heritability, by isolating the variance linked to genotype x environnement interaction. A better understanding of phenotypic plasticity could improve the genetic gain associated to selection process.

The most evident structure of phenotypic plasticity in a temperate tree ring, especially in conifers, is the earlywood-latewood succession. Wide-lumen and narrow-wall EW cells are formed during the comparatively fresh and humid opening of the growing season. Narrow lumen and thick-wall LW cells are formed during the second part of the growing season, when temperature increases and water availability and day-length decrease. Recent studies of the dynamic of wood formation have revealed close relationships between intra-annual variation of wood anatomy and of wood density and radial growth (Cuny *et al.* 2012). Different factors control the dynamics of wood formation. Xylem microcoring experiments have shown that maximum day-length coincides with maximum growth rate in *Fagus orientalis* (Oladi *et al.* 2011), in *Araucaria angustifolia* (Oliveira *et al.* 2009) and in *Picea*, *Pinus*, *Abies* and *Larix* in temperate and boreal zones (Rossi *et al.* 2006). Controlled-condition experiments in *Pinus radiata* have shown that EW tracheids are formed during long-days while LW tracheids are formed during short-days (Jenkins *et al.* 1977). Precipitation and temperature, also affect wood quality attributes (e.g., ring width and proportion of earlywood and latewood). Ring density and climate variable relationships have been reported on for a number of species (Brix 1972; Nicholls and Wright 1976; Robertson and Jozsa 1988; Franceschini *et al.* 2012). The latewood proportion within a growth ring strongly governs its wood density (Kubo and Jyodo 1996). Timing of the transition from earlywood to latewood is significant in determination of this proportion.

Wood core X-ray microdensitometry provides reliable estimates of wood density measurements without tree destruction (e.g., Decoux *et al.* 2004). Different wood quality components can thus be analysed: wood density and ring width of each ring or ring part. The dimension (width, area) and properties (at the anatomical, chemical and mechanical levels) of EW and LW have been shown to be genetically determined (Almeida *et al.* 1998; Pot *et al.* 2006; Wimmer 1997), but little has been done to explore the genetic architecture (number, position and effect of major quantitative trait loci, QTL) of this adaptive plastic response.

The objectives of the present study were to detect, to localise and to estimate the effects of QTLs controlling wood quality components assessed by microdensitometry and their interaction with environmental variation. Wood density components of individual growth rings were obtained from microdensitometric profiles measured with a direct reading X-ray densitometer in a F2 progeny of maritime pine. We analyzed the seasonal variation of vascular cambium activity (inferred from the analysis of ring width and percentage of late wood) and tracheid differentiation (inferred by EW and LW density) in two steps: (1) the phenotypic variation of the traits and (2) their genetic architecture according to environmental variation.

V.II Material and method

V.II.I Genetic material

The mapping population consisted of a three-generation inbred pedigree (F2) obtained by the self pollination of a “Landes x Corsica” inter-provenance hybrid (accession H12 resulting from a control cross between L146 and C10 genotypes). A total of 638 seeds were planted in a nursery in June 1998 and 626 transplanted into the field (Lacanau de Mios, France) in March 1999 (plantation density 4m x 2m, 0.51 ha). After 10 years, 565 F2s were still available for analysis. A total of 477 offspring were genotyped according the method described in Chapter II. It is briefly summarized below.

V.II.II DNA extraction

Young needles of each offspring were harvested on 10 year-old trees and conserved at -80°C before DNA extraction. Pieces of frozen needles (around 30 - 40 mg) were crushed using a mixer mill (Retsch MM300, Haan, Germany). Isolation of genomic DNA was performed using Invisorb DNA plants 96 kit from Invitex (GmbH, Berlin, Germany) following kit's specific instructions. All concentrations were measured using nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and the fluorescence assay (Quant-IT kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All samples with concentrations above 50 ng/μl (based on fluorescence measurements) were kept for either Veracode assay on the beadExpress platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) or iPLEX assay on the Mass-array platform (Sequenom, San Diego, CA, USA).

V.II.III Design of SNP assays, genotyping and scoring

Two medium-throughput genotyping technologies were used to genotype the F2 trees: VeraCode from Illumina (San Diego, CA, USA) and MassARRAY iPLEX from Sequenom (San Diego, CA, USA). The genotyping was carried out at the Genome-Transcriptome facility of Bordeaux (France) where these two platforms are available.

V.II.III.I VeraCode assay

Two 384-SNP assays were constructed with SNP derived from RNAseq data and from an already designed 1,536-GoldenGate SNP array (Chancerel *et al.* 2011). The flowchart of analysis to identify SNPs/Indels (1bp) informative in the H12 genotype (i.e. in the heterozygous state) is shown in additional file 1. For the selection of SNP derived from RNAseq data, we generated a composite cDNA library from total RNAs extracted from young and old needles, quiescent and swelling buds of

genotype H12, and produced 172,892 reads using the Roche 454 Titanium platform. These sequences (available under accession SRX031594 at NCBI short read archive: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX031594>) were cleaned using the Pyrocleaner tool developed by the Bioinformatics facility of Toulouse-Midi-Pyrénées (Mariette *et al.* 2011). This step consisted in removing short (<150bp) and long reads (>600bp), reads with a percentage of Ns (Ambiguous base calls) higher than 2%, low complexity regions, as well as duplicated reads. A total of 96,851 cleaned reads were obtained from which 79,179 were distributed into 18,038 contigs of the maritime pine unigene set (Chancerel *et al.* 2013, PineContig_v2). Then, a first Perl script, remove, (Lepoittevin *et al.* 2010) was used to remove the positions containing alignment gaps for all reads. A second script, snp2illumina, Lepoittevin *et al.* (2010) was used to extract SNPs and short INDELS of less than 7bp and output them as a SequenceList file compatible with the Illumina Assay Design Tool software (ADT, <http://www.illumina.com>). This file contains the SNP names and surrounding sequences with polymorphic loci indicated by IUPAC codes for degenerated bases for 114,244 SNPs in 9,241 contigs. Statistical data were generated regarding each SNP such as Minimum Allele Frequency (MAF), Minimum Allele Number (MAN), depth and frequencies of each nucleotide for a given SNP using the SNP_statistics perl script (Lang *et al.* 2009).

For the first 384-SNP assay (assay#1 in additional file 1), the parameters used to identify SNPs from RNASeq data were as follows: depth > 5, MAN > 1 and MAF > 20 % (Filter 1 in additional file 1). We only kept contigs with 1 or 2 SNPs (separated by at least 60 pb for contigs with 2 SNPs). A total of 404 SNPs were thus selected, from which 287 among the best Illumina scores (≥ 0.6) were retained, including 106 Indels. For the second 384-SNP assay (assay#2 in additional file 1), we used 3 different filters: Filter 2: depth > 6, MAN > 3 and MAF = 50% (corresponding to 49 SNPs), Filter 3: depth > 7, MAN > 3 and MAF ≥ 40 % (55 SNPs), and Filter 4: depth >8 (the most stringent in terms of coverage), MAN > 3 and MAF > 30% (198 SNPs). We kept contigs with only 2 SNPs per contig and Illumina score ≥ 0.5 . Indels were excluded and SNPs in the first 60 pb of the contig were discarded. Overall, 302 SNPs were thus selected.

For the selection of SNPs from the already designed 1536-GoldenGate SNP-array (Chancerel *et al.* 2011), a total of 179 SNPs segregating in the same F2 pedigree and already localized in H12 map were divided into the two assays, as follows: i/ 97 SNPs were included in assay#1. These SNPs were selected based on linkage group coverage (even distribution) and best illumina scores, and ii/ the remaining 82 SNPs were included in assay#2. We used BlastN (BlastN, Evalue=10⁻⁴) analysis to avoid overlapping between these 179 SNPs and in silico SNPs extracted from the Pine_contigV2.

The Illumina Veracode technology (Illumina Inc.) was used to carry out the genotyping reactions in accordance with the manufacturer's protocol (Lin *et al.* 2009). Reactions were carried out using

250ng of template DNA per sample. The analysis of the data was realized with the BeadStudio software (Illumina Inc.), as described by Lepoittevin *et al.* (2010). Clusters were visually inspected to ensure high quality data.

V.II.III.II MassARRAY iPLEX assay

A total of 102 SNPs whose positions in the H12 map was already known (Chancerel *et al.* 2013) and complementary to that of the markers of the VeraCode assay, were selected and included in four multiplexes according to the MassArray assay design software v4.1 (Sequenom). Two multiplexes (totalizing 34 SNPs) were already developed by Chancerel *et al.* (2013) and showed that the iPLEX GOLD method was highly reproducible. Two new multiplexes (with 36 and 32 SNPs) were designed for this study. A total of 15 ng of DNA was required for each reaction. The genotyping was carried out using the iPLEX Gold genotyping kit (Sequenom) following manufacturer's instructions. Alleles were automatically assigned by the MassArray TyperAnalyser 4.0.22 software and associated to a reliable value.

Positive (hybrid parent of the F2 mapping population) and negative controls were added during the genotyping process in order to detect any problem. Visual inspection of all the SNP was performed in order to identify any incorrect assignments made by the "Autocluster" option of the MassArray Typer Analyser software.

V.II.IV Linkage mapping procedure

The map of the inter provenance hybrid tree (H12) that was selfed to generate the F2 mapping population was constructed based on the two different SNP assays described above. All polymorphic markers segregated 1:2:1 in the progeny (heterozygous in the F1 parent) and locus segregation was tested for goodness of fit to expected Mendelian segregation ratio using Chi-2 test ($P \leq 0.01$). The mapping procedure followed that of Chancerel *et al.* (2011). Linkage analysis was conducted with JoinMap v4.1 using F2 as population type. Marker order and relative genetic distances were calculated by the regression mapping algorithm with the following parameters: Kosambi mapping function and a LOD threshold ≥ 3 . This procedure generally results into 3 different maps with decreasing statistical support (denoted map1, map2 and map3). We kept markers of map1 for QTL analysis.

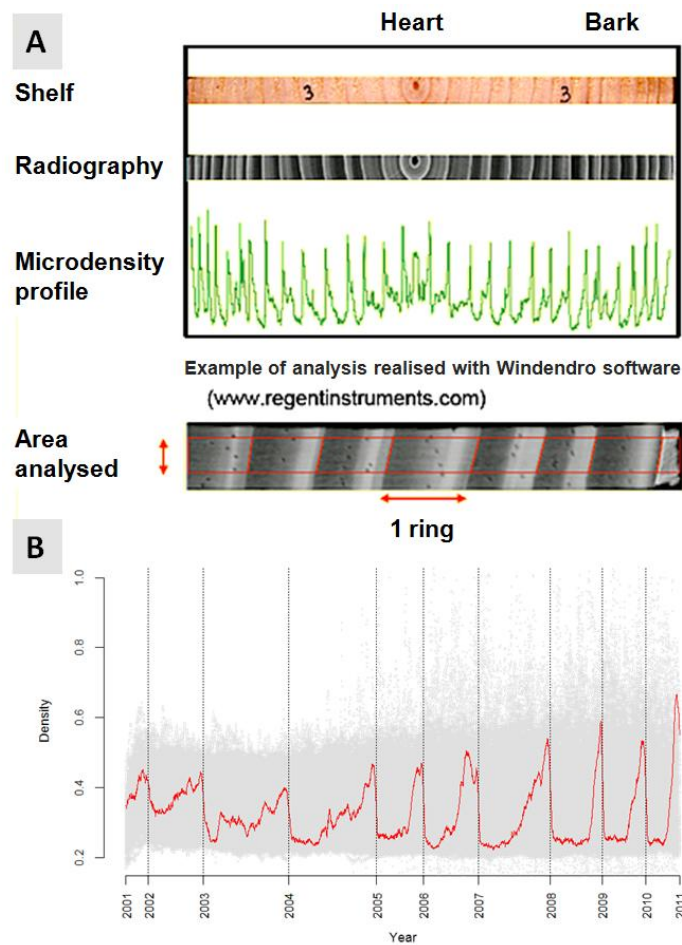


Figure 1. A. Wood core, X-ray picture and microdensity profile of a single individual. B. Microdensitometric data from the F2 population (light grey dots) and example of individual profile for genotype #20 (red curve) across 10 consecutive years (2001 to 2011).

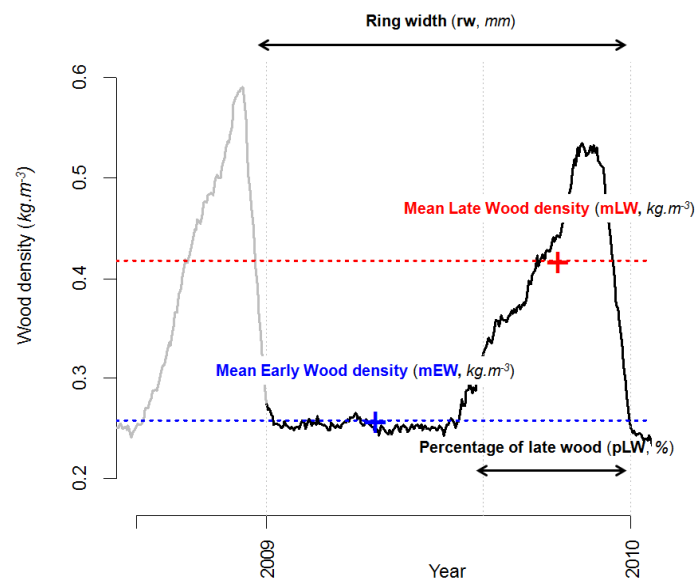


Figure 2. Schematic diagram of microdensity related traits (example of the ring 2009-2010). Ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, kg.m⁻³, blue), mean late wood density (mLW, kg.m⁻³, red) and percentage of late wood (%) are indicated.

V.II.V Wood core sampling and phenotyping

A diametral wood core was taken from each tree at breast height (1.3m) on the 565 F2s. After extraction of the resins (alcohol treatment) and drying (until a 12 % moisture content) each sample was submitted to a continuous X-ray scan. Radiographic films were then digitalized and analysed based on the method described by Polge (1966). For each ring a set of traits including ring width, density of earlywood, latewood and percentage of late wood was obtained using Windendro software (Regent Instruments Inc.) (Figure 1 and 2).

Apart from individual differences, the observed phenotypic variability results from the combination of environmental (calendar year) and ontogenic (cambial age) effects. The separation of these two effects is one of the key to understand accurately the specific effect of ontogenesis and environment on cambial activity. In a microdensity dataset corresponding to samples collected at the same exact height growth unit of trees of the same age, cambial age and calendar year effects are mostly confounded. However, in our study, samples were collected at 1.3 height without taking into account the growth unit. Therefore, for a given calendar year, annual rings were represented by different cambial ages. This is simply due to the fact that the rate of primary growth is different between trees. Considering on the one hand that cambial age effect is minimum between two successive rings and increases slowly with the next rings, and on the other hand that a given ring usually comprised few cambial ages (Bouffier *et al.* 2008) it was hypothesized that cambial age effect was small and could be neglected. In our study, data (Table 1) were available from ring 2004 to 2010 (the first rings from 1998 to 2003 were discarded because of i/ strong heterogeneity for wood density during the first years of growth), and ii/ often missing data due to incomplete cores. An example of wood density profile for tree number 20 of the F2 progeny is provided in Figure 1B.

V.II.VI QTL mapping

V.II.VI.I Single environment analysis

The single-environment model was performed for ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, kg.m⁻³), mean late wood density (mLW, kg.m⁻³) and percentage of late wood (%) for each year independently. Analyses were performed using the R-*qtl* package (Broman and Sen 2011, Broman *et al.* 2003). The composite interval mapping method (CIM) was used with a 10% significance threshold at the genome level. Type I error at genome level was calculated with 1,000 permutations (Chruchill et Doerge 1994). Confidence intervals (95%) around QTLs were calculated using bayesint fonction.

Table 1. Number of trees for which microdensity profiles are available per calendar year in the F2 mapping pedigree.

Calendar year	Number of trees
2004	529
2005	532
2006	532
2007	532
2008	532
2009	532
2010	531

Table 2. Wood density related traits measured in the F2 mapping pedigree.

Traits available for each ring	Definition	Unit
rw	ring width	<i>mm</i>
mEW	mean early wood density	<i>kg.m-3</i>
mLW	mean late wood density	<i>kg.m-3</i>
pLW	percentage of late wood	<i>%</i>

V.II.VI.II Multiple environment analysis

We used the multi-environment model (Korol *et al.* 1998) in which each sampling year was considered to be a different environment for the following traits: ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, kg.m-3), mean late wood density (mLW, kg.m-3) and percentage of late wood (%). We used the Multiple Interval Mapping (MIM) procedure (Jansen and Stam 1994) implemented in MultiQTLV2.6 (Haifa, Israel, 2005; [http://www.multiqtl.com/]). MIM allows individual QTLs to be detected independently of background noise and of previously detected QTLs. For each marker, we use the option “marker restoration” which calculates the probabilities for each missing genotype based on available scores of the nearest-neighbor markers.

Logarithm-of-odds scores (LODs) and P-values were calculated for all trait-by-chromosome combinations with the significance of the QTL estimated after 1,000 chromosome wise permutations tests. QTLs were declared significant using a type I error rate of 1% at the chromosome level. Since the permutations tests were calculated at the chromosome level, we further computed the corresponding Type I error rate at the whole genome level. The relationship between Type I error rate at the genome level (α_g) and Type I error rate at the chromosome level (α_{chr}) is as follows

(Saintagne *et al.* 2004):

$$\alpha_{chr} = 1 - \left\{ 1 - [1 - (1 - \alpha_g)^{1/M}] \right\}^m$$

where M is the total number of markers used for the QTL detection on the map and m the number of markers in each linkage group. Finally, QTLs were declared significant using a type I error rate of 5% at the genome level.

The empirical confidence interval at 95% for the QTL position and for the allelic effect was calculated using bootstrap analysis with 1,000 resamplings. Charts of linkage maps and QTL positions were drawn using MapChart2.2 (Voorrips 2002). The multi-environment model of Jansen *et al.* (1995) does not require independence among individuals in the different environments. By reducing environmental variances, the multi-environment QTL model enhances the detection power of low effect QTLs (Jansen *et al.* 1995).

V.II.VII Statistical analyses

Classical statistics were calculated using means across 7 years (2004-2010) for the following traits: ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, kg.m-3), mean late wood density (mLW, kg.m-3) and percentage of late wood (%) (Figure 2 and Table 2). Pearson correlations between traits were also computed for each sampling year separately and significant values (P<5%) were used to build a global correlation matrix.

A mixed effect linear model was also build using R (R-packages lme4, Bates *et al.* 2013 and lmerTest, Kuznetsova *et al.* 2013, R core development team 2013) taking into account the structure of fixed and non fixed effect. The environmental effect (represented by the year) was tested on all phenotypes. The individual effect (id) was considered as random.

$$Y = X.\beta + Z.u + \epsilon$$

With,

- Y: vector of observations (here rw, mEW, mLW and pLW)
- β : vector of fixed effect (here year).
- u: vector of random effect (here id)
- ϵ : vector of residuals
- X et Z: matrixes linking Y observations to β and u effect, respectively.

The individual variance was estimated for the individual effect (individual effect within full-sibs and residual variance).

To test the QTL x year interaction, A two-way analysis of variance was performed using the following model: $y = \mu + E + M + E \times M + \epsilon$, where y is the phenotypic measurement of each tree, μ is the general mean, E is the environmental effect (7 years), M is the genotypic effect (three genotypic classes), $E \times M$ is the interaction between the main two effects. Both E and M were treated as fixed effects, ϵ is the residual of the model $\sim N(0, \sigma_{\epsilon}^2)$.

V.II.VIII Climatic data

Climatic data were measured by a climatic device located nearby the experiment. Data are available in the INRA CLIMATIK database with a restricted access (link to the online CLIMATIK application: <https://idp.inra.fr/cas/login?service=https%3A%2F%2Fintranet.inra.fr%2Fclimatik%2Fdo%2Fwelcome>). Day length (DL, H), sum of precipitations (P, mm) and mean temperatura (T, $^{\circ}C$) were calculated monthly and summarized by year in order to characterize the climate during the studied period.

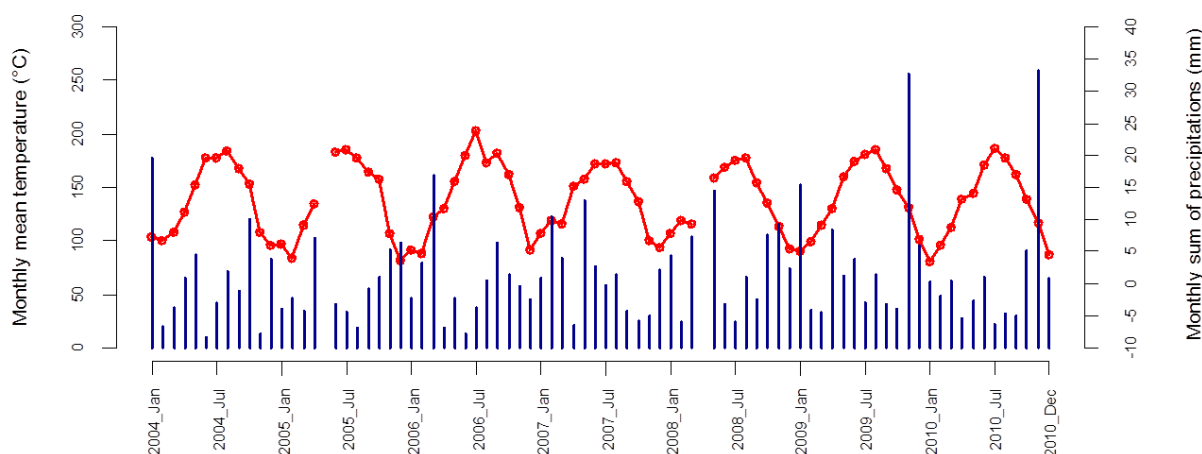


Figure 3. Meteorological conditions for the 7 years studied (2004 to 2010). Monthly mean values are indicated: Mean temperature ($^{\circ}\text{C}$, red curve and dots), sum of precipitations (mm , blue bars).

Table 3. Descriptive statistics for climatic variables measured in the studied period (2004-2010) at an annual scale. Mean, standard deviation (sd), minimum (min) maximum (max) and coefficient of variation (CV) are indicated for **(A)** monthly sum of precipitations (P , mm) and temperature (T , $^{\circ}\text{C}$). (Overall mean values are indicated in blue) and **(B)** annual sum of precipitations (P , mm), Early growth (from March to June) sum of precipitations (PE , mm), Late growth (from July to October) sum of precipitations (PL , mm), daily minimum, mean and maximum temperature (T_{min} , T_{mean} and T_{max} respectively, $^{\circ}\text{C}$)

A

year	parameter	mean	sd	min	max	CV
2004-2010	P	68	± 47	11	260	0,69
	T	13	± 6	4	24	0,43
2004	P	65	± 48	11	178	0,74
	T	13	± 6	6	21	0,44
2005	P	57	± 29	19	103	0,51
	T	13	± 7	4	21	0,53
2006	P	61	± 39	13	161	0,64
	T	14	± 7	5	24	0,48
2007	P	67	± 37	22	138	0,55
	T	13	± 5	6	19	0,38
2008	P	76	± 40	25	147	0,53
	T	13	± 5	5	20	0,39
2009	P	85	± 65	33	256	0,76
	T	13	± 6	5	21	0,42
2010	P	68	± 64	23	260	0,94
	T	12	± 6	4	21	0,48

B

Year	P (mm)	PE (mm)	PL (mm)	Tmin ($^{\circ}\text{C}$)	Tmean ($^{\circ}\text{C}$)	Tmax ($^{\circ}\text{C}$)
2004	782	200	288	0,7	12,7	27,0
2005	624	201	176	-0,6	12,3	28,1
2006	736	385	117	0,0	13,5	31,5
2007	799	317	294	0,5	12,7	25,5
2008	832	287	213	1,6	12,7	26,0
2009	1023	295	303	0,5	13,2	28,2
2010	813	270	161	0,0	12,2	28,3

V.III Results

All data used below (climatic, genotypic and phenotypic) are provided in additional file 2.

V.III.I Climatic data

Mean, standard deviation (sd), minimum (min) maximum (max) and coefficient of variation (CV) were calculated monthly for Day length (DL, *H*), sum of precipitations (*P*, *mm*) and temperature (*T*, °C). Overall means were also calculated. The comparison of patterns for all measurement show similar environmental patterns between years but exhibiting different amplitude (Figure 3).. The mean temperature for the studied period is 13°C and fluctuates between 4°C and 24°C on a monthly scale. The mean of monthly sum of precipitation is 68mm and fluctuates between 11mm and 260mm with peaks of precipitations occurring in winter periods (January to March) (Figure 3 and Table 3).

V.III.II Trait statistics

V.III.II.I Classical statistics

The variability of wood density related traits was rather low (CV=0.05 and 0.06 for mLW and mEW) compared to that of ring width (CV= 0.20). Late wood percentage (pLW) presented values in the range of what observed for ring width (CV= 0.18) (Table 4). Mean annual ring width is 6mm in the studied period (2004-2010) with values ranging from 3 to 11mm. Mean early wood density is 0.28 kg.m⁻³ and oscillates between 0.24 to 0.35 kg.m⁻³. Percentage of late wood fluctuates between 16% and 42% with a mean of 25% (Table4).

V.III.II.II Relationships between environmental variables and traits

The time trend analysis of mean ring width (Figure 4A) and ring density (Figure 4C) shows: i/ a rather strong reactivity to climatic conditions for mean ring width, with dryer years (2005 and 2010, compare Figure 4A and 4E) showing a clear decrease of radial growth and with more humid year (2004, 2006, 2007 and 2009, Figure 4E) characterized by a higher growth rate. Because nearby rings could display such huge differences in terms of growth (see 2004 vs 2005 vs 2006, 2007 vs 2008 and 2009 vs 2010 to a lesser extent) the cambial age effect could be ruled out as an alternative hypothesis to explain such variability, and ii/ a less pronounced effect of environmental conditions on wood density (especially for early wood density). Monthly mean temperature doesn't seem to condition the pattern of ring width in our study (See Figure 4D and 4E vs 4A and 4C). As expected late wood density followed the inverse trend to ring width. The percentage of late wood follows patterns similar to ring width (Figure 4A and B).

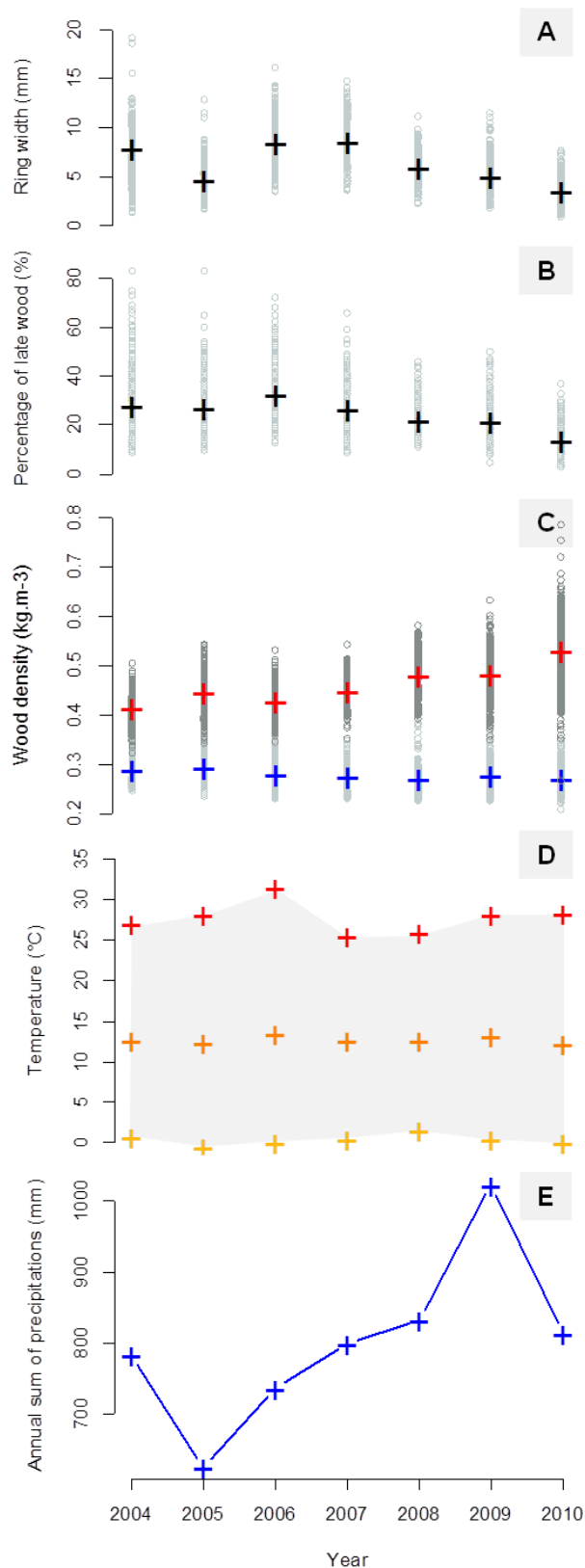


Figure 4. Time trends analysis for phenotypes and environmental parameters tested: grey circles represent individual values and crosses represent mean values for each year. From **A** to **D**: ring width (mm), percentage of late wood (%), wood density values (kg.m-3, blue and red crosses are mean values for early and late wood respectively), monthly temperature (minimum, mean and maximum monthly temperature, yellow, orange et red crosses respectively), annual sum of precipitations (mm).

Table 4. Classical statistics for wood density related traits across 7 years (2004-2010). Mean, standard deviation (sd), minimum (min) maximum (max) and coefficient of variation (CV) are indicated for ring width (rw, *mm*), mean early wood density (mEW, $kg.m^{-3}$), mean late wood density (mLW, $kg.m^{-3}$) and percentage of late wood (%). Overall means are indicated in blue.

year	trait	mean	sd	min	max	CV
mean	rw	6	± 1	3	11	0.20
	mLW	0.46	± 0.02	0.37	0.53	0.05
	mEW	0.28	± 0.02	0.24	0.35	0.06
	pLW	25	± 5	16	42	0.18
2004	rw	8	± 2	1	19	0.29
	mLW	0.42	± 0.03	0.32	0.51	0.06
	mEW	0.29	± 0.02	0.25	0.42	0.08
	pLW	28	± 12	9	83	0.42
2005	rw	5	± 1	2	13	0.30
	mLW	0.45	± 0.03	0.35	0.54	0.08
	mEW	0.30	± 0.02	0.24	0.40	0.08
	pLW	27	± 9	10	83	0.33
2006	rw	9	± 2	4	16	0.24
	mLW	0.43	± 0.03	0.35	0.53	0.06
	mEW	0.28	± 0.02	0.23	0.40	0.08
	pLW	33	± 8	13	72	0.25
2007	rw	9	± 2	4	15	0.21
	mLW	0.45	± 0.03	0.35	0.54	0.06
	mEW	0.28	± 0.02	0.23	0.38	0.07
	pLW	27	± 8	9	66	0.32
2008	rw	6	± 1	2	11	0.22
	mLW	0.48	± 0.03	0.39	0.58	0.07
	mEW	0.27	± 0.02	0.23	0.42	0.08
	pLW	22	± 5	11	46	0.25
2009	rw	5	± 1	2	12	0.29
	mLW	0.48	± 0.04	0.35	0.63	0.09
	mEW	0.28	± 0.02	0.23	0.39	0.09
	pLW	22	± 7	5	50	0.32
2010	rw	4	± 1	1	8	0.33
	mLW	0.53	± 0.06	0.27	0.79	0.12
	mEW	0.27	± 0.02	0.21	0.48	0.09
	pLW	14	± 5	3	37	0.39

Table 5. A. Mixed effect model applied on ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, $kg.m^{-3}$), mean late wood density (mLW, $kg.m^{-3}$) and percentage of late wood (%) values. Year and individuals (id) are considered as fixed and non fixed effect respectively. **B.** Variance of the individual effect (id) in previous models.

A

Trait	Fixed effect	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F.value	Pr(>F)
rw	Year	11211	1868.5	6	2805.2	1270.1	$<10^{-16}$
mEW	Year	0.20403	0.034005	6	2805.2	131.11	$<10^{-16}$
mLW	Year	4.3375	0.72292	6	2805.1	744.71	$<10^{-16}$
pLW	Year	105008	17501	6	2805.3	325.55	$<10^{-16}$

B

Trait	Random effect	Variance	sd	Variance id/residual (%)
rw	id	1.426	± 1.194	97
mEW	id	$<10^{-3}$	± 0.017	105
mLW	id	$<10^{-3}$	± 0.022	48
pLW	id	12.970	± 3.601	24

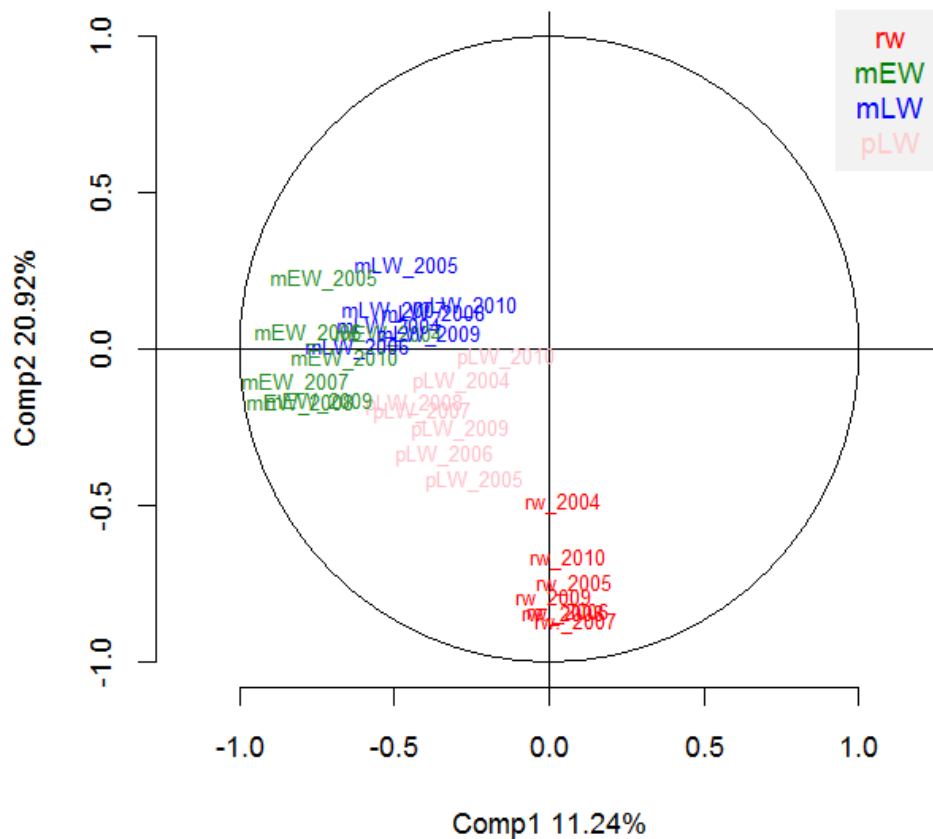


Figure 5. Principal Component Analysis (PCA) between the studied traits Ring width (rw, mm, red), mean early wood density (mEW, $kg.m^{-3}$, green), mean late wood density (mLW, $kg.m^{-3}$, blue) and percentage of late wood (pLW, %, pink). Axis contributions are indicated (%).

The mixed effect model shows highly significant year effect for all phenotypes tested (Table 5) confirming the environmental effect. The individual variance was of same range as residual for rw and mEW and lower for mLW and pLW (24% and 48% of explained variance/residual variance).

Given the vast amount of phenotypic traits obtained from microdensity profiles, we performed a principal component analysis (PCA) to assess the link between traits (Figure 5). The PCA shows that traits values are highly correlated between years for all phenotypes (Figure 5). The same way we can observe that wood density related traits (mEW and mLW, green and blue respectively) seem to belong to the same component (axis) and ring width (rw, in red) and percentage of late wood (pLW, in pink) to the other axis (independent).

Correlations between traits and environmental variables (day length, temperature and sum of precipitations) did not show significant correlations ($p < 0.05$ threshold, data not shown). Different periods were tested (year, month and season (ex. Mean values from march to june and from july to october)) to confirm this result and no significant correlations were found (this result is discussed in the next section).

V.III.III Genotyping (Veracode assay)

The Illumina GoldenGate Veracode technology (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) was used to carry out the genotyping reactions in accordance with the manufacturer's protocol. SNP genotyping was carried out at the Genome-Transcriptome facility of INRA Bordeaux using the Illumina BeadXpress station.

A total of 479 samples (grand-parents C10 and L146, 5 replicates of the hybrid parent H12 to estimate reproducibility rate, and 472 F2s) were included in the assays. Signal intensities were quantified using GenomeStudio software v. 1.0 (Illumina Inc.). GenCall (GC) score cutoff of 0.25 was used to determine valid genotypes at each SNP. GeneCall score measures how close a genotype is to the center of the cluster of other samples assigned to the same genotypes, compared with the centers of the clusters of the other genotypes. This measure ranges from 0 to 1. The higher the GeneCall score, the more reliable the genotype. After primary automatic analysis (GenCall threshold = 0.25), we used p50GC which is the 50th percentile of GC score over all SNPs per sample, in order to exclude "poor" samples. We excluded samples which were under and over the p50GC mean ± 0.01 . We verified the coherence of these results by comparing them with those obtained using the classical graphical method currently used for Infinium sample analysis (using Call Rate/p10GC). SNPs were individually inspected and classified as polymorphic when 3 clusters were clearly identified (two homozygotes and 1 heterozygote classes), as monomorphic when only one

Table 6. Descriptive statistics of each SNP assay developed in the study.

Assay nbr	Already mapped SNP (1536_array)	Insilico SNP	Illumina score	Polymorphic SNP	Monomorphic SNP	Failed SNP
1	97		0.89 [0.68/1]	87 (90%)	0 (0%)	10 (10%)
		287	0.79 [0.65/0.99]	39 (13.5%)	169 (59%)	79 (27.5%)
	384			126 (32.8%)	169 (44%)	89 (23.2%)
2	82		0.8 [0.5/0.985]	56 (68%)	0 (0%)	26 (32%)
		302	0.73 [0.5/0.99]	97 (32%)	30 (10%)	175 (58%)
	384			153 (39.8%)	30 (7.8%)	201 (52.3%)

Table 7. Selection criteria (Filters) used for in silico SNP detection in assay#2.

		Number of SNPs	Polymorphic SNPs	Monomorphic SNPs	Failed SNPs
Filter 1	Depth=6, MAF=0.5	49	12 (24.5%)	5 (10.2%)	32 (65.3%)
Filter 2	Depth= 7, MAF≥0.4	55	22 (40%)	2 (3.6%)	31 (56.4%)
Filter 3	Depth≥8, MAF≥0.3	198	63 (31.8%)	23 (11.6%)	112 (56.6%)
	SNP on the same contigs & distance < 60 pb	40 SNPs (on 20 contigs)	10 (25%)	2 (5%)	28 (70%)

cluster was observed (one homozygote class), and as failed SNPs when we observed too weak intensities, cluster compression or abnormal cluster detection. Manual adjustments were made as needed.

For assay#1, the GenCall score lead us to eliminate 4 DNA samples. The remaining 475 samples were retained for further SNP analysis using the GenomeStudio v 1.9.4 software (Illumina Inc.). The average call rate (percentage of successfully genotyped SNPs per DNA sample) was similar before and after (92%) manual adjustment. This assay included 287 *in silico* SNPs and 97 SNPs already validated in a previous experiment. The success rate (number of polymorphic SNPs divided by the total number of SNPs) was 13.5% for the former and 90% for the latter (Table 6).

As expected, most of the validated SNPs were informative in the mapping population (Table 6), *i.e.* 90% of the SNPs were polymorphic, none was monomorphic and for 10% the assay failed. In contrast 59% of the *in silico* SNPs were monomorphic, 13.5% polymorphic and for 27.5% the assay failed (which is the typical failure rate in pine). To explain this unexpected high rate of monomorphic loci we retrospectively checked the SNP depth parameters for each class. On average monomorphic SNPs presented 6 reads with a MAF of 0.25, failed SNPs presented 7 reads with a MAF of 0.28, while polymorphic SNPs had 9 reads with a MAF of 0.36. Therefore, we concluded that the polymorphic rate (number of polymorphic SNPs divided by the number of successful SNPs) was strongly dependant on SNP depth. For the second SNP assay, we took these first results into account for selecting *in silico* SNPs. Indels were no more considered and most SNPs had a MAF ≥ 0.3 and read depth ≥ 8 .

For assay#2, the GC criteria lead us to eliminate 19 DNA samples. The average call rate before analysis with GenomeStudio was 88% and reached 99% after manual adjustment. This assay included 302 *in silico* SNPs and 82 validated SNPs. Most of the validated SNPs were still informative in the mapping population (Table 7), *i.e.* 68% of these SNPs were polymorphic, none was monomorphic as expected, and for 32% the assay failed, showing that this second assay yielded poorer results compared to assay#1. With respect to the *in silico* SNPs, 10% were monomorphic, 32% polymorphic and for 58% the assay failed, which is still higher than the typical failure rate in pine for *in silico* SNPs (ca. 30%), again indicating that this second assay was not as good as the first assay in terms of success rate. We used different filters for sorting *in silico* SNPs in assay#2 (Table 7). For each category, we observed a lower rate of monomorphic SNPs compared to the first assay (showing that increasing the MAF and discarding indel was successful in reaching a higher polymorphic rate), but a larger rate of failed SNPs. We also observed that when two SNPs belonging to the same contig were distant by less than 60 pb, the rate of failed SNPs reached 70%. Thus, this last criterion is very important to take into account for SNP assay design using the Veracode technology.

Table 8. Descriptive statistics for the linkage genetic map of parental genotype H12. Number of SNP, length (cM) and mean distance between markers are indicated for each linkage group (LG) and for the whole map (bold characters, last column).

	LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7	LG8	LG9	LG10	LG11	LG12	Total
Total group length (cM)	147	135	160	165	170	121	149	158	137	162	133	118	1754
Number of SNP	15	17	29	20	23	26	23	18	19	18	23	17	248
Distance between SNP (cM)	10.5	8.5	5.7	8.7	7.7	4.9	6.8	9.3	7.6	9.5	6.0	7.4	7.7

Table 9. QTLs detected by single environment composite interval mapping for microdensitometry related traits across 7 years (2004-2010) in the F2 pedigree: ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, kg.m⁻³), mean late wood density (mLW, kg.m⁻³) and percentage of late wood (%). For each QTL, the following information are indicated: phenotype, year of measurement, number of observations (Nbr obs), linkage group (LG), position of LOD peak (position, cM), Bayesian confidence interval (BCI), LOD score, Pvalue and percentage of variation explained by the QTL (%var). Significant QTLxEnvironment (QTLxE) effects associated to the QTL are indicated by a "*" (see Figure 8).

Phenotype	Year	Nbr obs	LG	position (cM)	BCI (cM)	LOD	Pvalue	%var	QTLxE
rw	2010	469	1	114	[108-142]	3.69	0	2	
rw	2009	469	1	142	[120-146.697]	3.78	3.45E-02	2	
rw	2006	469	1	144	[134.463-146.697]	3.36	7.75E-02	3	
rw	2008	469	1	144	[122-146.697]	3.70	4.00E-02	3	
mLW	2006	469	3	111	[0-128]	3.51	6.10E-02	3	*
mLW	2004	466	3	122	[104-130]	5.24	1.50E-03	5	*
mEW	2006	469	3	26	[0-159.675]	3.33	8.45E-02	3	
mEW	2008	469	3	108	[96-126]	4.27	1.15E-02	5	
mEW	2007	469	3	110	[102-130]	4.03	2.50E-02	4	
mEW	2009	469	3	129	[112-136]	3.63	4.35E-02	3	
rw	2009	469	4	56	[48-70]	4.45	8.50E-03	4	
rw	2008	469	4	58	[48-66]	4.64	4.50E-03	3	
rw	2010	469	4	58	[36-64]	5.04	5.00E-04	4	
mEW	2006	469	4	70	[36-78]	3.41	7.10E-02	3	
mLW	2006	469	6	98	[76-106]	4.55	8.00E-03	4	
mLW	2007	469	6	100	[41.698-108]	3.42	7.65E-02	3	
mEW	2009	469	6	106	[98-121.346]	4.05	2.00E-02	3	
mEW	2010	469	6	116	[100-121.346]	3.26	8.60E-02	3	*
mEW	2005	469	7	105	[100-124]	3.55	5.85E-02	3	
mLW	2006	469	9	74	[69.728-112]	3.58	0	3	
mLW	2005	469	9	76	[18-96]	3.55	5.25E-02	3	
mLW	2007	469	9	98	[92-116]	3.59	5.35E-02	3	
rw	2007	469	10	13	[6-24]	6.37	<10 ⁻⁴	6	
rw	2008	469	10	13	[6-22]	5.85	<10 ⁻⁴	5	
rw	2009	469	10	13	[6-26]	4.59	6.00E-03	4	
rw	2006	469	10	24	[8-34]	4.22	1.25E-02	3	
mEW	2005	469	10	138	[128-152]	6.31	<10 ⁻⁴	5	
mEW	2006	469	10	138	[134-150]	6.61	5.00E-04	6	
mEW	2007	469	10	138	[134.256-144]	6.93	<10 ⁻⁴	7	
mEW	2008	469	10	140	[136-150]	5.98	<10 ⁻⁴	7	
mEW	2009	469	10	144	[120-156]	3.56	4.95E-02	3	
pLW	2006	469	10	136	[110-144]	3.52	6.30E-02	3	
rw	2009	469	11	4	[0-16]	5.37	2.00E-03	5	
rw	2010	469	11	8	[0-16]	5.21	5.00E-04	4	
rw	2005	469	11	20	[4-24]	4.40	5.00E-03	4	
rw	2004	466	11	22	[8-30]	3.90	1.85E-02	3	
rw	2006	469	11	23	[8-28]	3.66	0	3	
mLW	2005	469	11	4	[2-30]	3.86	2.85E-02	4	*
mLW	2007	469	11	28	[18-49.368]	5.10	3.00E-03	4	*
mLW	2008	469	11	32	[25.32-50]	3.98	1.75E-02	3	*
mLW	2009	469	11	38	[25.32-44]	4.45	7.00E-03	4	*
mLW	2006	469	11	58	[0-68]	3.32	8.30E-02	3	*
mEW	2007	469	11	4	[0-24]	3.36	8.50E-02	3	
mEW	2008	469	11	4	[0-18]	3.44	6.90E-02	3	
pLW	2010	469	12	28	[8-34]	3.63	3.85E-02	3	

Combining SNP assays#1 and #2, 26 contigs contained more than 1 SNP. From the 11,989 genotype comparisons, we observed 34 recombination events, indicating an error rate of 0.3%. This result confirms the Goldengate reproducibility in maritime pine (Chancerel *et al.* 2011).

V.III.IV Linkage map construction

A total of 279 (VeraCode) and 76 (iPLEX) polymorphic SNPs were initially available to establish the linkage map of the hybrid tree. Following the mapping procedure indicated in the material and method section, the most reliable map (map1) included 248 markers (200 VeraCode and 48 iPLEX SNPs) on 12 linkage groups, corresponding to the haploid number chromosomes of the pine genome. The length of the map was 1,754cM (146cM/linkage group on average) resulting into a density of 1 SNP every 7 cM, which is considered sufficient for QTL mapping (Table 8). The number of markers mapped by linkage group varies from 15 to 29 with a mean of 21 markers by LG. LG lengths is from 118cM to 170cM with a mean value of 146cM. Expected genome length was 1768cM. The observed genome coverage is close to 100% whereas the expected coverage was of 76%. There is no correlation between group length and the number of markers, which makes sense considering the strategy used to select the markers.

V.III.V QTL detection

V.III.V.I Single- and multi-environment analyses

In the single environment analysis all the traits are analyzed separately for each year. For the F2 pedigree 469 genotypes were available and 45 QTLs were detected, explaining from 2% to 7% of the phenotypic variance (Table 9). The multi-environment QTL approach allowed detecting several QTLs (Table 10), ranging from 4 QTLs for pLW to a maximum of 8 QTLs for mEW. In all, 19 QTLs were detected for ring width, early and late wood density and % of late wood. On LG1, we detected a QTL for ring width, stable over the studied period. Surprisingly, this QTL is not confirmed by the multi-environment analysis but colocalizes with two other QTLs: one for early wood density (mEW) and one QTL for the percentage of late wood (pLW). On LG2 we found a QTL for mEW, only detected by the multi-environment analysis. LG3 carried several colocalizing QTLs for mEW and mLW, confirmed by the multi-environment analysis. On LG4 we observe a QTL stable over years for ring width colocalizing with a QTL for mEW, which is also confirmed by the multi-environment method. Two multi-environments specific QTLs were detected on LG5, for mLW and pLW. On LG6, LG7 and LG11, we detected several stable QTLs and shared between mEW and mLW (confirmed by the multi-environment approach).

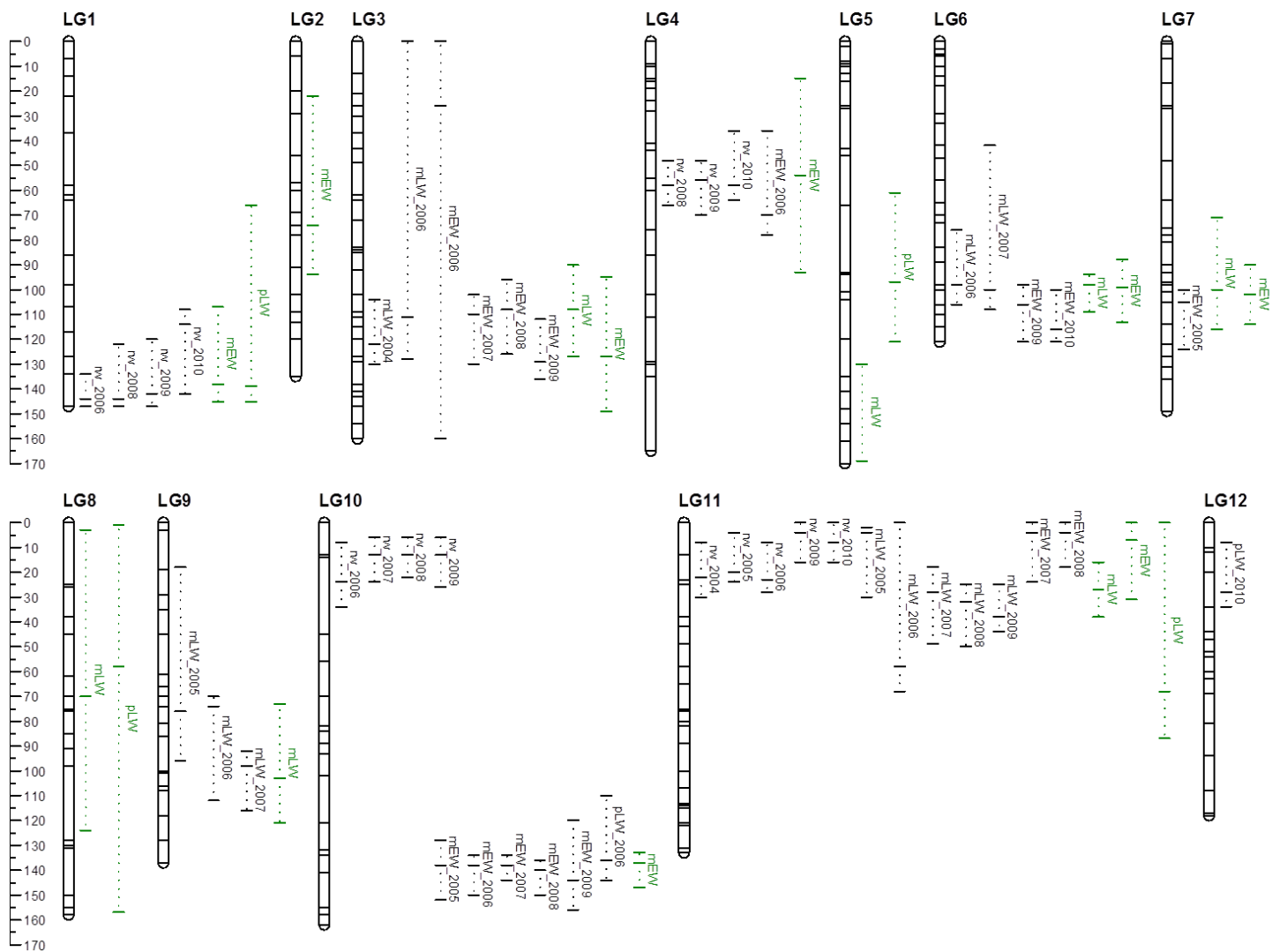


Figure 7. Detection of QTLs for wood density related traits across 7 years (2004-2010) by single environment analysis (black) and by multi-environment analysis (green) on the genetic maps of the F2 progeny for the linkage groups (LG) 1 to 12.

Finally, on LG9 and LG10 we observe regions dedicated to either mEW or mLW, that were confirmed by the multi-environment analysis. A significant number of QTLs were thus found to be stable over the 7 years, suggesting the stable action of major genes accounting for the variation of wood density and ring width, irrespective of a combined calendar year/ontogenic effect. This is the case for example in LG1 for rw and in LG10 for mEW, where all QTLs mapped approximately to the same position (Figure 7). Moreover, when such multiple colocalizations were observed and coincided with a QTL detected by the multiple-year approach, we found that the confidence interval of the multiple-year QTL was reduced compared to that of the single-year analysis ("CI 95% ", Table 9 and 10) indicated a gain in statistical power for QTL detection. On the other hand, QTLs detected for a given year and not colocalizing with a QTL for the same trait detected by the multiple-year approach, are likely to evidence gene action in response to biotic or abiotic factors occurring that particular year.

V.III.V.II QTL x Environment interaction

A variance analysis was undertaken on the 248 markers of the F2 pedigree across the data of the 7 years (2004-2010) for the following phenotypes: ring width (rw, *mm*), mean early wood density (mEW, $kg.m^{-3}$), mean late wood density (mLW, $kg.m^{-3}$) and percentage of late wood (pLW, %). The tested model is described in the materials and methods section. The MxE interaction effect (and associated F values) takes different values across the genome, depending on the associated marker and year tested (Figure 8, Table not shown). Significant MxE effects ($p\text{-value} < 0.05$) are observed for 4, 7 and 13 markers for mEW, mLW and pLW respectively. No significant MxE effect was observed for rw. Those markers are spread through the genome on LG3, LG4, LG5, LG6, LG11 and LG12 (Figure 8). Those markers are partly located under QTL (Table 8 and Table 9).

V.III.V.III Comparison of QTLs between earlywood and latewood density

The genetic complexity of a quantitative trait can often complicate the detection and interpretation of the many QTLs underlying trait variation. Thus, dissecting a complex trait into elementary components can provide more insights into the understanding of the genetic factors contributing to a complex trait. This is particularly true for wood density that presents a remarkable variation within a single growing season, i.e. earlywood and latewood. As illustrated on the linkage groups (Figure 9), common (between both types of wood) as well as specific trait-QTLs were detected. This is a major result of this study. There were 9 and 8 specific QTLs for mEW and mLW, respectively, and 10 QTLs common for both traits in single-environment analysis. Similarly, there were also 4 and 3 specific QTLs for mEW and mLW, respectively, and 8 QTLs common for both traits detected by the multi-environment analysis (Figure 9).

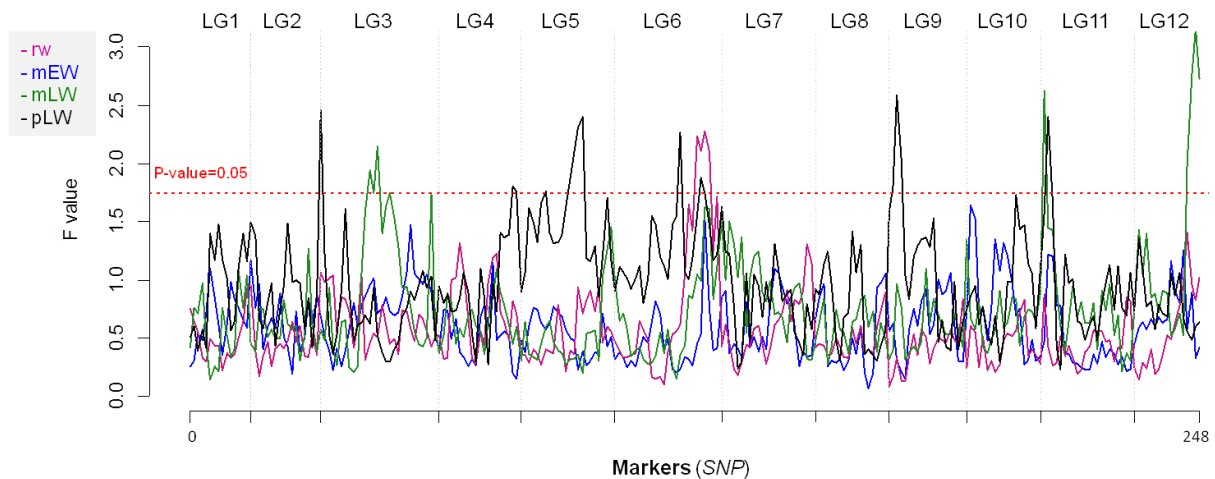


Figure 8. Marker x Environment interaction effects across 7 years (2004-2010) on the 248 markers of the F2 pedigree with the following phenotypes: ring width (rw, mm, violet line), mean early wood density (mEW, $kg.m^{-3}$, blue line), mean late wood density (mLW, $kg.m^{-3}$, green line) and percentage of late wood (pLW, %, black line). F values associated to the tests and threshold of p-value=0.05 associated are indicated.

Table 10. QTLs detected by multi-environment multiple interval mapping for microdensitometry related traits across 7 years (2004-2010) in the F2 pedigree: ring width (rw, mm), mean early wood density (mEW, $kg.m^{-3}$), mean late wood density (mLW, $kg.m^{-3}$) and percentage of late wood (pLW, %). For each QTL, the following information are indicated: phenotype, year of measurement, number of observations (Nbr obs), linkage group (LG), position of LOD peak (position, cM), confidence interval at 95% (CI), LOD score, Pvalue of the test and pvalue at the genome level (pG) are indicated. Significant QTLxEnvironment (QTLxE) effects associated to the QTL are indicated by a “*” (see Figure 8).

Phenotype	Nbr obs	LG	Position (cM)	CI (95%)	LOD	p-value (H1:H0)	pG	QTLxE
mEW	457	1	138.13	[107.2-144.8]	17.56	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
pLW	457	1	138.63	[66.0-144.8]	14.49	2.00E-03	3.24E-02	
mEW	457	2	73.73	[21.6-94.4]	14.37	3.00E-03	4.83E-02	
mLW	457	3	107.69	[90.4-126.6]	20.85	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	*
mEW	457	3	127.36	[95.2-149.1]	22.48	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mEW	457	4	53.54	[15.2-92.9]	16.57	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mLW	457	5	168.93	[129.9-168.9]	16.4	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
pLW	457	5	97.43	[60.5-120.7]	18.11	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	*
mLW	457	6	98.39	[93.7-109.0]	18.96	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mEW	457	6	99.08	[88.0-112.8]	21.05	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	*
mLW	457	7	99.71	[70.9-115.7]	17.97	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mEW	457	7	102.07	[90.1-113.8]	19.56	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mLW	457	8	70.12	[3.2-123.6]	14.39	2.00E-03	2.87E-02	
pLW	457	8	57.77	[1.4-156.9]	14.07	1.00E-03	1.44E-02	
mLW	457	9	102.93	[72.7-120.9]	20.11	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mEW	457	10	137.36	[133.3-146.9]	38.87	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
mLW	457	11	27.04	[15.6-37.8]	32.38	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	*
mEW	457	11	6.605	[0.00-31.19]	21.41	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	
pLW	457	11	68.08	[0.0-86.8]	13.9	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	*

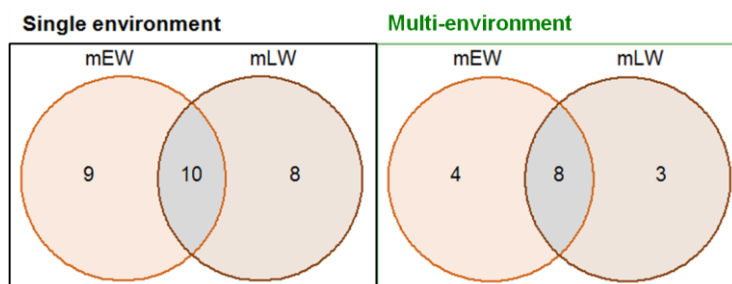


Figure 9. Venn diagrams showing specific and shared QTLs between mean early and late wood density values (mEW and mLW) for single environment analysis (left part, black box) and multi-environment analysis (right part, green box).

V.IV Discussion

Microdensity profiles obtained from a three-generation inbred pedigree allowed us to analyze for the first time in maritime pine the variation of ring width, percentage of late wood and wood density over 7 years as well as to quantify the seasonal plasticity of the genetic architecture of wood density.

V.IV.I relationships between microdensitometry related traits and climatic variables

The 7 years presented similar trends with respect to monthly mean temperature, preventing to analyze precisely the impact of this factor on microdensitometry related traits. Monthly sums of precipitation exhibited more variation between years and a strong reactivity to this climatic factor was observed for mean ring width, dryer years showing a clear decrease of radial growth and more humid years showing a higher growth rate, as already shown by many dendrochronological studies (e.g. Lebourgeois and Merian 2010). However, the mixed effect model resulted in a highly significant year effect for all traits tested, certainly owing to differences in terms of precipitations and despite the fact that the same traits were highly correlated between years as illustrated by the PCA. This being said, the relationships between microdensitometry related traits on the one hand and either yearly, monthly and seasonally computed climatic data on the other hand, did not exhibit significant correlations. This contradictory results put forward that this analysis could be improved by a better estimation of climatic variables.

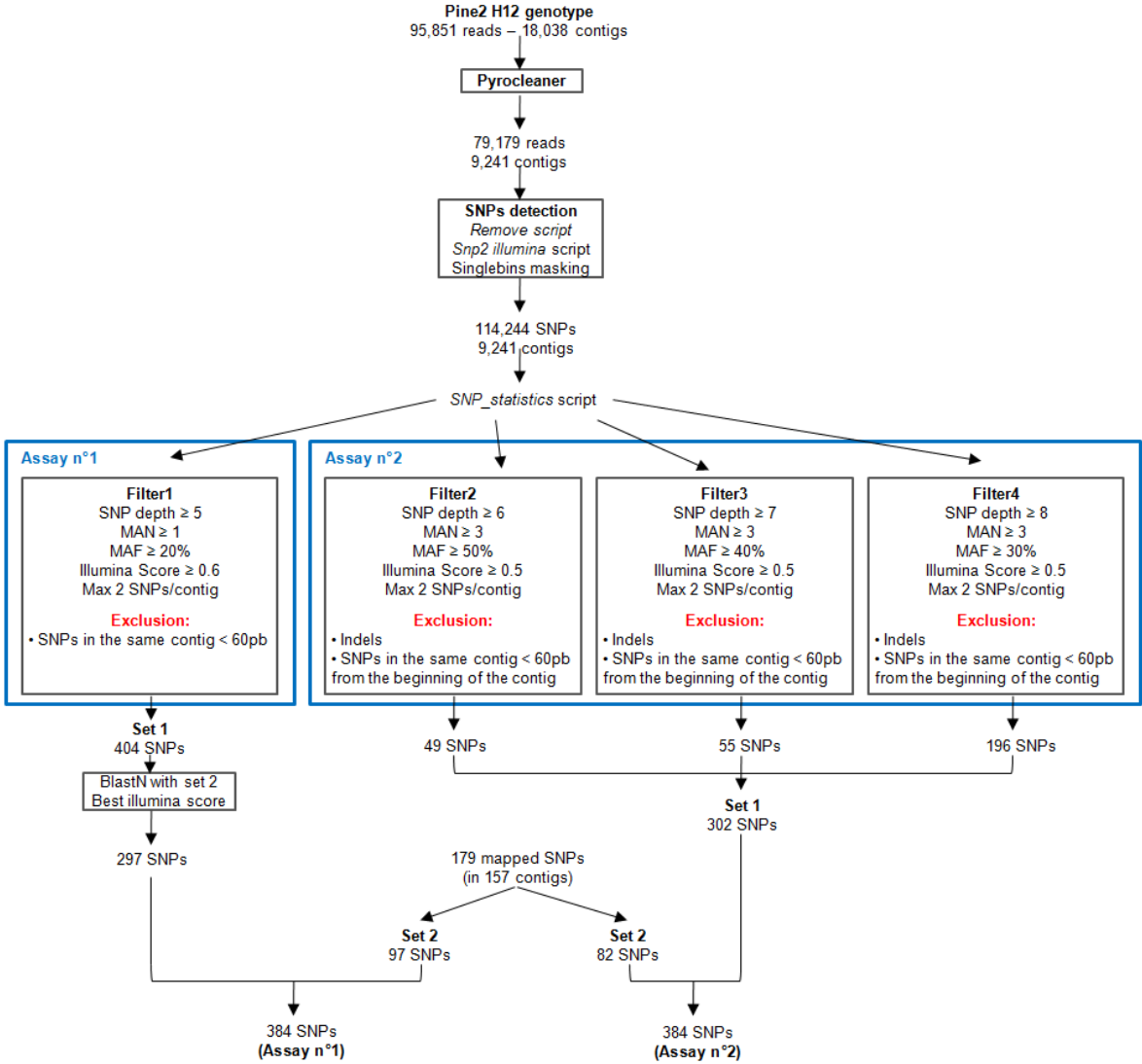
V.IV.II Plasticity of the genetic architecture of wood density

Just focusing on wood traits, the phenotypic variation explained by QTLs is found to be highly variable according to traits and studies. It reaches about 45% for the modulus of elasticity (Kuramoto *et al.* 2000), and was estimated around 10% for wood density in *Pinus taeda* (Sewell *et al.* 2000) or *Eucalyptus grandis* (Grattapaglia *et al.* 1996; Verhaegen *et al.* 1997). In the present study, 469 genotypes of an F2 pedigree were available for genetic analysis, which is at least twice the populations sizes generally used in most QTL studies, providing therefore a better statistical power to detect small effect QTLs and in the same time to avoid over-estimating QTL effect. Overall, 45 QTLs were detected based on the single-environment analysis, explaining from 2% to 7%. These results are comparable with those previously published for other pine species such as *Pinus sylvestris* (Lecerteau *et al.*, 1999) and *Pinus taeda* (Sewell *et al.*, 2000). As with *Pinus taeda*, dispersed genomic regions harboring QTLs influencing wood specific gravity and chemical wood property, were detected by Groover *et al.* (1994) and Sewell *et al.* (2002), respectively.

Interestingly, most QTLs were shown to be stable through time (year). Such QTL clusters suggest central underlying genes for wood density and ring width. In the study by Sewell *et al.* (2000) it was found that most QTLs were detected for only a single ring. Nevertheless, some QTLs were more stable. QTLs detected in only one year are likely to evidence gene action in response to biotic or abiotic factors. This is supported by recent findings by Wu *et al.* (2002) that different QTLs for volume growth of poplars were present at different environments and that expression of some QTLs depended on environment. In our study, the multi-environment QTL analysis allowed detecting 19 QTLs for ring width, early and late wood density and % of late wood, showing stable genetic determinism across different environments.

The most striking result of the present study is certainly the between seasonal pattern for mean wood density. Common QTLs between early and late wood as well as specific trait-QTLs were detected. In *Pinus taeda*, many loci appeared to be involved in the control of earlywood and latewood specific gravity, but few were also common (Sewell *et al.* 2000). Invoking pleiotropy rather than physical linkage is tempting for common QTLs corresponding to basic functions e.g. genes involved in cell wall thickening. At the molecular level, several investigations have been carried out to identify the main genes involved in EW vs. LW formation. A first study on loblolly pine by Egertsdotter *et al.* (2004) reported that genes involved in lignification were up regulated in differentiating xylem associated with LW formation. Li *et al.* (2010) reported in *Pinus radiata* a similar trend with transcripts involved in primary and secondary cell wall formation differentially expressed respectively in EW and LW. A similar result was obtained in *Pinus pinaster* for a glycine rich protein specifically expressed during LW formation (Le Provost *et al.* 2003). Finally Paiva *et al.* (2008) using cDNA macro-arrays characterized the expression profile of thousands of genes along a growing season in a single genotype of maritime pine. These authors reported that genes involved in cell division, energy, sugar transport and cell wall biogenesis were upregulated in EW, whereas genes involved in the cytoskeleton network and transcription were more represented in the LW forming tissue. New data have been produced in *Pinus pinaster* (Ph Chaumeil and M Garcès, unpublished) regarding the regulation of the transcriptome and proteome between EW and LW. Soon or later they will have to be integrated into the present story to propose candidate genes that are shared between both types of wood or specific to each stage, to shed new lights about the molecular machinery underlying the detected QTLs.

Additional file 1: Flowchart describing the different steps used to identify putative SNPs in the H12 hybrid tree.



VI Fluctuations journalières du tronc et de la croissance radiale du pin maritime:

variabilité phénotypique, déterminisme génétique et environnemental et architecture génétique.

VI.I Introduction

Le pin maritime, *Pinus pinaster* Ait, est une espèce d'intérêt écologique et économique majeurs, originaire du sud-ouest de l'Europe. La qualité de son bois, sa bonne résistance à la sécheresse et sa croissance rapide ont conduit à une plantation massive de l'espèce au cours du 19ème siècle. Le pin maritime est l'espèce la plus fréquemment plantée en France métropolitaine. Il couvre plus de 1.1 millions d'hectares, ce qui correspond à 7% de la surface forestière, et produit environ 30% de la quantité de bois récolté (IGN 2012, FCBA memento 2013). La plupart des plantations françaises sont situées dans le sud-ouest de la France, le long de la côte atlantique (en Aquitaine), où il couvre environ 800 000 hectares.

Une forte variabilité en termes de production de biomasse a été observée au sein des populations landaises. Cette variabilité a été exploitée par les sélectionneurs pour produire des variétés à fort rendement (Bouffier *et al.* 2008). Des performances de croissances très diverses ont été observées au sein de l'aire de distribution de l'espèce et révélée par des tests de provenances descendances. Cette diversité a été attribuée à une adaptation locale à la disponibilité en eau (Harfouche *et al.* 2003). Le manque d'eau est en effet une contrainte abiotique bien connue qui limite la croissance des plantes et ses conséquences sur les conifères ont largement été documentées (Badalotti *et al.* 2000; Calamassi *et al.* 2001; Edwards *et al.* 1995; Sands *et al.* 1977; Zobel *et al.* 2001), y compris chez le pin maritime (Sabaté *et al.* 2002). Ainsi, la productivité de nombreuses espèces plantées de conifères pourrait être fortement affecté par les sécheresses estivales dont l'intensité devrait augmenter dans le cadre du changement climatique (IPCC 2013). C'est le cas du pin maritime comme l'ont montré Loustau *et al.* (2005) pour le sud-ouest de la France.

Des observations répétées (i.e diamètre et hauteur de l'arbre) sont classiquement utilisées pour suivre l'accumulation de biomasse (Husch *et al.* 2003). De nombreuses approches de modélisation ont été développées pour caractériser les tendances d'accumulation de biomasse (Mäkelä *et al.* 1997; Pretzsch *et al.* 2002; Solomon *et al.* 1986; Stage 1973; Vanclay 1994) et étudier ses bases

génétiques (Danjon 1994, Kremer 1981a, 1981b). Ces modèles reposent sur des mesures ponctuelles (souvent annuelles) et ont été utilisés pour établir des liens statistiques entre la croissance inter-annuelle (et à long terme) et les variables climatiques, mais une meilleure compréhension de l'impact de l'environnement sur les trajectoires de croissance intra-annuelles nécessite un suivi journalier. Des observations faites à ce niveau de précision permettraient d'identifier les processus qui déterminent la dynamique de croissance des individus et leur sensibilité à l'environnement (climatique).

Les études écophysiologiques basées sur des données de microdendromètres ont montré que le mouvement de l'eau au sein de la plante entraîne une déformation cyclique des tissus à l'échelle journalière (Mencuccini *et al.* 2013; Sevanto *et al.* 2011; Steppe *et al.* 2006; Zweifel *et al.* 2007). Ces déformations sont induites par la demande évaporatoire de l'air et la transpiration foliaire associée (Angeles *et al.* 2004; Bréda *et al.* 2006; Dixon et Joly 1895; Dobbertin et Brang 2001; Milburn 1996; Zimmerman et Pospíšilová 1983). Le gradient de potentiel hydrique conduit l'eau verticalement à travers la tige et circule radialement, entre le xylème et l'écorce (Sevanto *et al.* 2011; Steppe *et al.* 2012; Zweifel *et al.* 2001). Ces deux processus sont couplés à des contractions ou expansions des tissus élastiques dans le sens radial (Zweifel *et al.* 2014), tamponnant le potentiel hydrique à travers la plante (Cruziat *et al.* 2002). La synchronisation et l'amplitude des variations journalières du diamètre du tronc sont généralement déterminées par des changements du niveau de transpiration et de réserve en eau du sol (Cermak *et al.* 2007; Kozlowsky and Winget 1964). Les cycles journaliers sont donc dépendants des conditions climatiques locales et changent rapidement en fonction des conditions climatiques (e.g. King *et al.* 2012 pour le mélèze européen et l'épicéa européen, Vieira *et al.* 2013 pour le pin maritime). L'amplitude maximale de contraction du diamètre du tronc (« maximum daily shrinkage », MDS, Garnier et Berger 1986) est donc un paramètre pertinent pour l'analyse des fluctuations journalières de l'équilibre hydrique dans les tissus.

La taille du tronc varie également en fonction de la croissance secondaire (radiale), résultant de la division des cellules du cambium et de leur expansion (Deslauriers *et al.* 2007; Downes *et al.* 1999; Irvine and Grace 1997; Turcotte *et al.* 2009; Zweifel *et al.* 2000). L'augmentation à long terme du rayon repose sur une interaction entre des processus hydrauliques et d'autres liés à la fixation de carbone. Cette croissance irréversible demande de transporter une quantité d'eau suffisante pour permettre une augmentation de la pression de turgescence des cellules, entraînant une expansion cellulaire et facilitant l'incorporation des sucres dans la structure cellulaire (Daudet *et al.* 2005; Genard *et al.* 2001; Lockhart 1965; Steppe *et al.* 2006). Cette composante de la variation du tronc peut être estimée en calculant la différence entre deux maximum journaliers successifs de la valeur du rayon du tronc (noté Δm_{xtr} par la suite).

Les capteurs de déplacement linéaire (microdendromètres) enregistrent les variations du rayon du tronc à l'échelle sub-horaire avec une résolution de l'ordre du micromètre. Ce sont des outils puissants pour suivre les changements du rayon du tronc en continu et donc pour caractériser la croissance de l'arbre au cours de la saison (e.g., Bouriaud *et al.* 2005; Carrer *et al.* 1998; Fritts 1961; Hertzog *et al.* 1995; Tardif *et al.* 2001). Ce type de mesure a été réalisé sur de nombreuses espèces de part le monde (Daubenmire 1945; Daudet *et al.* 2005; Deslauriers *et al.* 2003; Drew and Downes 2009; Zweifel *et al.* 2001; Sevanto *et al.* 2011; Steppe *et al.* 2006), y compris le pin maritime (Vieira *et al.* 2013). Cependant, ces études ont été menées le plus souvent sur un nombre limité de géotypes de la même espèce, empêchant de tester formellement la part de variabilité génétique dans la variation du phénotype. L'étude de la variabilité génétique intraspécifique des fluctuations du rayon du tronc et l'architecture des traits associés est donc un territoire scientifique nouveau. La plupart des études comparent des espèces différentes (Downes *et al.* 1999, Deslauriers *et al.* 2007, Deslauriers *et al.* 2007b, Drew *et al.* 2009, Zweifel *et al.* 2005) ou des conditions environnementales contrastées (King *et al.* 2013, Wimmer *et al.* 2002, Drew *et al.* 2011) mais ne s'attachent pas à décrire la variabilité au sein de l'espèce. Hors, la mise en évidence d'une variation génétique est cruciale dans le cadre de l'amélioration génétique. Par ailleurs, seule l'étude de J Bartholomé chez l'eucalyptus (non publiée) a abordée à ce jour l'architecture génétique de traits de microvariations journalières du rayon du tronc en réponse à la contrainte environnementale.

Dans cette étude, nous avons utilisé les données de microdendromètres enregistrées pendant 3 saisons de végétation, pour étudier la variabilité et la plasticité phénotypique des traits de microvariation journalière chez le pin maritime. Nous avons testé les hypothèses selon lesquelles les traits de microvariation journalière sont contrôlés par des facteurs génétiques et environnementaux et que la croissance annuelle cumulée est reliée aux traits de réponse journalière. Nous avons suivis la croissance annuelle, les trajectoires de croissance radiale et la variation journalière du rayon de 224 arbres issus de deux croisements contrôlés de parents d'origines géographiques contrastées (Maroc, Landes et Corse). En suivant les arbres sur 3 saisons de végétations, nous avons pu classer les signaux journaliers selon deux facteurs environnementaux (évapotranspiration et potentiel hydrique du sol), ce qui a permis de quantifier la plasticité phénotypique des traits de microvariation journalière. L'architecture génétique de ces traits a ensuite été analysée. Cette étude apporte des connaissances nouvelles sur la plasticité phénotypique, la variabilité et l'architecture génétique des traits de microvariation journalière chez le pin maritime.

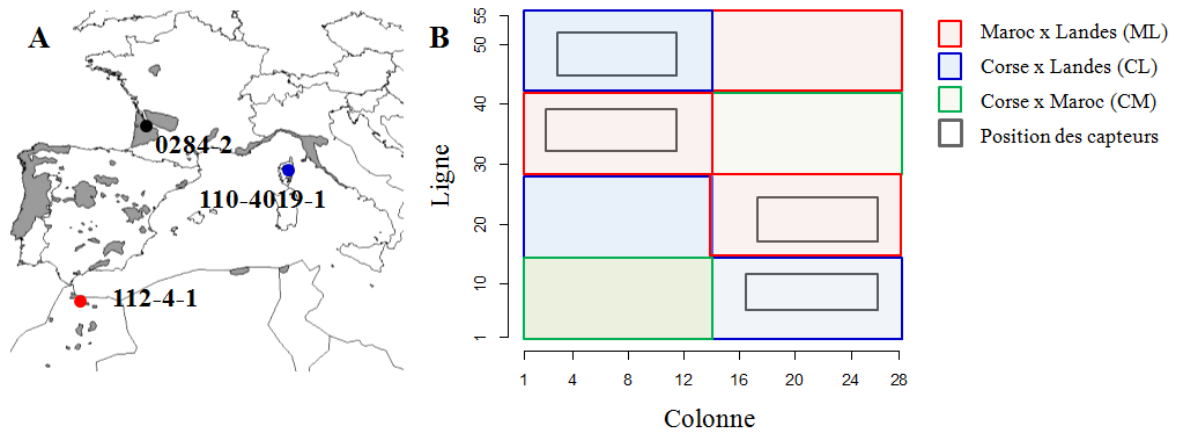


Figure 1. A. Origine géographique des arbres utilisés comme parents dans les croisements de pleins-frères. L'aire de distribution naturelle du Pin maritime est représentée en gris (selon Burban *et al.* 2004). **B.** Représentation schématique du plan d'expérience (ligne, colonne). La position des placettes équipées de capteurs est représentée en noir.

VI.II Matériels et méthodes

VI.II.I Matériel végétal et site expérimental

Le site expérimental est celui situé sur le domaine expérimental de l'INRA de Pierroton, sur la commune de Cestas. La description complète de l'essai est fournie dans le chapitre matériel et méthodes (chapitre II).

L'essai est composé de 1541 pleins frères de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) d'âge identique au moment de la plantation, issus de croisements contrôlés de trois géotypes parentaux d'origine géographique différente (Figure 1A) : Corse (C, accession 10_4019_1, Gorges de la Restonica, 42°15'47.1"N 9°04'55.3"E, 1710 m d'altitude), Landes (0284_2, 44°41'29.4"N 0°51'14.8"W) et Maroc (112_4_1, Jbel Berkane, rift occidental, 34°43'43.0"N 3°47'20.5"W, 1770 m d'altitude). La structure de l'essai est rappelée à la Figure 1A et 1B. Dans cette étude nous avons phénotypé et géotypé 317 individus au sein des croisements Corse x Landes (CL), Maroc x Landes (ML) et Corse x Maroc (CM) : 106, 117 et 94 individus, pour les croisements CL, ML et CM, respectivement.

Ces trois écotypes ont été choisis pour leurs caractéristiques intrinsèques principales. La provenance landaise présente un fort taux de croissance en hauteur, l'écotype Corse offre une bonne rectitude du fût et le marocain une bonne résistance à la sécheresse (Debazac 1964). Les zones géographiques d'origine des écotypes Corse, Landes et Maroc sont caractérisées respectivement par une évapotranspiration annuelle de 790, 955 et 1,055 mm, une somme de précipitations annuelle de 817, 800 et 348 mm et une température annuelle moyenne de 15, 16 et 17 °C (données moyennes sur les 20 dernières années d'après des stations météorologiques disponibles dans la base CLIMATIK proches des sites d'origine des parents de croisements). En comparaison, une évapotranspiration cumulée annuelle de 806 mm a été enregistrée sur le site expérimental de Cestas (période de mars 2011 à février 2014).

VI.II.II Phénotypage

VI.II.II.I Traits de croissance annuelle

Des mesures de la croissance des arbres (hauteur, diamètre) ont été réalisées chaque année depuis 2010 dans la période hivernale (décembre, quand la croissance est fortement ralentie). Le diamètre des individus a été mesuré à 20 cm au dessus du sol avec un pied à coulisse à la fin des saisons de végétation 2010 et 2011 (Décembre) puis avec une mètre ruban en décembre 2012 et 2013. Les deux techniques ont une précision similaire (de l'ordre du mm). La mesure de la hauteur totale des individus a été réalisée aux mêmes dates. Ces mesures ont été utilisées pour calculer les accroissements annuels 2011, 2012 et 2013 (accroissement en diamètre et en hauteur). La

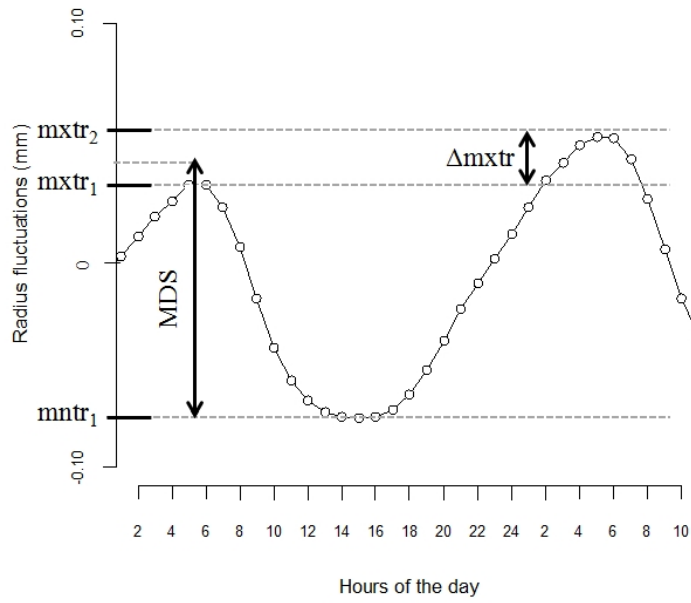


Figure 2. Représentation schématique des variations journalières du rayon. Les valeurs maximales et minimales journalières ($mxtr$ et $mntr$) du rayon du tronc, l'amplitude maximale de variation journalière (MDS) et la différence entre deux maxima journaliers successifs ($\Delta mxtr$) sont indiquées.

description complète des mesures de tous les individus du dispositif est présentée au chapitre IV, nous utiliserons ici seulement les données relatives aux arbres également génotypés avec la puce illumina 9k (317 arbres sur 1541).

VI.II.II. II Données de microvariation radiale

Des capteurs de déplacement linéaire (dendromètres) ont été installés sur 224 arbres du dispositif de Cestas-Pierroton en Février 2011, à 20 cm au dessus du sol, sur la partie est des troncs (dû à un vent majoritairement en provenance de l'ouest). La position des ces parcelles de mesure est indiquée par des rectangles noirs dans la Figure 1B. Les données étudiées dans le cadre de ce travail vont de Mars 2011 à Février 2014. Une mesure de tension a été effectuée par le système toute les 20 s et une moyenne de ces valeurs a été enregistrée dans la centrale toutes les 5 min (soit 288 valeurs par arbre, par jour). La description détaillée du dispositif est disponible dans le chapitre II, nous n'y reviendrons donc pas ici.

Deux variables ont été extraites des données de variation journalière du diamètre du tronc (Figure 2): (1) l'amplitude maximale de contraction du rayon tronc (maximum daily shrinkage, MDS, μm), calculée à partir du maximum et du minimum journaliers (nommés maximum et minimum trunk radii ,mxtr et mntr, respectivement) ; (2) la différence entre deux maxima journaliers successifs ($\Delta mxtr$, μm). MDS et $\Delta mxtr$ ont été calculés selon les équations suivantes:

$$MDS = ((mxtr_2 + mxtr_1) / 2) - mntr_1 \quad \text{Eqn 1}$$

$$\Delta mxtr = mxtr_2 - mxtr_1 \quad \text{Eqn 2}$$

Les indices « 1 » et « 2 » correspondent respectivement au jour de mesure et au jour suivant. Ces variables sont classiques pour décrire les variations journalières du diamètre du tronc (Deslauriers *et al.* 2003 ; Drew et Downes 2009 ; Downes *et al.* 1999). Le MDS représente un signal majoritairement hydraulique alors que le $\Delta mxtr$ est le résultat de la combinaison d'une composante hydraulique et de la croissance nette. La moyenne de deux maxima journaliers consécutifs a été utilisée pour estimer la part de variation due à la croissance. Cette valeur a été retranchée du signal hydraulique pour calculer le MDS. Il est important de noter que le $\Delta mxtr$, classiquement utilisé pour représenter la composante journalière de croissance pure, peut prendre des valeurs négatives dans notre étude. Ceci révèle la présence d'un signal hydraulique superposé à la mesure de croissance dans les mesures de $\Delta mxtr$ (see King *et al.* 2012). Par ailleurs 32 jours (sur 1075 au total) ont été exclus du jeu de données (soit 3%) en raison de la présence de données aberrantes (hors de la gamme de mesure des capteurs) associées à un dysfonctionnement électrique.

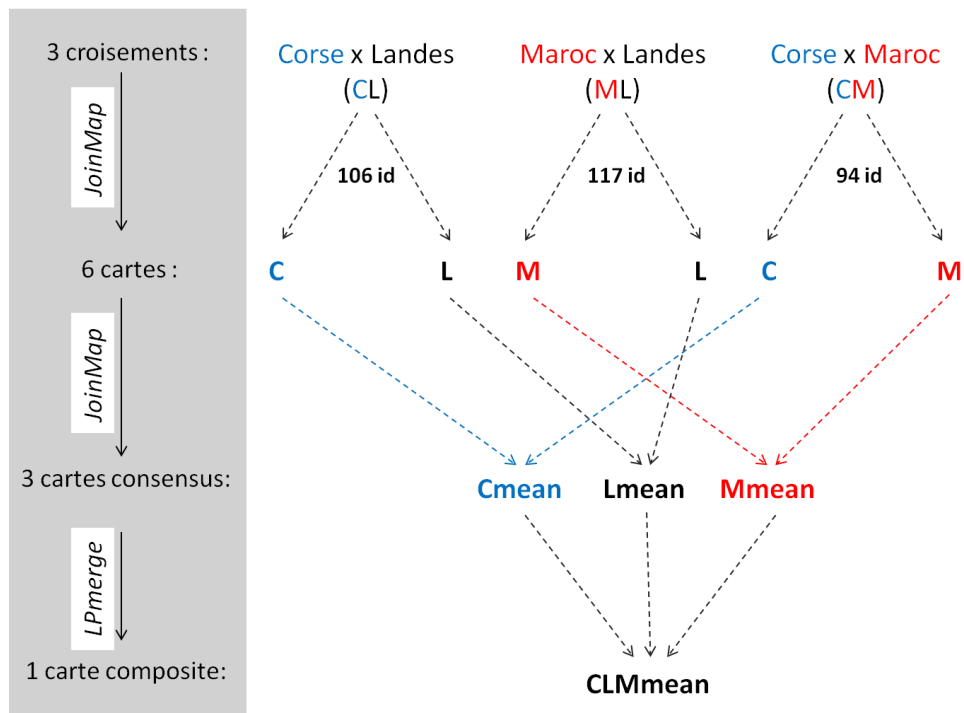


Figure 3. Méthode de construction de la carte composite des trois croisements génotypés à l'aide de la puce 9k (Corse x landes, Maroc x Landes et Corse x Maroc). Les parents Corse, Landes et Maroc sont représentés en bleu, noir et rouge respectivement. Les noms des groupes de cartes générés sont indiqués sur la partie droite de la figure. La partie gauche de la figure indique le nombre total de groupes de cartes générés à chaque étape ; ainsi que les logiciels utilisés (dans les cadres blancs).

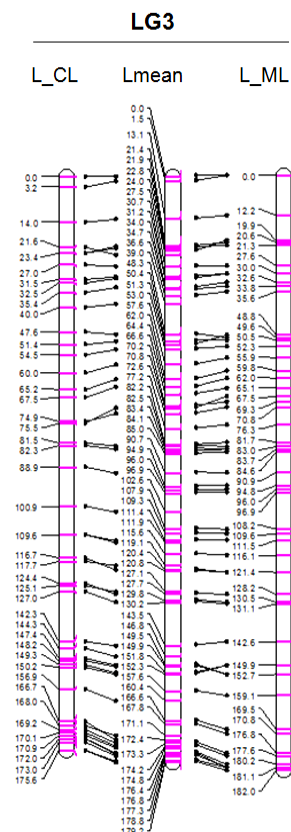


Figure 4. Alignement des groupes de liaison 3 (« linkage group 3» LG3) du parent L dans le croisement CL (L_CL, à gauche), pour la carte Lmean (Lmean, au milieu) et dans le croisement ML (L_ML, à droite). Les positions des marqueurs communs entre groupes adjacents sont représentées par des points noirs et reliées par des traits noirs. Les traits horizontaux montrent la colinéarité remarquable obtenue dans cette étude.

VI.II.III Génotypage et cartographie génétique

Le génotypage des 3 familles de pleins-frères a été réalisée grâce à une puce de génotypage de 8949 SNP (puce 9k). La puce 9k Infinium a été conçue à partir de deux sources de marqueurs (SNP) précédemment validés sur des populations de pin maritime et des marqueurs nouvellement synthétisés. La description complète de sa conception est disponible dans l'article disponible en annexe 1 (Plomion *et al.* 2015) dont je suis co-auteur.

VI.II.III.I Génotypage haute-densité sur un faible effectif

Une première analyse de liaison a été effectuée sur 106, 117 et 94 individus des croisements CL, ML et CM, respectivement. L'analyse de liaison a été faite selon la méthode du double pseudo-test-cross décrite dans Grattapaglia and Sederoff (1994). Des cartes génétiques ont été générées pour chaque parent testé (Corse, C, accession 10_4019_1, Landes, L, accession 0284_2 et Maroc, M, 112_4_1), dans chaque configuration de croisement ; soit 6 cartes: C et L dans le croisement CL, M et L dans le croisement ML et C et M dans le croisement CM (voir Figure 3). Nous avons utilisé les SNP et les individus avec respectivement moins de 1% et 2% de valeurs manquantes. La conformité à la ségrégation Mendélienne a été évaluée à l'aide d'un test du χ^2 ($P < 0.001$) et l'analyse de liaison a été réalisée avec le logiciel JoinMap v4.1 (van Ooijen 2006), en utilisant CP (« cross pollination », pollinisation croisée) comme type de population et un seuil de LOD ≥ 3 pour le regroupement des marqueurs en groupe de liaison. La phase (couplage ou répulsion) de chaque marqueur est détectée automatiquement par JoinMap avec l'option CP, ce qui permet de détecter la liaison de locus de phases différentes sur le même groupe de liaison.

VI.II.III.II Construction des cartes génétiques

La procédure de cartographie est décrite au chapitre II. Tous les marqueurs ségrégeant selon un ratio $1/2 : 1/2$ ont été pris en compte à l'exception des marqueurs possédant une distorsion significative selon un test de χ^2 à seuil de 1/1000. Les groupes de liaison ont été nommés LG (« linkage group ») et numérotés de 1 à 12 selon leur homologie avec les groupes décrits dans Chancerel *et al.* (2011 et 2013).

Les groupes homologues de parents identiques (génomés dans deux croisements différents) ont été assemblés par la suite en utilisant la fonction « combine groups for map integration » de JoinMap (exemple Figure 4 pour le LG3). 3 groupes des cartes supplémentaires ont ainsi été générés et nommés Cmean, Lmean et Mmean pour les parents C, L et M respectivement (voir Figure 3). Le package LPmerge (Endelman and Plomion 2014) a ensuite été utilisé pour construire une carte composite à partir des groupes de cartes moyennées parentales en utilisant la carte « Lmean »

comme référence de départ. Une carte composite « CLMmean » qui rassemble le maximum d'information des groupes de cartes parentales a ainsi été générée (Figure 3). Cette dernière étape de fusion a été effectuée afin de construire un outil de représentation unique pour la comparaison ultérieure de QTL dans les différents fonds génétiques.

VI.II.IV Données environnementales

Les variables environnementales sont mesurées (ou calculées) par une station météorologique située à environ 300 m de l'essai. De nombreuses variables telles que, la température, l'humidité relative, les sommes de précipitations, le rayonnement global ou la vitesse du vent sont disponibles. Ces données sont accessibles sur l'application INRA Climatik (<https://intranet.inra.fr/climatik/do/welcome>) en accès limité par mot de passe.

L'évapotranspiration a été calculée à l'échelle horaire selon la méthode de Penman-Monteith (ETP, mm, Monteith 1965) et cumulée par jour. Sur le dispositif, la température et l'humidité relative de l'air sont également mesurées au niveau de chaque plateau de microdendromètres à un pas de temps de 5min et moyennées par heure. Le rayonnement global (RG, W/m²) et la vitesse du vent (m.s⁻¹) ont été mesurés par la station météo décrite plus haut.

La réserve volumique en eau du sol (soil water content, SWC) est également mesurée sur les 4 placettes de capteurs dendrométriques par 4 sondes réflectométriques (16 sondes en tout, Campbell Scientific CS616). Chaque placette de mesure possède 2 sondes enterrées à 15 cm, une à 30cm et une autre à 45cm de profondeur (4 en tout). La capacité d'exploration est considérée comme étant de 15cm de sol pour les sondes à 15cm et 30cm et une extrapolation de 70cm est faite pour la sonde à 45 cm. On obtient ainsi une valeur de réserve volumique calculée pour une épaisseur de sol d'1m (correspondant à l'exploration des racines de pin au jeune âge).

A partir de la réserve en eau du sol, la fraction d'eau extractible (relative extractable water, REW_i) a été calculée selon l'équation suivante :

$$REW_i = (SWC_i - SWC_{WP}) / (SWC_{FC} - SWC_{WP}) \quad \text{Eqn 3}$$

Les indices WP et FC font respectivement référence au point de flétrissement (wilting point) et la capacité au champ du site expérimental (field capacity).

Le potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol_i} , MPa) a ensuite été estimé selon l'équation suivante, ajustée selon des mesures précédemment réalisées sur le site expérimental :

$$\Psi_{sol_i} = ((a + bREW_i - ((a + bREW_i)^2 - 3.2abREW_i)^{0.5}) / 1.6) + c \quad \text{Eqn 4}$$

Avec a=1.6, b=8.0, and c=-1.7

Les jours de mesures ont donc été regroupés et triés selon les mesures journalières d'ETP et Ψ_{sol} , afin de comparer les niveaux de contrainte. Chaque variable climatique a été classée en 5 groupes, correspondant à 20% de la variabilité observée sur la période étudiée : $x < 1.5$, $1.5 < x \leq 3$, $3 < x \leq 4.5$, $4.5 < x \leq 6$ et $x > 6$ pour ETP (mm) et $0 > x \geq -0.4$, $-0.4 > x \geq -0.5$, $-0.5 > x \geq -0.6$, $-0.6 > x \geq -0.7$ et $x < -0.7$ pour Ψ_{sol} (MPa).

10 classes, numérotées de 1 à 10, correspondent à un tri selon chaque contrainte séparément : de 1 à 5 $x < 1.5$, $1.5 < x \leq 3$, $3 < x \leq 4.5$, $4.5 < x \leq 6$ and $x > 6$ mm d'ETP et de 6 à 10 $0 > x \geq -0.4$, $-0.4 > x \geq -0.5$, $-0.5 > x \geq -0.6$, $-0.6 > x \geq -0.7$ et $x < -0.7$ pour Ψ_{sol} (MPa). L'effet cumulé des deux types de contraintes a également été testé à travers des catégories de contraintes croisées, numérotées de 11 à 35 (voir Tableau 4 et Figure 13). De cette manière, la variation des traits a été analysée en fonction des niveaux de contrainte environnementale subis par les plantes.

VI.II.V Analyses statistiques

VI.II.V.I Estimation des composantes de la variance

Des statistiques descriptives (moyenne, écart type, coefficient de variation) ont été obtenues sur tous les caractères mesurés sur les trois croisements, ainsi qu'une analyse de corrélation de Pearson. La plasticité phénotypique des individus sur les trois années testées (2011 à 2013) a également été testée en comparant le classement des individus entre deux années successives par un test apparié de Wilcoxon, pour chaque trait. Les arbres sont classés 1 à n (n variant selon le trait), des valeurs les plus faibles vers les valeurs les plus fortes (ex. pour l'accroissement en hauteur, l'arbre classé 1 est celui qui a le plus faible accroissement annuel). Les classements des individus sont reliés par des lignes entre deux années successives pour mettre en évidence les changements de classement.

Des modèles mixtes ont également été implémenté avec les packages R lme4 (Bates *et al.* 2013) et lmerTest (Kuznetsova *et al.* 2013) prenant en compte la structure de dépendance des données pour les effets fixes et aléatoires. L'effet environnemental (représenté par l'année, an), l'effet du croisement (cross) ainsi que leurs interactions ont été estimés pour tous les caractères mesurés sur une échelle de temps annuelle. L'effet du génotype (individu, id) a été considéré comme aléatoire.

$$Y = X.\beta + Z.u + \varepsilon$$

Avec,

- Y: vecteur des observations (ici accd, acch, moyennes annuelles de MDS et Δm_{xtr})
- β : vecteur des effets fixes (ici an, cross et an*cross).
- u: vecteur des effets aléatoires (effet individuel)
- ε : vecteur des résidus
- X et Z: matrices qui lient les observations Y aux effets β et u, respectivement.

Pour les traits de microvariation journalière (MDS et Δm_{xtr}) mesurés sur deux des trois croisements, l'effet environnemental (ETP et Ψ_{soil}), l'effet du croisement (cross) ainsi que leurs interactions ont été estimés par le modèle suivant où l'effet du génotype (individu, id) a été considéré comme aléatoire.

$$Y = X.\beta + Z.u + \varepsilon$$

Avec,

- Y: vecteur des observations (ici MDS et Δm_{xtr})
- β : vecteur des effets fixes (ici ETP, Ψ_{soil} , cross ETP*cross, Ψ_{soil} *cross).
- u: vecteur des effets aléatoires (effet individuel)
- ε : vecteur des résidus
- X et Z: matrices qui lient les observations Y aux effets β et u, respectivement.

Les variances ont été estimées pour les facteurs aléatoires dans tous les modèles (variance génétique au sein des pleins-frères et variance résiduelle).

La relation entre les variations journalières du rayon du tronc et l'accroissement en diamètre a également été testée de la manière suivante : i) les arbres ont été triés par croisement et classés selon leur accroissement en diamètre pendant la période étudiée, ii) les individus ont été regroupés en cinq catégories comprenant 20% des rangs (des plus mal classés vers les mieux classés, de l'accroissement en diamètre le plus faible vers le plus fort), les différences moyennes en MDS et Δm_{xtr} entre les conditions climatiques extrêmes rencontrées dans l'étude (PET=0 vs. PET>6, $\Psi_{soil}=0$ vs. $\Psi_{soil}<-0.7$) ont été calculées pour chaque catégorie, et enfin iv) des tests de Tukey (Tukey Honest Significant Differences) ont été effectués pour comparer les catégories.

VI.II.V.II Tests de colinéarité entre cartes

L'assignation des groupes de liaison a été effectuée par alignement des groupes de liaison sur la carte haute densité décrite dans Chancerel *et al.* (2013). Les groupes homologues ont ainsi pu être alignés et comparés sur la base de leurs marqueurs en commun. Des tests de corrélation ont été effectués sur les positions des marqueurs des groupes homologues sur les différentes cartes (position du marqueur sur la carte n°1 en abscisse, position du marqueur sur la carte n°2 en ordonnée) pour vérifier la colinéarité entre paires de cartes. Une fois la colinéarité confirmée, le package LPmerge (Endelman et Plomion 2014) a été utilisé pour construire une carte composite selon la procédure schématisée à la Figure 3.

VI.II.V.III Détection de QTL

Dans cette étude, les différentes analyses QTL en simple environnement ont été réalisées avec le package R *qtl* (Broman et Sen 2009, Broman *et al.* 2003). La méthode de CIM a été utilisée en fixant un seuil de significativité à 10% au niveau du génome. Le taux d'erreur de type I au niveau du génome a été calculé avec mille permutations (Chruchill et Doerge 1994). Les intervalles de confiance (95%) autour des QTL ont été calculés avec la fonction *bayesint*.

Pour chaque variable, l'effet environnement a également été quantifié dans chaque environnement et testé de manière globale par le modèle multi-environnements du logiciel MultiQTL (Korol *et al.* 1998). La détection de QTL en multi-environnements dans cette étude repose sur un modèle dans lequel chaque catégorie environnementale est considérée comme un environnement différent pour les variables testées (voir Tableau 1).

Tableau 1. Variables testées en analyse QTL. Les environnements testés correspondent aux classes décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

Variable	Description	Nbr d'environnements testés*	Type d'environnement
Δm_{xtr}	<i>différence entre 2 maxima journaliers successifs (μm)</i>	32	ETP et Ψ_{sol} journaliers
MDS	<i>amplitude maximale de contraction journalière du tronc (μm)</i>	32	ETP et Ψ_{sol} journaliers

* Les conditions climatiques des années de mesure et la zone géographique de l'essai n'ont pas permis de représenter toutes les catégories croisées d'environnement (voir classes vides Figure 10).

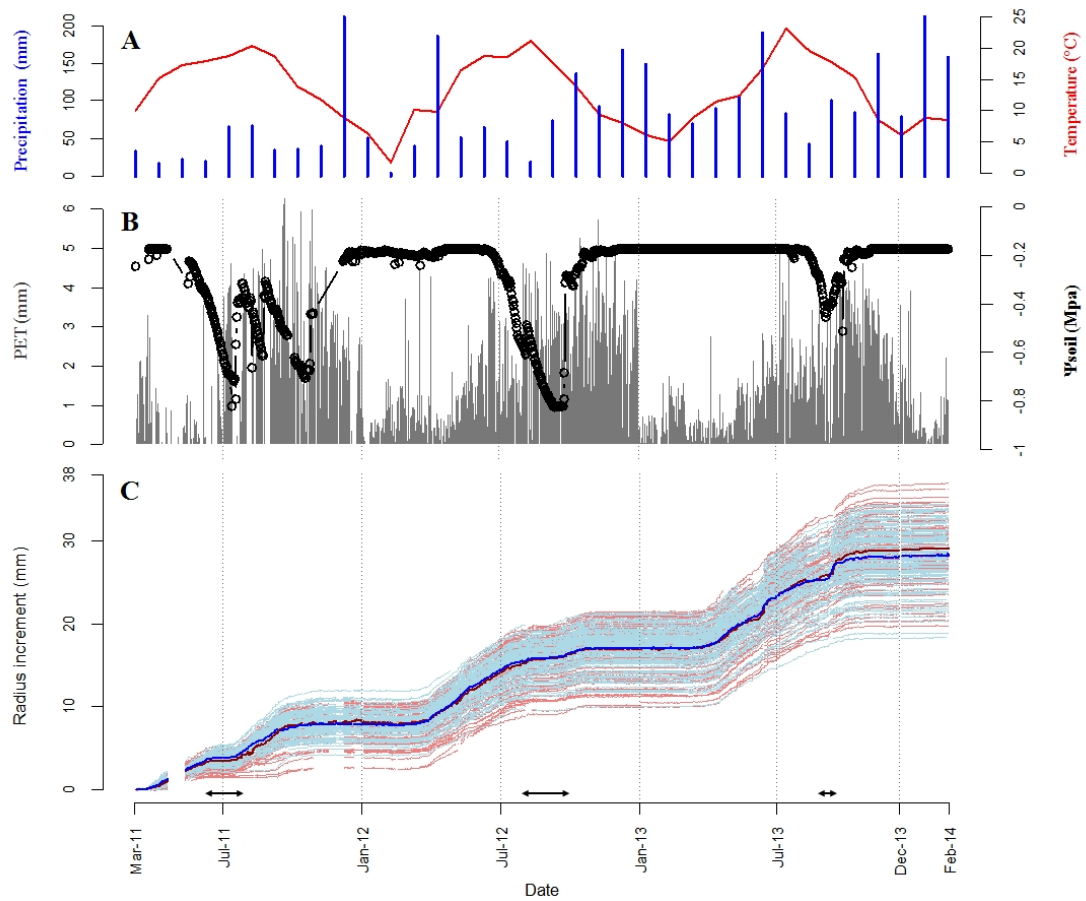


Figure 5. **A.** Sommes de précipitations mensuelles (mm) (barres bleues, axe des y, à gauche) et températures mensuelles moyennes (°C, ligne rouge, axe des y, à droite) pendant la période étudiée (axe des x). **B.** Evapotranspiration journalière Penman-Monteith (ETP, mm) (barres grises axe des y, à gauche) et potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol} , MPa) sur un profil d'1m de profondeur (points noirs, axe des y, à droite). **C.** Accroissement du rayon pour 223 génotypes de Pin maritime de mars 2011 à février 2014 (arbres âgés de 4 à 7 ans). Les lignes bleu clair représentent les arbres du croisement Corse x Landes (CL) ; les lignes roses représentent les arbres du croisement Maroc x Landes (ML). Les lignes épaisses bleu et rouge représentent respectivement les moyennes des croisements CL et ML.

VI.III Résultats

VI.III.I Années climatiques et gradient environnemental

Les conditions météorologiques étaient très variables entre les 3 années de mesure (2011, 2012 et 2013). Sur le site expérimental, la température moyenne mensuelle allait de 1,8°C (Février 2012) à 23°C (Juillet 2013), avec une moyenne sur la période étudiée de 13,1°C. Les sommes de précipitations mensuelles allaient de 4mm (Février 2012) à 212 mm (Décembre 2011), avec une moyenne de 86mm (Figure 5A). Le potentiel minimum journalier du sol (Ψ_{sol}) variait aussi considérablement au cours du temps, avec des valeurs comprises entre -0.17 MPa (période hivernale, début du printemps) et -0.83 MPa (Septembre 2012), avec une moyenne de -0.27 MPa. Les valeurs minimales ont été observées de Juin à Décembre 2011, de Juillet à Septembre 2012 et fin Août, début Septembre 2013. L'évapotranspiration journalière (ETP) variait de 0mm (Décembre-Janvier 2011, 2012, 2013 et Janvier 2014) à 6,4 mm (Juin 2011), avec une moyenne de 1,8 mm. Les valeurs étaient minimales pendant les périodes hivernales (Décembre-Janvier) et maximales pendant l'été (Juin, Juillet et Août). Cependant, il convient de préciser que les sommes annuelles d'ETP n'ont pas beaucoup varié pendant la période étudiée: 839, 808 et 773 mm en 2011, 2012 and 2013, respectivement (Figure 5B).

La mise en évidence de cette variabilité d'ETP et de Ψ_{sol} nous a permis de recréer un gradient de contraintes climatiques en regroupant les jours de mesure selon leurs valeurs d'ETP et de Ψ_{sol} (Tableau 2). La classification des jours selon les valeurs d'ETP et de Ψ_{sol} séparément (catégories, cat de 1 à 10) montre qu'une classe d'ETP peut coïncider avec des valeurs différentes de Ψ_{sol} et inversement. Les catégories (cat) de 1 à 5 correspondent à des valeurs de Ψ_{sol} réparties dans toute la gamme de variation (-0,17 à -0,83 MPa) de même pour les cat de 6 à 10 concernant les valeurs d'ETP (de 0 à 6,4 mm). Le regroupement des jours dans des catégories cumulant les deux types de contraintes permet de préciser plus finement le gradient (cat de 11 à 35). Le nombre de jours compris dans chaque catégorie (Tableau 2) montre que les conditions expérimentales sont peu contraignantes pendant la période étudiée. Il n'y a notamment aucun jours possédant à la fois un potentiel du sol très faible et un niveau d'évapotranspiration maximal (cat 11 et 12, Figure 10). De même, la majorité des jours est comprise dans des catégories de contrainte moyenne (108 et 147 jours pour une ETP moyenne de 3,7 mm et un Ψ_{sol} moyen de -0,44 MPa, et pour une ETP moyenne de 2,2 mm et un Ψ_{sol} moyen de -0,23 MPa, cat 21 et 26) à faible (94 jours pour une ETP moyenne de 0,8 mm et un Ψ_{sol} moyen de -0,22 MPa, cat 31).

Tableau 2. Données climatiques pour les classes environnementales testées. Les données correspondent à trois saisons de végétations successives (mars à avril à octobre de 2011 à 2013). La valeur moyenne (moy), l'écart-type (sd), le minimum (min), le maximum (max) et le coefficient de variation (cv) sont indiqués pour chaque catégorie (cat) d'évapotranspiration, ETP (mm) et le potentiel hydrique du sol, Ψ_{sol} (MPa) journaliers. Le nombre de jours inclus dans chaque catégorie est indiqué (Nbr de jours).

cat	ETP (mm)					Ψ_{sol} (MPa)					Nbr de jours
	moy	sd	min	max	cv	moy	sd	min	max	cv	
1	0.8	± 0.4	0.0	1.5	0.55	-0.29	± 0.16	-0.82	-0.17	-0.54	117
2	2.2	± 0.5	1.5	3.0	0.20	-0.34	± 0.20	-0.83	-0.17	-0.57	207
3	3.6	± 0.4	3.0	4.5	0.11	-0.34	± 0.22	-0.82	-0.17	-0.63	158
4	4.9	± 0.4	4.5	6.0	0.08	-0.42	± 0.20	-0.74	-0.17	-0.46	31
5	6.2	± 0.2	6.0	6.4	0.03	-0.58	± 0.04	-0.64	-0.54	-0.08	3
6	2.2	± 1.3	0.0	5.1	0.58	-0.22	± 0.07	-0.40	-0.17	-0.31	363
7	2.3	± 1.3	0.0	5.3	0.54	-0.44	± 0.03	-0.50	-0.40	-0.06	43
8	3.1	± 1.6	0.0	6.4	0.50	-0.54	± 0.03	-0.60	-0.50	-0.05	43
9	2.5	± 1.6	0.0	6.0	0.66	-0.66	± 0.03	-0.70	-0.60	-0.04	29
10	2.8	± 1.0	0.4	4.8	0.35	-0.77	± 0.07	-0.83	-0.70	-0.10	38
11											0
12											0
13	6.3	± 0.2	6.1	6.4	0.02	-0.55	± 0.01	-0.56	-0.54	-0.01	2
14	6.0	± 0.0	6.0	6.0	0.00	-0.64	± 0.00	-0.64	-0.64	0.00	1
15											0
16	4.7	± 0.2	4.5	5.1	0.04	-0.22	± 0.07	-0.38	-0.17	-0.31	14
17	5.3	± 0.0	5.3	5.3	0.00	-0.48	± 0.00	-0.48	-0.48	0.00	1
18	4.9	± 0.3	4.5	5.6	0.07	-0.54	± 0.03	-0.59	-0.50	-0.06	8
19	5.3	± 0.4	4.6	6.0	0.08	-0.64	± 0.03	-0.69	-0.61	-0.05	7
20	4.8	± 0.0	4.8	4.8	0.00	-0.74	± 0.00	-0.74	-0.74	0.00	1
21	3.7	± 0.4	3.0	4.4	0.11	-0.21	± 0.06	-0.39	-0.17	-0.30	108
22	3.7	± 0.4	3.1	4.4	0.10	-0.44	± 0.02	-0.47	-0.41	-0.05	12
23	3.6	± 0.4	3.1	4.5	0.10	-0.55	± 0.03	-0.60	-0.50	-0.06	13
24	3.8	± 0.5	3.1	4.4	0.12	-0.68	± 0.02	-0.70	-0.65	-0.03	6
25	3.6	± 0.4	3.0	4.2	0.12	-0.78	± 0.04	-0.82	-0.71	-0.05	19
26	2.2	± 0.5	1.5	3.0	0.20	-0.23	± 0.07	-0.40	-0.17	-0.31	147
27	2.4	± 0.5	1.5	3.0	0.19	-0.45	± 0.03	-0.50	-0.40	-0.07	19
28	2.3	± 0.4	1.6	3.0	0.17	-0.54	± 0.03	-0.59	-0.50	-0.05	13
29	2.1	± 0.4	1.5	3.0	0.20	-0.66	± 0.03	-0.70	-0.60	-0.05	12
30	2.3	± 0.4	1.5	2.9	0.18	-0.77	± 0.10	-0.83	-0.40	-0.14	16
31	0.8	± 0.4	0.0	1.5	0.55	-0.22	± 0.07	-0.40	-0.17	-0.30	94
32	0.8	± 0.4	0.0	1.3	0.49	-0.44	± 0.03	-0.50	-0.40	-0.06	11
33	0.7	± 0.6	0.0	1.5	0.82	-0.54	± 0.02	-0.56	-0.51	-0.03	7
34	0.7	± 0.4	0.0	1.5	0.54	-0.65	± 0.02	-0.68	-0.61	-0.03	3
35	1.0	± 0.3	0.4	1.2	0.34	-0.74	± 0.05	-0.82	-0.70	-0.07	2

Tableau 3. Statistiques descriptives des traits de croissance (accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm) et de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, Δm_{xtr} , μm) pour tous les individus suivis (317, pour les 3 croisements). La valeur moyenne, l'écart-type (sd), le minimum (min), le maximum (max) et le coefficient de variation (CV) sont indiqués pour chaque trait.

		2011					2012					2013				
		moyenne	sd	min	max	CV	moyenne	sd	min	max	CV	moyenne	sd	min	max	CV
accd (mm)	CL	17	± 4	9	29	0,22	22	± 4	10	34	0,19	23	± 5	11	56	0,24
	ML	21	± 4	9	29	0,20	24	± 4	12	35	0,18	25	± 5	10	47	0,21
	CM	19	± 5	0	43	0,29	23	± 4	10	34	0,18	26	± 7	10	63	0,27
acch (cm)	CL	40	± 13	7	76	0,33	98	± 22	-11	141	0,23	100	± 28	51	215	0,28
	ML	37	± 12	11	75	0,32	79	± 19	37	143	0,24	83	± 32	25	181	0,39
	CM	18	± 12	2	47	0,68	36	± 12	11	67	0,34	70	± 16	26	104	0,23
MDS (μm)	CL	138	± 20	81	178	0,14	119	± 11	96	154	0,09	107	± 22	68	195	0,20
	ML	154	± 28	82	227	0,18	116	± 10	93	157	0,09	100	± 14	69	147	0,14
	CM	NA	± NA	NA	NA	NA	NA	± NA	NA	NA	NA	NA	± NA	NA	NA	NA
Δm_{xtr} (μm)	CL	22	± 6	7	35	0,29	26	± 6	9	45	0,22	29	± 5	6	38	0,17
	ML	33	± 10	8	58	0,30	27	± 6	10	42	0,21	32	± 5	17	47	0,14
	CM	NA	± NA	NA	NA	NA	NA	± NA	NA	NA	NA	NA	± NA	NA	NA	NA

VI.III.II Variation des traits de croissance annuelle et des moyennes annuelles de traits de microvariation radiale du tronc

Les données de croissance annuelle montrent un accroissement en diamètre (accd, mm) moyen de 19, 23 et 25 mm en 2011, 2012 et 2013, respectivement (Tableau 3 et Figure 6) avec des accroissements similaires entre croisements (avec un très léger avantage en faveur du croisement ML). Les accroissements en hauteur sont plus hétérogènes à la fois entre années et entre croisements. Les accroissements en hauteur moyens (acch, cm) sont de 32, 71 et 84 cm de 2011 à 2013 respectivement, avec un accroissement en hauteur plus important pour le croisement CL les 3 années. On peut également noter une variabilité individuelle importante pour ces deux traits avec des coefficients de variation compris entre 0,20 et 0,68. Les modèles mixtes appliqués à ces données confirment ces observations. Les effets du croisement (cross), de l'année de mesure (an) et de leurs interactions sont significatifs (Tableau 4A) avec des parts de variance expliquées par l'effet individuel sont de l'ordre de 33% pour accd et 6% pour acch (Tableau 4B).

La mesure de traits de microvariation du rayon du tronc a été effectuée uniquement sur les arbres équipés de microdendromètres, soit 239 arbres répartis dans les croisements CL et ML. 15 arbres ont été exclus de l'analyse (6%) en raison d'un fort pourcentage de valeurs manquantes (>30%). L'analyse finale concerne donc 223 arbres : 106 et 117 arbres pour les croisements CL et ML, respectivement. Les moyennes annuelles des traits de microvariation du rayon du tronc (MDS et $\Delta mxtr$, μm) montrent que l'amplitude maximale de contraction du tronc (MDS) diminue au fil des années avec des valeurs moyennes pour les deux croisements de 146, 118 et 104 μm en 2011, 2012 et 2013, respectivement (Tableau 5). Les valeurs de MDS sont similaires entre les croisements CL et ML. Les différences moyennes entre maxima journaliers successifs ($\Delta mxtr$) sont similaires entre années, avec des valeurs de 28, 27 et 31 μm de 2011 à 2013. Le croisement ML montre des valeurs moyennes de $\Delta mxtr$ supérieures à celles du croisement CL les 3 années suivies (33, 27 et 32 μm contre 22, 26 et 29 μm en 2011, 2012 et 2013, respectivement). Les modèles mixtes appliqués à ces données confirment ces observations. Les effets de l'année de mesure (an) et de l'interaction croisement x environnement (cross : an) sont très significatifs, mais l'effet du croisement (cross) n'est significatif que pour $\Delta mxtr$ (pas pour MDS, Tableau 4A). Les parts de variance expliquées par l'effet individuel sont de l'ordre de <1% pour MDS et 33% pour $\Delta mxtr$ (Tableau 4B).

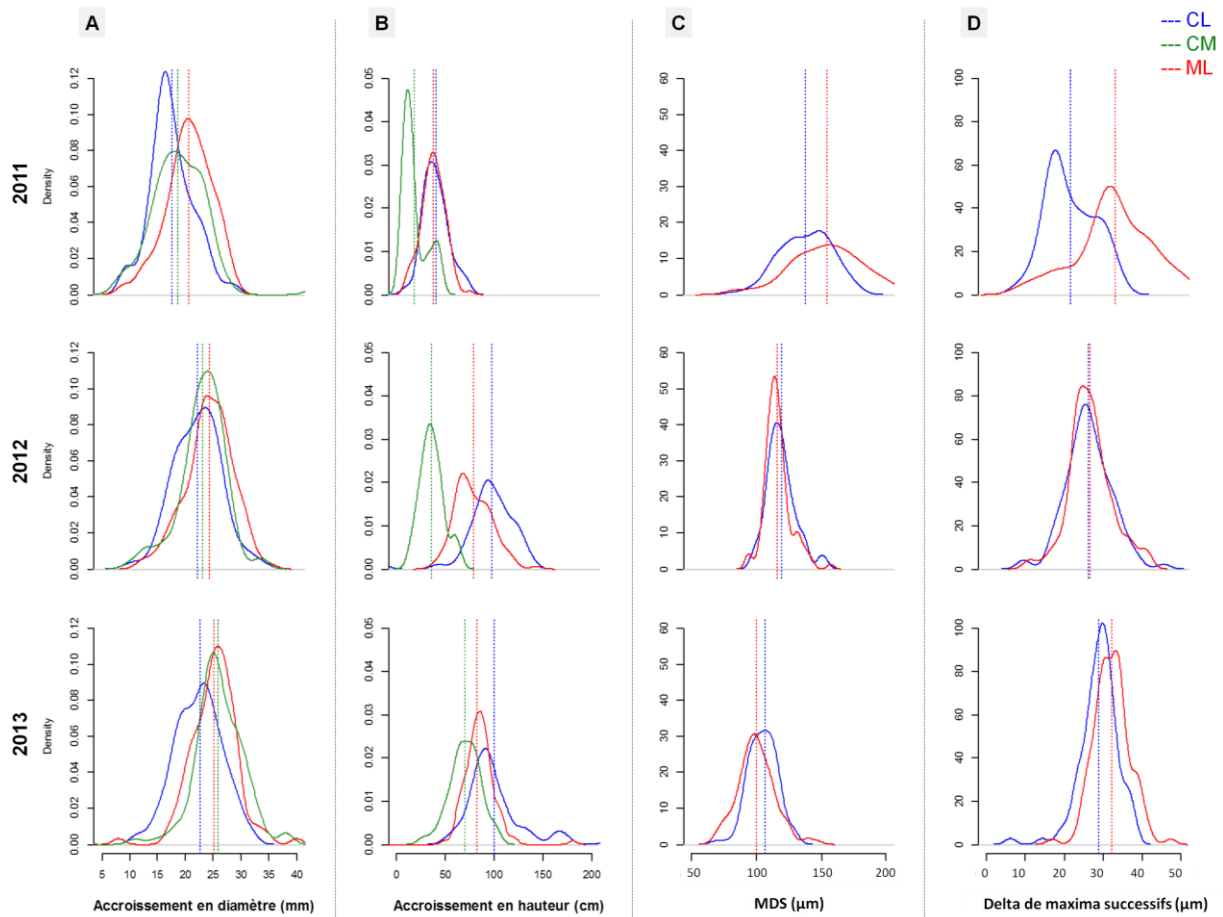


Figure 6. Courbes de distribution des données phénotypiques pour les années 2011 à 2013: les courbes bleues, rouges et vertes correspondent aux valeurs des croisements CL, ML et CM respectivement. Les lignes pointillées de mêmes couleurs indiquent les valeurs moyennes par croisement. De **A** à **D**: accroissement en diamètre (*mm*), accroissement en hauteur (*cm*), amplitude maximale de contraction journalière (MDS, μm), différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc (Δmxtr , μm).

Tableau 4. A. Modèles mixtes appliqués aux données annuelles de croissance (accroissement en diamètre, *accd*, mm, accroissement en hauteur, *acch*, cm,) et les moyennes annuelles des traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, *MDS*, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, Δmxtr , μm) de 2010 et 2013. L'année (*an*), le croisement (*cross*) et leur interaction (*cross* : *an*) constituent les effets fixes des modèles. **B.** Variance de l'effet aléatoire individu (*id*) dans les modèles précédents.

A

Modèle	Facteur	SCE	CM	DDL	F.value	Pr(>F)	
<i>accd</i> ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>cross</i>	575.1	287.55	2	15.652	3.38e-07	***
	<i>an</i>	5261.2	2630.62	2	143.193	<10 ⁻¹⁶	***
	<i>cross:an</i>	260.7	65.18	4	3.548	0.007132	**
<i>acch</i> ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>cross</i>	139011	69506	2	201.15	<10 ⁻¹⁶	***
	<i>an</i>	455955	227978	2	659.78	<10 ⁻¹⁶	***
	<i>cross:an</i>	49958	12490	4	36.15	<10 ⁻¹⁶	***
<i>MDS</i> ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>cross</i>	0.000777	0.000777	1	2.293	0.1314	
	<i>an</i>	0.201746	0.100873	2	297.710	<10 ⁻¹⁶	***
	<i>cross:an</i>	0.016186	0.008093	2	23.885	1.476e-10	***
Δmxtr ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>cross</i>	0.0020138	0.00201375	1	63.826	8.415e-14	***
	<i>an</i>	0.0019751	0.00098753	2	31.300	2.085e-13	***
	<i>cross:an</i>	0.0034343	0.00171714	2	54.425	<10 ⁻¹⁶	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

B

Modèle	Facteur	Variance	Std.Dev.
<i>accd</i> ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>id</i>	5.55	2.356
	Residual	18.37	4.286
<i>acch</i> ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>id</i>	62.51	7.906
	Residual	345.54	18.589
<i>MDS</i> ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>id</i>	6.717e-06	0.002592
	Residual	3.388e-04	0.018407
Δmxtr ~ <i>cross</i> + <i>an</i> + <i>cross:an</i> + (1 <i>id</i>)	<i>id</i>	1.056e-05	0.003250
	Residual	3.155e-05	0.005617

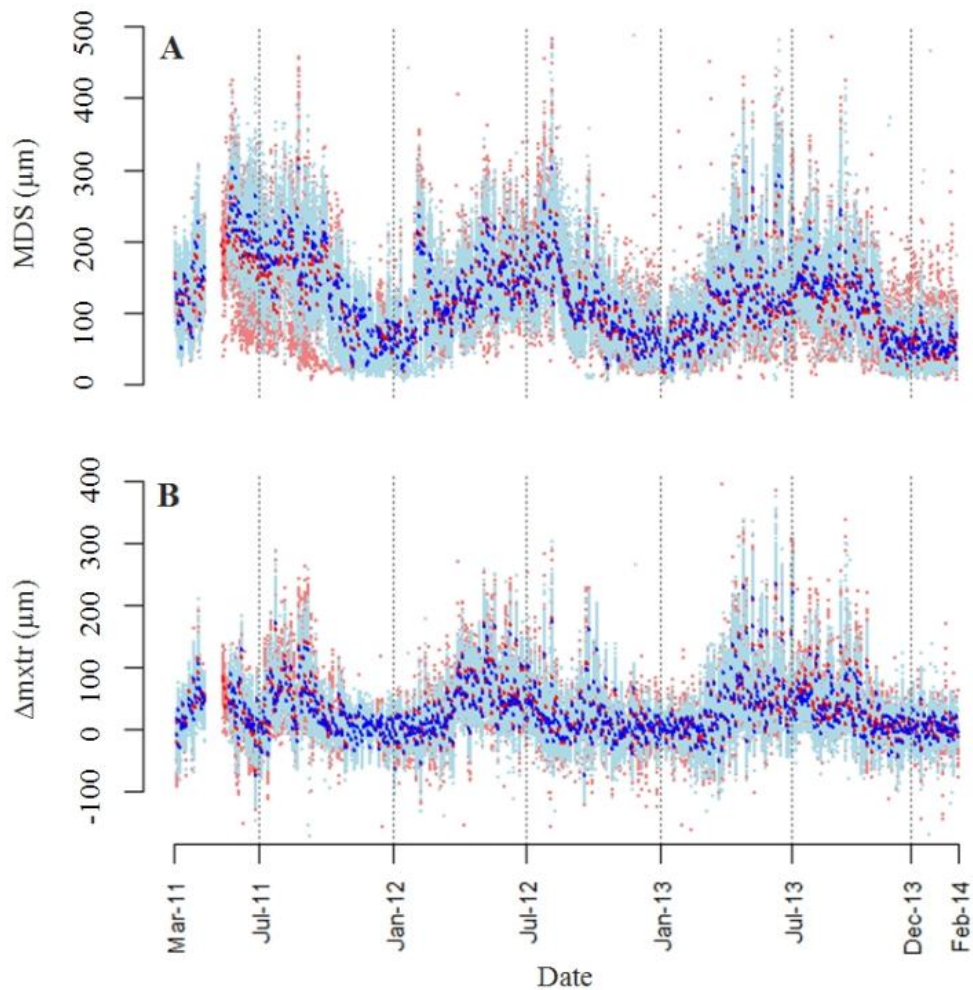


Figure 7. Variation saisonnières des traits de microvariation journalière du rayon. **A.** amplitude maximale de contraction journalière (MDS, μm) et **B.** différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc ($\Delta mxtr$, μm). Les points bleu clair représentent les valeurs de chaque arbre du croisement Corse x Landes (CL) ; les points rouge clair représentent les arbres du croisement Maroc x Landes (ML). Les points bleu et rouge foncé représentent respectivement les moyennes des croisements CL et ML sur la période étudiée (axe des x).

VI.III.II Variation des trajectoires de croissance radiale

Les trajectoires de croissance radiale ont été représentées pour les 223 arbres suivis dans les croisements CL et ML (Figure 5C). Aucune différence significative n'étant observée pour les valeurs de diamètre entre les deux croisements au début de l'expérience (mars 2011), les diamètres des arbres ont été initialisés à zéro afin de comparer les trajectoires de croissance radiale des individus. Comme attendu, un faible taux de croissance a été observé en Juin 2011, Août 2012 et Septembre 2013 (flèches horizontales, Figure 5C), ce qui correspond aux périodes de faible potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol} , MPa) et/ou forte évapotranspiration (ETP, mm) décrites précédemment. Pendant les 1075 jours suivis, la variabilité phénotypique était modérée à forte avec des coefficients de variation allant respectivement de 11 à 22% et de 11 à 30% pour les croisements CL et ML (voir annexe II). A la fin de l'expérience (Février 2014), les arbres ayant eu l'accroissement en rayon le plus important sur la période étudiée (34,49 mm pour le croisement CL and 37,02 mm pour le croisement ML) ont un accroissement deux fois supérieur à celui des arbres ayant eu le plus faible accroissement (18,37 mm chez les CL et 19,75 mm chez les ML). Les trajectoires de croissances sont similaire entre les croisements, avec cependant un accroissement final en rayon légèrement supérieur pour le croisement ML.

VII.III.III Variations saisonnières des traits de microvariation du rayon du tronc

Les valeurs de MDS et Δm_{xtr} ont été représentées sur la période étudiée (de mars 2011 à février 2014, Figure 7), pour chaque individu séparément et en moyenne par croisement. L'amplitude maximale de contraction du tronc (MDS) fluctuait pendant la période étudiée, montrant un accroissement linéaire pendant la saison de croissance et décroissant en hiver (de 302 μm à 19 μm et de 325 μm à 15 μm pour les croisements CL et ML respectivement, Figure 7A). La différence entre deux maxima journaliers successifs (Δm_{xtr}) a également montré de fluctuations importantes pendant les périodes de croissance (de 223 μm à -76 μm et de 233 μm à -75 μm pour les croisements CL et ML respectivement) suivies d'un plateau autour de zéro pendant le reste de l'année (hors période de croissance, Figure 7B).

VI.III.IV Variations des traits journaliers sur des gradients de contrainte environnementale

Nous avons ensuite rassemblé toutes les valeurs journalières de MDS et Δm_{xtr} pour tester leur dépendance aux variations de l'évapotranspiration journalière (ETP, mm) et du potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol} , MPa) (Figure 8). Nous avons observé des résultats similaires pour les deux croisements. Le MDS augmente (en moyenne sur les deux croisements) de manière linéaire avec

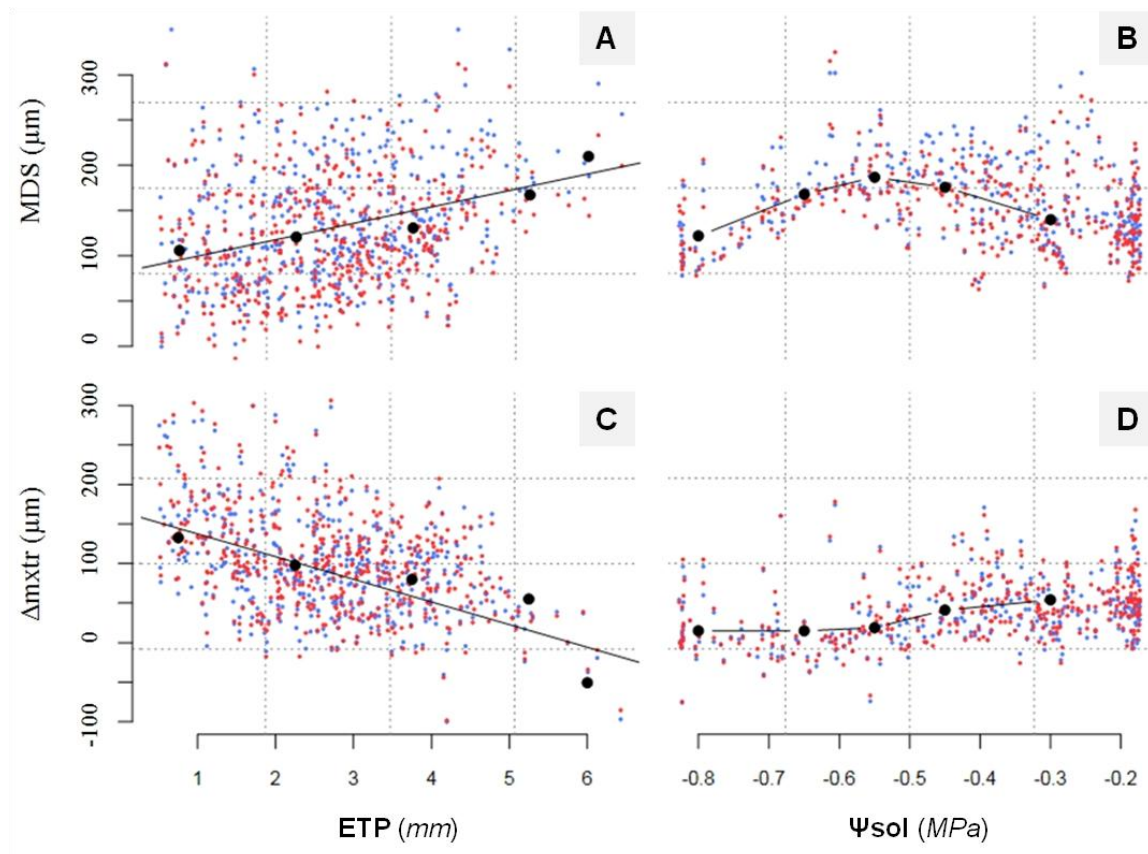


Figure 8. Relation entre les variations journalières du rayon du tronc et les paramètres environnementaux ETP (mm) et Ψ_{sol} (MPa) : **A** et **B** amplitude maximale de contraction du tronc (MDS, μm), **C** et **D** différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc (Δmxtr , μm). Les points bleu clair représentent les arbres du croisement Corse x Landes (CL) ; les points rouges représentent les arbres du croisement Maroc x Landes (ML).

l'ETP, avec 33% d'augmentation entre ETP<1.5 et ETP>6mm (Figure 8A). Un patron différent est observé par rapport au Ψ_{sol} (Figure 8B) : le MDS augmente de $\Psi_{sol}=0$ MPa à $\Psi_{sol}=-0,5$ MPa (25% d'augmentation) et ensuite diminue de $\Psi_{sol}=-0,5$ aux valeurs les plus basses de Ψ_{sol} (35% de diminution). A l'inverse, Δm_{xtr} diminue de manière linéaire quand l'ETP augmente: de 65 μm pour ETP<1.5 à -45 μm pour ETP>6 (Figure 8C). Δm_{xtr} diminue progressivement parallèlement à la diminution de Ψ_{sol} , avec 71% de diminution entre $\Psi_{sol} \geq 0$ et $\Psi_{soil} < -0.7$ MPa (Figure 8D).

La dépendance de MDS et Δm_{xtr} aux variations d'ETP et de Ψ_{sol} sont très significatifs sur MDS et Δm_{xtr} que l'on considère toute les données réunis sur les trois années ou chaque année séparément (Tableau 5A). Pour MDS, l'effet du croisement (cross) et les interactions avec les variables environnementales sont toujours significatives. Ces mêmes effets sont majoritairement non significatifs pour Δm_{xtr} (à l'exception de 2013). Ce résultat est inverse de celui obtenu avec le modèle précédent (cf Tableau 4A). On peut également noter que la part de variance expliquée par l'effet aléatoire « individu » reste faible quel que soit le modèle (Tableau 5B), comme dans le modèle précédent (cf Tableau 4B).

VI.III.V Variations des traits journaliers dans les classes de contrainte environnementale

Nous avons ensuite cherché à approfondir la relation entre les variations journalières du rayon du tronc et les contraintes climatiques (d'ETP et Ψ_{sol}) en triant les jours en classes de contrainte similaires (voir le paragraphe Matériel et Méthodes). Les modèles mixtes ayant montré des réponses à la contrainte climatique similaires entre années pour la réponse de MDS et Δm_{xtr} aux variations d'ETP et Ψ_{sol} , nous avons rassemblé les données des trois années de mesure au sein de classes. Les cycles journaliers dans leur globalité ont d'abord été représentés au sein de 10 classes, considérant les contraintes ETP et Ψ_{sol} séparément (Figure 9). Des réponses similaires à la contrainte ont été observées pour tous les individus au sein de ces classes (Figure 9). Comme attendu, l'amplitude du cycle augmente avec l'ETP (de 135 μm à 206 μm en moyenne pour les deux croisements, Tableau 6). Quand Ψ_{sol} diminue, l'amplitude des cycles commence par augmenter légèrement de 139 μm à 186 μm entre 0 MPa et -0.6 MPa puis diminue en allant vers les valeurs de Ψ_{sol} les plus négatives. Les valeurs de Δm_{xtr} extraites de ces cycles (Tableau 6) montrent une diminution linéaire quand les deux types de contraintes augmentent. Ces résultats vont dans le sens de ceux décrits précédemment. Cependant la description des classes climatiques a montré qu'il n'est pas suffisant de considérer les contraintes séparément pour comprendre toutes des variations du cycle journalier. Un second tri a donc été effectué pour créer des classes qui cumulent les deux types de contraintes (catégories numérotées de 11 à 35, Figure 10 et Tableau 7).

Tableau 5. A. Modèles mixtes appliqués aux données journalières de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, Δm_{xtr} , μm) de 2011 et 2013. Le croisement (cross), l'évapotranspiration (ETP, mm), le potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol} , MPa) et leurs interactions constituent les effets fixes des modèles. **B.** Variance de l'effet aléatoire individu (id) dans les modèles précédents.

A

Modèle	Année	Facteur	SCE	CM	DDL	Den DL	F.value	Pr(>F)	
MDS ~ cross + ETP + Ψ_{sol} + cross:ETP + cross: Ψ_{sol} + cross:ETP: Ψ_{sol} + (1 id)	all data	cross	0.16125	0.04031	4	545	14.425	3.337e-11	***
		ETP	0.35557	0.35557	1	114477	127.232	<10 ⁻¹⁶	***
		Ψ_{sol}	0.10120	0.10120	1	114477	36.214	1.774e-09	***
		cross:ETP	0.04794	0.01198	4	114480	4.288	0.001806	**
		cross: Ψ_{sol}	0.68676	0.17169	4	114486	61.437	<10 ⁻¹⁶	***
		cross:ETP: Ψ_{sol}	1.43180	0.28636	5	114484	102.469	<10 ⁻¹⁶	***
	2011	cross	0.05370	0.013425	4	1002.5	5.698	0.000155	***
		ETP	0.07357	0.073568	1	26886.6	31.225	2.32e-08	***
		Ψ_{sol}	0.00012	0.000118	1	26886.6	0.050	0.004228	**
		cross:ETP	0.03593	0.008983	4	26888.0	3.813	0.004216	**
		cross: Ψ_{sol}	0.31842	0.079606	4	26890.0	33.788	<10 ⁻¹⁶	***
		cross:ETP: Ψ_{sol}	0.36192	0.072383	5	26890.3	30.722	<10 ⁻¹⁶	***
	2012	cross	0.0642	0.01605	4	988	7.24	9.500e-06	***
		ETP	0.3724	0.37240	1	46145	168.02	<10 ⁻¹⁶	***
		Ψ_{sol}	0.1171	0.11709	1	46145	52.83	3.699e-13	***
cross:ETP		0.0492	0.01231	4	46149	5.55	0.0001818	***	
cross: Ψ_{sol}		0.0919	0.02298	4	46149	10.37	2.160e-08	***	
cross:ETP: Ψ_{sol}		3.8838	0.77676	5	46148	350.46	<10 ⁻¹⁶	***	
2013	cross	0.06091	0.015228	4	2582	5.534	0.0001957	***	
	ETP	0.03917	0.039172	1	40928	14.237	0.0001614	***	
	Ψ_{sol}	0.03530	0.035304	1	40928	12.831	0.0003413	***	
	cross:ETP	0.03357	0.008393	4	40939	3.050	0.0159243	*	
	cross: Ψ_{sol}	0.06237	0.015592	4	40939	5.667	0.0001480	***	
	cross:ETP: Ψ_{sol}	1.35087	0.270174	5	40956	98.193	<10 ⁻¹⁶	***	
Δm_{xtr} ~ cross + ETP + Ψ_{sol} + cross:ETP + cross: Ψ_{sol} + cross:ETP: Ψ_{sol} + (1 id)	all data	cross	0.01591	0.00398	4	1653	1.924	0.1038466	
		ETP	0.02823	0.02823	1	116452	13.659	0.0002193	***
		Ψ_{sol}	0.02623	0.02623	1	116452	12.692	0.0003674	***
		cross:ETP	0.05631	0.01408	4	116461	6.811	1.777e-05	***
		cross: Ψ_{sol}	0.21317	0.05329	4	116475	25.784	<10 ⁻¹⁶	***
		cross:ETP: Ψ_{sol}	1.76386	0.35277	5	116473	170.680	<10 ⁻¹⁶	***
	2011	cross	0.011601	0.002900	4	6739.6	1.995	0.09237	.
		ETP	0.029932	0.029932	1	27242.2	20.595	5.700e-06	***
		Ψ_{sol}	0.075895	0.075895	1	27242.6	52.220	5.094e-13	***
		cross:ETP	0.017029	0.004257	4	27246.8	2.929	0.01961	*
		cross: Ψ_{sol}	0.008659	0.002165	4	27257.4	1.489	0.20234	
		cross:ETP: Ψ_{sol}	0.013571	0.002714	5	27255.5	1.867	0.09638	.
	2012	cross	0.0005	0.00012	4	4112	0.07	0.991615	
		ETP	0.0130	0.01304	1	46705	7.25	0.007086	**
		Ψ_{sol}	0.0158	0.01585	1	46705	8.82	0.002989	**
cross:ETP		0.0010	0.00026	4	46713	0.15	0.965150		
cross: Ψ_{sol}		0.0030	0.00075	4	46717	0.42	0.797369		
cross:ETP: Ψ_{sol}		3.4355	0.68709	5	46712	382.19	<10 ⁻¹⁶	***	
2013	cross	0.015443	0.0038607	4	12634	1.4720	0.207749		
	ETP	0.016020	0.0160203	1	41990	6.1080	0.013461	*	
	Ψ_{sol}	0.010107	0.0101070	1	41990	3.8535	0.049650	*	
	cross:ETP	0.021494	0.0053734	4	42011	2.0487	0.084717	.	
	cross: Ψ_{sol}	0.036839	0.0092097	4	42010	3.5113	0.007158	**	
	cross:ETP: Ψ_{sol}	0.038872	0.0077744	5	42043	2.9641	0.011166	*	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

B

Modèle	Année	Facteur	Variance	Std.Dev.	
MDS ~ cross + ETP + Ψ_{sol} + cross:ETP + cross: Ψ_{sol} + cross:ETP: Ψ_{sol} + (1 id)	all data	id	0.000150	0.01225	
		Résiduelle	0.002795	0.05286	
	2011	id	0.0007578	0.02753	
		Résiduelle	0.0023560	0.04854	
	2012	id	0.0001451	0.01205	
		Résiduelle	0.0022164	0.04708	
	2013	id	0.0001732	0.01316	
		Résiduelle	0.0027515	0.05245	
	Δm_{xtr} ~ cross + ETP + Ψ_{sol} + cross:ETP + cross: Ψ_{sol} + cross:ETP: Ψ_{sol} + (1 id)	all data	id	3.163e-05	0.005624
			Résiduelle	2.067e-03	0.045463
2011		id	8.312e-05	0.009117	
		Résiduelle	1.453e-03	0.038123	
2012		id	3.155e-05	0.005617	
		Résiduelle	1.798e-03	0.042400	
2013		id	4.218e-05	0.006495	
		Résiduelle	2.623e-03	0.051214	

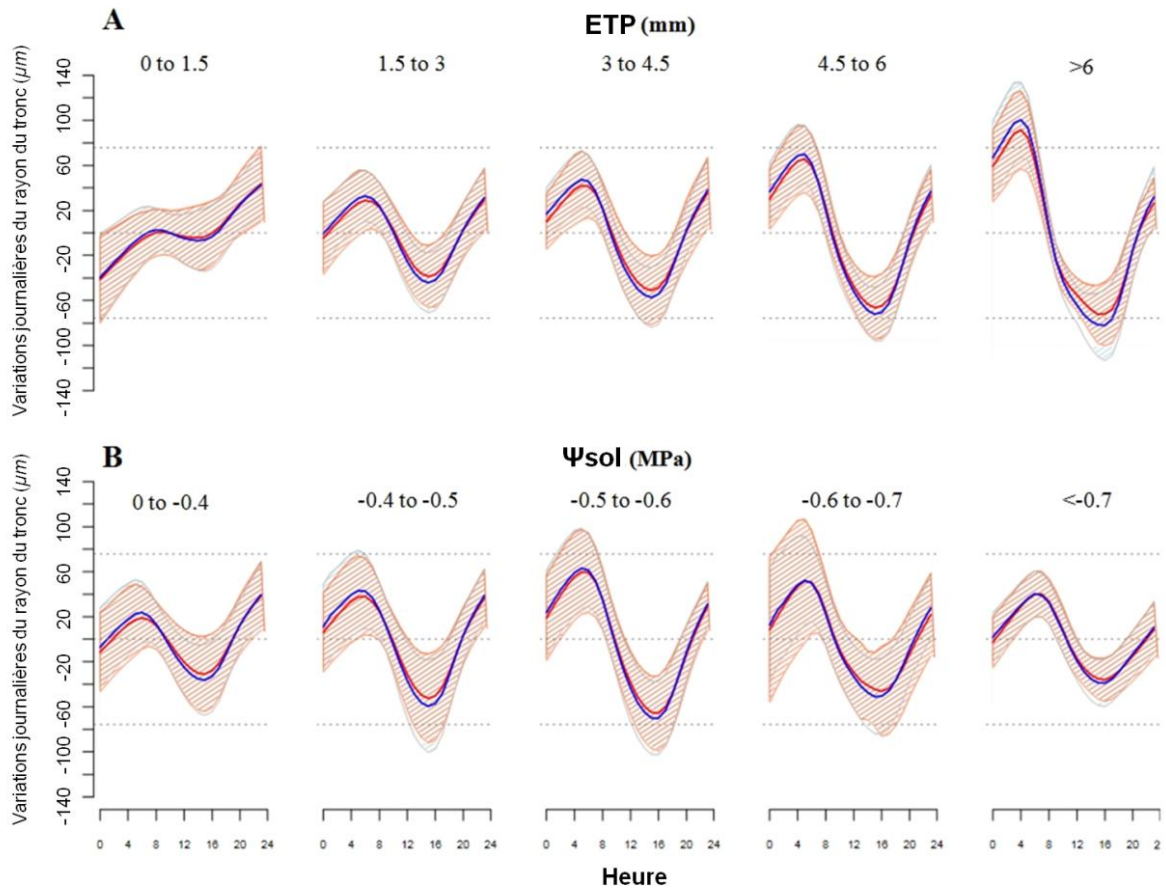


Figure 9. Cycles circadiens triés par croisement et par classe de contraintes environnementales 1 à 10 décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. **A.** Classes d'ETP (mm) et **B.** classes de Ψ_{sol} (MPa) séparées. Les variations journalières du rayon sont centrées sur 0 et exprimées en μm . Les données proviennent de trois saisons de végétation, de mars 2011 à février 2014 et ont été moyennées à l'échelle horaire. Les signaux moyens des croisements Corse x Landes (CL) et Maroc x Landes (ML) sont indiqués respectivement en bleu et rouge. Les écarts types pour les croisements CL et ML sont respectivement représentés en bleu pâle et rouge hachuré.

Tableau 6. Statistiques descriptives des traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, Δm_{xtr} , μm) réparties dans les classes environnementales numérotées de 1 à 10 (cat) dans le paragraphe Matériel et Méthodes. La valeur moyenne, l'écart-type (sd) et le coefficient de variation (CV) sont indiqués pour chaque croisement de pleins-frères : Corse x Landes et Maroc x Landes, notés CL et ML respectivement.

	Cat	Nbr j	moyenne	MDS (μm)			Δm_{xtr} (μm)							
				CL	sd	CV	moyenne	CL	sd	CV	moyenne	ML	sd	CV
ETP (mm)														
< 1,5	1	117	135	± 62	0,46	136	± 62	0,46	65	± 63	0,97	65	± 63	0,98
1,5 à 3	2	207	144	± 53	0,37	145	± 51	0,35	44	± 45	1,02	44	± 45	1,03
3 à 4,5	3	158	150	± 46	0,31	153	± 45	0,30	33	± 36	1,09	33	± 36	1,08
4,5 à 6	4	31	175	± 46	0,26	179	± 44	0,25	18	± 31	1,73	18	± 32	1,78
> 6	5	3	203	± 51	0,25	209	± 44	0,21	-46	± 30	-0,65	-45	± 30	-0,67
Ψ_{sol} (Mpa)														
0 à -0,4	6	363	139	± 52	0,37	140	± 52	0,37	54	± 50	0,92	54	± 50	0,93
-0,4 à -0,5	7	43	176	± 60	0,34	176	± 55	0,31	41	± 44	1,08	42	± 44	1,06
-0,5 à -0,6	8	43	186	± 49	0,26	189	± 46	0,25	19	± 42	2,24	19	± 40	2,08
-0,6 à -0,7	9	29	165	± 61	0,37	172	± 58	0,34	15	± 52	3,49	15	± 54	3,56
< -0,7	10	38	121	± 42	0,35	123	± 42	0,34	15	± 40	2,69	16	± 42	2,67

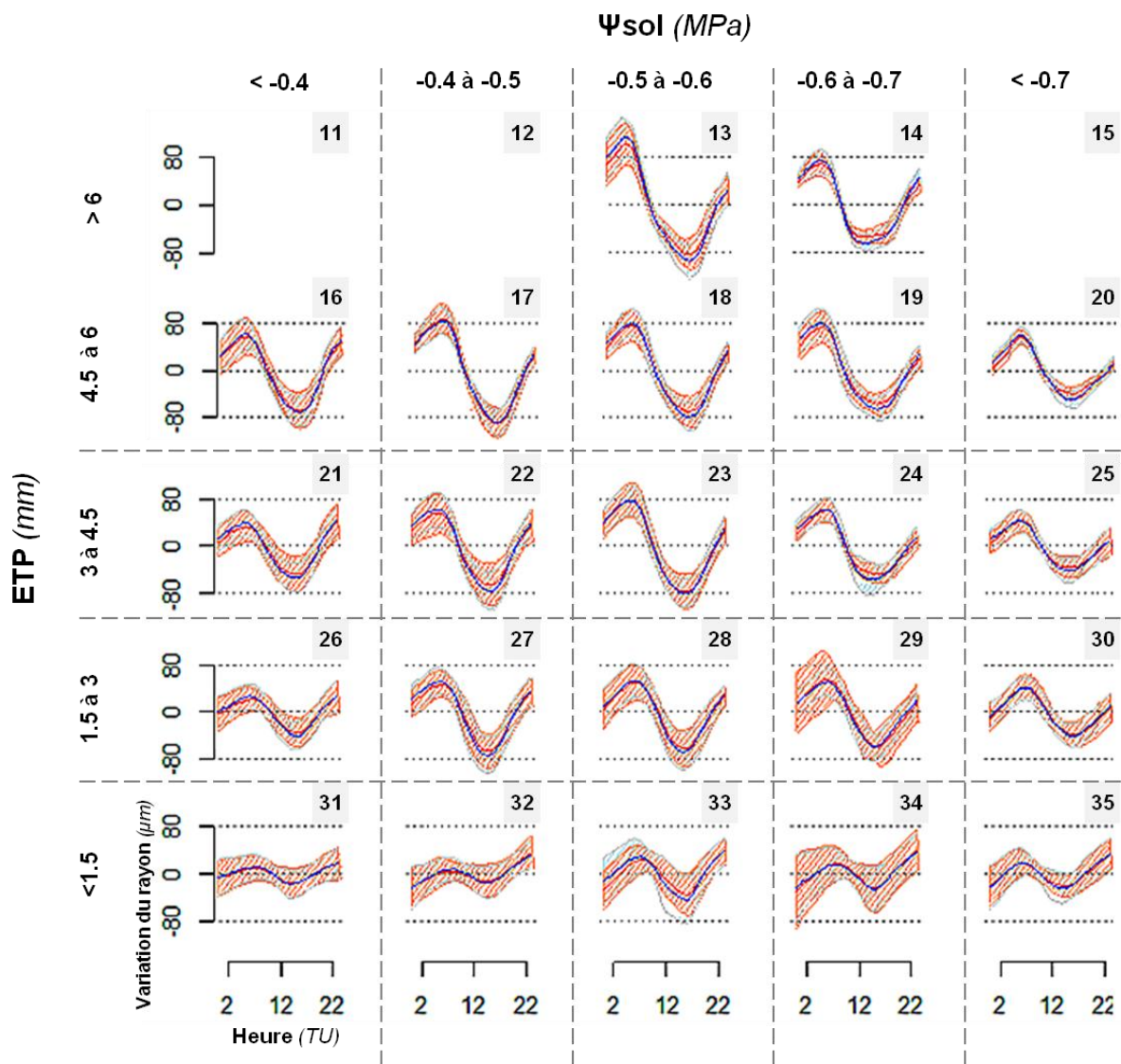


Figure 10. Cycles circadiens triés par croisements et par classes de contraintes environnementales cumulées numérotées de 11 à 35 décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes (selon les valeurs journalières d'ETP, *mm* et de Ψ_{sol} , *MPa*). Les variations journalières du rayon sont centrées sur 0 et exprimées en μm . Les données proviennent de trois saisons de végétation, de mars 2011 à février 2014 et ont été moyennées à l'échelle horaire. Les signaux moyens des croisements Corse x Landes (CL) et Maroc x Landes (ML) sont indiqués respectivement en bleu et rouge. Les écartypes pour les croisements CL et ML sont respectivement représentés en bleu pâle et rouge hachuré.

Tableau 7. Statistiques descriptives des traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, Δm_{xtr} , μm) réparties dans les classes environnementales numérotées de 11 à 35 (cat) dans le paragraphe Matériel et Méthodes. La valeur moyenne, l'écart-type (sd) et le coefficient de variation (CV) sont indiqués pour chaque croisement de pleins-frères : Corse x Landes et Maroc x Landes, notés CL et ML respectivement.

				MDS (μm)						Δm_{xtr} (μm)					
				CL			ML			CL			ML		
	Cat	Nbr j	moyenne	sd	CV	moyenne	sd	CV	moyenne	sd	CV	moyenne	sd	CV	
ETP >6 (mm)															
Ψ_{soil}	-0,4 à -0,5	13	1	193	± 42	0,22	172	± 31	0,18	-36	± 17	-0,47	-37	± 12	-0,31
(MPa)	-0,5 à -0,6	14	2	241	± 55	0,23	211	± 46	0,22	-58	± 34	-0,59	-45	± 33	-0,73
ETP de 4,5 à 6															
Ψ_{soil}	0 à -0,4	16	1	137	± 33	0,24	132	± 24	0,19	12	± 8	0,69	14	± 6	0,43
	-0,4 à -0,5	17	7	178	± 41	0,23	167	± 35	0,21	20	± 5	0,23	1	± 1	1,00
	-0,5 à -0,6	18	8	195	± 44	0,22	183	± 43	0,24	20	± 10	0,49	26	± 10	0,38
	-0,6 à -0,7	19	1	191	± 38	0,20	200	± 30	0,15	17	± 7	0,44	18	± 1	0,06
	< -0,7	20	14	175	± 47	0,27	177	± 53	0,30	38	± 36	0,94	38	± 34	0,90
ETP de 3 à 4,5															
Ψ_{sol}	0 à -0,4	21	19	113	± 41	0,37	115	± 36	0,31	-4	± 3	-0,67	-5	± 3	-0,60
	-0,4 à -0,5	22	6	152	± 39	0,26	145	± 30	0,21	-5	± 6	-1,14	-5	± 3	-0,57
	-0,5 à -0,6	23	13	195	± 47	0,24	192	± 49	0,26	9	± 5	0,58	12	± 7	2,21
	-0,6 à -0,7	24	12	205	± 48	0,24	189	± 50	0,27	22	± 20	0,94	26	± 33	1,27
	< -0,7	25	108	154	± 40	0,26	147	± 45	0,31	43	± 29	0,67	49	± 31	0,62
ETP de 1,5 à 3															
Ψ_{sol}	0 à -0,4	26	16	125	± 44	0,35	130	± 44	0,34	35	± 41	1,16	41	± 44	1,07
	-0,4 à -0,5	27	12	163	± 49	0,30	172	± 52	0,30	26	± 3	0,12	46	± 26	0,57
	-0,5 à -0,6	28	13	192	± 46	0,24	182	± 53	0,29	40	± 50	1,27	44	± 49	1,09
	-0,6 à -0,7	29	19	183	± 51	0,28	170	± 47	0,28	34	± 29	0,85	42	± 38	0,90
	< -0,7	30	147	141	± 49	0,35	137	± 54	0,39	48	± 45	0,94	51	± 46	0,89
ETP <1,5															
Ψ_{sol}	0 à -0,4	31	2	134	± 39	0,29	141	± 37	0,26	12	± 29	2,36	28	± 13	0,46
	-0,4 à -0,5	32	3	182	± 93	0,51	222	± 103	0,46	73	± 83	1,14	99	± 80	0,81
	-0,5 à -0,6	33	7	167	± 41	0,24	162	± 40	0,25	40	± 35	0,86	50	± 35	0,71
	-0,6 à -0,7	34	11	151	± 76	0,50	160	± 78	0,49	67	± 58	0,86	86	± 57	0,67
	< -0,7	35	94	132	± 59	0,45	129	± 58	0,45	64	± 65	1,01	67	± 61	0,92

Au sein de chaque catégorie de Ψ_{sol} , on observe que l'amplitude du signal augmente avec la contrainte d'ETP (ex de 167 μ m à 193 μ m et de 162 μ m à 172 μ m entre les catégories 33, puis 28 puis 23 puis 18 puis 13, pour les croisements CL et ML, respectivement). De même on observe que les contraintes cumulées vont dans le sens d'une augmentation de l'amplitude du signal suivie par une diminution après un certain niveau de contrainte, conforme au patron observé précédemment sur le gradient de Ψ_{sol} . Ainsi on observe les variations maximales du MDS en comparant les catégories 31, 13 puis 14 : de ETP<1,5mm avec Ψ_{sol} <-0,4 MPa vers ETP>6mm avec -0.6< Ψ_{sol} <-0,5 MPa, jusqu'à la contrainte maximale rencontrée, ETP>6mm et -0.7< Ψ_{sol} <-0,6 MPa (MDS= 134 μ m, 241 μ m puis 193 μ m et 141 μ m, 211 μ m puis 172 μ m pour les croisements CL et ML, respectivement).

L'observation du Δm_{xtr} sous l'angle des catégories de contraintes cumulées montrent que sa valeur tend à diminuer quand la contrainte hydrique (représentée par le Ψ_{sol}) augmente. De même on observe que sa valeur devient négative dans les catégories environnementales les plus contraintes (13, 14, 21 et 22). Les deux croisements semblent présenter le même type de réponse à la contrainte.

VI.III.VI Comparaison des traits journaliers avec la croissance annuelle

Nous avons cherché à mettre en relations les traits de microvariation de rayon du tronc avec les traits de croissance annuelle à travers des matrices de corrélation de Pearson. Les moyennes annuelles de MDS et Δm_{xtr} (Figure 11 et Tableau 8) sont significativement corrélées entre elles pour les 3 années suivies (0.73, 0.35 et 0.39 en 2011, 2012 et 2013 respectivement). De plus, on observe que les valeurs de MDS et Δm_{xtr} sont corrélées entre catégories d'environnement climatique proches (Figure 12 et Tableaux 9 et Figure additionnelle 1). Les corrélations montrent également que le Δm_{xtr} est un bon prédicteur de l'accroissement en diamètre (accd).

Pour prédire le lien entre les traits de microvariation journalière du rayon du tronc et l'accroissement en diamètre des individus, nous avons utilisé l'approche décrite dans la section matériel et méthodes (Figure 13). Nous avons observé que les catégories d'arbres ayant l'accroissement en diamètre le plus grand pendant la période étudiée présentaient un niveau de plasticité du MDS significativement supérieur aux arbres ayant un accroissement en diamètre plus faible. Nous n'avons pas observé de résultats significatifs pour la plasticité du Δm_{xtr} (données non fournies).

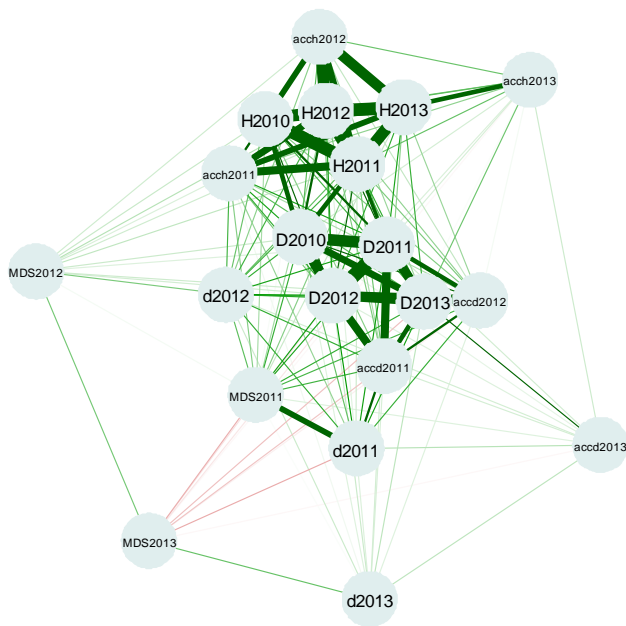


Figure 11. Réseau de corrélations entre les données annuelles de croissance et de microvariation journalière du rayon de 2011 à 2013, pour les 317 arbres géotypés (diamètre, D mm, hauteur, H cm, accroissement en diamètre, $acch$ mm, accroissement en hauteur, $acch$ cm, amplitude maximale de contraction journalière (moyenne annuelle de MDS, μm), différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc (moyenne annuelle de Δmxt noté d , μm)). Seul les coefficients significatifs (p value < 0.05) sont indiqués. Les corrélations positives sont en verts, les corrélations négatives en rouge, et l'épaisseur dépend de l'intensité de la relation entre les variables.

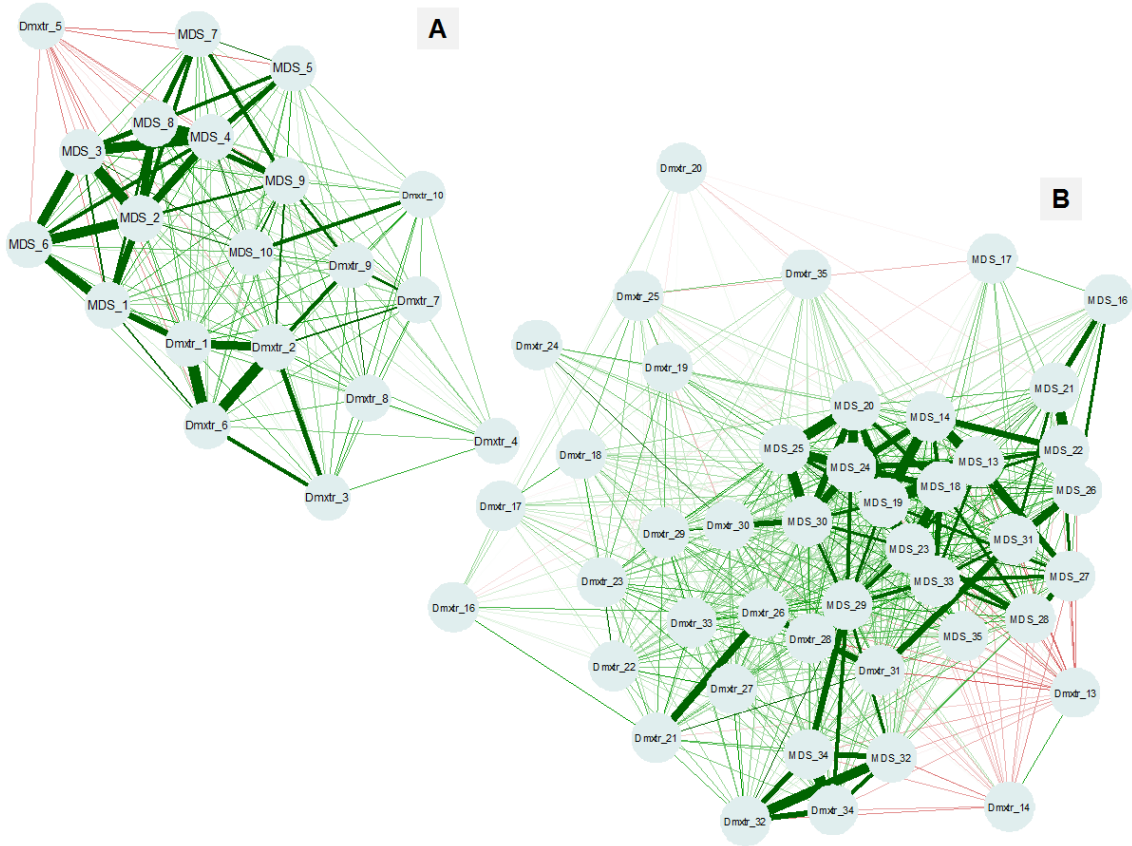


Figure 12. Réseaux de corrélations entre les données de microvariation journalière du rayon de 2011 à 2013, moyennées selon les classes environnementales décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. **A.** Classes d'ETP (mm) et de Ψ_{sol} (MPa) séparées et **B.** Classes de contraintes cumulées d'ETP (mm) et de Ψ_{sol} (MPa). Les variables amplitude maximale de contraction journalière (moyenne annuelle de MDS, μm) et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc (moyenne annuelle de Δmxt noté $Dmxt$, μm)). Seul les coefficients significatifs (p value < 0.05) sont indiqués. Les corrélations positives sont en verts, les corrélations négatives en rouge, et l'épaisseur dépend de l'intensité de la relation entre les variables.

Tableau 8. Matrice des coefficients de corrélation de Pearson entre les données annuelles de croissance (diamètre D, mm, hauteur H, cm, accroissement en diamètre, accd, mm, accroissement en hauteur, acch, cm.) et les moyennes annuelles des traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, $\Delta mxtr$, μm) de 2010 et 2013, pour les 317 arbres génotypés. Seul les coefficients significatifs (pvalue <0.01) sont indiqués. Les valeurs non significatives sont notées NS (non significatif).

	D2010	H2010	D2011	H2011	accd2011	acch2011	MDS2011	$\Delta mxtr2011$	D2012	H2012	accd2012	acch2012	MDS2012	$\Delta mxtr2012$	D2013	H2013	accd2013	acch2013	MDS2013	
D2010																				
H2010	0,68																			
D2011	0,91	0,62																		
H2011	0,70	0,94	0,65																	
accd2011	0,50	0,32	0,81	0,37																
acch2011	0,53	0,56	0,53	0,80	0,35															
MDS2011	0,48	0,27	0,52	0,33	0,46	0,33														
$\Delta mxtr2011$	0,39	NS	0,54	0,20	0,63	0,30	0,73													
D2012	0,88	0,57	0,97	0,60	0,80	0,48	0,54	0,57												
H2012	0,61	0,90	0,58	0,96	0,35	0,77	0,28	0,17	0,53											
accd2012	0,59	0,34	0,68	0,35	0,61	0,26	0,45	0,47	0,84	0,31										
acch2012	0,42	0,72	0,40	0,78	0,26	0,64	NS	NS	0,37	0,93	0,22									
MDS2012	0,21	0,21	0,17	0,22	NS	0,18	NS	NS	0,19	0,24	0,20	0,20								
$\Delta mxtr2012$	0,48	0,38	0,53	0,46	0,48	0,45	0,41	0,48	0,57	0,46	0,49	0,32	0,35							
D2013	0,75	0,45	0,84	0,49	0,71	0,41	0,48	0,54	0,86	0,43	0,68	0,29	NS	0,51						
H2013	0,56	0,85	0,53	0,90	0,32	0,73	0,21	NS	0,49	0,95	0,29	0,88	0,20	0,40	0,47					
accd2013	0,16	NS	0,19	NS	0,19	NS	0,17	0,24	0,17	NS	NS	NS	NS	0,19	0,59	NS				
acch2013	0,19	0,37	0,18	0,39	0,12	0,31	NS	NS	0,18	0,41	0,13	0,38	NS	NS	0,37	0,68	0,20			
MDS2013	NS	NS	-0,15	NS	-0,22	NS	-0,26	-0,26	-0,16	NS	-0,14	NS	0,36	NS	-0,23	NS	NS	NS		
$\Delta mxtr2013$	0,17	NS	0,19	NS	0,18	0,14	NS	0,18	0,21	NS	0,17	NS	NS	0,20	0,23	NS	0,23	NS	0,39	

Tableau 9. Matrice des coefficients de corrélation de Pearson entre les traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, $\Delta mxtr$, μm) réparties dans les classes environnementales numérotées de 1 à 10 dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Seul les coefficients significatifs (pvalue <0.05) sont indiqués. Les valeurs non significatives sont notées NS (non significatif).

	$\Delta mxtr_1$	$\Delta mxtr_2$	$\Delta mxtr_3$	$\Delta mxtr_4$	$\Delta mxtr_5$	$\Delta mxtr_6$	$\Delta mxtr_7$	$\Delta mxtr_8$	$\Delta mxtr_9$	$\Delta mxtr_10$	MDS_1	MDS_2	MDS_3	MDS_4	MDS_5	MDS_6	MDS_7	MDS_8	MDS_9	MDS_10	
$\Delta mxtr_1$																					
$\Delta mxtr_2$	0,84																				
$\Delta mxtr_3$	0,56	0,74																			
$\Delta mxtr_4$	0,18	0,44	0,53																		
$\Delta mxtr_5$	-0,42	-0,32	-0,14	NS																	
$\Delta mxtr_6$	0,90	0,90	0,72	0,38	-0,34																
$\Delta mxtr_7$	0,58	0,67	0,45	0,29	-0,21	0,49															
$\Delta mxtr_8$	0,47	0,62	0,54	0,63	NS	0,49	0,58														
$\Delta mxtr_9$	0,58	0,71	0,47	0,42	-0,22	0,50	0,68	0,65													
$\Delta mxtr_10$	0,44	0,57	0,58	0,35	NS	0,43	0,43	0,46	0,60												
MDS_1	0,78	0,60	0,25	NS	-0,38	0,66	0,37	0,32	0,40	0,27											
MDS_2	0,53	0,53	0,21	NS	-0,40	0,48	0,30	0,31	0,39	0,31	0,81										
MDS_3	0,35	0,38	0,19	0,16	-0,28	0,34	0,17	0,29	0,30	0,27	0,67	0,90									
MDS_4	0,36	0,42	0,18	0,25	-0,35	0,32	0,28	0,39	0,41	0,33	0,62	0,81	0,86								
MDS_5	0,35	0,42	0,22	0,31	-0,40	0,33	0,33	0,33	0,42	0,44	0,43	0,61	0,57	0,75							
MDS_6	0,49	0,41	NS	NS	-0,32	0,44	0,13	0,19	0,23	0,15	0,85	0,88	0,86	0,71	0,40						
MDS_7	0,45	0,41	0,19	NS	-0,43	0,34	0,41	0,17	0,36	0,26	0,58	0,72	0,57	0,59	0,63	0,45					
MDS_8	0,50	0,48	0,19	0,17	-0,42	0,41	0,31	0,38	0,38	0,29	0,68	0,80	0,76	0,83	0,71	0,61	0,76				
MDS_9	0,62	0,67	0,40	0,29	-0,36	0,51	0,59	0,54	0,70	0,47	0,57	0,69	0,55	0,68	0,62	0,40	0,72	0,76			
MDS_10	0,48	0,56	0,40	0,31	-0,18	0,44	0,37	0,51	0,56	0,71	0,51	0,64	0,64	0,65	0,53	0,45	0,40	0,60	0,66		

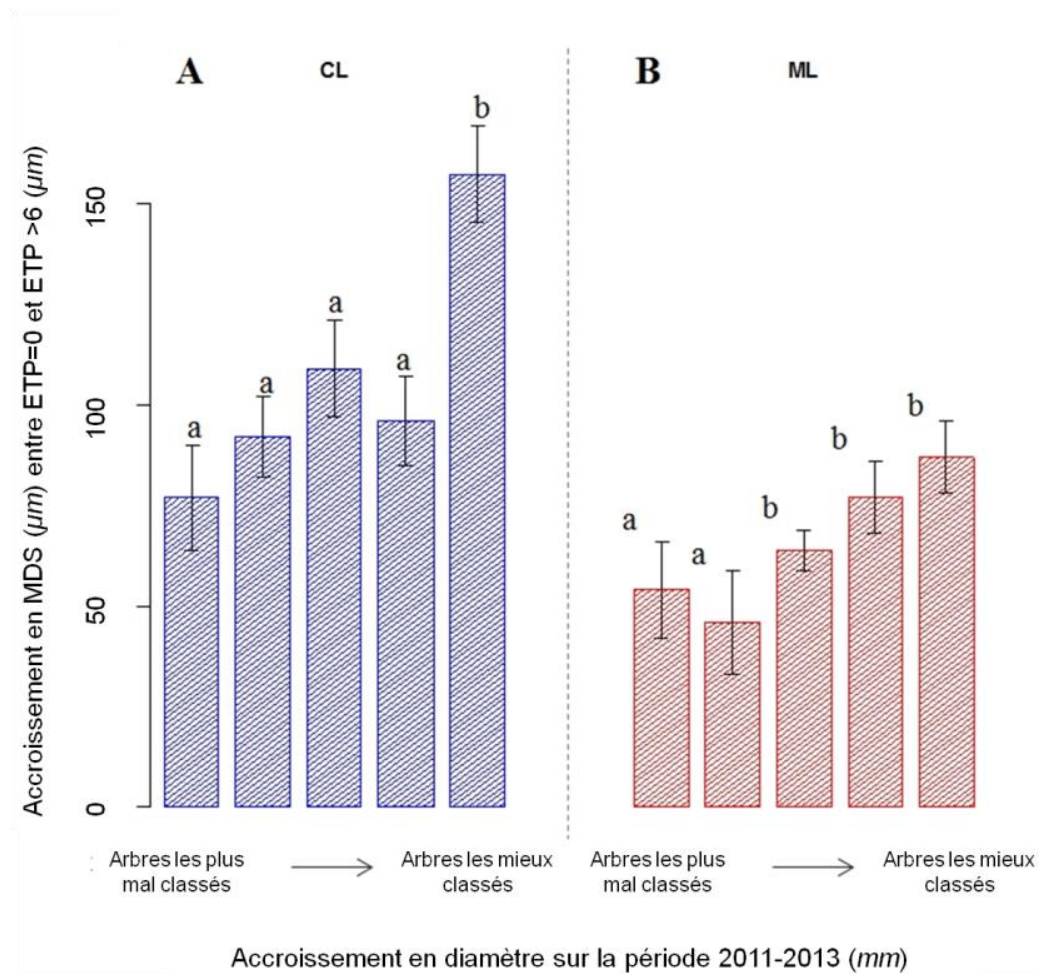


Figure 13. Variation des valeurs maximales d'amplitude de contraction du tronc (MDS, μm) dans des conditions climatiques contrastées en évapotranspiration (ETP, mm). Les barres bleues et rouges représentent respectivement les croisements Corse x Landes (CL, **A**) et Maroc x Landes (ML, **B**). Les arbres sont classés en 5 catégories en fonction de leur accroissement en rayon pendant la période d'étude. Les catégories comprennent 20% des arbres, des plus mal classés aux mieux classés. Les lettres au dessus des barres indiquent les catégories obtenues après un test de Tukey.

Ce résultat suggère une relation entre la plasticité du MDS et l'accroissement annuel en diamètre des arbres. Cependant, la comparaison du classement des individus entre années (Figure additionnelle 2) montre une grande instabilité, tant sur les traits de croissance annuelle que sur les traits de microvariation journalière du rayon, ce qui empêche de conclure sur cette relation à long terme.

VI.III.VII Construction des cartes génétiques : Résultats de cartographie à partir de la biopuce 9k

VI.III.VII.I Croisement CL

Suite au génotypage par les 8949 SNP de la puce 9k et au tri effectué avec le logiciel Genome Studio (identification des clusters, voir chapitre II) le nombre de marqueurs suivant était disponible pour le croisement CL : 905 SNP dans 623 contigs différents (parent C) et 1232 SNP dans 848 contigs différents (parent L). Seuls les marqueurs ségrégeant $1/2 : 1/2$ ayant été conservés, il n'y a pas de marqueur qui font le pont entre les cartes C et L. En tout, 574 et 826 marqueurs ont été cartographiés en utilisant la logiciel Join Map sur les 12 groupes de liaison (« linkage group », LGs) femelles et mâles respectivement (Tableau 10). Le nombre de marqueurs cartographiés par groupes de liaison est de 23 à 68 pour C et de 55 à 83 pour L, avec une moyenne de 48 marqueurs par LG pour C et 69 pour L (Tableau 10). Le nombre de groupe de liaison, 12 pour les deux parents, correspond au nombre haploïde de chromosomes. La longueur des groupes de liaison varie de 94 à 153 cM pour C et de 120 à 185 cM pour L avec une valeur moyenne de 124 cM pour C et 155 cM pour L.

VI.III.VII.II Croisement ML

Le nombre de marqueurs suivant était disponible pour le croisement ML : 1015 SNP dans 646 contigs (parent M) et 1387 SNP dans 945 contigs (parent L). De la même façon que précédemment, seuls les marqueurs ségrégeant $1/2 : 1/2$ ayant été conservés, il n'y a pas de marqueur qui font le lien entre les cartes M et L. En tout, 627 et 920 marqueurs ont été cartographiés avec Join Map sur les 12 groupes de liaison (« linkage group », LGs) femelles et mâles respectivement (Tableau 10). Le parent M présentant des groupes de liaison fragmentés (LGs 2, 5, 7 et 9), les chiffres suivants correspondent aux données assemblées au sein des 12 groupes de liaison attendus. Le nombre de marqueurs cartographiés par groupe de liaison est de 38 à 75 pour M et de 53 à 104 pour L, avec une moyenne de 47 marqueurs par LG pour M et 77 pour L (Tableau 10). La longueur des groupes de liaison va de 71 à 160 cM pour M et de 129 à 182 pour L avec une valeur moyenne de 104 cM pour M et 163 cM pour L.

Tableau 10. Bilan des 10 cartes génétiques générées dans la cadre de cette étude. Le nombre de marqueurs, la taille (en cM) et la distance moyenne entre deux marqueurs adjacents (en cM) est indiquée pour chaque groupe de liaison (linkage group, LG) et pour l'ensemble des douze groupes (Total, dernière colonne). Le croisement (cross), le nom du parent (parent) et le nombre d'individus (n) sont indiqués.

Puce	cross	parent	n	LG	1	2	2'	3	4	4'	5	5'	6	7	7'	8	8'	9	9'	10	11	12	Total
OK	CL	C	106	Taille du groupe (cM)	120	120		115	126		140		116	153		102	136		141	94	126	1488	
				Nombre de SNP	44	54		68	37		54		46	59		38	23		40	47	64	574	
				Distance entre SNP (cM)	2,7	2,2		1,7	3,4		2,6		2,5	2,6		2,7	5,9		3,5	2,0	2,0	2,8	
		L	106	Taille du groupe (cM)	154	185		176	170		176		120	165		142	140		178	131	126	1863	
				Nombre de SNP	79	79		61	67		83		59	74		56	85		64	55	64	826	
				Distance entre SNP (cM)	2,0	2,3		2,9	2,5		2,2		2,0	2,2		2,5	1,6		2,8	2,4	2,0	2,3	
	ML	M	117	Taille du groupe (cM)	160	138	35	147	155		47	83	148	87	44	153	48	23	119	120	150	1658	
				Nombre de SNP	38	51	18	49	55		19	15	51	58	13	75	17	19	43	41	65	627	
				Distance entre SNP (cM)	4,2	2,7	2,0	3,0	2,8		2,5	5,5	2,9	1,5	3,4	2,1	2,8	1,2	2,8	2,9	2,3	2,8	
		L	117	Taille du groupe (cM)	175	179		182	160		145		143	173		178	145		178	129	165	1953	
				Nombre de SNP	80	74		68	74		104		84	87		53	87		71	67	71	920	
				Distance entre SNP (cM)	2,2	2,4		2,7	2,2		1,4		1,7	2,0		3,4	1,7		2,5	1,9	2,3	2,2	
	CM	C	94	Taille du groupe (cM)	160	161		153	158		202		138	160		159	114		166	151	164	1886	
				Nombre de SNP	58	57		73	56		81		72	64		45	44		52	65	61	728	
				Distance entre SNP (cM)	2,8	2,8		2,1	2,8		2,5		1,9	2,5		3,5	2,6		3,2	2,3	2,7	2,6	
		M	94	Taille du groupe (cM)	146	124	24	128	80	14	136	2	139	155		143	77	32	190	75	154	1619	
				Nombre de SNP	47	55	20	49	39	17	18	15	53	63		67	15	20	57	36	59	630	
				Distance entre SNP (cM)	3,1	2,3	1,2	2,6	2,1	0,8	7,5	0,1	2,6	2,5		2,1	5,1	1,6	3,4	2,1	2,6	2,6	
	CL+CM	C mean	Taille du groupe (cM)	123	141		119	151		157		121	151		148	123		148	119	140	1642		
			Nombre de SNP	67	71		93	64		91		81	91		50	50		64	76	87	885		
			Distance entre SNP (cM)	1,9	2,0		1,3	2,4		1,7		1,5	1,7		3,0	2,5		2,3	1,6	1,6	1,9		
CL+ML	L mean	Taille du groupe (cM)	162	180		179	162		145		133	170		152	143		178	130	141	1876			
		Nombre de SNP	100	97		83	90		117		95	101		71	110		86	84	88	1122			
		Distance entre SNP (cM)	1,6	1,9		2,2	1,8		1,2		1,4	1,7		2,1	1,3		2,1	1,5	1,6	1,7			
ML+CM	M mean	Taille du groupe (cM)	159	131		137	148		158		144	161		152	27		188	120	154	1679			
		Nombre de SNP	57	72		67	65		39		62	86		92	23		72	59	85	779			
		Distance entre SNP (cM)	2,8	1,8		2,1	2,3		4,0		2,4	1,9		1,7	1,2		2,6	2,1	1,8	2,2			
CLMmean				Taille du groupe (cM)	164	152		179	162		157		136	161		154	143		185	163	154	1911	
				Nombre de SNP	187	200		205	186		181		203	236		184	137		194	184	211	2308	
				Distance entre SNP (cM)	0,9	0,7		0,9	0,9		0,9		0,7	0,7		0,8	1,0		1,0	0,9	0,7	0,8	

VI.III.VII.III Croisement CM

Le nombre de marqueurs suivant était disponible pour le croisement CM : 1083 SNP dans 734 contigs (parent C) et 1038 SNP dans 642 contigs (parent M). Seuls les marqueurs ségrégeant $1/2 : 1/2$ ayant été conservés, il n'y a pas de marqueur qui font le lien entre les cartes C et M. En tout, 728 et 630 marqueurs ont été cartographiés sous Join Map sur les 12 groupes de liaison (« linkage group », LGs) femelles et mâles respectivement (Tableau 10). Le parent M présentant des groupes de liaison fragmentés (LGs 2, 4, 5 et 9), les chiffres suivants correspondent aux données assemblées au sein des 12 groupes de liaison attendus. Le nombre de marqueurs cartographiés par groupe de liaison est de 44 à 81 pour C et de 35 à 75 pour M, avec une moyenne de 61 marqueurs par LG pour C et 53 pour M (Tableau 10). La longueur des groupes de liaison va de 114 à 202 cM pour C et de 105 à 190 pour M avec une valeur moyenne de 157 cM pour C et 135 cM pour M.

VI.III.VII.IV Cartes C, L et M moyennées (Cmean, Lmean et Mmean)

Les groupes de liaison entre parents identiques ont été identifiés sur la base de 885, 1122 et 779 marqueurs communs entre les parents C, L et M respectivement. Sans surprise, un niveau de macrolinéarité élevé a été observé sur les 12 LGs (exemple Figure 4). Ce qui nous a permis d'assembler les groupes avec JoinMap pour obtenir les cartes moyennées Cmean, Lmean et Mmean pour les 12 LG. Cet assemblage a également permis de rassembler l'information contenue sur des groupes fragmentaires pour le parent M. Le nombre de marqueurs suivant était disponible pour les cartes moyennées : 885 SNP (parent C), 1122 SNP (parent L) et 779 SNP (parent M), cartographiés avec Join Map, sur 12 groupes de liaison de Cmean, Lmean et Mmean respectivement (Tableau 11). Le nombre de marqueurs cartographiés par groupes de liaison est de 50 à 93 pour C, de 71 à 117 pour L et de 23 à 92 pour M avec une moyenne de 74 marqueurs par LG pour C, 94 pour L et 65 pour M (Tableau 10). Le nombre de groupe de liaison, 12 pour les deux parents, correspond au nombre haploïde de chromosomes du pin maritime. La longueur des groupes de liaison va de 119 à 157 cM pour C, de 130 à 180 pour L et de 27 à 188 pour M, avec une valeur moyenne de 137 cM pour C, 156 cM pour L et 140 cM pour M.

VI.III.VII.V Alignement des groupes homologues et construction d'une carte génétique composite

Le package R LPmerge (Endelman and Plomion 2014) a ensuite été utilisé pour construire une composite « CLMmean » qui rassemble le maximum d'information des groupes de cartes parentales Cmean, Lmean et Mmean. Les groupes de liaison ont été assemblés sur la base de marqueurs communs. Le nombre de marqueurs suivant était disponible pour la carte CLMmean: 2308 SNP dans 2308 contig différents sur les 12 groupes de liaison de CLMmean (Tableau 10). Le nombre de

Tableau 11. Comparaison des positions de marqueurs SNP dans les 10 cartes de liaison générées dans l'étude. Le nombre de marqueurs communs entre deux cartes est indiqué dans la diagonale basse du tableau (chiffres en noirs). Les chiffres de la diagonale haute du tableau indiquent les coefficients de corrélation pour les positions des marqueurs (en bleu). Les coefficients <0.2 sont notés comme non significatifs (NS).

	C_CL	C_CM	CLMmean	Cmean	L_CL	L_ML	Lmean	M_CM	M_ML	Mmean
C_CL		0,71	0,98	0,79	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C_CM	411		0,87	0,95	NS	0,82	0,83	NS	NS	NS
CLMmean	577	729		0,89	0,93	0,93	0,94	0,48	0,44	0,91
Cmean	568	728	889		NS	0,91	0,9	NS	NS	0,29
L_CL	0	1	827	1		0,94	0,98	0,49	NS	0,28
L_ML	0	216	921	216	624		0,99	NS	NS	NS
Lmean	0	216	1123	216	826	920		0,55	NS	0,33
M_CM	0	0	560	0	120	0	120		0,22	0,39
M_ML	99	0	563	93	0	0	0	439		0,52
Mmean	95	0	750	89	114	0	114	596	600	

marqueurs cartographiés par LG est de 137 à 236 avec une moyenne de 192 marqueurs par LG (Tableau 10). La longueur des LG va de 136 à 185 cM avec une valeur moyenne de 159 cM.

VI.III.VIII Distribution des marqueurs sur les 10 cartes génétiques

Les positions des marqueurs sur les 10 cartes générées à partir des individus de l'essai ont été comparées pour tester la colinéarité entre carte et surtout justifier la robustesse de la carte composite CLMmean. Le Tableau 3 présente les résultats de comparaison entre cartes. Le nombre de marqueurs communs entre deux cartes varie de 0 à 1123 (Tableau 11, diagonale basse). Les paires de cartes ayant moins de 20 marqueurs communs correspondent majoritairement aux parents d'un croisement commun (ex. C et L de CL) car seuls les marqueurs spécifiques de l'un des parents ont été cartographiés. Les autres paires de cartes comportent un nombre de marqueur communs suffisant pour pouvoir comparer leurs positions (de 93 à 1123). Les régressions sur les positions de marqueurs entre deux cartes (Tableau 11, diagonale haute) montrent une bonne colinéarité entre cartes (>0,4) à l'exception des cartes du parent M. La régression des positions entre la carte CLMmean et toutes les autres cartes est cependant excellente (entre 0,44 et 0,99). La carte CLMmean est donc une ressource fiable pour la représentation et la comparaison des QTL détectés sur les six cartes parentales.

VI.IV.III.IX QTL liés aux traits de microvariation radiale

Une détection de QTL a enfin été effectuée sur les traits de microvariation journalière du rayon du tronc. L'analyse QTL a permis de détecter 33 QTL par la méthode simple environnement (Figure 15 et Figure additionnelle 3) (chaque environnement correspondant ici à une catégorie climatique, de 1 à 35) et 74 QTL par la méthode multi-environnement (Figure 15 et Figure additionnelle 4), répartis sur tous les groupes de liaison (LG de 1 à 12). En simple environnement, ces QTL expliquent une part de variance relativement importante de 7% à 17%, mais certainement sur-estimée étant donné le faible effectif utilisé.

On observe un QTL lié au Δm_{xtr} sur le LG1 pour le parent M au sein du croisement ML dans la catégorie 22 (contrainte climatique faible). Ce QTL est confirmé dans la détection en mode multi-environnement. On peut également observer que la méthode multi-environnement détecte des QTL spécifiques sur le LG1 tant pour Δm_{xtr} et MDS, avec une zone spécifique du croisement CL et une zone spécifique du croisement ML mais qui contiennent toutes deux des QTL communs entre Δm_{xtr} et MDS.

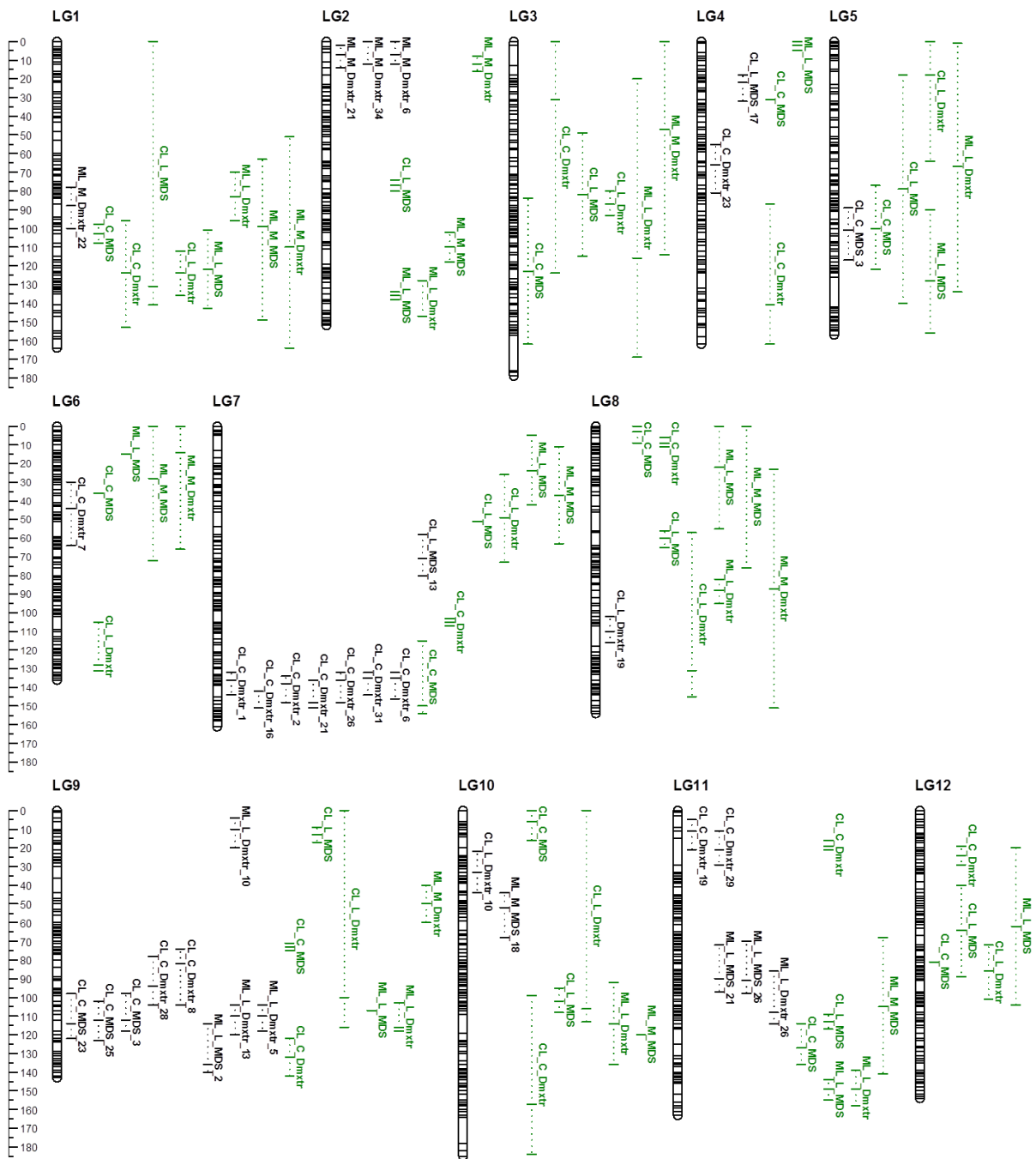


Figure 15. QTL (Quantitative Trait Loci) détectés pour deux traits de microvariation du rayon : amplitude maximale de contraction journalière (MDS, μm) et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc (Δmxtr , μm). Les groupes de liaison sont notés LG et représentent les chromosomes du pin maritime (de 1 à 12). Les groupes présentés ici sont ceux de la carte composite CLMmean. La longueur des groupes est indiquée en bas à gauche du groupe (en cM). Les QTL sont projetés, à droite du groupe. La position pour le pic de LOD et l'intervalle de confiance à 95% du QTL sont indiqués par une ligne pointillée et un tiret horizontal respectivement. Le nom du QTL est composé comme suit : nom du croisement (CL, ML ou CM), nom du parent (C, L ou M), nom du phénotype, numéro de la classe environnementale (1 à 35). Les QTL détectés en environnement simple et en multi-environnement sont représentés en noir et vert respectivement (voir détails dans le matériel et méthodes).

Le LG2 porte un QTL détecté pour le parent M au sein du croisement ML et lié à $\Delta mxtr$ dans des environnements peu contraints (6, 34 et 21). Ce QTL est confirmé par la méthode multi-environnement. Ce LG possède également 3 QTL liés au MDS (pour les parents CL_L, ML_L et ML_M) et un autre QTL lié à $\Delta mxtr$ (ML_L) sur une autre zone.

Le LG3 porte 6 QTL possédant des intervalles de confiance très larges, couvrant la majorité du groupe de liaison. La topologie suggère la présence d'un ou plusieurs QTL commun aux 2 croisements testés (2 parents des 2 croisements) pour $\Delta mxtr$ et MDS (2 parents du croisement CL).

Le LG4 comporte deux zones de QTL. La première comprend un QTL lié au MDS pour le parent CL_L dans l'environnement n°17, confirmé en multi-environnement. Ce QTL colocalise avec un QTL lié au MDS pour le parent ML_L en multi-environnement. La deuxième zone de QTL du groupe comprend un QTL lié au $\Delta mxtr$ dans l'environnement n°23 (peu contraint), confirmé (mais décalé) en multi-environnement.

Le LG5 comporte un QTL lié au MDS dans l'environnement n°3 pour le parent CL_C, confirmé en multi-environnement. Ce QTL colocalise avec deux autres QTL liés au MDS pour le parent L, dans les croisements CL et ML en multi-environnement. Une autre zone comporte deux QTL liés au $\Delta mxtr$ pour le parent L des deux croisements sur le même groupe avec des pics assez décalés.

Le LG6 comprend un QTL lié au $\Delta mxtr$ pour le parent CL_C dans l'environnement n°7 (peu contraint) qui n'est pas directement confirmé en multi-environnement mais il colocalise avec un QTL détecté pour le parent ML_M pour le même trait et trois QTL de MDS en multi-environnement. Un autre QTL est détecté en multi-environnement pour $\Delta mxtr$ sur le parent CL_L.

Le LG7 montre un point chaud remarquable de QTL liés au $\Delta mxtr$ pour le parent C du croisement CL dans divers environnements, qui est confirmé en multi-environnement (avec un optimum décalé). Ce QTL colocalise avec un QTL de MDS pour le même parent (dans le même croisement) en multi-environnement. Une deuxième zone de QTL est visible sur le LG7 pour le MDS. On observe un QTL détecté pour le MDS dans l'environnement n°13 (contrainte forte) sur CL_L, confirmé en multi-environnement et commun entre 3 des 4 parents testés (sauf CL_C). Ce QTL colocalise également avec un QTL lié au $\Delta mxtr$ pour CL_L.

Le LG8 porte un QTL lié au $\Delta mxtr$ en situation de contrainte (Environnement n° 19) confirmé en multi-environnement. Il porte aussi sept autres QTL sur deux zones dans lesquelles des QTL liés au $\Delta mxtr$ et au MDS coexistent en multi-environnement.

Le LG9 comprend une zone riche en QTLs liés $\Delta mxtr$ et au MDS dans divers environnements, communs aux deux croisements et confirmés en multi-environnement. Il comprend également un

QTL lié au Δm_{xtr} en situation de contrainte hydrique (environnement n° 10), confirmé en multi-environnement pour le parent ML_L.

Le LG10 comprend deux QTL communs entre Δm_{xtr} et au MDS en situation de contrainte hydrique modérée à forte (environnements n° 10 et n°18), confirmés en multi-environnement. Quatre autres QTL colocalisent sur le même groupe de liaison et sont communs entre Δm_{xtr} et au MDS et entre CL et ML.

Le LG11 comporte deux zones de QTL. La première comprend deux QTL liés au Δm_{xtr} pour un niveau de contrainte hydrique modéré à fort ($-0.6 > \Psi_{sol} > -0.7$ MPa) sur le parent CL_C, confirmés en multi-environnement. Le groupe de liaison comporte également une zone commune au Δm_{xtr} et au MDS et aux deux croisements testés, confirmée par l'approche multi-environnement.

Enfin, le LG12 comporte également une zone commune au Δm_{xtr} et au MDS et aux deux croisements testés, détectée en multi-environnement uniquement.

L'observation des effets de substitution allélique montre que les effets sont majoritairement favorables pour les allèles homozygotes (AA-AB>0). On peut également noter que les effets augmentent en valeur absolue et peuvent même avec des sens opposés avec l'intensification de la contrainte environnementale (ex. de +8 à -38 μm pour MDS entre un QTL détecté en cat2 et un QTL détecté en cat13 ou +7 à +39 μm entre un QTL détecté en cat1 et un QTL détecté en cat34).

VI.IV Discussion

Le niveau de variation génétique disponible au sein d'une espèce, son mode de transmission (héritabilité) et les pressions de sélection qui s'exercent sur les populations (sélection naturelle en réponse aux signaux environnementaux en population naturelle ou sélection des arbres dans les programmes de sélection) sont des facteurs clés pour prédire la réponse des génotypes à la sélection chez tous les organismes. Le rôle de ce processus évolutif sur un nombre réduit de générations est particulièrement important chez les arbres forestiers, car le changement climatique se produit à une échelle de temps de quelques générations seulement de ces espèces longévives. Des populations adaptées à leur environnement local sont généralement observées pour la plupart des espèces forestières mais il a été suggéré que les arbres pourraient s'adapter rapidement aux changements du climat qui se produisent à des pas de temps courts, grâce à un niveau de base de variation génétique élevé (Jaramillo-Correa *et al.* 2015). Les tests de provenances ont apportés des informations importantes sur le niveau et la structure de la variabilité génétique des traits dits « adaptatifs » (i.e liés à la fitness) chez de nombreuses espèces forestières (revue par Alberto *et al.* 2013). De nombreux traits (y compris la croissance) ont montré un niveau important de variation tant au sein des populations qu'entre différentes populations (González-Martínez *et al.* 2002, Santos-del-Blanco *et al.* 2012, Lamy *et al.* 2011, 2014). La variation intra-population observée a été attribuée au niveau de variation génétique, naturellement très élevé chez les arbres, en raison de flux de gènes importants, d'une importante fécondité et de l'accumulation de mutations dans les populations à effectifs importants (Petit et Hampe 2006). La variation observée entre populations a été attribuée à l'adaptation locale des populations à un environnement hétérogène au sein d'aires de répartition très étendues (Savolainen *et al.* 2007).

Afin d'apporter une première contribution à l'étude de la variabilité intraspécifique et de l'architecture génétique des traits de réponse journalière du pin maritime aux variations du climat, nous avons développé une étude pilote, basée sur des microdendromètres à haute résolution. Nous avons analysé la variabilité des microvariation journalières du rayon du tronc au sein de deux familles de pleins frères, en lien avec les variations du climat, principalement déterminé par l'évapotranspiration (ETP) et le potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol}). Une analyse temporelle des traits de variation journalière du rayon du tronc (MDS et Δm_{xtr}) montre qu'ils suivent une dynamique saisonnière, conditionnée par les variations de l'environnement climatique. L'analyse de l'architecture génétique de ces traits montre que le déterminisme génétique des traits est également exprimé différemment en fonction du niveau de contrainte.

VI.IV.I Effet des variations climatiques sur la croissance et les microvariations journalières du tronc

La comparaison des mesures de 2011 à 2013 montrent que les croisements sont sensibles aux variations annuelles du climat, tant au niveau de leur croissance que de leur variation journalière. La mesure précise des paramètres climatiques à l'échelle journalière a également permis de caractériser chaque jour et ainsi de les regrouper en classes de contraintes environnementales selon deux facteurs : ETP et Ψ_{sol} .

L'analyse des courbes de croissance radiale au cours des trois saisons de végétation étudiées montre une diminution relative des taux de croissance, dans les périodes présentant des conditions hydriques limitantes (i.e Ψ_{sol} bas et ETP importante). Ce processus est observé pour tous les géotypes étudiés. Cette observation suggère que l'arrêt de croissance est étroitement synchronisé avec une diminution de la réserve en eau du sol, qui entraîne un arrêt de croissance quand le niveau de réserve tombe en dessous d'un certain seuil, correspondant à un stress hydrique (Granier *et al.* 1995). Les dynamiques de croissance individuelles montrent un niveau de variabilité phénotypique élevé. Cette deuxième observation confirme que des arbres poussant sur un même site et soumis au même niveau de contrainte climatique peuvent montrer des dynamiques de croissance différentes (Rathgeber *et al.* 2011), en fonction de leur composition génétique.

Le MDS varie au cours de l'année, avec une augmentation linéaire pendant la saison de croissance et une diminution linéaire pendant l'hiver. Comme attendu, le MDS augmente de manière linéaire avec l'ETP en raison d'un gradient interne de potentiel hydrique (en réponse à une augmentation de la demande évaporatoire). Cependant, les arbres étudiés dans cet essai n'ont pas été soumis à des conditions climatiques extrêmes pendant la période étudiée, sinon le MDS aurait dû diminuer de nouveau en conditions de stress sévères, comme suggéré par Garnier et Berger (1986). Ainsi, les comportements observés pourraient être différents de ceux d'arbres poussant dans des conditions de stress hydrique persistant (i.e les conditions du Maroc).

Nous avons observé que Δm_{xtr} fluctue considérablement pendant l'année, montrant des variations autour de 0 en dehors de la saison de végétation. En conditions favorables, le rayon des arbres augmente en raison de la croissance secondaire (Drew and Downes 2009, 2010; Rossi *et al.* 2008; De Schepper *et al.* 2012). En conditions de forte demande transpiratoire, l'eau cicule au sein de du tronc, entre les couches de tissus élastiques (écorce inférieure, incluant les cellules en cours de division, en cours d'élargissement et le phloème) et la colonne transpiratoire. La différence entre deux maxima journaliers successifs du tronc peut donc être négative proportionnellement à cette perte d'eau (Drew *et al.* 2011; King *et al.* 2012 Zweifel *et al.* 2000). En conséquence, Δm_{xtr} diminue

de manière linéaire avec l'ETP pendant la saison de croissance et reste proche de 0 pendant l'hiver, où seules des variations de la réserve en eau interne de l'arbre sont observées.

Il est bien connu que les stomates se ferment progressivement jusqu'au soir, afin de maintenir le potentiel hydrique de l'arbre au-dessus du niveau de cavitation du xylème (Loustau *et al.* 1996). Cette fermeture stomatique a des conséquences physiologiques qui se traduisent par une diminution de l'activité photosynthétique et une croissance secondaire ralentie, en raison d'une allocation préférentielle du carbone à des processus physiologiques plus complexes, comme la croissance racinaire (Chaves *et al.* 2002; Oribe *et al.* 2003; Zweifel *et al.* 2006). En conséquence, les arbres diminuent leur métabolisme et rentrent en phase quiescente (Cherubini *et al.* 2003; McDowell *et al.* 2008). Pendant l'été, les arbres sont incapables de compenser les pertes journalières en eau, ce qui explique les valeurs les plus négatives de Δx_{tr} .

Les effets de ces deux types de contrainte climatique peuvent être testés séparément mais les données vont dans le sens d'une contrainte climatique qui résulte de l'effet conjoint des deux paramètres (ETP et Ψ_{sol}). Ainsi l'amplitude du signal journalier des arbres augmente avec la contrainte jusqu'à un certain seuil puis diminue quand la contrainte devient trop importante.

Nos résultats montrent également que les mécanismes contrôlant le fonctionnement stomatique sont contrôlés génétiquement, conformément aux résultats sur le déterminisme génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le pin maritime (Marguerit *et al.* 2014). Un MDS plus important amène une ouverture stomatique plus importante, facilitant l'acquisition de carbone et la croissance. Les liens entre les performances de croissance et les variations journalières du rayon du tronc sont en accord avec ces hypothèses. Il en résulte que les individus possédant un fort niveau de variabilité de MDS (en réponse à la contrainte hydrique) présente également un meilleur accroissement en diamètre pendant la période étudiée. Cela suggère que la plasticité du MDS pourrait être utilisée comme proxy des performances de croissance radiale. Il est cependant important de noter que les arbres subissent de changements de classement très importants sur ces traits au jeune âge qui rendent les projections à long terme difficiles.

VI.IV.II Génotypage et cartographie génétique

Dans ce travail, des cartes génétiques ont été générées pour représenter le génome du pin maritime dans 3 descendances de cartographie (CL, ML et CM). La construction des cartes génétiques est une étape cruciale dans la compréhension de la variation génétique, en particulier chez les espèces qui ne possèdent pas de génomes de référence. Il est également possible d'estimer la taille du génome étudié à partir des données de cartographie. L'information générée pour les trois

populations a été combinée dans une carte consensus pour permettre la représentation conjointe de QTL. Pour les parents C, L et M génotypés avec la puce 9k, la couverture reste correcte mais l'augmentation de la taille de population de cartographie permettrait une meilleure estimation des distances génétiques et de la taille du génome (Bartholomé *et al.* 2014 chez l'Eucalyptus).

Dans cette étude, une carte consensus a été générée pour représenter l'information de ségrégation de trois populations de pleins frères de pin maritime (CL, ML et CM). La carte composite donne les positions relatives de 2308 SNP uniques, dans des contigs uniques, espacés en moyenne ce 0,8 cM. L'estimation de couverture de génome est de 71% pour une taille de 1912 cM malgré le nombre très important de marqueurs, dû au nombre insuffisant d'individus. Les tests de régression sur les positions de marqueurs entre deux cartes ont cependant montré que l'intégration des SNP génotypés au sein de la carte consensus n'a pas modifié de manière substantielle l'ordonnement et la distance entre marqueurs ; contrairement aux résultats d'études précédentes (Sewell *et al.* 1999 ; Brown *et al.* 2001, 2003 ; Krutovsky *et al.* 2004). La carte CLMmean est donc un outil robuste pour la représentation de toutes les cartes générées pour les parents testés, tout type de génotypage confondu.

VI.IV.III Architecture génétique des traits de microvariation journalière du tronc

L'analyse de l'architecture génétique des traits de microvariation journalière du rayon du tronc (représentés par MDS et Δm_{xtr}) a été réalisée pour la première fois dans le cadre de cette étude. Les résultats d'analyse QTL montrent qu'il existe de nombreuses zones chromosomiques en lien avec la réponse instantanée des arbres aux variations du climat. Ils montrent également qu'il existe un déterminisme génétique en partie commun entre les MDS et Δm_{xtr} qui s'exprime de manière différente en fonction des conditions environnementales. On observe notamment des zones stables entre environnements climatique différents qui témoignent de mécanismes stables peu sensibles aux variations de l'environnement. Il est cependant important de noter que ces zones stables concernent essentiellement des catégories climatiques similaires et peu contraintes. De même on observe que les QTL détectés en situation de contrainte (dans les conditions de l'essai) sont spécifiques d'une catégorie d'environnement. De la même manière, la majorité des QTL détectés colocalisent entre croisements mais il existe aussi des QTL spécifiques du fond génétique. Ces résultats sont classiques dans la littérature "QTL" mais sont vérifiés ici pour la première fois à des échelles temporelles et environnementales plus fines pour des traits de fluctuation radiale du tronc sur une matrice environnementale contrastée.

La mise en évidence d'une variabilité individuelle et l'existence de QTL pour les traits de microvariations journalières du tronc vont le sens des études menées sur l'efficacité d'utilisation de

l'eau. Un grand nombre d'étude ont montré qu'il existe de la variabilité entre provenances et au sein des populations pour l'efficience d'utilisation de l'eau (Zhang et Marshall 1994, Fernández *et al.* 2000, Olivas-García *et al.* 2000, Tognetti *et al.* 2000, Fernández *et al.* 2006, Aranda *et al.* 2010). Dans le cadre d'étude sur la résistance à la sécheresse, des études ont mis en évidence une variabilité à l'échelle individuelle chez les arbres forestiers (Brendel *et al.* 2002, Gebremedhin 2003, Monclus *et al.* 2009, Aspinwall *et al.* 2011). L'efficience d'utilisation de l'eau va être mesurée sur les 223 arbres suivis avec les dendromètres, ce qui permettra d'analyser les corrélations avec le MDS et Δm_{xtr} , puis de comparer si les zones de QTL détectées dans notre étude sont en lien avec celle détectés pour l'efficience d'utilisation de l'eau. Il serait ainsi peut-être possible d'évaluer la stratégie d'utilisation de l'eau des arbres, grâce à des mesures automatisées et non destructrices fournies par des microdendromètres.

La dimension génétique de notre étude a été limitée à la comparaison de deux familles de pleins-frères de père commun, donc des fonds génétiques corse vs. marocain. Elle doit être mieux précisée dans l'avenir. Pour ce faire, il est prévu d'installer 200 capteurs sur un pannel de diversité représenté dans un test de provenances de pin maritime qui a été installé il y a trois ans sur le domaine de Pierroton. Celui-ci comprend 521 génotypes de 35 populations de l'ensemble de l'aire naturelle de l'espèce, bouturés chacun 8 fois en moyenne. Ainsi 25 génotypes (8 clones/génotype) choisis dans cinq pools génétiques bien distincts (Maroc, Portugal, Espagne, Corse, Landes) pourraient être équipés et les mesures permettraient d'estimer la différenciation génétique entre écotypes ainsi que l'héritabilité (répétabilité s'agissant de clones) des traits de fluctuation journalière du tronc.

VI.IV.IV Conclusion

Cette étude est la première à décrire la variabilité phénotypique intraspécifique avec de tels effectifs et l'architecture génétique de traits de microvariation journalière du rayon du tronc. Nous avons montré que les traits liés à la fluctuation journalière du tronc étaient caractérisés par un fort niveau de variabilité entre pleins frères et montraient une sensibilité aux effets du climat (PET, Ψ_{sol}). Nous avons aussi montré que la plasticité en termes de MDS était associée à une meilleure croissance en diamètre, suggérant une relation entre la plasticité du fonctionnement journalier et la croissance radiale. Enfin nous avons montré que l'architecture génétique de ces traits était aussi complexe que des traits plus intégrés (comme la croissance annuelle) avec des QTL partagés et spécifiques entre conditions environnementales contrastées et fonds génétiques différents.

Les questions de recherches futures concernent : i/ le développement d'une modélisation plus complexe des signaux journaliers des arbres individuels pour en extraire des informations sur d'autres traits, basés sur des mécanismes physiologiques sous-jacents, et ii/ l'analyse de la variabilité écotypique qui est d'un intérêt majeur chez une espèce présente sur une gamme environnementale aussi large sur l'ensemble de son aire naturelle de distribution. Une meilleure compréhension des rôles de la plasticité phénotypique, de la variabilité génétique et de leurs interactions dans le déterminisme de traits liés à la croissance chez un organisme est d'une importance fondamentale pour comprendre les mécanismes d'adaptation aux perturbations environnementales. Dans les programmes d'amélioration génétique, ces connaissances sont indispensables pour développer des variétés durables qui resteront performantes dans des conditions climatiques variées que l'arbre rencontrera pendant son cycle de vie.

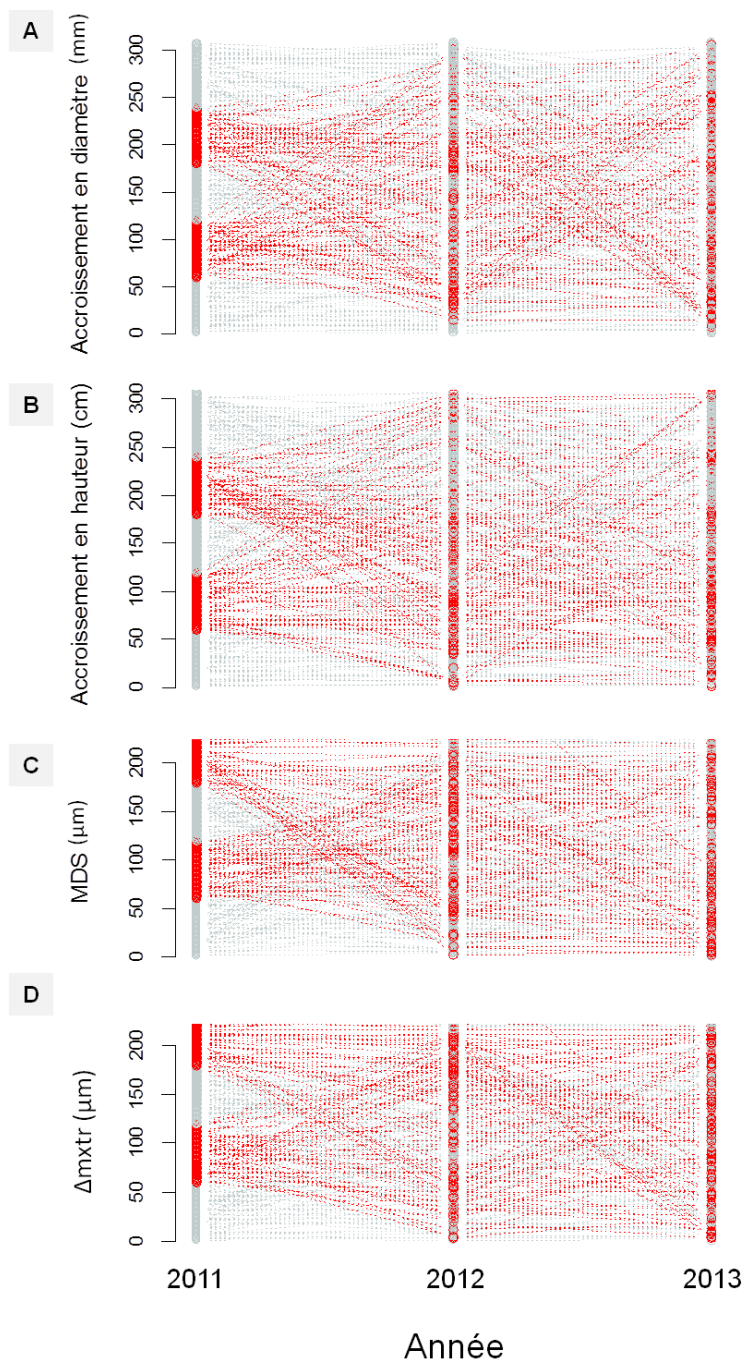


Figure additionnelle 2. Mise en évidence des variations de classement des individus pour chaque phénotype testé de 2011 à 2013. De **A** à **D**: accroissement en diamètre (*mm*), accroissement en hauteur (*cm*), amplitude maximale de contraction journalière (MDS, μm), différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc (Δmxtr , μm). Les arbres sont classés 1 à *n* (*n* variant selon le trait), des valeurs les plus faibles vers les valeurs les plus fortes (ex. pour l'accroissement en hauteur, l'arbre classé 1 est celui qui a le plus faible accroissement annuel). Les classements des individus sont reliés par des lignes entre années pour mettre en évidence les changements de classement. Les valeurs de classement sont regroupées par groupes de 20% des individus (groupement arbitraire) et colorées alternativement en rouge et gris pour mieux visualiser les trajectoires.

Figure additionnelle 3. QTL détectés selon la méthode simple environnement (voir matériel et méthodes) pour les deux traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, $\Delta mxtr$, μm). Pour chaque QTL, les informations suivantes sont présentées : croisement (Croisement CL ou ML), nom du parent (Parent C, L ou M), nom du phénotype, catégorie environnementale, nombre d'observation (NBr obs), groupe de liaison (LG), position du pic de LOD (position, cM), intervalle de confiance bayésien à 95% (BCI, cM), valeur du pic de LOD, p-value à 10% génome (Pvalue), le pourcentage de variance expliqué par le QTL (%var) et l'effet de substitution allélique (ESA, μm , AA-AB).

Cross	Parent	Phenotype	Environnement	Nbr obs	LG	position (cM)	BCI (cM)	LOD	%var	Pvalue(Chi2)	ESA (μm)
ML	M	$\Delta mxtr$	22	113	1	88	[78-100]	3,76	10	7,71E-04	-12
ML	M	$\Delta mxtr$	6	113	2	7	[0-12]	3,53	12	1,91E-04	5
ML	M	$\Delta mxtr$	21	113	2	7	[2-14]	4,38	11	2,56E-04	5
ML	M	$\Delta mxtr$	34	113	2	0	[0-12]	3,84	12	1,18E-04	39
CL	C	$\Delta mxtr$	23	102	4	66	[55-81]	3,83	10	9,75E-04	6
CL	L	MDS	17	100	4	22	[18-32]	3,77	8	3,57E-03	17
CL	C	MDS	3	102	5	101	[89-117]	3,68	12	3,06E-04	-10
CL	C	$\Delta mxtr$	7	102	6	44	[30-64]	3,59	11	5,32E-04	7
CL	C	$\Delta mxtr$	1	102	7	136	[132-144]	5,00	15	3,61E-05	7
CL	C	$\Delta mxtr$	2	102	7	138	[134-148]	3,63	12	2,53E-04	4
CL	C	$\Delta mxtr$	6	102	7	135	[132-146]	4,92	17	1,32E-05	6
CL	C	$\Delta mxtr$	16	102	7	151	[142-151]	3,55	13	2,16E-04	8
CL	C	$\Delta mxtr$	21	102	7	148	[136-151]	3,49	9	2,48E-03	4
CL	C	$\Delta mxtr$	26	102	7	136	[132-148]	4,50	15	4,06E-05	5
CL	C	$\Delta mxtr$	31	102	7	135	[132-144]	4,41	16	2,22E-05	7
CL	L	MDS	13	82	7	71	[58-80]	4,17	15	3,04E-04	-38
CL	L	$\Delta mxtr$	19	100	8	110	[102-116]	3,79	14	1,16E-04	6
ML	L	$\Delta mxtr$	5	112	9	110	[104-118]	3,77	14	4,09E-05	-15
CL	C	$\Delta mxtr$	8	102	9	82	[74-104]	3,72	8	4,56E-03	-5
ML	L	$\Delta mxtr$	10	113	9	10	[4-20]	3,86	7	4,10E-03	4
ML	L	$\Delta mxtr$	13	112	9	110	[104-120]	3,64	13	6,50E-05	-16
CL	C	$\Delta mxtr$	28	102	9	94	[78-104]	3,59	11	5,71E-04	-9
ML	L	MDS	2	113	9	136	[114-140]	3,69	10	5,98E-04	8
CL	C	MDS	3	102	9	112	[98-118]	4,07	14	6,93E-05	-11
CL	C	MDS	23	102	9	114	[98-122]	4,15	15	5,90E-05	-18
CL	C	MDS	25	96	9	112	[102-123]	3,59	10	1,95E-03	-18
CL	L	$\Delta mxtr$	10	102	10	33	[22-44]	4,07	12	3,63E-04	5
ML	M	MDS	18	113	10	52	[44-68]	3,49	7	3,48E-03	-13
CL	C	$\Delta mxtr$	19	100	11	11	[5-21]	3,67	11	7,43E-04	-5
ML	L	$\Delta mxtr$	26	113	11	108	[86-114]	3,85	12	1,70E-04	4
CL	C	$\Delta mxtr$	29	102	11	21	[11-29]	3,54	8	4,42E-03	-3
ML	L	MDS	21	113	11	90	[72-97]	3,97	10	4,21E-04	9
ML	L	MDS	26	113	11	91	[70-98]	4,00	11	3,50E-04	8

Figure additionnelle 4. QTL détectés en selon la méthode multi-environnement (voir matériel et méthodes) pour les traits de microvariation du rayon du tronc (amplitude maximale de contraction journalière, MDS, μm et différence entre deux valeurs maximales journalières successives du rayon du tronc, Δmxt , μm). Pour chaque QTL, les informations suivantes sont présentées : croisement (Croisement CL ou ML), nom du parent (Parent C, L ou M), nom du phénotype, groupe de liaison (LG), position du pic de LOD (position, cM), intervalle de confiance à 95% (CI, cM), valeur du pic de LOD, p-value à 1% chromosome (p-value).

Cross	Parent	Phenotype	LG	Position (cM)	CI (95%)	LOD	p-value (H1:H0)
CL	C	MDS	1	103	[98-108]	30.70	0
CL	L	MDS	1	131	[0-241]	21.95	0
ML	L	MDS	1	222	[201-243]	48.99	0
ML	M	MDS	1	199	[63-249]	24.98	0
CL	C	Δmxt	1	124	[96-152]	27.52	0
CL	L	Δmxt	1	124	[112-135]	38.22	0
ML	L	Δmxt	1	183	[170-196]	45.72	0
ML	M	Δmxt	1	110	[51-170]	31.11	0
CL	L	MDS	2	177	[174-180]	57.06	0
ML	L	MDS	2	136	[134-137]	33.87	0
ML	M	MDS	2	110	[102-118]	39.91	0
ML	L	Δmxt	2	157	[127-187]	29.59	0
ML	M	Δmxt	2	12	[8-16]	39.20	0
ML	M	Δmxt	2	4	[0-12]	57.61	0
CL	C	MDS	3	123	[84-162]	35.77	0
CL	L	MDS	3	82	[48-115]	29.32	0
CL	C	Δmxt	3	31	[0-124]	29.36	0
CL	L	Δmxt	3	187	[180-193]	39.95	0
ML	L	Δmxt	3	216	[120-269]	25.81	0
ML	M	Δmxt	3	47	[0-114]	24.54	0.001
CL	C	MDS	4	31	< 0.5 cM	51.33	0
ML	L	MDS	4	2	[0-5]	58.91	0
CL	C	Δmxt	4	141	[87-196]	27.05	0
CL	C	MDS	5	100	[77-122]	47.16	0
CL	L	MDS	5	179	[118-240]	22.78	0.006
ML	L	MDS	5	128	[90-166]	33.99	0
CL	L	Δmxt	5	18	[0-63]	35.59	0
ML	L	Δmxt	5	67	[1-134]	30.90	0
CL	C	MDS	6	36	< 0.5 cM	57.82	0
ML	L	MDS	6	15	< 0.5 cM	49.02	0
ML	M	MDS	6	28	[0-72]	30.46	0
CL	L	Δmxt	6	128	[105-151]	31.17	0
ML	M	Δmxt	6	14	[0-66]	35.75	0
CL	C	MDS	7	150	[115-184]	33.99	0
CL	L	MDS	7	51	< 0.5 cM	84.91	0
ML	L	MDS	7	24	[5-42]	43.54	0
ML	M	MDS	7	37	[11-63]	35.70	0
ML	M	MDS	7	37	[13-53]	21.53	0.004
CL	C	Δmxt	7	205	[203-207]	54.13	0
CL	L	Δmxt	7	49	[26-73]	42.97	0
CL	C	MDS	8	3	[0-9]	44.25	0
CL	L	MDS	8	160	[156-165]	39.18	0
ML	L	MDS	8	22	[0-55]	29.65	0
ML	M	MDS	8	76	[0-176]	32.77	0
CL	C	Δmxt	8	9	[6-11]	39.62	0
CL	L	Δmxt	8	131	[57-205]	23.98	0.004
ML	L	Δmxt	8	188	[181-195]	47.51	0
ML	M	Δmxt	8	87	[23-151]	35.58	0
CL	C	MDS	9	173	[171-175]	92.27	0
CL	L	MDS	9	13	[9-17]	53.41	0
ML	L	MDS	9	207	< 0.5 cM	62.56	0
ML	M	MDS	9	13	[12-15]	44.38	0
CL	C	Δmxt	9	132	[122-142]	56.33	0
CL	L	Δmxt	9	100	[0-216]	28.37	0
ML	L	Δmxt	9	216	[203-218]	43.64	0
ML	M	Δmxt	9	50	[40-60]	25.71	0
CL	C	MDS	10	6	[0-16]	43.99	0
CL	L	MDS	10	202	[195-208]	41.05	0
ML	M	MDS	10	120	< 0.5 cM	70.32	0
CL	C	Δmxt	10	157	[99-214]	33.43	0
CL	L	Δmxt	10	106	[0-213]	22.38	0.225
ML	L	Δmxt	10	214	[192-236]	29.47	0
CL	C	MDS	11	127	[113-136]	32.69	0
CL	L	MDS	11	113	[109-117]	43.97	0
ML	L	MDS	11	149	[144-154]	49.37	0
ML	M	MDS	11	105	[68-141]	29.94	0
CL	C	Δmxt	11	19	[16-21]	38.56	0
ML	L	Δmxt	11	149	[139-158]	34.67	0
CL	C	MDS	12	181	< 0.5 cM	48.24	0
CL	L	MDS	12	164	[140-189]	28.47	0
ML	L	MDS	12	162	[120-204]	36.80	0
CL	C	Δmxt	12	24	[19-29]	51.24	0
CL	L	Δmxt	12	186	[172-201]	33.84	0
ML	M	MDS	22	2	< 0.5 cM	52.52	0

VII Conclusion générale

Cette étude s'inscrit dans le contexte des questions de recherche liées à l'impact du changement climatique sur les forêts de production. Le pin maritime offrant un modèle de premier choix tant d'un point de vue sociétal que scientifique, considérant que cette espèce fait l'objet de programmes de recherche depuis plus de 50 ans, notamment en sylviculture, écophysiologie, pathologie, entomologie et génétique. Les modèles de prédiction du climat indiquent que le changement climatique aura un impact négatif sur la production des forêts de la zone méditerranéenne dans les décennies à venir. Les changements prévus seront probablement très supérieurs à la capacité d'adaptation naturelle (in situ) des écosystèmes forestiers ce qui aurait pour conséquence une baisse du rendement. Il faut donc anticiper ces bouleversements. C'est ainsi que la recherche menée sur l'intensification durable des forêts de plantation s'orientent vers des innovations en termes d'itinéraires sylvicoles (gestion adaptative) et de matériel végétal (amélioration génétique). Ces grandes orientations scientifiques nécessitent d'être présent sur des fronts de science qui visent à titre d'exemple à mieux comprendre i/ la physiologie des arbres dans des contextes environnementaux (biotiques et abiotiques) de plus en plus incertains, ainsi que ii/ le fonctionnement des cycles de la matière (C, H₂O, nutriments) et d'énergie dans les systèmes forestiers de production.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons souhaité faire progresser les connaissances sur la croissance primaire et secondaire du pin maritime au stade juvénile, en croisant trois couches d'information : le phénotype, le génotype et l'environnement, afin d'étudier d'une part le déterminisme génétique (G) et environnemental (E) de la variabilité phénotypique, ainsi que la contribution de l'interaction GxE, et d'autre part l'architecture génétique de ces traits en terme de nombre, position et effet des QTL qui contrôlent une partie de la variation du phénotype. La biologie dite "à haut débit" permet aujourd'hui d'acquérir des quantités de données importantes sur ces trois composantes (P, G, E) et l'analyse intégrée de ces données a été le fil rouge de cette thèse. Les données génotypiques ont bénéficié de la construction de biopuces de génotypage qu'il est désormais possible de développer même sur des espèces non modèles. Les données climatiques sont considérées de nature stratégique par l'INRA et sont acquises dans le cadre d'un réseau national accessible à partir du portail "Climatik". Une telle station est présente sur le site de Pierroton et nous avons pu en bénéficier. Quant au phénotypes, une caractéristique importante de nos travaux a été de les considérer dans une dimension dynamique. Ainsi, un effort particulier a été porté sur la caractérisation de

cinétiques de croissance sur des échelles de temps plus ou moins fines. Cette approche multi-échelle de l'environnement (sub-horaire à annuelle) nous a donc permis d'apprécier la variabilité phénotypique des traits de croissance au jeune âge ainsi que de leur architecture génétique dans des environnements contrastés, entre pleins frères (F1 et F2) issus de croisements biparentaux et d'autofécondation. S'agissant de la détection de QTL, des effectifs plus importants que la plupart des études menées chez les arbres forestiers ont été utilisés, ce qui a permis d'estimer les effets des QTL sans trop de biais.

Dans un premier temps, nous avons étudié les déterminismes génétiques et environnementaux du débourrement et de la croissance au sein et entre trois descendances de plein-frères (CL, ML et CM) de pins maritimes. L'architecture génétique de ces traits a également été étudiée à partir de deux croisements (CL et ML) en fonction de variations environnementales, représentées par des années climatiques contrastées (2012 et 2013), notamment pendant la période du débourrement. La littérature montre que le débourrement d'espèce caducifoliées nécessite une quantité de froid en hiver (appelée « chilling requirement ») pour lever l'endodormance, associée à des températures de printemps dites de « forcing » ou « heat requirement » pour lever l'ecodormance (Vitasse 2009). Les données obtenues dans le cadre de ce travail sur la phase de forcing semblent suivre cette logique. Au final, cette étude permet de conclure sans équivoque sur un déterminisme largement contrôlé par l'environnement ainsi qu'une plasticité qui ne semble pas sous contrôle génétique fort (rangs des génotypes très conservés entre années) à *contrario* de la croissance. L'étude de la variabilité génétique *sensu stricto* devra être précisée grâce à l'analyse d'un dispositif expérimental plus adapté. Nous disposons en effet de données issues d'un test de provenances comprenant 512 génotypes clonés de 35 populations de l'aire naturelle du pin maritime dont l'analyse permettra d'estimer la variabilité génétique ainsi que le niveau et la structure géographique de la différenciation phénotypique. Même si la dimension génétique de nos investigations doit être renforcée, notre étude a permis de montrer que la majorité des QTL détectés était spécifique d'un des croisements, ce qui implique une variabilité de l'architecture génétique des traits de débourrement en fonction du fond génétique (ici corse versus marocain, le père landais étant commun aux deux croisements). Des QTL spécifiques et partagés entre stade de développement du bourgeon ont été également détectés. Ces résultats donnent l'image d'une architecture génétique complexe avec de nombreux gènes contrôlant le phénotype et dont certains sont stables et d'autres spécifiques du stade de débourrement et du fond génétique.

La variation phénotypique des traits de croissance observée dans notre étude est conforme à celle décrite dans la littérature (Debazac 1964 ; Kremer 1981 et Harfouche *et al.* 1995): une forte variabilité individuelle avec des accroissements (surtout en hauteur) contrastés entre les trois familles. L'effet année est également très important sur la croissance primaire et secondaire ce qui démontre une forte sensibilité à l'environnement de la croissance au jeune âge. Par ailleurs, cette plasticité semble génétiquement contrôlée considérant les changements importants de rangs des génotypes entre années, surtout en comparaison aux traits de débourrement. De même nous avons mis en évidence une forte variabilité de l'architecture génétique des traits de croissance en fonction des environnements climatiques. Encore une fois, notre dispositif expérimental est peu adapté pour estimer la variabilité génétique *sensus stricto* de la croissance, mais cette fois-ci, les données de la littérature montrent une forte différenciation des écotypes de pin maritime et une héritabilité de l'ordre de 20-30%

Dans une seconde étude, nous avons souhaité analyser plus finement la plasticité de l'architecture génétique en utilisant une approche rétrospective en utilisant le bois comme "enregistreur" de l'environnement climatique passé. Des profils micro-densitométriques ont ainsi été obtenus pour plusieurs centaines d'arbres âgés de 14 ans appartenant à une famille issue de l'autofécondation d'un hybride corse x landes. Les variations de l'épaisseur des cernes, du pourcentage de bois final et de la densité du bois de printemps et d'été ont été mesurées rétrospectivement pour 7 années consécutives. Même si l'effet année est significatif pour l'ensemble des traits, il est surtout marqué pour la croissance radiale avec une baisse notable des performances l'année la plus sèche. C'est bien évidemment dans la variabilité intra-annuelle, c'est-à-dire inter saison, que se trouve la plus forte variabilité de la densité du bois; et c'est l'impact de cette signature climatique sur l'architecture génétique de la densité du bois que nous avons capté pour la première fois chez une espèce d'arbre forestier.

Nous avons détecté de nombreux QTL dans des régions chromosomiques dispersées sur l'ensemble du génome. Deux résultats majeurs ont été obtenus:

- la mise en évidence d'une instabilité partielle des QTL de densité entre bois de printemps et bois d'été. En effet, autant de QTL communs que de QTL spécifiques ont été détectés entre ces deux types de bois. On peut donc supposer l'existence de gènes à effet pléiotropique (plutôt qu'une liaison physique) pour les QTL communs, qui correspondrait par exemple à des gènes clefs impliqués dans des mécanismes généraux de la formation du bois,

ainsi qu'à l'existence de gènes spécifiquement régulés au cours de la saison de végétation et impliqués par exemple dans le contrôle de la durée du grandissement cellulaire et de la durée de l'épaississement des parois, les deux facteurs contribuant majoritairement la taille radiale des cellules et à l'épaisseur de la paroi et donc déterminant la densité du bois, Cuny *et al.* 2014).

-une stabilité inter-annuelle (sur les 7 années analysées) des QTL, que ce soit pour le bois initial ou final, suggérant une stabilité remarquable des mécanismes moléculaires associés à la formation du bois initial et final année après année. Une telle stabilisation du phénotype et de son architecture génétique fait penser à la canalisation chère à Waddington (1966) qui résulterait de processus sélectifs et participerait à la valeur sélective globale des individus. Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par des résultats récemment obtenus chez le pin maritime sur les patrons micro-évolutifs (différenciation inter provenances) de la résistance à la cavitation et de la densité du bois au stade juvénile, qui suggèrent également une stase évolutive pour ces deux traits résultant plus probablement d'un processus de canalisation que de sélection uniforme (Lamy *et al.* 2011, 2012 et 2014). Ainsi, l'identification d'une architecture robuste (aux conditions climatiques, l'effet ontogénique étant considéré comme négligeable) de la densité du bois irait aussi dans le sens d'une architecture génétique contrainte, c'est-à-dire d'un phénomène de canalisation.

Des données de génomique fonctionnelle produites chez le pin maritime (Paiva *et al.* 2008, Gion *et al.* 2005, Le Provost *et al.* 2003, Ph Chaumeil et M Garcès, non publié) concernant les gènes de régulation du transcriptome et du protéome entre le bois initial et le bois final pourraient être intégrée à cette étude pour suggérer des gènes candidats fonctionnels et expressionnels (voire positionnels si les gènes correspondant co-localisent avec les QTL) partagés par les deux types de bois ou spécifiques d'un type de bois, pour apporter des éléments nouveaux dans la connaissance des processus moléculaires sous-jacents aux QTL.

Afin de faire un premier pas dans l'étude de la variabilité intraspécifique et de l'architecture génétique des traits de réponse journaliers du pin maritime aux variations du climat, nous avons dans le cadre d'une troisième étude acquis des données uniques sur un grand effectif, grâce à l'utilisation de microdendromètres à haute résolution. Nous avons ainsi analysé la variabilité phénotypique des microvariations journalières du rayon du tronc au sein de deux familles de pleins frères, en lien avec les variations du climat, principalement déterminé par l'évapotranspiration (ETP) et le potentiel hydrique du sol (Ψ_{sol}). Une analyse

temporelle des traits de variation journalière du rayon du tronc (MDS et Δm_{xtr}) montre que ces deux traits suivent une dynamique saisonnière, conditionnée par les variations de l'environnement climatique. L'analyse de l'architecture génétique de ces traits montre que le déterminisme génétique des traits est également exprimé différemment en fonction du niveau de contrainte. La comparaison des mesures de 2011 à 2013 montrent que les croisements sont sensibles aux variations annuelles du climat, tant au niveau de leur croissance que de leur variation journalière. La mesure précise des paramètres climatiques à l'échelle journalière a également permis de caractériser chaque jour et ainsi de les regrouper en classes de contraintes environnementales selon deux axes : ETP et Ψ_{sol} .

L'observation des dynamiques de croissance saisonnières suggère qu'une diminution de la croissance journalière est étroitement synchronisée avec une diminution de la réserve en eau du sol, qui peut aller jusqu'à entraîner un arrêt de croissance quand le niveau de réserve tombe en dessous d'un certain seuil, correspondant à un stress hydrique (Granier *et al.* 1995). Nous avons également observé que des arbres poussant sur un même site et soumis au même niveau de contrainte climatique présentaient des dynamiques de croissance différentes (comme l'ont déjà montré Rathgeber *et al.* 2011), en fonction de leur composition génétique.

Cependant, les arbres étudiés dans cet essai n'ont pas été soumis à des conditions climatiques extrêmes pendant la période étudiée, sinon le MDS aurait diminué de nouveau en conditions de stress sévère, comme suggéré par Garnier et Berger (1986). Ainsi, les comportements observés pourraient être différents de ceux d'arbres poussant dans des conditions de stress hydrique chroniques (i.e. les conditions du Maroc).

Nos résultats montrent également que les mécanismes contrôlant le fonctionnement stomatique sont contrôlés génétiquement, conformément aux résultats sur le déterminisme génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le pin maritime (Marguerit *et al.* 2014). Nos résultats montrent qu'une plasticité plus importante du MDS aux variations de la contrainte climatique (notamment ETP) est liée à une meilleure croissance annuelle en diamètre. Cela suggère que le MDS pourrait être utilisé comme proxy des performances de croissance radiale. Il est cependant important de noter que les arbres subissent de changements de classement très importants sur ces traits au jeune âge qui rendent les projections à long terme difficiles.

Les résultats d'analyse QTL montrent enfin qu'il existe de nombreuses zones en lien avec la réponse instantanée des arbres aux variations du climat. Ils montrent également qu'il

existe un déterminisme génétique en partie commun entre les MDS et Δmxt qui s'exprime de manière différente en fonction des conditions environnementales.

Perspectives

Des questions de recherches futures concernent : i/ le développement d'une modélisation plus complexe des signaux journaliers des arbres pour en extraire des informations sur d'autres traits, basés sur des mécanismes physiologiques sous-jacents et ii/ une meilleure prise en compte de la variabilité écotypique qui est d'un intérêt majeur dans une espèce aussi dispersée sur un territoire présentant une large gamme de conditions environnementales où la sélection naturelle a conduit à des adaptations locales.

Dans la continuité de nos recherches, les micro-variations du rayon pourront être dans une dizaine d'années (quand les arbres du dispositif de Pierroton seront âgés d'une quinzaine d'années) reliées aux propriétés du bois (micro-densitométrie). L'analyse combinée de l'élaboration des propriétés du bois et de la réponse de la croissance à l'environnement, pourrait permettre une meilleure compréhension des bases physiologiques des propriétés du bois.

Enfin, une carte génétique consensus pour les Pinaceae vient d'être élaborée au sein de notre équipe de recherche. Regroupant près de 7000 gènes (dont les 2500 de cette thèse) elle devrait permettre de tester des colocalisations entre des QTL détectés dans des pedigrees de pin maritime voire des espèces différentes afin d'aborder de façon plus précise l'architecture génétique de la croissance et des propriétés du bois. Par ailleurs, les avancées en termes de cartes de gènes permettront de comparer la position de gènes candidats à celle des QTL suggérant des pistes pour valider les gènes voire les polymorphismes causaux par des approches de génomique fonctionnelle ou de génétique d'association.

VIII Références

- Acevedo-Rodriguez R, Vargas-Hernandez JJ, Lopez-Upton J, Mendoza JV. 2006. Effect of geographic origin and nutrition on shoot pre-nology of Mexican Douglas-Fir (*Pseudotsuga* sp.) seedlings. *Agrociencia* 40, 125-137.
- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S. 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* 1, 95-111.
- Alberto FJ, Aitken SN, Alía R, González-Martínez SC, Hänninen H et al. 2013. Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology* 19:1645-1661.
- Alia R, Gil L, Pardos JA. 1995. PERFORMANCE OF 43 PINUS-PINASTER AIT PROVENANCES ON 5 LOCATIONS IN CENTRAL SPAIN. *Silvae Genetica* 44, 75-81.
- Allard RW, Workman P. 1963. Population studies in predominantly self-pollinated species. IV. Seasonal fluctuations in estimated values of genetic parameters in lima bean populations. *Evolution*, 470-480.
- Angeles G, Bond B, Boyer JS, Bodriib T, Burns MJ et al. 2004. The Cohesion-Tension Theory. *New Phytologist* 163: 451-452.
- Appleby N, Edwards D, Batley J. 2009. New Technologies for Ultra-High Throughput Genotyping in Plants. In: *Plant Genomics*. Edited by Gustafson JP, Langridge P, Somers DJ, 513: Humana Press, 19-39.
- Aranda I, Alía R, Ortega U, Dantas ÂK, Majada J. 2010. Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genetics & Genomes* 6, 169-178.
- Arano KG, Munn IA. 2006. Evaluating forest management intensity: A comparison among major forest landowner types. *Forest Policy and Economics* 9, 237-248.
- Aspinwall MJ, King JS, McKeand SE, Domec J-C. 2011. Leaf-level gas-exchange uniformity and photosynthetic capacity among loblolly pine (*Pinus taeda* L.) genotypes of contrasting inherent genetic variation. *Tree physiology* 31, 78-91.
- Badalotti A, Anfodillo T, Grace J. 2000. Evidence of osmoregulation in *Larix decidua* at Alpine treeline and comparative responses to water availability of two co-occurring evergreen species. *Annals of Forest Science* 57: 623-633.
- Bahrman N, Baradat P, Petit R. 1992. Structuration de la variabilité génétique du pin maritime dans l'ensemble de son aire naturelle. Hypothèses explicatives. Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques, Colloque International en hommage à Jean Pernès, BRG/MRT Paris, 351-368.
- Baldocchi D. 1992. A LAGRANGIAN RANDOM-WALK MODEL FOR SIMULATING WATER-VAPOR, CO-2 AND SENSIBLE HEAT-FLUX DENSITIES AND SCALAR PROFILES OVER AND WITHIN A SOYBEAN CANOPY. *Boundary-Layer Meteorology* 61, 113-144.
- Baradat P, Marpeau-Bezard A. 1988. Le pin maritime *Pinus pinaster* Ait. Biologie et génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce. Thèse doct État, univ Bordeaux I
- Bartelink HH. 2000. A growth model for mixed forest stands. *Forest Ecology and Management* 134, 29-43.
- Bartholomé J : Déterminisme génétique de la dynamique de croissance et de la composition isotopique du carbone chez l'*Eucalyptus* en réponse aux variations environnementales. Thèse de doctorat de Montpellier SupAgro.
- Bartholomé J, Mabilia A, Savelli B, Bert D, Brendel O, Plomion C, Gion J-M. 2015. Genetic architecture of carbon isotope composition and growth in *Eucalyptus* across multiple environments. *New Phytologist*, n/a-n/a.
- Bartholome J. Déterminisme génétique de la dynamique de croissance et de la composition isotopique du carbone chez l'*Eucalyptus* en réponse aux variations environnementales= Genetic determinism of growth dynamics and carbon isotope composition in *Eucalyptus* in response to environmental changes.
- Bates D, Maechler M, Bolker B. 2013. lme4: Linear-mixed Effects Models Using Eigen and S4 Classes. Retrieved from: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4> (R package version 0.999999-2..
- Beavis W, Grant D, Albertsen M, Fincher R. 1991. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theoretical and Applied Genetics* 83, 141-145.
- Beavis WD. 1998. QTL analyses: power, precision, and accuracy. *Molecular dissection of complex traits*. 145-162.

- Becker M, Bert GD, Bouchon J, Picard JF, Ulrich E. 1994. Tendances à long terme observées dans la croissance de divers feuillus et résineux du nord-est de la France depuis le milieu du 19^{ème} siècle. *Revue Forestière Française* 46, 4, 335-341.
- Beckmann J, Soller M. 1988. Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theoretical and Applied Genetics* 76, 228-236.
- Bendtsen BA. 1978. Properties of wood from improved and intensively managed trees. *Forest Products Journal*.
- 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, 862-882.
- Bossel H. 1996. TREEDYN3 forest simulation model. *Ecological Modelling* 90, 187-227.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* 32, 314.
- Bouffier L, Raffin A, Kremer A. 2008. Evolution of genetic variation for selected traits in successive breeding populations of maritime pine. *Heredity* 101: 156-165.
- Boulet G, Chehbouni A, Braud I, Vauclin M, Haverkamp R, Zammit C. 2000. A simple water and energy balance model designed for regionalization and remote sensing data utilization. *Agricultural and Forest Meteorology* 105, 117-132.
- Bouriaud O, Leban JM, Bert D, Deleuze C. 2005. Intra-annual variations in climate influence growth and wood density of Norway spruce. *Tree Physiology* 25, 651-660.
- Bouvarel P. 1960. Note sur la résistance au froid de quelques provenances de pin maritime.
- Bradshaw AD. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics* 13, 115-155.
- Bradshaw HD, Stettler RF. 1995. Molecular-Genetics of Growth and Development in Populus .4. Mapping QTL with Large Effects on Growth, Form, and Phenology Traits in a Forest Tree. *Genetics* 139, 963-973.
- Bradshaw Jr H, Foster G. 1992. Marker-aided selection and propagation systems in trees: advantages of cloning for studying quantitative inheritance. *Canadian Journal of Forest Research* 22, 1044-1049.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM. 2006. Evolutionary response to rapid climate change. *Science(Washington)* 312, 1477-1478.
- Breda 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.
- Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl JM. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of delta(13)C and ring width in maritime pine. *Plant Cell and Environment* 25, 945-953.
- Brix H. 1972. Nitrogen fertilization and water effects on photosynthesis and earlywood-latewood production in Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 2, 467-478.
- Broman KW, Sen S. 2009. *A Guide to QTL Mapping with R/qtl*: Springer.
- Broman KW, Sen S. 2011. *A Guide to Qtl Mapping With R/Qtl*: Springer.
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19, 889-890.
- Broman KW. 2001. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab Animal* 30, 44-52.
- Broquedis M, Demounem R, David R. 1976. L'évolution saisonnière de la croissance des organes végétatifs du Pin maritime et de leur teneur en auxine, dans les trois principaux sites écologiques de la forêt landaise. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 283 D, 10, 1189-1192.
- Brown GR, Bassoni DL, Gill GP, Fontana JR, Wheeler NC, Megraw RA, Davis MF, Sewell MM, Tuskan GA, Neale DB. 2003. Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL verification and candidate gene mapping. *Genetics* 164, 1537-1546.
- Brown GR, Kadel EE, Bassoni DL, Kiehne KL, Temesgen B, Van Buijtenen J, Sewell MM, Marshall KA, Neale DB. 2001. Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics. *Genetics* 159, 799-809.
- Brown, C.L. 1971. Primary growth. In: Zimmermann M.H., Brown C.L. (eds), *Trees: Structure and Function*, Springer Verlag, New York, pp. 1-66.

- Calamassi R, Rocca GD, Falusi M, Paolettiinstb E, Strati S. 2001 Resistance to water stress in seedlings of eight European provenances of *Pinus halepensis* Mill. *Annals of Forest Science* 58: 663-672.
- Caldwell MM, Meister HP, Tenhunen JD, Lange OL. 1986. Canopy structure, light microclimate and leaf gas exchange of *Quercus coccifera* L. in a Portuguese macchia: measurements in different canopy layers and simulations with a canopy model. *Trees-Structure and Function* 1, 25-41.
- Callahan HS, Pigliucci M, Schlichting CD. 1997. Developmental phenotypic plasticity: where ecology and evolution meet molecular biology. *Bioessays* 19, 519-525.
- Carbonell E, Asins M, Baselga M, Balansard E, Gerig T. 1993. Power studies in the estimation of genetic parameters and the localization of quantitative trait loci for backcross and doubled haploid populations. *Theoretical and Applied Genetics* 86, 411-416.
- Carle J, Holmgren L. 2009. 5 Wood from Planted Forests. *Planted forests: uses, impacts and sustainability*, 47.
- Carrer M, Anfodillo T, Urbinati C, Carraro V. 1998. High-altitude forest sensitivity to global warming: results from long-term and short-term analyses in the Eastern Italian Alps. In: Beninston M, Innes JL (eds). *The impacts of climate variability on forests*. Springer, Berlin 171–189.
- Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi MC, Barreneche T, Lauteri M, Villani F. 2004. Identification of QTL affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant Cell and Environment* 27, 1088-1101.
- Celton JM, Martinez S, Jammes MJ, Bechti A, Salvi S, Legave JM, Costes E. 2011. Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes. *New phytologist* 192, 378-392.
- Cermak J, Kucera J, Bauerle WL, Phillips N, Hinckley TM. 2007. Tree water storage and its diurnal dynamics related to sap flow and changes in stem volume in old-growth Douglas-fir trees. *Tree Physiology* 27: 181–198.
- Chagné D, Brown G, Lalanne C, Madur D, Pot D, Neale D, Plomion C. 2003. Comparative genome and QTL mapping between maritime and loblolly pines. *Molecular Breeding* 12, 185-195.
- Chagné D, Lalanne C, Madur D, Kumar S, Frigério J-M, Krier C, Decroocq S, Savouré A, Bou-Dagher-Kharrat M, Bertocchi E. 2002. A high density genetic map of maritime pine based on AFLPs. *Annals of Forest Science* 59, 627-636.
- Chancerel E, Lamy JB, Lesur I, Noirot C, Klopp C, Ehrenmann F, Boury C, Le Provost G, Label P, Lalanne C, Leger V, Salin F, Gion JM, Plomion C. 2013. High-density linkage mapping in a pine tree reveals a genomic region associated with inbreeding depression and provides clues to the extent and distribution of meiotic recombination. *Bmc Biology* 11.
- Chancerel E, Lepoittevin C, Le Provost G, Lin Y-C, Jaramillo-Correa JP, Eckert AJ, Wegrzyn JL, Zelenika D, Boland A, Frigerio J-M. 2011. Development and implementation of a highly-multiplexed SNP array for genetic mapping in maritime pine and comparative mapping with loblolly pine. *BMC genomics* 12, 368.
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP et al. 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chmura DJ, Rozkowski R. 2002. Variability of beech provenances in spring and autumn phenology. *Silvae Genetica* 51, 123-127.
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR. 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15289-15294.
- Choisnel E. 1985. Un modèle agrométéorologique opérationnel de bilan hydrique utilisant des données climatiques. *Conf. Int. CIID, Les besoins en eau des cultures*, Paris, éd. INRA, 115-132.
- Chuine I, Beaubien EG. 2001. Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecology Letters* 4, 500-510.
- Chuine I, Cour P, Rousseau DD. 1999. Selecting models to predict the timing of flowering of temperate trees: implications for tree phenology modelling. *Plant Cell and Environment* 22, 1-13.
- Chuine I, Cour P. 1999. Climatic determinants of budburst seasonality in four temperate-zone tree species. *New Phytologist* 143, 339-349.
- Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963-971.

- Collard B, Mace E, McPhail M, Wenzl P, Cakir M, Fox G, Poulsen D, Jordan D. 2009. How accurate are the marker orders in crop linkage maps generated from large marker datasets? *Crop and Pasture Science* 60, 362-372.
- Conkle MT. 1973. Growth data for 29 years from the California elevational transect study of ponderosa pine. *Forest Science* 19, 31-39.
- Coops NC, Waring RH. 2001. Assessing forest growth across southwestern Oregon under a range of current and future global change scenarios using a process model, 3-PG. *Global Change Biology* 7, 15-29.
- Cornelius J. 1994. Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. *Canadian journal of forest research* 24, 372-379.
- Costa P, Durel CE. 1996. Time trends in genetic control over height and diameter in maritime pine. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 26, 1209-1217.
- Cramer W, Bondeau A, Woodward FI, Prentice IC, Betts RA, Brovkin V, Cox PM, Fisher V, Foley JA, Friend AD. 2001. Global response of terrestrial ecosystem structure and function to CO₂ and climate change: results from six dynamic global vegetation models. *Global change biology* 7, 357-373.
- Cramer W, Kicklighter DW, Bondeau A, Moore B, Churkina G, Nemry B, Ruimy A, Schloss AL, Intercompariso PPNM. 1999. Comparing global models of terrestrial net primary productivity (NPP): overview and key results. *Global Change Biology* 5, 1-15.
- Crawley M, Akhteruzzaman M. 1988. Individual variation in the phenology of oak trees and its consequences for herbivorous insects. *Functional Ecology*, 409-415.
- Crismani W, Girard C, Mercier R. 2013. Tinkering with meiosis. *Journal of Experimental Botany* 64, 55-65.
- Cruziat P, Cochard H, Ameglio T. 2002. Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science* 59: 723–752.
- Cuny HE, Rathgeber CB, Lebourgeois F, Fortin M, Fournier M. 2012. Life strategies in intra-annual dynamics of wood formation: example of three conifer species in a temperate forest in north-east France. *Tree Physiology* 32, 612-625.
- Danjon F. 1994. Stand Features and Height Growth in a 36-Year-Old Maritime Pine (*Pinus-Pinaster* Ait. Provenance Test. *Silvae Genetica* 43: 52-62.
- Daubenmire RF. 1945. An improved type of precision dendrometer. *Ecology* 26: 97-8.
- Daudet FA, Ameglio T, Cochard H, Archilla O, Lacoïnte A. 2005. Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations. *Journal of Experimental Botany* 56: 135–144.
- Davi H, Dufrene E, Granier A, Le Dantec V, Barbaroux C, Francois C, Breda N. 2005. Modelling carbon and water cycles in a beech forest Part II: Validation of the main processes from organ to stand scale. *Ecological Modelling* 185, 387-405.
- David R. 1974. La fixation des dunes de la région d'Aquitaine : rôle du pin maritime, influence de l'eau sur la croissance du pin. *International Journal of Biometeorology* 18, 2, 128-132.
- De Jong G. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist* 166, 101-118.
- De Schepper V, van Dusschoten D, Copini P, Jahnke S, Steppe K. 2012. MRI links stem water content to stem diameter variations in transpiring trees. *Journal of Experimental Botany* 63: 2645-53.
- Deans JD, Harvey FJ. 1995. Phenologies of 16 European Provenances of Sessile Oak Growing in Scotland. *Forestry* 68, 265-273.
- Debazac EF. 1964. Manuel des conifères. ENGREF, Nancy, 172p.
- Decoux V, Varcin É, Leban J-M. 2004. Relationships between the intra-ring wood density assessed by X-ray densitometry and optical anatomical measurements in conifers. Consequences for the cell wall apparent density determination. *Annals of forest science* 61, 251-262.
- Demoune R, Dayani A, David R. 1970. Influence exercée par les facteurs climatiques et édaphiques sur l'activité du cambium et la différenciation des éléments du bois, chez le Pin maritime des Landes de Gascogne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 271, D, 314-319.
- Demoune R. 1979. Essai de définition et de caractérisation de niveaux écophysologiques dans le Massif forestier des Landes de Gascogne. Thèse Univ. Bordeaux I, 441 p.

- Derory J, Scotti-Saintagne C, Bertocchi E, Le Dantec L, Graignic N, Jauffres A, Casasoli M, Chancerel E, Bodenes C, Alberto F, Kremer A. 2010. Contrasting relations between diversity of candidate genes and variation of bud burst in natural and segregating populations of European oaks. *Heredity* 105, 401-411.
- Deslauriers A, Morin H, Urbinati C, Carrer M. 2003. Daily weather response of balsam fir (*Abies balsamea* (L. Mill.) stem radius increment from dendrometer analysis in the boreal forests of Quebec (Canada). *Trees* 17: 477–484.
- Deslauriers A, Rossi S, Anfodillo T. 2007. Dendrometer and intra-annual tree growth: what kind of information can be inferred? *Dendrochronologia* 25, 113-124.
- Desprez-Loustau ML and Dupuis F. 1994. Variation in the phenology of shoot elongation between geographic provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) – implications for the synchrony with the phenology of the twisting rust fungus, *Melampsora pinitorqua*. *Ann Sci For*, 51: 553–568.
- Desprez-Loustau ML, Marçais B, Nageleisen LM, Piou D, Vannini A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* 63, 597-612.
- Destremau DX, Duvall RL, Trech T, Vander Wyst G. 1976a. Cinq années de mesures hebdomadaires d'accroissement en circonférence. *Annales de la Recherche Forestière au Maroc* 16, 2-43.
- Destremau DX, Jolly H, Tahri T. 1976b. Contribution à la connaissance des provenances de *Pinus pinaster*. *Annales de la Recherche Forestière au Maroc* 16, 101-153.
- Devitt ML, Stafstrom JP. 1995. Cell-Cycle Regulation during Growth-Dormancy Cycles in Pea Axillary Buds. *Plant Molecular Biology* 29, 255-265.
- DeWitt TJ. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity: tests with predator-induced morphology and life history in a freshwater snail. *Journal of Evolutionary Biology* 11, 465-480.
- Dhôte JF, Hervé JC. 2000. Changements de productivité dans quatre forêts de chênes sessiles depuis 1930 : une approche au niveau du peuplement. *Annales des Sciences Forestières*, 57, 651–680.
- Dhôte JF. 1990. Modèles de la dynamique des peuplements forestiers : articulation entre les niveaux de l'arbre et du peuplement. Application à la sylviculture des hêtraies. Thèse de l'université Claude Bernard Lyon I, 240 p.
- Dhôte JF. 1991. Modélisation de la croissance des peuplements réguliers de hêtre: dynamique des hiérarchies sociales et facteurs de production. *Annales des Sciences Forestières*, 48, 389–416.
- Dixon HH, Joly J. 1895. On the ascent of sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 186: 563–576.
- Dobbertin M, Brang P. 2001 Crown defoliation improves tree mortality models. *Forest Ecology and Management* 141: 271-84.
- Donnelly A, Caffarra A, Kelleher C, O'Neill B, Diskin E, Pletsers A, Proctor H, Stirnemann R, O'Halloran J, Peñuelas J. 2012. Surviving in a warmer world: environmental and genetic responses. *Climate Research* 53, 245-262.
- Downes G, Beadle C, Worledge D. 1999. Daily stem growth patterns in irrigated *Eucalyptus globulus* and *E-nitens* in relation to climate. *Trees-Structure and Function* 14, 102-111.
- Drew DM, Downes GM, Battaglia M. 2010. CAMBIUM, a process-based model of daily xylem development in *Eucalyptus*. *Journal of Theoretical Biology* 264: 395-406.
- Drew DM, Downes GM. 2009. The use of precision dendrometers in research on daily stem size and wood property variation: A review. *Dendrochronologia* 27: 159-U7.
- Drew DM, Richards AE, Downes GM, Cook GD, Baker P. 2011 The development of seasonal tree water deficit in *Callitris intratropica*. *Tree Physiology* 31: 953–964.
- Drouaud J, Camilleri C, Bourguignon PY, Canaguier A, Berard A, Vezon D, Giancola S, Brunel D, Colot V, Prum B, Quesneville H, Mezard C. 2006. Variation in crossing-over rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination "hot spots". *Genome Research* 16, 106-114.
- Duchaufour Ph. 1995. Pédologie. Sol, végétation, environnement. Abrégés. Masson.
- Ducousso A, Bacilieri R, Demesure B, Dumolin-Lapegue S, Kremer A, Petit R, Zanetto A. 1997. Geographic structure of genetic diversity for European deciduous oaks. *Bulletin Technique - Office National des Forêts* 33.
- Ducousso A, Guyon JP, Kremer A. 1996. Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). *Annales Des Sciences Forestieres* 53, 775-782.

- Dummel K. 1970. Intensitätsstufen sind praxisreif! Zur Diskussion über die Bildung von Intensitätsstufen. (Intensity classes are hot! The discussion regarding the formation of intensity classes.) *Allgemeine Forst Zeitschrift* 25, 636–640.
- Durst P, McKenzie P, Brown C, Appanah S. 2006. Challenges facing certification and eco-labelling of forest products in developing countries. *International Forestry Review* 8, 193-200.
- Eckert AJ, Bower AD, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ SC, Wegrzyn JL, Coop G, Neale DB. 2010. Back to nature: ecological genomics of loblolly pine (*Pinus taeda*, Pinaceae). *Molecular Ecology* 19, 3789-3805.
- Edwards DR, Dixon MA. 1995. Mechanisms of drought response in *Thuja occidentalis* L. II. Post-conditioning water stress and stress relief. *Tree Physiology* 15: 129-133.
- Egertsdotter U, Zyl L, MacKay J, Peter G, Kirst M, Clark C, Whetten R, Sederoff R. 2004. Gene expression during formation of earlywood and latewood in loblolly pine: expression profiles of 350 genes. *Plant Biology* 6, 654-663.
- Elzinga JA, Atlan A, Biere A, Gigord L, Weis AE, Bernasconi G. 2007. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 432-439.
- Endelman JB, Plomion C. 2014. LPmerge: an R package for merging genetic maps by linear programming. *Bioinformatics* 30, 1623-1624.
- FAO. 2007. ITEM 5 : Global wood and wood products flow. In Advisory committee on paper and wood products (Shanghai, China: FAO).
- FAO. 2007. States of the world's forests 2007. Rome: food and agriculture organization of the united nations.
- FAO. 2013. Situation des Forêts du monde 2013- States of the world's forests 2013.
- FCBA. Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement (2013) Mémento 2013. FCBA Institute Technologiques
- Fernández J, Díaz-Espejo A, Infante J, Durán P, Palomo M, Chamorro V, Girón I, Villagarcía L. 2006. Water relations and gas exchange in olive trees under regulated deficit irrigation and partial rootzone drying. *Plant and Soil* 284, 273-291.
- Fernández J, Moreno F. 2000. Water use by the olive tree. *Journal of crop production* 2, 101-162.
- Ferreira A, da Silva MF, Silva LDCE, Cruz CD. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology* 29, 187-192.
- Flint J, Mackay TF. 2009. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome research* 19, 723-733.
- Franceschini T, Bontemps J-D, Leban J-M. 2012. Transient historical decrease in earlywood and latewood density and unstable sensitivity to summer temperature for Norway spruce in northeastern France. *Canadian Journal of Forest Research* 42, 219-226.
- Frewen BE, Chen TH, Howe GT, Davis J, Rohde A, Boerjan W, Bradshaw H. 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics* 154, 837-845.
- Fritts HC. 1961 An evaluation of three techniques for measuring radial tree growth. *Bulletin of the Ecological Society of America* 42: 54–55.
- Fritts HC. 1976. Characteristics of Tree Rings as Predictors of Climate. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 172, 30-30.
- Gailing O, Vornam B, Leinemann L, Finkeldey R. 2009. Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model. *Physiologia Plantarum* 137, 509-519.
- Gamborg C, Larsen JB. 2003. 'Back to nature' - a sustainable future for forestry? *Forest Ecology and Management* 179, 559-571.
- Garnier E, Berger A. 1986. Effect of Water-Stress on Stem Diameter Changes of Peach-Trees Growing in the Field. *Journal of Applied Ecology* 23, 193-209.
- Gaspar MJ, Louzada JL, Silva ME, Aguiar A, Almeida MH. 2008. Age trends in genetic parameters of wood density components in 46 half-sibling families of *Pinus pinaster*. *Canadian journal of forest research* 38, 1470-1477.
- Gebremedhin MT. 2003. Variation in growth, water relation, gas exchange, and stable carbon isotope composition among clones of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) under water stress, University of Florida.

- Genard M, Fishman S, Vercambre G, Huguet JG, Bussi C et al. 2001 A biophysical analysis of stem and root diameter variations in woody plants. *Plant Physiology* 126 : 188-202.
- Geraldes A, Difazio S, Slavov G, Ranjan P, Muchero W, Hannemann J, Gunter L, Wymore A, Grassa C, Farzaneh N. 2013. A 34K SNP genotyping array for *Populus trichocarpa*: design, application to the study of natural populations and transferability to other *Populus* species. *Molecular ecology resources* 13, 306-323.
- Germain E. 1992. Le noyer. In: Gallais A., Bannerot H. (eds), *Amélioration des espèces végétales cultivées, objectifs et critères de sélection*. INRA Editions, Paris, pp. 620-632.
- Gion J-M, Lalanne C, Le Provost G, Ferry-Dumazet H, Paiva J, Frigerio JM, Chaumeil P, Barré A, de Daruvar A, Brach J, Claverol S, Bonneau M, Plomion C. 2005. The proteome of maritime pine wood forming tissue. *Proteomics* 5: 3731-3751
- González-Martínez S, Alía R, Gil L. 2002. Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* 89, 199-206.
- Granier A, Badeau V, Breda N. 1995. Modélisation du bilan hydrique des peuplements forestiers. *Revue Forestière Française XLVII*: 59-68.
- Grant RF, Nalder IA. 2000. Climate change effects on net carbon exchange of a boreal aspen-hazelnut forest: estimates from the ecosystem model ecosys. *Global Change Biology* 6, 183-200.
- Grattapaglia D, Bertolucci FL, Sederoff RR. 1995. Genetic-Mapping of QTL Controlling Vegetative Propagation in *Eucalyptus-Grandis* and *E-Urophylla* Using a Pseudo-Testcross Strategy and Rapd Markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 933-947.
- Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic-Linkage Maps of *Eucalyptus-Grandis* and *Eucalyptus-Urophylla* Using a Pseudo-Testcross - Mapping Strategy and Rapd Markers. *Genetics* 137, 1121-1137.
- Grishkevich V, Yanai I. 2013. The genomic determinants of genotype \times environment interactions in gene expression. *Trends in Genetics* 29, 479-487.
- Groover A, Devey M, Fiddler T, Lee J, Megraw R, Mitchel-Olds T, Sherman B, Vujcic S, Williams C, Neale D. 1994. Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. *Genetics* 138, 1293-1300.
- Guinaudeau J, Illy G, Maugé JP, Dumas F. 1963. Essai de fertilisation minérale sur Pin maritime à Mimizan (Landes). Résultats après la sixième année. - *Annales de l'École nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et expériences*, tome XX, fasc. 1.
- Gupta PK, Rustgi S, Mir RR. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity* 101, 5-18.
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Castellano MM, del Pozo JC. 2002. G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 480-486.
- H.E. Cuny, C.B.K. Rathgeber, D. Frank, P. Fonti, M. Fournier. (In press). Kinetics of tracheid development explains conifer tree-ring structure. *New Phytologist*
- Hager C, Wurth G, Kohlmaier GH. 1999. Biomass of forest stands under climatic change: a German case study with the Frankfurt biosphere model (FBM). *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 51, 385-401.
- Haldane JBS. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J Genet*, 8, 299-309.
- Haley CS, Knott SA. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69, 315-324.
- Hall D, Luquez V, Garcia VM, St Onge KR, Jansson S, Ingvarsson PK. 2007. Adaptive population differentiation in phenology across a latitudinal gradient in European Aspen (*Populus tremula*, L.): A comparison of neutral markers, candidate genes and phenotypic traits. *Evolution* 61, 2849-2860.
- Hamrick JL, Godt MJW, and Sherman-Broyles SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For.* 6: 95-124.
- Hanninen H, Hakkinen R, Hari P, Koski V. 1990. Timing of Growth Cessation in Relation to Climatic Adaptation of Northern Woody-Plants. *Tree Physiology* 6, 29-39.

- Hansen MC, Potapov PV, Moore R, Hancher M, Turubanova S, Tyukavina A, Thau D, Stehman S, Goetz S, Loveland T. 2013. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science* 342, 850-853.
- Harfouche A, Baradat P, Durel CE. 1995. Intraspecific Variability in Maritime Pine (*Pinus-Pinaster* Ait) in the South-East of France .1. Variability in Autochthonous Populations and in the Whole Range of the Species. *Annales Des Sciences Forestieres* 52, 307-328.
- Harfouche A, Kremer A. 2000. Provenance hybridization in a diallel mating scheme of maritime pine (*Pinus pinaster*). I. Means and variance components. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 30, 1-9.
- Harfouche A. 2003. Retrospective early test for adult vigor of *Pinus pinaster* families grown under two water regimes. Implications for early selection. *Annals of Forest Science* 60: 539-547.
- Heide OM. 2003. High autumn temperature delays spring bud burst in boreal trees, counterbalancing the effect of climatic warming. *Tree Physiology* 23, 931-936.
- Herzog KM, Häsler R, Thum R. 1995. Diurnal changes in the radius of a subalpine Norway spruce stem: their relation to the sap flow and their use to estimate transpiration. *Trees* 10: 94–101.
- Hoffmann F. 1995. *Fagus*, a Model for Growth and Development of Beech. *Ecological Modelling* 83, 327-348.
- Hopkins ER. 1960. Variation in the growth rate and quality of *Pinus pinaster* Aiton in Western Australia. *West Austr For Dep Bull* 67, 34 p
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME. 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in plant science* 8, 534-540.
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC, Chen THH. 2003. From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 81, 1247-1266.
- Howe GT, Hackett WP, Furnier GR, Klevorn RE. 1995. Photoperiodic Responses of a Northern and Southern Ecotype of Black Cottonwood. *Physiologia Plantarum* 93, 695-708.
- Hudson CJ, Kullar AR, Freeman JS, Faria DA, Grattapaglia D, Kilian A, Myburg AA, Potts BM, Vaillancourt RE. 2012. High synteny and colinearity among *Eucalyptus* genomes revealed by high-density comparative genetic mapping. *Tree Genetics & Genomes* 8, 339-352.
- Hunter AF, Lechowicz MJ. 1992. Predicting the Timing of Budburst in Temperate Trees. *Journal of Applied Ecology* 29, 597-604.
- Hurme P, Sillanpää MJ, Arjas E, Repo T, Savolainen O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. *Genetics* 156, 1309-1322.
- Hurrell JW, Trenberth KE. 2010. Climate Change. In: *Effects of Climate Change on Birds*. eds. Møller AP, Fiedler W et Berthold P, University Press, Oxford, New York, 9, 29pp.
- Husch B, Beers TW, Kershaw JA. 2003. *Forest mensuration*. John Wiley et Sons, New Jersey, USA
- Ihrke CA, Kronstad W. 1975. Genetic recombination in maize as affected by ethylenediaminetetraacetic acid and dimethyl sulfoxide. *Crop Science* 15, 429-431.
- Illy G, Castaing J-P. 1966. Rythme saisonnier de croissance en diamètre et en hauteur chez le Pin maritime. *Bulletin de la Société Botanique de France* 113, 173-179.
- Ingvarsson PK, Garcia MV, Hall D, Luquez V, Jansson S. 2006. Clinal variation in *phyB2*, a candidate gene for day-length-induced growth cessation and bud set, across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula*). *Genetics* 172, 1845-1853.
- IPCC. 2007. *Climate Change 2007: The physical sciences basis: contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. (eds S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, & H.L. Miller). Cambridge University Press, Cambridge.
- Irvine J, Grace J. 1997. Continuous measurements of water tensions in the xylem of trees based on the elastic properties of wood. *Planta* 202 : 455–461.
- Isik F. 2014. Genomic selection in forest tree breeding: the concept and an outlook to the future. *New forests* 45, 379-401.

- Jansen RC, Stam P. 1994. High-Resolution of Quantitative Traits into Multiple Loci Via Interval Mapping. *Genetics* 136, 1447-1455.
- Jansen RC, Vanooijen JW, Stam P, Lister C, Dean C. 1995. Genotype-by-Environment Interaction in Genetic-Mapping of Multiple Quantitative Trait Loci. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 33-37.
- Jansen RC. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135, 205-211.
- Jaramillo-Correa JP, Grivet D, Lepoittevin C, Sebastiani F, Heuertz M, Garnier-Géré P, Alía R, Plomion C, Vendramin GG, González-Martínez SC. 2015. Molecular proxies of climate maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae). *Genetics* 199: 793-807
- Jarvis AJ, Davies WJ. 1998. The coupled response of stomatal conductance to photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany* 49, 399-406.
- Jenkins P, Hellmers H, Edge E, Rook D, Burdon R. 1977. Influence of photoperiod on growth and wood formation of *Pinus radiata*. *NZ J1. for. Sci* 7, 172-191.
- Jensen JS, Hansen JK. 2008. Geographical variation in phenology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur* L. oak grown in a greenhouse. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23, 179-188.
- Jermstad KD, Bassoni DL, Jech KS, Ritchie GA, Wheeler NC, Neale DB. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas fir. III. Quantitative trait loci-by-environment interactions. *Genetics* 165, 1489-1506.
- Jermstad KD, Bassoni DL, Jech KS, Wheeler NC, Neale DB. 2001. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir. I. Timing of vegetative bud flush. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 1142-1151.
- Jermstad KD, Bassoni DL, Wheeler NC, Anekonda TS, Aitken SN, Adams WT, Neale DB. 2001. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir. II. Spring and fall cold-hardiness. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 1152-1158.
- Johnsen K, Samuelson L, Teskey R, McNulty S, Fox T. 2001. Process models as tools in forestry research and management. *Forest Science* 47, 2-8.
- Joos F, Prentice IC, House JI. 2002. Growth enhancement due to global atmospheric change as predicted by terrestrial ecosystem models: consistent with US forest inventory data. *Global Change Biology* 8, 299-303.
- Kalcsits L, Silim S, Tanino K. 2009. The Influence of Temperature on Dormancy Induction and Plant Survival in Woody Plants. *Plant Cold Hardiness: From the Laboratory to the Field*, 108-118.
- Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152, 1203-1216.
- Kawecki TJ, Ebert D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters* 7, 1225-1241.
- Kaya Z, Sewell MM, Neale DB. 1999. Identification of quantitative trait loci influencing annual height- and diameter-increment growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98, 586-592.
- Kicklighter DW, Bruno M, Donges S, Esser G, Heimann M, Helfrich J, Ift F, Joos F, Kaduk J, Kohlmaier GH, McGuire AD, Melillo JM, Meyer R, Moore B, Nadler A, Prentice IC, Sauf W, Schloss AL, Sitch S, Wittenberg U, Wurth G. 1999. A first-order analysis of the potential role of CO₂ fertilization to affect the global carbon budget: a comparison of four terrestrial biosphere models. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 51, 343-366.
- Kim S, Misra A. 2007. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9, 289-320.
- King G, Fonti P, Nievergelt D, Buntgen U, Frank D. 2012. Climatic drivers of hourly to yearly tree radius variations along a 6°C natural warming gradient. *Agricultural Forest Meteorology* 168: 36–46.
- Kirschbaum MUF. 1999. Modelling forest growth and carbon storage in response to increasing CO₂ and temperature. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 51, 871-888.
- Knapp S, Bridges W. 1990. Using molecular markers to estimate quantitative trait locus parameters: power and genetic variances for unreplicated and replicated progeny. *Genetics* 126, 769-777.
- Kole C. 2007. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Forest trees*, Berlin: Springer vol. 7.
- Koornneef M, Eden Jv, Hanhart C, Stam P, Braaksma F, Feenstra W. 1983. Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Heredity* 74, 265-272.

- Korol AB, Ronin YI, Nevo E. 1998. Approximate analysis of QTL-environment interaction with no limits on the number of environments. *Genetics* 148, 2015-2028.
- Korol RL, Running SW, Milner KS, Hunt ER. 1991. Testing a Mechanistic Carbon Balance Model against Observed Tree Growth. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 21, 1098-1105.
- Kosambi DD. 1943. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Human Genetics*, 12, 172-175.
- Kozlowski TT, Winget CH. 1964. Diurnal and seasonal variation in radii of tree stems. *Ecology* 45: 149-55.
- Kramer K. 1994. Selecting a Model to Predict the Onset of Growth of *Fagus-Sylvatica*. *Journal of Applied Ecology* 31, 172-181.
- Kramer K. 1995. Modeling Comparison to Evaluate the Importance of Phenology for the Effects of Climate-Change on Growth of Temperate-Zone Deciduous Trees. *Climate Research* 5, 119-130.
- Kramer PJ, ROSE JR J. 1985. Physiological characteristics of loblolly pine seedlings in relation to field performance. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NURSERY MANAGEMENT PRACTICES FOR THE SOUTHERN PINES, Auburn, 416-440.
- Kremer A, Roussel G. 1986. Décomposition de la croissance en hauteur du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) Variabilité géographique des composantes morphogénétiques et phénologiques. *Annales des sciences forestières*, Vol. 43: EDP Sciences, 15-34.
- Kremer A. 1981a. Genetic-Control of Height Growth in *Pinus-Pinaster* .2. Interannual Pattern, Genotypexyear Interaction. *Annales Des Sciences Forestieres* 38: 331-355.
- Kremer A. 1981b. Genetic-Control of Height Growth in *Pinus-Pinaster* (*Pinus-Pinaster* Ait.).3. Evolution of the Components of the Phenotypic and Genotypic Variance. *Annales Sciences Forestières* 38: 355-375.
- Kremer A. 1994. Genetic Diversity and Phenotypic Variability of Forest Trees. *Genetics Selection Evolution* 26, S105-S123.
- Kriebel HB, Bagley WT, Deneke FJ, Funsch RW, Roth P, Jokela JJ, Merritt C, Wright JW, Williams RD. 1976. Geographic Variation in *Quercus-Rubra* in North Central United-States Plantations. *Silvae Genetica* 25, 118-122.
- Krutovsky KV, Troggio M, Brown GR, Jermstad KD, Neale DB. 2004. Comparative mapping in the Pinaceae. *Genetics* 168, 447-461.
- Kubo T, Jyodo S. 1996. Some characteristics of the annual ring structure related to wood density variation in sugi (*Cryptomeria japonica*). *Mokuzai Gakkaishi* 42, 1156-1162.
- Kumar S, Spelman RJ, Garrick DJ, Richardson TE, Lausberg M, Wilcox PL. 2000. Multiple-marker mapping of wood density loci in an outbred pedigree of radiata pine. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 926-933.
- Kuramoto N, Kondo T, Fujisawa Y, Nakata R, Hayashi E, Goto Y. 2000. Detection of quantitative trait loci for wood strength in *Cryptomeria japonica*. *Canadian Journal of Forest Research* 30, 1525-1533.
- Kuznetsova A, Brockhoff PB and Christensen RHB. 2013. lmerTest: Tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package).. R package version 2.0-0. <http://CRAN.R-project.org/package=lmerTest>.
- Lagercrantz U, Lydiate DJ. 1995. Rflp Mapping in *Brassica-Nigra* Indicates Differing Recombination Rates in Male and Female Meioses. *Genome* 38, 255-264.
- Lamy JB, Bouffier L, Burlett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S. 2011. Uniform selection as the primary evolutionary force of cavitation resistance across a species range. *PlosOne* 6(8): e23476
- Lamy JB, Delzon S, Bouche P, Alia R, Vendramin GG, Cochard H, Plomion C. 2014. Limited genetic variability and phenotypic plasticity for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytol* 201: 874-86
- Lamy JB, Lagane F, Plomion C, Cochard H, Delzon S. 2012. Micro-evolutionary patterns of juvenile wood density in a pine species. *Plant Ecol* 213: 1781-1792
- Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199.
- Landsberg JJ, Waring RH. 1997. A generalised model of forest productivity using simplified concepts of radiation-use efficiency, carbon balance and partitioning. *Forest Ecology and Management* 95, 209-228.

- Lang G, Early J, Martin G, Darnell R. 1987. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22, 371-377.
- Laube J, Sparks TH, Estrella N, Höfler J, Ankerst DP, Menzel A. 2014. Chilling outweighs photoperiod in preventing precocious spring development. *Global change biology* 20, 170-182.
- Launey J, Ivkovich M, Pâques L, Bastien C, Higelin P, Rozenberg P. 2002. Rapid measurement of trunk MOE on standing trees using RIGIDIMETER. *Annals of Forest Sciences*, 59, 465-469.
- Lavigne B, Chancerel E, Lagane F, Capdeville G, Lesur I, Burlett R, Larter M, Lamy JB, Bartholomé J, Cochard H, Delzon S, Plomion C. 2015. Genetic architecture of cavitation resistance reveals that hydraulic safety is not linked to wood density in Maritime pine. (in prep)
- Le Provost G, Paiva J, Pot D, Brach J, Plomion C. 2003. Seasonal variation in transcript accumulation in wood-forming tissues of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) with emphasis on a cell wall glycine-rich protein. *Planta* 217, 820-830.
- Lecerteau E and Szmidt AE. 1999. properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Hered.* 82: 252-260.
- Lemoine B. 1975. Essai de synthèse biomathématique des aspects concurrentiels, écologiques, morphologiques et cycliques de la croissance du pin maritime dans les Landes de Gascogne. *Oecologia Plantarum*, 10, 2, 141-167.
- Lemoine B. 1979. Pin maritime et secheresses dans les landes de Gascogne. Croissances en circonférences. *Comptes rendus des seances.*
- Lepoittevin C, Harvengt L, Plomion C, Garnier-Géré P. 2012. Association mapping for growth, straightness and wood chemistry traits in the *Pinus pinaster* Aquitaine breeding population. *Tree Genetics & Genomes* 8, 113-126.
- Lesgourgues Y, Merzeau D, Cremière L, Baillères V. 1997. Conduites des boisements de Pin maritime sur le Plateau landais : itinéraires techniques, pistes pour le futur. In : 4^e colloque Association pour la Recherche sur la production forestière et le Bois en Région Aquitaine : De la gestion au développement durable. Bordeaux, pp. 207-222.
- Lesur I, Bechade A, Lalanne C, Klopp C, Noirot C, Leplé JC, Kremer A, Plomion C, Le Provost G. 2015b. A unigene set for European beech (*Fagus sylvatica* L.) and its use to decipher the molecular mechanisms involved in dormancy regulation. *Mol Ecol Res* (doi: 10.1111/1755-0998.12373)
- Lesur I, Le Provost G, Bento P, Da Silva C, , Leplé JC, Murat F, Ueno S, Bartholomé J, Lalanne C, Ehrenmann F, Noirot C, Burban C, Loustau ML, Léger V, Amselem J, Belser C, Quesneville H, Stierschneider M, Fluch S, Feldhahn L, Tarkka M, Herrmann S, Buscot F, Klopp C, Kremer A, Salse J, Aury JM, Plomion C. 2015a. The oak gene expression atlas: insights into Fagaceae genome evolution and the discovery of genes regulated during bud dormancy release. *BMC Genomics* 16:112
- Leuning R, Kelliher FM, Depury DGG, Schulze ED. 1995. Leaf Nitrogen, Photosynthesis, Conductance and Transpiration - Scaling from Leaves to Canopies. *Plant Cell and Environment* 18, 1183-1200.
- Levins R. 1969. Dormancy as an adaptive strategy. In: Woolhouse H.W. (ed), *Dormancy and survival*, Cambridge University Press, pp. 1-10.
- Li B, McKeand S, Weir R. 1999. Tree improvement and sustainable forestry - impact of two cycles of loblolly pine breeding in the USA. *Forest Genetics*, 6 229- 234.
- Li P, Adams WT. 1993. Genetic-Control of Bud Phenology in Pole-Size Trees and Seedlings of Coastal Douglas-Fir. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 23, 1043-1051.
- Li X, Wu HX, Southerton SG. 2010. Seasonal reorganization of the xylem transcriptome at different tree ages reveals novel insights into wood formation in *Pinus radiata*. *New Phytologist* 187, 764-776.
- Libby WJ, Palmberg-Lerche C. 2002. *Forest plantation productivity*. (Rome: FAO).
- Liepe K. 1993. Growth-chamber trial on frost hardiness and field trial on flushing of sessile oak (*Quercus petraea* Liebl). *Annals of forest science* 50 (Suppl 1) 208-214.
- Lindner M, Maroschek M, Netherer S, Kremer A, Barbati A, Garcia-Gonzalo J, Seidl R, Delzon S, Corona P, Kolström M. 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management* 259: 698-709.
- Lockhart JA. 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8: 264-275.

- Loustau D, Berbigier P, Roumagnac P, ArrudaPacheco C, David JS et al. 1996. Transpiration of a 64-year-old maritime pine stand in Portugal .1. Seasonal course of water flux through maritime pine. *Oecologia* 107: 33-42.
- Loustau D, Bosc A, Colin A, Ogée J, Davi H, François C, Dufrêne E, Déqué M, Cloppet E, Arrouays D. 2005. Modeling climate change effects on the potential production of French plains forests at the sub-regional level. *Tree Physiology* 25, 813-823.
- Lu B. 1974. Genetic recombination in *Coprinus*. IV. A kinetic study of the temperature effect on recombination frequency. *Genetics* 78, 661-677.
- Luquez V, Hall D, Albrechtsen BR, Karlsson J, Ingvarsson P, Jansson S. 2008. Natural phenological variation in aspen (*Populus tremula*): the SwAsp collection. *Tree Genetics et Genomes* 4, 279-292.
- MacKay J, Dean J, Piomion C, Bousquet J, Kole C. 2011. Transcriptomics. Genetics, genomics and breeding of conifers, 323-357.
- Makela A, Sievanen R, Lindner M, Lasch P. 2000. Application of volume growth and survival graphs in the evaluation of four process-based forest growth models. *Tree Physiology* 20, 347-355.
- Mäkelä A, Vanninen P, Ikonen VP. 1997. An application of process-based modeling to the development of branchiness in Scots pine. *Silva Fennica* 31: 369–380.
- Makela A. 1988. Performance Analysis of a Process-based Stand Growth Model Using Monte Carlo Techniques. *Scandinavian Journal of Forest Research* 3, 315-331.
- Mardis ER. 2011. A decade/'s perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470, 198-203.
- Marguerit E, Bouffier L, Chancerel E, Costa P, Lagane F et al. 2014. The genetics of water-use efficiency and its relation to growth in maritime pine. *Journal of Experimental Botany* 1.
- Mariette S, Chagné D, Lézier C, Pastuszka P, Raffin A, Plomion C, Kremer A. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86, 469-479.
- Martin B, Cossalter C. 1976. The Eucalypts of the Sunda Islands [Part 3, 4, 5]. *Bois et Forêts des Tropiques*, 3-20,22,24.
- Martinez O, Curnow R. 1992. Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 480-488.
- Matyas C. 1994. Modeling climate change effects with provenance test data. *Tree Physiology* 14, 797-804.
- Matyas C. 1996. Climatic adaptation of trees: rediscovering provenance tests. *Euphytica* 92, 45-54.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N 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.
- McKeand S, Li B, Amerson H. 1999. Genetic variation in fusiform rust resistance in loblolly pine across a wide geographic range. *Silvae genetica* 48, 255-260.
- McMillin CW. 1968. Morphological characteristics of loblolly pine wood as related to specific gravity, growth rate and distance from pith. *Wood Science and Technology* 2, 166-176.
- Mcmurtrie RE, Rook DA, Kelliher FM. 1990. Modeling the Yield of *Pinus-Radiata* on a Site Limited by Water and Nitrogen. *Forest Ecology and Management* 30, 381-413.
- MCPFE (Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe) 2003
- Megraw RA. 1985. Wood quality factors in loblolly pine. The influence of tree age, position in tree, and cultural practice on wood specific gravity, fiber length, and fibril angle. *Wood quality factors in loblolly pine. The influence of tree age, position in tree, and cultural practice on wood specific gravity, fiber length, and fibril angle.*, xii + 88pp.
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W. 2001. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology* 47, 239-274.
- Mencuccini M, Hölttä T, Sevanto S, Nikinmaa E. 2013. Concurrent measurements of change in the bark and xylem diameters of trees reveal a phloem-generated turgor signal. *New Phytologist* 198: 1143-54.
- Meredieu C, Perret S, Dreyfus P, Amaro A, Reed D, Soares P. 2003. Modeling dominant height growth: effect of stand density. IUFRO Workshop Reality, Models and Parameters Estimation organised by l'Institut Supérieur de

- Gestion de Lisbonne Sesimbra (Portugal, 2-5 juin 2002). In: Modelling forest systems (Amaro A., Reed D., Soares P., eds). CABI Publishing, Wallingford, UK, 111-121.
- Mezard C. 2006. Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* 34, 531-534.
- Milburn JA. 1996. Sap ascent in vascular plants: Challengers to the cohesion theory ignore the significance of immature xylem and the recycling of Munch water. *Annals of Botany* 78: 399-407.
- Minkinen K, Korhonen R, Savolainen I, Laine J. 2002. Carbon balance and radiative forcing of Finnish peatlands 1900-2100 - the impact of forestry drainage. *Global Change Biology* 8, 785-799.
- Mohren GMJ. 1987. Simulation of forest growth, applied to Douglas fir stands in the Netherlands. PhD Thesis, University of Wageningen, 184 p.
- Monclus R, Villar M, Barbaroux C, Bastien C, Fichot R, Delmotte F, Delay D, Petit J-M, Brechet C, Dreyer E. 2009. Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* × *Populus trichocarpa* F1 progeny. *Tree physiology* 29, 1329-1339.
- Monteith JL. 1965. Evaporation and environment. In G.E. Fogg (ed.). *Symposium of the Society for Experimental Biology, The State and Movement of Water in Living Organisms*. Academic Press, Inc., NY: 19: 205-234.
- Montes CS, Weber JC. 2009. Genetic variation in wood density and correlations with tree growth in *Prosopis africana* from Burkina Faso and Niger. *Annals of forest science* 66, 1-9.
- Montigny MK, MacLean DA. 2006. Triad forest management: Scenario analysis of forest zoning effects on timber and non-timber values in New Brunswick, Canada. *The Forestry Chronicle* 82, 496-511.
- Mora O, Banos V, Carnus J-M, Regolini M. 2012. Le massif des Landes de Gascogne à l'horizon 2050. Rapport de l'étude prospective, Conseil régional d'Aquitaine-INRA.
- Moreno-Gonzalez J. 1992. Genetic models to estimate additive and non-additive effects of marker-associated QTL using multiple regression techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 435-444.
- Morgenstern E. 1996. Geographic variation in forest trees.
- Morse AM, Peterson DG, Islam-Faridi MN, Smith KE, Magbanua Z, Garcia SA, Kubisiak TL, Amerson HV, Carlson JE, Nelson CD. 2009. Evolution of genome size and complexity in *Pinus*. *PLoS ONE* 4, e4332.
- Mott L, Groom L and Shaler S. 2002. Mechanical properties of individual southern pine fibers, Part I: comparison of early wood and late wood fibers with respect to tree height and juvenility, *Wood and Fiber Science*, 34, 2, pp. 221-237.
- Nabuurs GJ, Schelhaas MJ, Mohren GMJ, Field CB. 2003. Temporal evolution of the European forest sector carbon sink from 1950 to 1999. *Global Change Biology* 9, 152-160.
- Neale DB, Ingvarsson PK. 2008. Population, quantitative and comparative genomics of adaptation in forest trees. *Current opinion in plant biology* 11, 149-155.
- Neale DB, Kremer A. 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 12, 111-122.
- Nelson WB. 2005. *Applied life data analysis*: John Wiley & Sons.
- Nguyen-Queyrens A, Ferhi A, Loustau D, Guehl JM. 1998. Within-ring delta C-13 spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 28, 766-773.
- Nicholls J, Wright J. 1976. The effect of environmental factors on wood characteristics. 3. The influence of climate and site on young *Pinus radiata* material. *Canadian Journal of Forest Research* 6, 113-121.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology* 13, 1143-1155.
- O'Neill GA, Hamann A, Wang T. 2008. Accounting for population variation improves estimates of the impact of climate change on species' growth and distribution. *Journal of Applied Ecology* 45, 1040-1049.
- Oladi R, Pourtahmasi K, Eckstein D, Bräuning A. 2011. Seasonal dynamics of wood formation in Oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky) along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forest, Iran. *Trees* 25, 425-433.

- Olivas-García JM, Cregg BM, Hennessey TC. 2000. Genotypic variation in carbon isotope discrimination and gas exchange of ponderosa pine seedlings under two levels of water stress. *Canadian journal of forest research* 30, 1581-1590.
- Oliveira JM, Santarosa E, Pillar VD, Roig FA. 2009. Seasonal cambium activity in the subtropical rain forest tree *Araucaria angustifolia*. *Trees* 23, 107-115.
- O'Neill GA, Nigh GD, Wang T and Ott PK. 2007. Growth response functions improved by accounting for nonclimatic site effects. *Can. J. For. Res.* 37: 2724-2730.
- Ophir R, Pang XQ, Halaly T, Venkateswari J, Lavee S, Galbraith D, Or E. 2009. Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Molecular Biology* 71, 403-423.
- Oribe Y, Funada R, Kubo T. 2003. Relationships between cambial activity, cell differentiation and the localization of starch in storage tissues around the cambium in locally heated stems of *Abies sachalinensis* (Schmidt. Masters. *Trees* 17: 185-192.
- Paiva J, Garnier-Géré PH, Rodrigues JC, Alves A, Santos S, Graça J, Le Provost G, Chaumeil P, da Silva-Perez D, Bosc A, Fevereiro P, Plomion C. 2008. Plasticity of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) wood forming tissues during a growing season. *New Phytol* 179:1080-1094
- Paiva JA, Garcés M, Alves A, Garnier-Géré P, Rodrigues JC, Lalanne C, Porcon S, Le Provost G, da Silva Perez D, Brach J. 2008. Molecular and phenotypic profiling from the base to the crown in maritime pine wood-forming tissue. *New Phytologist* 178, 283-301.
- Pan Y, Birdsey RA, Fang J, Houghton R, Kauppi PE, Kurz WA, Phillips OL, Shvidenko A, Lewis SL, Canadell JG. 2011. A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science* 333, 988-993.
- Paquereau .1964. Flores et climats post-glaciaires en Gironde. *Actes Soc. Linn. Bordeaux*, t. 101, n°1, 157p., 4 fig., 16pl.
- Parmesan C, Yohe G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37-42.
- Parton WJ, Schimel DS, Cole CV, Ojima DS. 1987. Analysis of Factors Controlling Soil Organic-Matter Levels in Great-Plains Grasslands. *Soil Science Society of America Journal* 51, 1173-1179.
- Pavy N, Namroud M, Gagnon F, Isabel N, Bousquet J. 2012. The heterogeneous levels of linkage disequilibrium in white spruce genes and comparative analysis with other conifers. *Heredity* 108, 273-284.
- Peirce JL, Broman KW, Lu L, Williams RW. 2007. A simple method for combining genetic mapping data from multiple crosses and experimental designs. *PLoS ONE* 2, e1036.
- Penuelas J, Filella I. 2001. Phenology - Responses to a warming world. *Science* 294, 793-+.
- Peterson DL, Spanner MA, Running SW and Teuber KB. 1988. Relationship of Thematic Mapper Simulated data to leaf area index of temperate coniferous forests. *Remote Sensing Environ.*, 22: 323-341.
- Petit R. 1988. Ressources genetiques du pin maritime: apport des marqueurs enzymatiques: Centre National de la Recherche Scientifique, Génétique et Physiologie du Développement des Plantes, Laboratoire d'Amélioration des Arbres Forestiers, Station de Recherche Forestière.
- Petit RJ and Hampe A. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 37: 187-214.
- Pigliucci M, Schlichting CD, Jones CS, Schwenk K. 1996. Developmental reaction norms: the interactions among allometry, ontogeny and plasticity. *Plant Species Biology* 11, 69-85.
- Plomion C, Bartholomé J, Lesur I, Boury C1, Lagrault H, Ehrenmann F, Bouffier L, Gion JM, Grivet D, Rodríguez-Quilón I, de Miguel M, Cervera M, Bagnoli F, Isik F, Vendramin GG, Gonzalez-Martinez SC. 2014. Single nucleotide polymorphism discovery and high-density SNP assay development for genetic analysis in maritime pine. *Molecular Ecology Resources* (in prep)
- Plomion C, Le Provost G, Stokes A. 2001. Wood formation in trees. *Plant Physiology* 127, 1513-1523.
- Plomion C, O'Malley DM. 1996. Recombination rate differences for pollen parents and seed parents in *Pinus pinaster*. *Heredity* 77, 341-350.

- Polge H. 1966. Etablissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographie d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants. Applications dans les domaines technologique et physiologique. Thèse Docteur ès Sciences, Faculté des Sciences de Nancy Ann. Sci. forest. 23, (1).
- Pot D, Chantre G, Rozenberg P, Rodrigues JC, Jones GL, Pereira H, Hannrup B, Cahalan C, Plomion C. 2002. Genetic control of pulp and timber properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Annals of Forest Science* 59, 563-575.
- Pot D, Rodrigues J-C, Rozenberg P, Chantre G, Tibbits J, Cahalan C, Pichavant F, Plomion C. 2006. QTLs and candidate genes for wood properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Tree Genetics & Genomes* 2, 10-24.
- Potvin C, Tousignant D. 1996. Evolutionary consequences of simulated global change: genetic adaptation or adaptive phenotypic plasticity. *Oecologia* 108, 683-693.
- Pretzsch H, Biber P, Ďurský J. 2002. The single tree-based stand simulator SILVA: construction, application and evaluation. *Forest Ecology and Management* 162: 3–21.
- Price AH. 2006. Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends in plant science* 11, 213-216.
- Pro Silva. 1999. Brochure PRO SILVA. [online] URL: <http://www.prosilvaeurope.org/docs/doc153.pdf> Richardson D.M. (ed.). 1998. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press.
- Raffin A. 2005. Génétique et pin maritime dans le Sud-Est de la France.
- Rathgeber CBK, Rossi S, Bontemps JD. 2011 Cambial activity related to tree size in a mature silver-fir plantation. *Annals of Botany* 108: 429–438.
- Rehfeldt GE, Wykoff WR, Ying CC. 2001. Physiologic plasticity, evolution, and impacts of a changing climate on *Pinus contorta*. *Climatic Change* 50, 355-376.
- Rehfeldt GE, Ying CC, Spittlehouse DL, Hamilton Jr DA. 1999. Genetic responses to climate in *Pinus contorta*: niche breadth, climate change, and reforestation. *Ecological Monographs* 69, 375-407.
- Resch T. 1974. Essai de distinction morphologique des races majeures de *Pinus pinaster* Ait. *Ann. Rech. For. Maroc* 14, 91-102.
- Richards JH, Larson PR. 1981. Morphology and Development of *Populus-Deltoides* Branches in Different Environments. *Botanical Gazette* 142, 382-393.
- Richardson DM. 1998. Forestry trees as invasive aliens. *Conservation biology* 12, 18-26.
- Righi D .1977. Genèse et évolution des podzols et des sols hydromorphes du Médoc, thèse d'Etat, Université de Poitiers, 150p.
- Ritland K, Krutovsky KV, Tsumura Y, Pelgas B, Isabel N, Bousquet J. 2011. Genetic mapping in conifers. *Genetics, genomics and breeding of conifers*, 196-238.
- Ritter B, Geleyn J-F. 1992. A comprehensive radiation scheme for numerical weather prediction models with potential applications in climate simulations. *Monthly Weather Review* 120, 303-325.
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F. 1990. Estimation of Recombination Frequencies and Construction of Rflp Linkage Maps in Plants from Crosses between Heterozygous Parents. *Genetics* 125, 645-654.
- Robertson E, Jozsa L. 1988. Climatic reconstruction from tree rings at Banff. *Canadian Journal of Forest Research* 18, 888-900.
- Rodolphe F, Lefort M. 1993. A multi-marker model for detecting chromosomal segments displaying QTL activity. *Genetics* 134, 1277-1288.
- Rohde A, Howe G, Olsen J, Moritz T, Van Montagu M, Junttila O, Boerjan W. 2000. Molecular aspects of bud dormancy in trees. *Molecular biology of woody plants: Springer*, 89-134.
- Rohde A, Storme V, Jorge V, Gaudet M, Vitacolonna N, Fabbri F, Ruttink T, Zaina G, Marron N, Dillen S, Steenackers M, Sabatti M, Morgante M, Boerjan W, Bastien C. 2011. Bud set in poplar - genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytologist* 189, 106-121.
- Ronin Y, Mester D, Minkov D, Belotserkovski R, Jackson B, Schnable P, Aluru S, Korol A. 2012. Two-phase analysis in consensus genetic mapping. *G3: Genes | Genomes | Genetics* 2, 537-549.

- Rose A, Baillie D. 1979. The effect of temperature and parental age on recombination and nondisjunction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 92, 409-418.
- Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T, Morin H, Saracino A, Motta R, Borghetti M. 2006. Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. *New Phytologist* 170, 301-310.
- Rossi S, Deslauriers A, Grigar J, Seo JW, Rathgeber CBK et al. 2008. Critical temperatures for xylogenesis in conifers of cold climates. *Global Ecology and Biogeography* 17: 696-707.
- Rozenberg P, Cahalan C. 1997. Spruce and wood quality: Genetic aspects.(A review). *Silvae Genetica* 46, 270-279.
- Running SW, Coughlan JC. 1988. A General-Model of Forest Ecosystem Processes for Regional Applications .1. Hydrologic Balance, Canopy Gas-Exchange and Primary Production Processes. *Ecological Modelling* 42, 125-154.
- Running SW, Hunt RE. 1993. Generalization of a forest ecosystem process model for other biomes, BIOME-BGC, and an application for global-scale models. In: *Scaling Physiologic Processes: Leaf to Globe* (J.R. Ehleringer, C.B. Field, eds). Academic Press, San Diego, pp. 141–158.
- Ruttink T, Arend M, Morreel K, Storme V, Rombauts S, Fromm J, Bhalerao RP, Boerjan W, Rohde A. 2007. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19, 2370-2390.
- Sabate S, Gracia CA, Sanchez A. 2002. Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. *Forest Ecology and Management* 162: 23-37.
- Salvi S, Tuberosa R. 2007. Cloning QTLs in plants. *Genomics-assisted crop improvement*: Springer, 207-225.
- Sands PJ. 1995. Modeling Canopy Production .2. From Single-Leaf Photosynthetic Parameters to Daily Canopy Photosynthesis. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 603-614.
- Sands R, Clarke A. 1977. Response of radiata pine to salt stress. I. Water relations, osmotic adjustment and salt uptake. *Functional Plant Biology* 4: 637-646.
- Sansaloni CP, Petroli CD, Carling J, Hudson CJ, Steane DA, Myburg AA, Grattapaglia D, Vaillancourt RE, Kilian A. 2010. A high-density Diversity Arrays Technology (DART) microarray for genome-wide genotyping in *Eucalyptus*. *Plant Methods* 6, 16.
- Santos-del-Blanco L, Climent J, González-Martínez S, Pannell J. 2012. Genetic differentiation for size at first reproduction through male versus female functions in the widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Annals of botany* 110, 1449-1460.
- Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knürr T. 2007. Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 595-619.
- Saxe H, Cannell MGR, Johnsen B, Ryan MG, Vourlitis G. 2001. Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist* 149, 369-399.
- Schlarbaum SE, Bagley WT. 1981. Intraspecific Genetic-Variation of *Quercus-Rubra* L, Northern Red Oak. *Silvae Genetica* 30, 50-56.
- Schlichting CD, Smith H. 2002. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology* 16, 189-211.
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5, 63-69.
- Schober R. 1975. Ertragstabeln wichtiger Baumarten bei vershiedener Durchforstung . J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt, 154 p.
- Schulze ED. 1986. Carbon-Dioxide and Water-Vapor Exchange in Response to Drought in the Atmosphere and in the Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 37, 247-274.
- Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Barreneche T, Bertocchi E, Plomion C, Kremer A. 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1648-1659.
- Sellers PJ, Dickinson RE, Randall DA, Betts AK, Hall FG, Berry JA, Collatz GJ, Denning AS, Mooney HA, Nobre CA, Sato N, Field CB, Henderson-Sellers A. 1997. Modeling the exchanges of energy, water, and carbon between continents and the atmosphere. *Science* 275, 502-509.

- Sevanto S, Hölttä T, Holbrook NM. 2011 Effects of the hydraulic coupling between xylem and phloem on diurnal phloem diameter variation. *Plant, Cell et Environment* 34: 690-703.
- Sewell M, Bassoni D, Megraw R, Wheeler N, Neale D. 2000. Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 1273-1281.
- Sewell M, Davis M, Tuskan G, Wheeler N, Elam C, Bassoni D, Neale D. 2002. Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). II. Chemical wood properties. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 214-222.
- Sewell MM, Sherman BK, Neale DB. 1999. A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. *Genetics* 151, 321-330.
- Seymour RS, Hunter ML. 1999. Principles of ecological forestry. Pages 22–61 in M. Hunter, editor. *Maintaining biodiversity in forested ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sievanen R, Burk TE. 1993. Adjusting a Process-Based Growth-Model for Varying Site Conditions through Parameter-Estimation. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 23, 1837-1851.
- Simonneau T, Habib R, Goutouly JP, Huguet JG. 1993. Diurnal Changes in Stem Diameter Depend Upon Variations in Water-Content - Direct Evidence in Peach-Trees. *Journal of Experimental Botany* 44, 615-621.
- Soller M, Beckmann J. 1990. Marker-based mapping of quantitative trait loci using replicated progenies. *Theoretical and Applied Genetics* 80, 205-208.
- Solomon DS, Hosmer RA, Hayslett HT Jr. 1986. A two-stage matrix model for predicting growth of forest stands in the Northeast. *Canadian Journal of Forest Research*.16: 521–528.
- Sparks TH, Menzel A. 2002. Observed changes in seasons: an overview. *International Journal of Climatology* 22, 1715-1725.
- Speidel G. 1969. Intensity classes in forest management. Comments on the discussion paper of K. Möhring in issue 38/1969. *Allgemeine Forst Zeitschrift* 24,774–775.
- Stage AR. 1973. Prognosis model for stand development. U.S. Forest. Service. Research. Paper. INT-137.
- Stam P. 1993. Construction of Integrated Genetic-Linkage Maps by Means of a New Computer Package - Joinmap. *Plant Journal* 3, 739-744.
- Steiner K. 1979. Variation in bud-burst timing among populations of interior Douglas-fir. *Silvae Genet* 28, 76-79.
- Steppe K, Cochard H, Lacoite A, Ameglio T. 2012. Could rapid diameter changes be facilitated by a variable hydraulic conductance? *Plant Cell and Environment* 35: 150-7.
- Steppe K, De Pauw DJW, Lemeur R, Vanrolleghem PA. 2006. A mathematical model linking tree sap flow dynamics to daily stem diameter fluctuations and radial stem growth. *Tree Physiology* 26: 257-73.
- Stocker T, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM. 2014. *Climate change 2013: The physical science basis*: Cambridge University Press Cambridge, UK, and New York.
- Sturtevant AH. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of experimental zoology* 14, 43-59.
- Sweet G, Thulin I. 1962. PROVENANCE OF PINUS PINASTER AIT.-A FIVE-YEAR PROGRESS REPORT ON A TRIAL AT WOODHILL, NEW ZEALAND. *New Zealand Journal of Forestry* 8.
- Tan YD, Fornage M. 2008. Mapping functions. *Genetica* 133, 235-246.
- Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 3-8.
- Tardif J, Brisson J, Bergeron Y. 2001. Dendroclimatic analysis of *Acer saccharum*, *Fagus grandifolia*, and *Tsuga canadensis* from an old-growth forest, southwestern Quebec. *Canadian Journal of Forest Research* 31, 1491-1501.
- Thomson AM, Parker WH. 2008. Boreal forest provenance tests used to predict optimal growth and response to climate change. 1. Jack pine. *Canadian Journal of Forest Research* 38, 157-170.
- Thomson AM, Riddell CL, Parker WH. 2009. Boreal forest provenance tests used to predict optimal growth and response to climate change: 2. Black spruce. *Canadian journal of forest research* 39, 143-153.
- Tikkanen OP, Julkunen-Tiitto R. 2003. Phenological variation as protection against defoliating insects: the case of *Quercus robur* and *Operophtera brumata*. *Oecologia* 136, 244-251.

- Tognetti R, Cherubini P, Innes JL. 2000. Comparative stem-growth rates of Mediterranean trees under background and naturally enhanced ambient CO₂ concentrations. *New Phytologist* 146, 59-74.
- Towe AM, Stadler D. 1964. Effects of temperature on crossing over in *Neurospora*. *Genetics* 49, 577.
- Trichet P, Jolivet C, Arrouays D, Loustau D, Bert D, Ranger J. 1999. Le maintien de la fertilité des sols forestiers landais dans le cadre de la sylviculture intensive du pin maritime.
- Tsarouhas V, Gullberg U, Lagercrantz U. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling timing of bud flush in *Salix*. *Hereditas* 138, 172-178.
- Tulsieram LK, Glaubitz JC, Kiss G, Carlson JE. 1992. Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. *Nature Biotechnology* 10, 686-690.
- Turcotte A, Morin H, Krause C, Deslauriers A, Thibeault-Martel M. 2009. The timing of spring rehydration and its relation with the onset of wood formation in black spruce. *Agricultural and Forest Meteorology* 149: 1403–1409.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroove S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leple JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryabov D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. et Gray). *Science* 313, 1596-1604.
- Ukrainetz NK, O'Neill GA, Jaquish B. 2011. Comparison of fixed and focal point seed transfer systems for reforestation and assisted migration: a case study for interior spruce in British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* 41, 1452-1464.
- Valentine HT, Gregoire TG, Burkhart HE, Hollinger DY. 1997. A stand-level model of carbon allocation and growth, calibrated for loblolly pine. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 27, 817-830.
- Van Ooijen J. 2006. JoinMap 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands.
- Vanclay JK. 1994. Modelling forest growth and yield, applications to mixed tropical forests. CAB International. Wallingford 312 p.
- Verhaegen D, Plomion C, Gion J-M, Poitel M, Costa P, Kremer A. 1997. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. *Theoretical and Applied Genetics* 95, 597-608.
- Vieira J, Rossi S, Campelo F, Freitas H, Nabais C. 2013. Seasonal and daily cycles of stem radial variation of *Pinus pinaster* in a drought-prone environment. *Agricultural and Forest Meteorology* 180: 173-181.
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A. 2009. Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research* 39, 1259-1269.
- vonWuehlisch G, Krusche D, Muhs HJ. 1995. Variation in temperature sum requirement for flushing of beech provenances. *Silvae Genetica* 44, 343-346.
- Voorrips RE. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTL. *Journal of Heredity* 93, 77-78.
- Waddington C, Robertson E. 1966. Selection for developmental canalisation. *Genet. Res* 7, 303-312.
- Wagner GP, Booth G, Bagheri-Chaichian H. 1997. A population genetic theory of canalization. *Evolution*, 329-347.
- Walker, L.R. 1999. Patterns and processes in primary successions. *Ecosystems of Disturbed Ground* (ed. L.R. Walker), pp. 585–610. *Ecosystems of the World* 16, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389-395.
- Wang YP, Leuning R. 1998. A two-leaf model for canopy conductance, photosynthesis and partitioning of available energy I: Model description and comparison with a multi-layered model. *Agricultural and Forest Meteorology* 91, 89-111.
- Welcker C, Sadok W, Dignat G, Renault M, Salvi S, Charcosset A, Tardieu F. 2011. A common genetic determinism for sensitivities to soil water deficit and evaporative demand: meta-analysis of quantitative trait loci and introgression lines of maize. *Plant physiology* 157, 718-729.
- White A, Cannell MGR, Friend AD. 2000. CO₂ stabilization, climate change and the terrestrial carbon sink. *Global Change Biology* 6, 817-833.
- Whitman DW, Agrawal AA. 2009. What is phenotypic plasticity and why is it important. *Phenotypic plasticity of insects* 10, 1-63.
- Williams M, Rastetter EB, Fernandes DN, Goulden ML, Wofsy SC, Shaver GR, Melillo JM, Munger JW, Fan SM, Nadelhoffer KJ. 1996. Modelling the soil-plant-atmosphere continuum in a *Quercus-Acer* stand at Harvard forest: The regulation of stomatal conductance by light, nitrogen and soil/plant hydraulic properties. *Plant Cell and Environment* 19, 911-927.
- Wimmer R, Downes G, Evans R, Rasmussen G, French J. 2002. Direct effects of wood characteristics on pulp and handsheet properties of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung* 56, 244-252.
- Wimmer R, Lucas B, Oliver W, Tsui T. 1997. Longitudinal hardness and Young's modulus of spruce tracheid secondary walls using nanoindentation technique. *Wood Science and Technology* 31, 131-141.
- Worrall J. 1975. Provenance and clonal variation in phenology and wood properties of Norway spruce. *Silvae genet* 24, 2-5.
- Worrall J. 1983. Temperature - Bud-Burst Relationships in Amabilis and Subalpine Fir Provenance Tests Replicated at Different Elevations. *Silvae Genetica* 32, 203-209.
- Wright J. 2012. *Introduction to forest genetics*: Elsevier.
- Wu JX, Jenkins JN, McCarty JC, Lou XY. 2011. Comparisons of four approximation algorithms for large-scale linkage map construction. *Theoretical and Applied Genetics* 123, 649-655.
- Wu R, Ma C-x, Chang M, Littell RC, Wu SS, Yin T, Huang M, Wang M, Casella G. 2002. A logistic mixture model for characterizing genetic determinants causing differentiation in growth trajectories. *Genetical research* 79, 235-245.
- Würschum T. 2012. Mapping QTL for agronomic traits in breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics* 125, 201-210.
- Ye ZH. 2002. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 183-202.
- Yeh TF, Goldfarb B, Chang HM, Peszlen I, Braun JL, Kadla JF. 2005. Comparison of morphological and chemical properties between juvenile wood and compression wood of loblolly pine. *Holzforschung* 59, 669-674.
- Zeng ZB. 1994. Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136, 1457-1468.
- Zhao HY, Speed TP. 1996. On genetic map functions. *Genetics* 142, 1369-1377.
- Zhuchenko A, Korol A. 1983. Ecological aspects of the recombination problem. *Theoretical and Applied Genetics* 64, 177-185.
- Zimmermann MH, Pospíšilová, J. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. *Biologia Plantarum* 26: 165-165.
- Zobel B, Jett J. 1995. *Genetics of wood production*, Springer series in Wood Science. Springer-Verlag, NY. 337p.
- Zobel DB, Riley L, Kitzmiller JH, Sniezko RA. 2001 Variation in water relations characteristics of terminal shoots of Port-Orford-cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*. seedlings. *Tree Physiol* 21: 743-749.
- Zou W, Zeng ZB. 2008. Statistical Methods for Mapping Multiple QTL. *International Journal of Plant Genomics* 2008.
- Zou W, Zeng Z-B. 2009. Multiple interval mapping for gene expression QTL analysis. *Genetica* 137, 125-134.
- Zweifel R, Drew DM, Schweingruber F, Downes GM. 2014. Xylem as the main origin of stem radius changes in *Eucalyptus*. *Functional Plant Biology* 41: 520-534.

- Zweifel R, Item H, Hasler R. 2000. Stem radius changes and their relation to stored water in stems of young Norway spruce trees. *Trees* 15: 50–57.
- Zweifel R, Item H, Hasler R. 2001. Link between diurnal stem radius changes and tree water relations. *Tree Physiology* 21: 869–877.
- Zweifel R, Steppe K, Sterck FJ. 2007. Stomatal regulation by microclimate and tree water relations: interpreting ecophysiological field data with a hydraulic plant model. *Journal of Experimental Botany* 58: 2113-2131.
- Zweifel R, Zimmermann L, Newbery D. 2005. Modeling tree water deficit from microclimate: an approach to quantifying drought stress. *Tree physiology* 25, 147-156.
- Zweifel R, Zimmermann L, Zeugin F, Newbery DM. 2006. Intra-annual radial growth and water relations of trees: implications towards a growth mechanism. *Journal of Experimental Botany* 57: 1445–1459.

IX Annexes: publications et communications

Publications

Annexe 1: Daily stem radius fluctuations in maritime pine: genetic variability between full-sibs and environmental effects. Hélène Lagraulet, Didier Bert, Alexandre Bosc, Régis Burlett, Yech'an Laizet, Jérôme Bartholomé, André Granier, Hervé Cochard, David Frank, Patrick Fonti, Christophe Plomion, Jean-Marc Gion (*En révision à Annals of Forest Science*).

Annexe 2: High-density SNP assay development for genetic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*). Plomion C, Bartholomé J, Lesur I, Boury C, Rodríguez-Quilón I, Lagraulet H, Ehrenmann F, Bouffier L, Gion JM, Grivet D, de Miguel M, de María N, Cervera M, Bagnoli F, Isik, Vendramin GG, González-Martínez SC (*En révision à Molecular Ecology Resources*).

Communications

Annexe 3: Genetic architecture of phenotypic plasticity: wood formation as a study case. Hélène Lagraulet, Emilie Chancerel, Frédéric Lagane, Laurent Bouffier, Christophe Boury, Elisa Marguerit, Philippe Rozenberg, Jean-Marc Gion, Christophe Plomion (*IUFRO Tree Biotechnology Conference 2013*).

Annexe 1

High-density SNP assay development for genetic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*)

(In revision in Molecular Ecology Resources)

Plomion C^{1,2} †, Bartholome J^{1,2}, Lesur I^{1,3}, Boury C^{1,2}, Rodriguez-Quilon I⁴, Lagraulet H^{1,2}, Ehrenmann F^{1,2}, Bouffier L^{1,2}, Gion JM^{1,5}, Grivet D⁴, de Miguel M^{1,2}, de Maria N⁴, Cervera MT⁴, Bagnoli F⁶, Isik F⁷, Vendramin GG⁶, Gonzalez-Martinez SC⁴

¹ INRA, UMR1202 BIOGECO, F-33610 Cestas, France

² Univ. Bordeaux, BIOGECO, UMR 1202, F-33400 Talence, France

³ HelixVenture, F-33700 Merignac, France

⁴ INIA, Forest Research Centre, E-28040 Madrid, Spain

⁵ CIRAD, UMR AGAP, F-33612 Cestas, France

⁶ Institute of Biosciences and Bioresources, National Research Council, Sesto Fiorentino (FI), Italy

⁷ North Carolina State University, Department of Forestry and Environmental Resources, Raleigh, NC, USA

2
3 **High-density SNP assay development for genetic analysis**
4 **in maritime pine (*Pinus pinaster*)**

5
6 Plomion C^{1,2†}, Bartholomé J^{1,2}, Lesur I^{1,3}, Boury C^{1,2}, Rodríguez-Quilón I⁴, Lagrault H^{1,2},
7 Ehrenmann F^{1,2}, Bouffier L^{1,2}, Gion JM^{1,5}, Grivet D⁴, de María M^{1,2}, de María N⁴, Cervera
8 MT⁴, Bagnoli F⁶, Isik F⁷, Vendramin GG⁶, González-Martínez SC⁴

9
10 ¹INRA, UMR1202 BIOGECO, F-33610 Cestas, France

11 ²Univ. Bordeaux, BIOGECO, UMR 1202, F-33400 Talence, France

12 ³Helix Venture, F-33700 Mérignac, France

13 ⁴INIA, Forest Research Centre, E-28040 Madrid, Spain

14 ⁵CIRAD, UMR AGAP, F-33612 Cestas, France

15 ⁶Institute of Biosciences and Bioresources, National Research Council, Sesto Fiorentino (FI),
16 Italy

17 ⁷North Carolina State University, Department of Forestry and Environmental Resources,

18 Raleigh, NC, USA

19
20 **Keywords:** Maritime pine, SNP, linkage mapping, population genetics

21 [†]Corresponding author: Christophe PLOMION

22 INRA, UMR1202 BIOGECO, F-33610 Cestas, France

23 e-mail: plomion@pierrroton.inra.fr

24
25 **Running title:** SNP discovery and validation in maritime pine

27 **Abstract**

28
29 Maritime pine provides essential ecosystem services in the south-western Mediterranean
30 basin, where it covers around 4 million ha. Its scattered distribution over a range of
31 environmental conditions makes it an ideal forest tree species for studies of local adaptation
32 and evolutionary responses to climatic change. Highly-multiplexed single-nucleotide
33 polymorphism (SNP) genotyping arrays are increasingly used to study genetic variation in
34 living organisms and for practical applications in plant and animal breeding and genetic
35 resource conservation. We developed a 9k Illumina Infinium SNP array and genotyped
36 maritime pine trees from i) a three-generation inbred (F2) pedigree, ii) the French breeding
37 population, and iii) natural populations from Portugal and the French Atlantic coast. A large
38 proportion of the exploitable SNPs (2,052 / 8,410, i.e. 24.4%) segregated in the mapping
39 population and could be mapped, providing the densest ever gene-based linkage map for this
40 species. Based on 5,016 loci, natural and breeding populations from the French gene pool
41 exhibited similar level of genetic diversity. Population genetics and structure analyses based
42 on 3,981 SNP markers common to the Portuguese and French gene pools revealed high levels
43 of differentiation, leading to the identification of a set of highly differentiated SNPs that could
44 be used for seed provenance certification. Finally, we discuss how the validated SNPs could
45 facilitate the identification of ecologically and economically relevant genetic factors in this
46 species, improving our understanding of the demography and selective forces shaping its
47 natural genetic diversity, and providing support for new breeding strategies.

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50 **Introduction**

51
52 Maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae) is a long-lived wind-pollinated forest tree
53 species native to the western part of the Mediterranean Basin. Its natural range extends from
54 northern Morocco in the south to French Brittany in the north, and from Portugal in the west
55 to Italy in the east (<http://www.euforgen.org/distribution-maps/>). It is found in various
56 ecological situations, from sea level to an altitude of 2,100 m in the High Atlas (Morocco),
57 from regions characterised by heavy annual rainfall in a atlantic climate to dry regions in the
58 semi-arid Mediterranean climate, and from calcareous to acidic soils (Alía and Martín, 2003).
59 Its scattered distribution has resulted in local adaptations and high levels of genetic
60 differentiation for adaptive traits across its natural range (González-Martínez *et al.* 2002,
61 Santos-del-Blanco *et al.* 2012, Lamy *et al.* 2011, 2014). Considerable genetic differentiation
62 between ecotypes has been reported for various neutral molecular markers, providing clear
63 evidence for a geographic structure of genetic diversity in this species (Bucci *et al.* 2007,
64 Santos-del-Blanco *et al.* 2012, Jaramillo-Correa *et al.* 2010, 2015).
65
66 This fast-growing tree has been widely planted in systematic reforestation programs since the
67 19th century, to secure coastal (along the Atlantic) and inland (Castilian plateau) sand dune
68 areas, to drain marshes and to create new forests for resin production. Over the last 50 years,
69 maritime pine has been commercially exploited as a timber resource for the forestry industry
70 (sawmills, wood panels, pulp and paper). In recent years, it has also been used as a source of
71 chemicals for the bio-industry (Rohdewald 2002, Touriño *et al.* 2005, Jorge *et al.* 2002), as
72 bioactive phenolic compounds can be extracted from its bark. There are now 4.2 million ha
73 under maritime pine within its natural range and 200,000 ha outside it (mostly in Australia)
74 (Bouffier *et al.* 2013). The breeding of maritime pine began in the 1960s in southwestern

75 France, after several species and provenance trials had shown that the local ecotype was the
76 best adapted and fastest growing tree in the Aquitaine soil and climatic conditions (Illy 1966,
77 Harfouche 1995). This programme has now reached its third generation, and is one of the
78 most advanced conifer breeding programmes in the world (Mullin *et al.* 2011).
79
80 Maritime pine has also been adopted by the forest tree genetics research community as a key
81 model species to study genetic variation or linked mutations underlying phenotypic
82 variability, particularly those selected by the environment and involved in local adaptation
83 (reviewed by González-Martínez *et al.* 2011). It is now hoped that the discovery of
84 polymorphisms causing changes in gene expression and/or amino-acid sequences will lead to
85 innovations in genetic resource management, for both breeding (Isik 2014) and conservation
86 strategies (Ouborg *et al.* 2010). Such discoveries should also lead to changes in silviculture
87 practices to take into account the evolutionary processes inferred from neutral and selected
88 markers (Lefèvre *et al.* 2014). Major efforts have been devoted to the sequencing and
89 assembly of the maritime pine transcriptome (Canales *et al.* 2014), for studies of the
90 molecular basis of the phenotypic response to biotic and abiotic constraints (e.g. Le Provost *et*
91 *al.* 2013). Moreover, since the pioneering work of Lepoittevin *et al.* (2010), describing the
92 design of the first multiplex single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assay in
93 maritime pine, medium-scale SNP-arrays have been developed (Supplemental Tables 1 and
94 2). These assays have made it possible to characterise hundreds of trees, at hundreds of loci,
95 for various applications: nucleotide diversity analysis (Plomion *et al.* 2014), QTL detection
96 (de Miguel *et al.* 2014), association mapping (Lepoittevin *et al.* 2012, Budde *et al.* 2014),
97 environmental association (Jaramillo-Correa *et al.* 2015) and linkage map construction
98 (Chancerel *et al.* 2013).
99

100 Given the high throughput and reliability of the Infinium platform from Illumina (e.g.
101 Bartholomé *et al.* 2015 for eucalyptus, Pavy *et al.* 2013 for spruce), we used this platform to
102 design a customised genotyping array for maritime pine, including 4,712 SNPs from the
103 studies cited above and 4,237 SNPs newly identified from RNA-seq data and new amplicon
104 resequencing. The resulting 9k SNP array is the largest genotyping chip ever produced for this
105 species with 7,252 workable SNPs in at least one of the four tested populations. We assessed
106 the suitability of this array for linkage mapping, identification of seed sources (Portugal vs.
107 French Atlantic coast) and comparison between natural and breeding populations (within the
108 French Atlantic gene pool). Finally, we discuss the utility of this SNP array for exploring
109 genetic diversity and its contribution to phenotypic variation, genetic inferences about
110 historical demographic events, the past action of natural selection and adaptive evolution, and
111 the implementation of novel tree breeding strategies.

113 **Materials and methods**

115 *Design of an Illumina Infinium array for maritime pine*

116 We designed a 9k Illumina Infinium SNP array for maritime pine, including the two subsets
117 of SNPs described below.

119 *Previously available SNPs*

120 Over the past five years, several studies have reported the discovery of SNP markers in
121 maritime pine (see Supplemental Tables 1 and 2). We selected a total of 4,997 SNPs from
122 assays based on VeraCode, GoldenGate or Infinium Illumina technologies (Illumina, San
123 Diego, CA, USA) and incorporated them into the same Infinium genotyping array. Some SNP
124 assays had been used on a number of occasions (270 SNPs were common to at least two

125 studies), whereas others were developed specifically for one study, as shown in Supplemental
126 Figure 1. SNP redundancy was checked by aligning flanking sequences with the maritime
127 pine UniGene (Canales *et al.* 2014: http://www.scbi.uma.es/sustainpinedb/home_page).
128 Alignments were performed by carrying out BlastN searches in the Blastall V2.2.26 suite (e-
129 value = 10^{-5}). We retained the best aligned contig (in terms of E-value and % of identity) for
130 each sequence and the position of the SNP was retrieved from that contig. When a redundant
131 SNP was associated with different dbSNP accessions, we retained the accession with the
132 longest flanking sequence. Overall, we retained 4,712 different SNPs in this first subset.

134 *Newly discovered SNPs*

135 This second subset comprised SNPs obtained by the random screening of EST data or
136 specifically detected in candidate gene sequences.

138 *Newly discovered SNPs from 454 sequence reads*

139 A flowchart describing the steps involved in the identification of SNPs from 454 sequence
140 data is shown in Figure 1. Three genotypes involved as progenitors of interprovenance
141 hybrids in the framework of the maritime pine breeding programme (accessions 110-4019-1
142 from Corsica (C), 0284-2 from Landes (L) and 112-4-1 (M) from Morocco) were used. A
143 composite cDNA library was constructed with the SMART PCR cDNA synthesis kit
144 (Clontech, Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA) for each tree. The C and M libraries
145 contained equal proportions of cDNAs from differentiating xylem, swelling buds and young
146 needles, whereas the L library consisted of equal proportions of cDNAs from differentiating
147 xylem, swelling and quiescent buds, and young and mature needles. Pyrosequencing (454
148 Titanium, Roche, Branford, CT, USA) was performed with the Roche-454 Genome
149 Sequencing platform (FLX Titanium technology). Sequences (available under accession

150 numbers SRX031589, SRX208012 and SRX031592 from the NCBI short-read archive) were
 151 cleaned with the Pyrocleaner tool (Mariette *et al.* 2011), which removes particularly short
 152 (<150 bp) and long reads (>600 bp), reads with a percentage of Ns (ambiguous base calls)
 153 greater than 2%, low-complexity regions, and duplicated reads. For each library, the SNPs
 154 were identified by aligning each set of sequences against the 198,425 contigs of the second
 155 maritime pine UniGene (PineV2) established by Chancerel *et al.* (2013). Alignments were
 156 performed with the CLC Genomics Workbench Reference Mapping function of CLC
 157 Genomics Workbench V6.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark), with the default parameters. SNPs
 158 were then detected with the neighbourhood quality standard algorithm (NQS) and the
 159 following parameters: minimum coverage = 6, minimum central base quality = 20, minimum
 160 neighbourhood quality over a window length of 11 nucleotides = 15, maximum gap and
 161 mismatch count = 2 and minimum allele frequency = 20%.

162

163 *Newly discovered SNPs from candidate genes*

164 Grivet *et al.* (2015) obtained 105 *in vitro* SNPs from two full-length candidate genes with
 165 functions relating to phenology (*coll* and *gia*) and 64 amplicons sequenced as part of the
 166 CRIEC (Comparative Re-sequencing in European Conifers) project, an Evoltree
 167 (<http://www.evoltree.eu>) initiative. An additional set of *in silico* SNPs was then obtained from
 168 281 candidate genes with functions relating to abiotic and biotic (plant defence) stress
 169 responses in forest trees selected from the following sources: i) 66 genes from published
 170 (Perdiguero *et al.* 2013) and unpublished maritime pine sequences available from GenBank,
 171 ii) 149 genes from sequencing studies in other conifers (e.g. Wachowiak *et al.* 2009, Kujala
 172 and Savolainen 2012), iii) 53 transcripts displaying differential expression in the presence and
 173 absence of pine wood nematode infection (Santos *et al.* 2013), iv) 10 genes associated with
 174 adventitious shoot induction and plant development in pines (Alonso *et al.* 2007, Ordás *et al.*

175 unpublished for *knox* genes), and v) 3 genes potentially involved in cavitation resistance in
 176 beech (Lalagüe *et al.* 2014). These sequences were blasted (BlastN, e-value = 10⁻⁵) against the
 177 maritime pine UniGene to retrieve the best matching contig and the SNP flanking sequences
 178 from the catalogue of 55,607 available SNPs obtained by Canales *et al.* (2014) (Figure 2).
 179 Redundant SNPs were removed.

180

181 *Annotation of synonymous and non-synonymous substitutions*

182 The respective positions of SNPs were defined in the contigs of the maritime pine UniGene
 183 from Canales *et al.* (2014). Within the coding sequences (when characterised), non-
 184 synonymous and synonymous SNPs were annotated by comparing the amino acids translated
 185 from the reference codon to the codon containing the SNP. The functional annotation was
 186 retrieved from the study by Canales *et al.* (2014). All these items of information are available
 187 in Supplemental Table 3.

188

189 *Populations studied and genetic analysis*

190 The SNP assays were tested and validated on the basis of Mendelian segregation in a mapping
 191 pedigree (92 genotypes) and genetic diversity analysis in an elite breeding population from
 192 France (50 genotypes) and natural populations of different origins (French Atlantic coast with
 193 50 genotypes and Portugal with 42 genotypes).

194

195 *Mapping population and linkage analysis*

196 The mapping population consisted of a three-generation inbred pedigree (F2) obtained by the
 197 self-pollination of an inter-provenance “Landes x Corsica” hybrid (accession H12 resulting
 198 from the control cross between L146 and C10 genotypes). In total, 638 F2 seeds were planted
 199 in a nursery in June 1998 and 626 seedlings were transplanted into the field in March 1999 (4

200 m × 2 m, 0.51 ha, Lacanau de Mios, France). After 15 years, 565 F2 plants were still available
 201 for genetic analysis. We used 92 F2 plants (a different set compared to that used by Chancerel
 202 *et al.* 2013) to test for the Mendelian segregation of SNP markers and to associate them with a
 203 particular linkage map position. The F2 plants with the most recombinant genotypes were
 204 selected with MapPop software (<http://www.bio.unc.edu/faculty/vision/lab/mappop/>, Vision
 205 *et al.* 2000) and a linkage map was established by genotyping 477 F2 plants for 248 SNPs
 206 (unpublished) distributed over 12 linkage groups (LG), the haploid chromosome number in
 207 pines.
 208
 209 The R package *onemap* v2.0-3 (Margarido *et al.* 2007, Mollinari *et al.* 2009) was used for
 210 linkage mapping. All polymorphic SNPs and individuals were considered in the analysis as
 211 they passed the missing data threshold of 5% and 1%, respectively. SNPs were clustered into
 212 LGs on the basis of a LOD score greater than 10. The LG names were defined on the basis of
 213 previously mapped loci (Chancerel *et al.* 2013). The RECORD algorithm (Os *et al.* 2005) was
 214 used to order markers within LGs, with the following parameters: LOD=3 and max.rf=0.4.
 215 Recombination rates were converted into genetic distances (cM) with the Kosambi mapping
 216 function (Kosambi 1943). The goodness-of-fit of SNP segregations to the expected Mendelian
 217 segregation ratio (i.e. 1:2:1 for an F2 population) was assessed in chi-squared tests, with
 218 adjustment of the significance threshold for simultaneous multiple tests (Benjamini and
 219 Yekutieli 2001) within each LG. The same procedure was also applied to a previous SNP
 220 dataset genotyped in the same F2 family, but with different genotypes and mapping software
 221 (Chancerel *et al.* 2013). The two genetic maps were then combined into a composite linkage
 222 map with the R package *LPmerge* (Endelman and Plomion, 2014).
 223

224 *Populations of unrelated individuals and genetic diversity estimation*

225 The French Atlantic coast gene pool was represented by two subsets of individuals: i) 50 trees
 226 from two natural populations, Hourtin and Petrocq, sampled from a clonal collection
 227 (CLONAPIN) established directly from the source populations (as described by Rodríguez-
 228 Quiñón *et al.* 2015). Hourtin (45°11'N, 1°09'E) and Petrocq (44°04'N, 1°18'E) are coastal
 229 populations growing at low altitude (<30 m a.s.l.) and under typical maritime climate (annual
 230 precipitation of 980-1248 mm and mean annual temperature of 12-13°C); and ii) 50 elite trees
 231 from a larger set of about 600 genotypes mass-selected in natural forests of the Aquitaine
 232 region in the early 1960s to constitute the first generation of the maritime pine breeding
 233 program (Illy 1966). These 50 genotypes constitute the founders of a three-generation
 234 pedigreed population used to develop proof-of-concept for genomic selection in maritime pine
 235 (Isik *et al.* 2015).
 236
 237 The Portuguese population was also represented by two subsets of genotypes: i) 19 trees
 238 sampled from two provenances in a provenance trial carried out at Mimizan (France:
 239 44°20'N, 1°28'W). These provenances were described by Illy (1966): 6 trees were from seeds
 240 collected at “Pinhal de Leiria” (an 11 ha coastal forest located at 39°79'N, 8°98'W; 0-50 m
 241 a.s.l.; annual precipitation of 700-900 mm) and 13 trees were from seeds collected at “Trás-
 242 os-Montes” (a mountain forest located at 41°57'N, 7°50'W; 1150 m a.s.l., annual
 243 precipitation of 1200-1400 mm); and ii) 23 additional trees from “Pinhal de Leiria” collected
 244 from the CLONAPIN maritime pine collection.
 245
 246 We first tested departure from Hardy-Weinberg equilibrium, using standard chi-squared tests
 247 with a nominal significance threshold of $1.05 \cdot 1.15 \times 10^{-5}$, corresponding to an experiment-
 248 wise type I error of 5 % (Bonferroni correction to account for multiple testing). We then

249 estimated three genetic diversity parameters for each SNP: minor allele frequency (MAF),
 250 observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), Nei's index of genetic diversity corrected for
 251 sample size, Nei 1987). These three parameters were highly correlated (>0.95). We therefore
 252 present data for MAF and H_e only. Genetic differentiation (F_{st}) was assessed for pairs of
 253 populations, with a set of 3,981 polymorphic SNPs common to both populations, using GDA
 254 software (Lewis and Zaykin 2001). Finally, Bayesian clustering analysis (Structure software,
 255 Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003) was performed to identify different gene pools in
 256 maritime pine, as described by Jaramillo-Correa *et al.* (2015).

257

258 *Folded site frequency spectrum (SFS) for the French and Portuguese groups*

259 Sites with missing data were excluded from the samples, to ensure general consistency across
 260 loci in terms of the number of sequences analysed for each site. Furthermore, we retained the
 261 same SNPs for the French and Portuguese groups, 3,513 SNPs in total, corresponding to 88%
 262 of the original dataset (3,981 SNPs). Finally, two individuals were discarded from the French
 263 group as they presented 19% (INIA_PET11) and 10% (INIA_PET12) missing data across the
 264 3,981 SNPs. The estimate of folded SFS was therefore based on 3,513 common SNPs with no
 265 missing data, genotyped in 94 French and 42 Portuguese individuals.

266

267 SNPs were analysed as unpolarized (i.e. no ancestral state inferred), with the least frequent
 268 nucleotide at a given SNP site considered to correspond to the minor allele and thus used for
 269 the calculation of minor allele frequency (MAF). MAF was calculated for the French and
 270 Portuguese groups separately. The folded SFS was then plotted from the observed MAF and
 271 from the expected SFS. We used equation 6 from the paper by Ganapathy and Uyenoyama
 272 (2009) to determine the expected SFS. This equation is widely used to describe the expected

273 SFS for a genomic sample of SNPs, each of which is assumed to correspond to a mutation on
 274 an independent gene genealogy.

275

276 *DNA extraction and genotyping*

277 Developing needles were collected after bud burst for each genotype of the F2, natural and
 278 breeding populations. They were stored at -80°C or dried with silica gel before DNA
 279 extraction. About 30 - 40 mg of frozen/dried needles were crushed with a mixer mill (Retisch
 280 MM300, Haan, Germany). Genomic DNA was isolated with the Invisorb DNA plants 96 kit
 281 from Invitex (GmbH, Berlin, Germany), according to the manufacturer's instructions. All
 282 concentrations were determined with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop
 283 Technologies, Wilmington, DE, USA) and a fluorescence assay (Quant-IT kit, Invitrogen,
 284 Carlsbad, CA, USA). Samples with DNA concentrations greater than 50 ng/ μl (based on
 285 fluorescence measurements) were used for the Infinium assay. Genotyping was carried out at
 286 the Genes Diffusion Facility (Douai, France).

287

288 **Results**

289

290 *SNP detection*

291 The SNP genotyping array included 8,949 SNPs, 4,712 of which (i.e 52.65%) were already
 292 available (166 from Lepoittevin *et al.* 2010, 835 SNPs from Chancerel *et al.* 2011, 3,378
 293 SNPs from Chancerel *et al.* 2013, 434 SNPs from de Mignuel *et al.* 2014, and 184 unpublished
 294 SNPs (Supplemental Figure 1). The other 4,237 (i.e 47.35%) corresponded to newly
 295 discovered SNPs.

296

297 *Newly discovered SNPs*

298 *In silico SNPs from 454 sequence reads (Figure 1)*

299 Pyrosequencing of the C (Corsica), M (Morocco) and L (Landes) libraries provided 188,494,
300 611,673 and 458,882 reads, respectively. After cleaning, we retained 107,089, 484,348 and
301 225,842 reads for C, L and M, respectively. These reads were aligned on the PineV2 unigene.
302 We identified 2,039 SNPs in the C dataset, 4,937 in the L dataset and 4,752 in the M dataset.
303 We then selected SNPs in a test-cross configuration (1:1 segregation), i.e. heterozygous in one
304 parent and homozygous in the other, because, in a full-sib family with biallelic codominant
305 markers, pairs of markers presenting this configuration provide the best estimate of
306 recombination rates, particularly if compared with pairs having a test-cross and intercross
307 (1:2:1) configuration (Plomion *et al.* 1997). Thus, we selected 2,830, 1,695 and 2,957 SNPs
308 for the C × M, L × C and L × M crosses, respectively. In total 784, 2,046 and 911 SNPs were
309 informative for the C, M and L parents, respectively. This procedure resulted in the retention
310 of 3,741 unique SNPs as particularly suitable for linkage mapping.

311
312 *In vitro and in silico SNPs from candidate genes (Figure 2)*

313 Of the 281 candidate genes, 166 were associated with at least one contig of the maritime pine
314 UniGene. We retrieved 888 SNPs from these 166 contigs. Finally, after removing duplicated
315 sequences and SNPs located less than 100 bp apart, we retained 391 SNPs for SNP array
316 development. In addition, 105 *in vitro* SNPs from 66 resequenced candidate genes were
317 identified and incorporated into the SNP array.

318
319 *Annotation of synonymous and non-synonymous substitutions*

320 In total, 4,257 (47.6%) SNPs were found in contigs for which a full-length protein was
321 predicted, with 1,557 (36.6%) of these SNPs located in non-coding regions. SNPs in coding

228

322 sequences (2,700 *i.e.* 63.4%) were characterised in terms of their synonymous (S) or non-
323 synonymous (NS) nature and codon responsible for the NS change (Supplemental Figure 2A
324 and Supplemental Table 3). We identified 567 (21%) synonymous SNPs, and found that the
325 point mutation affected the third position in the codon in 87.5% of cases. There were 2,133
326 (79%) non-synonymous SNPs with the mutation affecting the first codon position in 21.5% of
327 cases and the second codon position in 70.6%. For NS mutations, the change in the protein is
328 indicated in Supplemental Table 3. Most of the SNPs were transitions (59.3%). The most
329 common transition was C↔T and the most common transversion G↔T (Supplemental Figure
330 2B).

331
332 *Linkage mapping*

333 Out of the 8,410 SNPs used to genotype the 92 trees of the F2 mapping population, 4,634
334 (55.1%) were monomorphic (including 2,231 SNPs, about half, from the newly developed
335 set), 2,052 (from 1,672 different contigs) were polymorphic (24.4%) and the remaining 1,724
336 (20.5%) corresponding to failed assays. All polymorphic SNPs passed the quality threshold
337 and were therefore used in linkage analysis. The total map length was 1,993 cM, spread over
338 12 LGs corresponding to the haploid number of chromosomes for the maritime pine genome.
339 LG length ranged from 129.2 (LG11) to 198.2 cM (LG5) and the mean number of SNPs per
340 LG was 171 cM (F2_N in Table 1). The mean SNP density was 0.98, but more than half of
341 the markers were grouped into clusters (*i.e.* groups of markers displaying no recombination).
342 This resulted in 901 unique positions, separated by a mean distance of 2.25 cM. Two factors
343 could account for the clustering of SNPs: i) the small size of the mapping population (92
344 genotypes) and ii) the presence of more than one SNP in 260 of the 1,672 mapped contigs.
345 Distorted SNPs were retained in the linkage analysis and accounted for 3.6% of the mapped
346 markers. They were grouped together in five regions located on three LGs (segregation

229

347 distortion regions. SDRs): two linked SDRs on LG#3 with 10 and 5 markers, one SDR on
 348 LG#6 (26 markers) and three SDRs on LG#10 (14, 12 and 2 markers) (Figure 3). The order of
 349 SNPs was similar (Spearman $\rho=0.98$) to that obtained from the linkage map reconstructed
 350 with the dataset of Chancerel *et al.* (2013) based on different genotypes of the same progeny
 351 (F2_O in Table 1). Only 56 of the 1,180 markers common to the two genetic maps differed in
 352 order between the two maps (Figure 3). These differences in marker order occurred between
 353 tightly linked markers (≤ 5 cM), mostly on LG#1 and LG#10, for which 10 and 15 markers
 354 were involved, respectively. Finally, based on the highly conserved marker order between the
 355 two maps, a composite map was established (F2_C in Table 1) with LPmerge software. It
 356 contained 2,353 SNPs (including 1,121 SNPs in the same contigs). This composite map
 357 included 1,661 different loci, and is therefore the densest yet gene-based linkage map for this
 358 species. The total map length was 1,711.7 cM. There were 955 unique positions, separated by
 359 a mean distance of 1.82 cM.

360

361 *Genetic diversity and population structure analysis*

362 Only a few markers displayed significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium in each
 363 population: 6 (0.10%) for the French Atlantic-based breeding population, 16 (0.26%) for the
 364 natural French Atlantic population and 18 (0.35%) for the Portuguese population. These
 365 markers, together with those for which >10% of the data were missing in any of the three
 366 populations, were removed from further analyses, resulting in a set of 5,016 SNPs (including
 367 24% monomorphic loci) successfully scored in all populations. We found no differences in
 368 genetic diversity, assessed with this common SNP set, between the natural and breeding
 369 populations in the French Atlantic region (*He* of 0.336 vs. 0.332, based on polymorphic loci
 370 only; Table 2), suggesting that the mass selection in natural forests for constitution of the base
 371 breeding population for this ecotype was broad enough to collect most of the standing genetic

372 variation. This is further supported by the absence of significant genetic differentiation
 373 between the natural and mass-selected populations ($F_{st} = 0.0005$, 95% CI: -0.00002, 0.00107).

374 Genetic diversity was slightly lower for the Portuguese population (*He* of 0.319) than for both
 375 the breeding and natural populations in France. High levels of genetic differentiation were
 376 observed between the French Atlantic and Portuguese populations ($F_{st} = 0.0847$, 95% CI:
 377 0.08087, 0.08864), with 263 SNPs having F_{st} above 0.25. These SNP markers are good
 378 candidates to replace the biochemical assay (based on terpene content analysis, Baradat and
 379 Marpeau-Bezard, 1988) currently used to determine the putative origin of adult forest stands
 380 in Aquitaine before the collection of seeds and their distribution for commercial purposes in
 381 France. Indeed, seed-lots from Portugal were introduced into Aquitaine in the 1950s and the
 382 stands they formed suffered frost damage after the exceptionally cold winter of 1985 (Ribeiro
 383 *et al.* 2002). Therefore, from 1986 onwards, candidate stands for seed collection in Aquitaine
 384 had to be certified as of French origin. The Bayesian clustering pattern observed, with the
 385 identification of only two gene pools ($K=2$), including the French natural and breeding
 386 populations grouped together into a single gene pool significantly separated from the
 387 Portuguese population (Figure 4), is a strong asset in this respect. This result will guide the
 388 development of highly informative genotyping multiplexes based on the Sequenom
 389 MassARRAY technology that has already been optimized for this species (Chancerel *et al.*
 390 2013).

391

392 As expected, the SFS of both the French and Portuguese populations showed a deficit of the
 393 observed low-frequency variants (Supplemental Figure 3). This deficit is probably due to a
 394 combined effect of the approach developed to select most of the SNPs (i.e. *in silico* analysis
 395 of ESTs obtained from small numbers of genotypes, precluding the capture of rare variants),

396 and the sampling scheme (a small population size), hindering the detection of rare variants
397 even if present on the SNP array.
398
399 **Discussion**
400
401 In this section, we discuss how the substantial number of polymorphisms detected and
402 validated in this study might help researchers working on maritime pine to address scientific
403 questions in population genomics and quantitative genetics with large samples of individuals
404 from natural and pedigreed populations that can now be surveyed for genetic variation at a
405 few thousand expressed genes across the genome. We also discussed the limitations that this
406 SNP array represents for genetic applications.

408 *Linkage and QTL mapping*

409 High-throughput SNP genotyping has been successfully implemented in several conifers
410 (Pavy *et al.* 2008; Eckert *et al.* 2009a; Chancerel *et al.* 2011, 2013). This approach has
411 generated thousands of markers for genetic mapping, significantly improving our
412 understanding of large and complex conifer genomes (Jermstad *et al.* 2011, Pavy *et al.* 2012,
413 Martínez-García *et al.* 2013, Neves *et al.* 2014). We show here that a combination of highly
414 multiplexed SNP genotyping and a selective mapping strategy is useful for the cost-efficient
415 mapping of hundreds of genes, since the bin set of 92 highly recombinant F2s represented
416 95% of the recombination occurring among the initial set of 477 genotypes used to construct
417 the framework linkage map. The genetic map obtained with this strategy was highly reliable
418 and accurate, as revealed by comparison with a previously developed map based on different
419 genotypes from the same progeny (Chancerel *et al.* 2013). A low fraction of molecular
420 markers were distorted and they did not alter marker order. The use of markers common to the

421 two sets of offspring made it possible to construct a composite genetic linkage map
422 confirming the positions of most of the previously mapped markers. The composite linkage
423 map obtained in this study is the densest gene-based map for maritime pine and is in the range
424 of recently published linkage maps for other conifer species (Pavy *et al.* 2012, Neves *et al.*
425 2014). However, a considerable fraction of SNPs clustered in the same position. Once high-
426 throughput genotyping of thousands of molecular markers has been achieved, the main
427 limitations for genetic linkage mapping will come from the high number of individuals
428 needed to detect recombination events between closely positioned genes (Bartholomé *et al.*
429 2015).

430

431 *Association mapping*

432 In long-lived outbreeding organisms, such as forest trees, association mapping is an attractive
433 alternative to QTL mapping, as it can be used to identify molecular variation underlying
434 phenotypes from multiple genetic backgrounds without the need to produce segregating
435 progenies (Neale and Savolainen 2004). Under certain circumstances (e.g. moderate-high
436 heritability), association mapping can also be applied to natural populations. This approach is
437 useful for studies of adaptive traits in the precise environments in which they evolved (see
438 Parchman *et al.* 2012; Budde *et al.* 2014 for forest trees). Recent years have seen an explosion
439 in the number of association mapping studies in model organisms, such as humans and
440 *Arabidopsis* (see reviews in Stranger *et al.* 2011; Weigel 2012). However, only a few studies,
441 mostly focusing on technological characters associated with wood quality, have been carried
442 out on forest trees (e.g. González-Martínez *et al.* 2011 and references therein; Cappa *et al.*
443 2013; Guerra *et al.* 2013). Progress has been particularly slow in maritime pine, partly due to
444 the lack of a reliable and cost-efficient genotyping platform capable of dealing with the large
445 sample sizes required to detect small- and medium-sized allelic effects. However, promising

446 results were obtained in the first genetic association studies in maritime pine, based on only a
447 few hundred markers (Lepointevin *et al.* 2012; Cabezas *et al.* 2015).. Apart from including all
448 SNPs reported to display significant genotype:phenotype associations in previous studies, our
449 new SNP assay provides the largest genotyped platform developed to date in maritime pine,
450 with 7,252 workable SNPs. Despite its modest size, this resource has the potential to
451 estimate new association studies for a wide range of adaptive and production traits in this
452 species.
453 Given the large size of conifer genomes (24.5 Gb for maritime pine, Chagné *et al.* 2002), our
454 SNP assay would only covers a small fraction of the potential relevant variation underlying
455 phenotypes. However, this assay is enriched in SNPs from candidate genes, based on all the
456 available information (published or unpublished) concerning genes displaying signatures of
457 natural selection (e.g. Eveno *et al.* 2008; Grivet *et al.* 2011), involved in environmental
458 associations (e.g. Jaramillo-Correa *et al.* 2015) or displaying differential expression (e.g. for
459 pine nematode resistance, Santos *et al.* 2012; or drought response, Perdiguero *et al.* 2013) in
460 this species. We therefore expect the use of this SNP genotyping array to generate highly
461 informative data. For example, Westbrook *et al.* (2013) found that a small number of
462 significantly associated SNPs (~20-30) had the same predictive power as the full dataset
463 (4,854 SNPs) in SNP-based models for oleoresin flow in *Pinus taeda* L. Finally, this SNP
464 array will allow unprecedented explorations of the molecular basis of polygenic quantitative
465 traits, through the implementation of multilocus association models (e.g. piMASS, Guan and
466 Stephen 2011).. Although largest SNP assays would be desirable, some thousands well-
467 selected SNPs have been found to be enough to provide relevant insights on polygenic
468 adaptation patterns (see Berg and Coop 2014, for example).
469 *Genomic selection*
470

471 High-throughput genotyping platforms, such as the new SNP array developed here, can guide
472 breeding and selection decisions (Eggen 2011). Genomic selection (GS) is a paradigm shift
473 first introduced into animal breeding in 2008 for the selection of superior individuals in many
474 countries (Goddard 2009). The major difference between GS and marker-assisted selection
475 (MAS) is the number of markers used. GS makes use of a much larger number of markers to
476 trace all the QTLs with small or large effect (Hayes and Goddard 2010). SNP-based
477 genotyping platforms are reliable and repeatable for the genotyping of large numbers of
478 individuals. There are few missing genotypes, and these genotypes can be handled (dropped
479 or imputed) without markedly decreasing data quality. Thus, SNP arrays have become the
480 choice genotyping platform for animal breeding and human genetics studies, despite advances
481 in the efficiency of DNA sequencing technologies. GS is expected to revolutionise forest tree
482 breeding, by decreasing the need for expensive and time-consuming progeny-testing
483 practices. If successful, GS could halve the long breeding cycles (>15 years) of forest trees
484 and double the genetic gain per unit time (Isik 2014). One probable application of GS
485 application in forest trees would involve the use of data from different sources, such as
486 progeny tests and genotyping centres, in a single-step approach to predicting the genetic merit
487 of individuals (Legarra *et al.* 2009). The predicted model for one cycle can then be refined as
488 new data become available. As breeding cycles progress and genotyping/sequencing costs
489 fall, progeny testing will have a lesser effect on selection decisions. Nevertheless, the lack of
490 a reliable and cost-efficient genotyping platform remains the major bottleneck for the routine
491 application of GS in forest trees. The new SNP array presented here constitutes a valuable
492 tool to carry out GS proof-of-concept in maritime pine population of limited effective size.
493 However, because of the relatively large breeding effective population size (~135 for the
494 French breeding programme), operative implementation of GS would still need further
495 development of SNP resources. Based on deterministic simulations, Grattapaglia and Resende

496 (2011) suggested a marker density of over 10 SNPs per cM to reach an accuracy of 0.7 with
 497 GS. This would translate to at least 15,000 SNP markers for maritime pine, half of which
 498 provided in the SNP array developed here.
 499
 500 *Population genomics*
 501 The high-density SNP array developed in this study provides a powerful tool for the genome-
 502 wide genotyping of a large number of populations across the full distribution range of the
 503 species. The genotyping of hundreds of individuals across the entire range of maritime pine,
 504 with SNPs located both in coding and noncoding regions, would increase our understanding
 505 of the role of the evolutionary, demographic and adaptive mechanisms acting on natural
 506 populations. The available molecular markers have shown that maritime pine populations are
 507 spatially structured into regional gene pools connected by gene flow, particularly in the
 508 Iberian Peninsula (Burban and Petit 2003, Bucci *et al.* 2007, Jaramillo-Correa *et al.* 2015).
 509 However, the timing of the historical events leading to this spatial separation, and the degree
 510 of connectivity between gene pools, remain to be determined. In addition, maritime pine
 511 grows in diverse environmental conditions, resulting in the local adaptation of populations
 512 over the range of this species (González-Martínez *et al.* 2002, Jaramillo-Correa *et al.* 2015,
 513 Serra-Varela *et al.* 2015), but the molecular mechanisms underlying this adaptation are poorly
 514 understood. Our SNP array provides a means of identifying functional variation and the
 515 molecular bases of adaptation, through various methods based on the differentiation of allele
 516 frequencies between populations (F_{ST} -based methods; see e.g. Prunier *et al.* 2011, Chen *et al.*
 517 2012), site-frequency spectrum (SFS) statistics (e.g., Eckert *et al.* 2009b), correlations with
 518 environmental variables (e.g., Eckert *et al.* 2010, Jaramillo-Correa *et al.* 2015), or
 519 combinations of these approaches. 'Reverse' ecology approaches connecting genomic data
 520 with environmental parameters have also proved useful for identifying the major ecological

521 drivers of adaptation (Levy and Borenstein 2012). Ascertainment biases, resulting from the
 522 small panel of individuals from which SNPs were obtained (ascertainment width) and from
 523 the stringent criteria in terms of minimum allele frequency and read coverage used to retain
 524 the SNPs (ascertainment depth), must be taken into account when interpreting the results of
 525 future studies of natural populations. A systematic bias would be expected for estimates of
 526 nucleotide diversity, inferences about population structure, evolutionary processes based on
 527 natural selection and/or historical demographic models, particularly if based on the SFS
 528 (reviewed by Helyar *et al.* 2011; Albrechtsen *et al.* 2011). Ascertainment bias has the potential
 529 of skewing the SFS towards common alleles, as is the case for our SNP array. A correction,
 530 explicitly incorporating SNP ascertainment bias into population genetics models, or the use of
 531 methods robust to ascertainment bias are necessary to accurately assess population genetic
 532 inferences (see Albrechtsen *et al.* 2011; Excoffier *et al.* 2013). Furthermore, most of the SNPs
 533 were obtained from independent contigs of the UniGene, precluding the use of linkage
 534 disequilibrium (LD) and haplotype diversity as metrics for population genetic inferences. This
 535 limitation could therefore potentially reduce the success in identifying loci underlying local
 536 adaptation, as this approach – similarly to genome-wide association – exploits LD to
 537 indirectly identify adaptive SNPs by relying upon the premise that some markers in LD with a
 538 causal SNP should be associated with important ecological variables as well. Despite these
 539 limitations, thanks to the methodological advances, our SNP array should allow to interpret
 540 the signatures left in the genome by different evolutionary forces, and to make inferences
 541 about complex population processes and geographic patterns of genome-wide genetic
 542 variation.
 543
 544
 545

546 **Conclusion and future direction in genomic resource development**

547

548 In this study we report the discovery of new SNP markers in maritime pine, from RNA-seq
549 and amplicon resequencing data, and the establishment of an Infinium genotyping array
550 including SNPs that have already been validated. We found this technology highly reliable
551 considering the extremely low level of missing data compared to alternatives such as
552 Restriction site-associated DNA Sequencing (RAD-Seq), which made unnecessary imputing
553 data. Infinium technology is also unaffected by allele drop out, a major drawback for genetic
554 inferences with RAD-Seq in highly heterozygous species such as maritime pine (Davey et al.
555 2013, Gautier et al. 2013, Puritz et al. 2014, Mastretta-Yanes et al. 2015). The SNP array
556 presented here represents a major step forward for population and conservation genetics and
557 for breeding in maritime pine, however, we also discussed a number of limitations, mostly
558 derived from the large conifer genome sizes and low levels of LD.
559 In the near future, we will develop new generation genotyping-by-sequencing methods, which
560 should make it possible to decrease the problem of ascertainment bias, because the individuals
561 of interest are sequenced directly. Considering missing data allele drop out concerns, future
562 development of marker technology in this species will be based on sequence capture and
563 direct sequencing (Gnrirke et al. 2009).

564

565 **Acknowledgements**

566

567 This study was carried out with financial support from the European Union Sixth and Seventh
568 Framework Programmes: Evoltree (no. 016322), ProcoGen (no. 289841), NovelTree (no.
569 211868), Forger (no. KBBE-289119), TipTree (BiodivERsA-ERANET); the French National
570 Research Agency: ANR-FLAG (ANR-12ADAP-007-01); the Italian Ministry of Education,
571 University and Scientific Research: Biodiversitalia (RBAP10A2T4); the Spanish Ministry of
572 Science and Innovation: AdapCon (CGL2011-30182-C02-01). We thank C García-Barriga for
573 DNA extraction. D Grivet was supported by a "Ramón y Cajal" Fellowship from the Spanish
574 Ministry of Science and Innovation, I Lesur by ANR-FLAG and C Boury by ProcoGen. H
575 Lagraulet received a PhD fellowship from INRA (EFPA division and ACCAF
576 metaprogramme) and Région Aquitaine (no. 20111203004). J Bartholomé was supported by a
577 postdoctoral fellowship from "Conseil Général des Landes". I Rodriguez-Quilón
578 acknowledges a PhD scholarship (FPI-INIA) from the Spanish National Institute for
579 Agricultural and Food Research and Technology and the Spanish Ministry of Science and
580 Innovation.
581
582 **Data accessibility**
583
584 Roche 454 raw data have been deposited in the short-read archive of NCBI (accessions:
585 SRX031589 for genotype 110-4019-1, SRX208012 for genotype 0284-2 and SRX031592 for
586 genotype 112-4-1). The assembled contigs of the second maritime pine UniGene are available
587 from: http://genotoul-contigbrowser.toulouse.inra.fr:9092/Pinus_pinaster2/index.html.
588

589 **Authors' contributions**

590
591 IL and HL: *in silico* SNP detection in mapping populations; IL: SNP array design and SNP
592 annotation; CB, LB, JMG, FB, GGV, DG, IRQ, and SCGM: logistical aspects of genotyping;
593 CB, JB IRQ, SCGM and DG: SNP scoring; CP, IL, MdM, MTC, NdM and FH: database
594 compilation from published and unpublished data; JB: linkage mapping; SCGM and DG:
595 population genetics analysis; CP: design of the study and overall coordination. All the authors
596 participated in the writing of the paper, and have read and approved the manuscript submitted.
597

598 **References**

599
600 Albrechtsen A, Nielsen FC, Nielsen R (2011) Ascertainment biases in SNP chips affect
601 measures of population divergence. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 2534-2547.
602
603 Alía R, Martin S (2003) EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use
604 for Maritime Pine (*Pinus pinaster*). IPGRI: Rome. Italy, 6p.
605
606 Alonso P, Cortizo M, Cantón FR, *et al.* (2007). Identification of genes differentially expressed
607 during adventitious shoot induction in *Pinus pinea* cotyledons by subtractive hybridization
608 and quantitative PCR. *Tree Physiology*, **27**, 1721-1730.
609
610 Baird NA, Eitter PD, Atwood TS, *et al.* (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping
611 using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, **3**, e3376.
612
613 Baradat P, Marpeau-Bezard A (1988) Le pin maritime, *Pinus pinaster* Ait., biologie et
614 génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce, Ph.D. Thesis,
615 University of Bordeaux I.
616
617 Bartholomé J, Mandrou E, Mabilala A, *et al.* (2015) High-resolution genetic linkage maps of
618 *Eucalyptus* improve BRASUZ1 reference genome assembly. *New Phytologist*, doi:
619 10.1111/nph.13150.
620
621 Berg JJ, Coop G (2014) A population genetic signal of polygenic adaptation. *PLoS Genetics*,
622 **10**, e1004412.

623 Benjamini Y, Yekutieli D (2001) The control of the false discovery rate in multiple testing
624 under dependency. *Annals of Statistics*, **29**, 1165-1188.

625

626 Bouffier L, Annie Raffin A, Alfia R (2013) Maritime pine – *Pinus pinaster* Ait. In: *Best*
627 *Practice for Tree Breeding in Europe* (eds Mullin TJ & Lee SJ). pp. 65-75. Skogforsk,
628 Sweden, Uppsala.

629

630 Bucci G, González-Martínez SC, Le Provost G, et al. (2007) Range-wide phylogeography and
631 gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular*
632 *Ecology*, **16**, 2137–2153.

633

634 Budde KB, Heuertz M, Hernández-Serrano A, et al. (2014) *In situ* genetic association for
635 serotiny, a fire-related trait, in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *New*
636 *Phytologist*, **201**, 230-241.

637

638 Burban C, Petit RJ (2003) Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers
639 having contrasted inheritance. *Molecular Ecology*, **12**, 1487–1495.

640

641 Cabezas JA, González-Martínez SC, Collada C, et al. (2015) Nucleotide polymorphisms in a
642 pine ortholog of the *Arabidopsis* degrading enzyme cellulase KORRIGAN are associated with
643 early growth performance in *Pinus pinaster*. (in press)

644

645 Canales J, Bautista R, Label P, et al. (2014) *De novo* assembly of maritime pine
646 transcriptome: implications for forest breeding and biotechnology. *Plant Biotechnology*
647 *Journal*, **12**, 286–299.

648 Cappa EP, El-Kassaby YA, Garcia MN, et al. (2013) Impacts of population structure and
649 analytical models in genome-wide association studies of complex traits in forest trees: A case
650 study in *Eucalyptus globulus*. *PLoS ONE*, **8**, e81267.

651

652 Chagné D, Lalanne C, Madur D, Kumar S, Frigerio J-M, Krier C, Decroocq S, Savouré A,
653 Bou Dagher-Kharat M, Bertocchi E, Brach J, Plomion C (2002) A high density linkage map
654 of *Pinus pinaster* based on AFLPs. *Annals Forest Science*, **59**: 627-636.

655

656 Chancerel E, Lamy JB, Lesur I, et al. (2013) High density linkage mapping in a pine tree
657 reveals a genomic region associated with inbreeding depression and provides clues to the
658 extent and distribution of meiotic recombination. *BMC Biology*, **11**:50.

659

660 Chancerel E, Lepoittevin C, Le Provost G, et al. C (2011) Development and implementation
661 of a highly-multiplexed SNP array for genetic mapping in maritime pine and comparative
662 mapping with loblolly pine. *BMC Genomics*, **12**: 368.

663

664 Chen J, Källman T, Ma X, et al. (2012) Disentangling the roles of history and local selection
665 in shaping clinal variation of allele frequencies and gene expression in Norway spruce (*Picea*
666 *abies*). *Genetics*, **191**: 865–881.

667

668 Davey JW, Cezard T, Fuentes-Utrilla P, et al. (2013) Special features of RAD sequencing
669 data: implications for genotyping. *Molecular Ecology*, **22**, 3151–3164.

670

671 de Miguel M, Cabezas JA, de María N, et al. (2014) Genetic control of functional traits
672 related to photosynthesis and water use efficiency in *Pinus pinaster* Ait. drought response:

673 integration of genome annotation, allele association and QTL detection for candidate gene
674 identification. *BMC Genomics*, **15**, 464.
675
676 Eckert AJ, van Heerwaarden J, Wegrzyn JL, *et al.* (2010) Patterns of population structure and
677 environmental associations to aridity across the range of loblolly pine (*Pinus taeda* L.,
678 Pinaceae). *Genetics*, **185**, 969–982.
679
680 Eckert, AJ, Pande B, Ersoz ES, *et al.* (2009a) High-throughput genotyping and mapping of
681 single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and*
682 *Genomes*, **5**, 225–34.
683
684 Eckert AJ, Wegrzyn JL, Pande B, *et al.* (2009b) Multilocus patterns of nucleotide diversity
685 and divergence reveal positive selection at candidate genes related to cold hardiness in coastal
686 Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *Genetics*, **183**: 289–298.
687
688 Eggen A (2012) The development and application of genomic selection as a new breeding
689 paradigm. *Animal Frontier*, **2**, 10–15.
690
691 Endelman JB, Plomion C (2014) LPmerge: an R package for merging genetic maps by linear
692 programming. *Bioinformatics*, **30**, 1623-1624.
693
694 Eveno E, Collada C, Guevara MA, *et al.* (2008) Contrasting patterns of selection at *Pinus*
695 *pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses.
696 *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 417–437.
697

698 Excoffier L, Dupanloup I, Huerta-Sánchez E, Sousa VC, Foll M (2013) Robust demographic
699 inference from genomic and SNP data. *PLoS Genetics*, **9**, e1003905.
700
701 Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus
702 genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587.
703
704 Ganapathy G, Uyenoyama MK (2009) Site frequency spectra from genomic SNP surveys.
705 *Theoretical Population Biology*, **75**, 346–354.
706
707 Gautier M, Gharbi K, Cezard T, *et al.* (2013) The effect of RAD allele dropout on the
708 estimation of genetic variation within and between populations. *Molecular Ecology*, **21**,
709 3165–3178.
710
711 Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, *et al.* (2009) Solution hybrid selection with ultra-long
712 oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology*, **27**, 182-
713 189.
714
715 Goddard M (2009) Genomic selection: prediction of accuracy and maximisation of long term
716 response. *Genetica*, **136**, 245–257.
717
718 Gonzalez-Martinez SC, Dillon S, Garnier-Géré P, *et al.* (2011). Patterns of nucleotide
719 diversity and association mapping. In: *Genetics, Genomics and Breeding of Conifer Trees*
720 (*eds. Plomion C, Bousquet J, & Kole C*). pp. 239–275. Edenbridge Science Publishers and
721 CRC Press, USA, New-York.
722

723 González-Martínez SC, Alía R, Gil L (2002) Population genetic structure in a Mediterranean
724 pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity*,
725 **89**, 199–206.
726
727 Grattapaglia D, Resende MDV (2011) Genomic selection in forest tree breeding. *Tree*
728 *Genetics and Genomes* **7**, 241–255.
729
730 Grivet D, Sebastiani F, Alía R, et al. (2011) Molecular footprints of local adaptation in two
731 Mediterranean conifers. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 101–116.
732
733 Grivet D, Avia K, Vaattovaara A, et al. (2015) Contrasting patterns of nucleotide diversity
734 and adaptive evolution in two widespread European pines. In review.
735
736 Guan Y, Stephens M (2011) Bayesian variable selection regression for genome-wide
737 association studies, and other large-scale problems. *Annals of Applied Statistics*, **5**, 1780–
738 1815.
739
740 Guerra FP, Wegrzyn JL, Sykes R, et al. (2013) Association genetics of chemical wood
741 properties in black poplar (*Populus nigra*). *New Phytologist*, **197**, 162–76.
742
743 Harfourche A (1995) Variabilité géographique et hybridation interraciale chez le pin maritime
744 (*Pinus pinaster* Ait.). Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré Nancy I, France, 153p.
745
746 Hartl DL, Clark AG (1998) Principles of population genetics. 3rd edition. Sinauer Associates,
747 USA, Sunderland, MA.

748
749 Hayes B, Goddard M (2010) Genome-wide association and genomic selection in animal
750 breeding. *Genome*, **53**, 876–883.
751
752 Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, et al. (2011) Application of SNPs for population
753 genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology*
754 *Resources*, **11**, 123–136.
755
756 Illy G (1966) Recherches sur l'amélioration génétique du pin maritime. *Annal des Sciences*
757 *Forestières*, **23**, 769–948.
758
759 Isik F (2014) Genomic selection in forest tree breeding: The concept and an outlook to the
760 future. *New Forests*, **45**, 379–401.
761
762 Jaramillo-Correa JP, Grivet D, Lepoittevin C, et al. (2015) Molecular proxies of climate
763 maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae). *Genetics*, doi:
764 10.1534/genetics.114.173252.
765
766 Jaramillo-Correa JP, Grivet D, Terrab A, et al. (2010) The Strait of Gibraltar as a major
767 biogeographic barrier in Mediterranean conifers: a comparative phylogeographic survey.
768 *Molecular Ecology*, **19**, 5452–68.
769
770 Jermstad KD, Eckert AJ, Wegrzyn JL, et al. (2011) Comparative mapping in *Pinus*: Sugar
771 pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) and loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and*
772 *Genomes*, **7**, 457–68.

773

774 Jorge FC, Pascoal Neto C, Irlle C, *et al.* (2002) Wood adhesives derived from alkaline extracts

775 of maritime pine bark: preparation, physical characteristics and bonding efficacy. *European*

776 *Journal of Wood and Wood Products*, **60**, 303-310.

777

778 Kosambi DD (1943) The estimation of map distances from recombination values. *Annals of*

779 *Human Genetics*, **12**, 172-175.

780

781 Kujala S, Savolainen O (2012) Sequence variation patterns along a latitudinal cline in Scots

782 pine (*Pinus sylvestris*): signs of clinal adaptation? *Tree Genetics and Genomes*, **8**, 1451-1467.

783

784 Lalagüe H, Csilléry K, Oddou-Muratario S, *et al.* (2014) Nucleotide diversity and linkage

785 disequilibrium at 58 stress response and phenology candidate genes in a European beech

786 (*Fagus sylvatica* L.) population from southeastern France. *Tree Genetics and Genomes*, **10**,

787 15-26.

788

789 Lamy JB, Bouffier L, Burrett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S (2011) Uniform selection

790 as the primary evolutionary force of cavitation resistance across a species range. *PLoS ONE*,

791 **6**, e23476.

792

793 Lamy JB, Delzon S, Bouche P, *et al.* (2014) Limited genetic variability and phenotypic

794 plasticity for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytologist*, **201**, 874-86.

795

796 Lefèvre F, Boivin T, Bontemps A, *et al.* (2014) Considering evolutionary processes in

797 adaptive forestry. *Annals of Forest Science*, **71**, 723-739

798

799 Le Provost G, Domergue F, Lalanne C, *et al.* (2013) Cuticular wax: an essential component of

800 fast-growing maritime pine saplings to cope with water deficit. *BMC Plant Biology*, **13**, 95.

801

802 Legarra A, Aguilar I, Misztal I (2009) A relationship matrix including full pedigree and

803 genomic information. *Journal of Dairy Science*, **92**, 4656-4663.

804

805 Lepoittevin C, Frigerio JM, Garnier-Géré P, *et al.* (2010) *In vitro vs. in silico* detected SNPs

806 for the development of a genotyping array: What can we learn from a non-model species?

807 *PLoS ONE*, **5**, e11034.

808

809 Lepoittevin C, Harvengt L, Plomion C, Garnier-Géré P (2012) Association mapping for

810 growth, straightness and wood-chemistry traits in the *Pinus pinaster* Aquitaine breeding

811 population. *Tree Genetics and Genomes*, **8**, 113-126.

812

813 Levy R, Borenstein E (2012) Reverse ecology: from systems to environments and back.

814 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **751**, 329-345.

815

816 Lewis PO, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of

817 allelic data. Version 1.0 (dl16c). Free program distributed by the authors over the internet from

818 <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

819

820 Mariette J, Noirot C, Klopp C (2011) Assessment of replicate bias in 454 pyrosequencing and

821 a multi-purpose read-filtering tool. *BMC Research Notes*, **4**, 149.

822

823 Margarido GRA, Souza AP, Garcia AAF (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*, **144**, 78-79.

825

826 Martínez-García PJ, Stevens KA, Wegzyn JL, et al. (2013) Combination of multipoint maximum likelihood (MML) and regression mapping algorithms to construct a high-density genetic linkage map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes*, **9**, 1529–35.

830

831 Mastretta-Yanes A, Arrigo N, Alvarez N, et al. (2015) Restriction site-associated DNA sequencing, genotyping error estimation and *de novo* assembly optimization for population genetic inference. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 28-41.

833

834 Mollinari M, Margarido GRA, Vencovsky R, Garcia AAF (2009) Evaluation of algorithms used to order markers on genetic maps. *Heredity*, **103**, 494-502.

837

838 Mullin TJ, Andersson B, Bastien JC, et al. (2011) Economic importance, breeding objectives and achievements. In: *Genetics, Genomics and Breeding of Conifer Trees* (eds. Plomion C, Bousquet J, & Kole C). pp. 40-127. Edenbridge Science Publishers and CRC Press, USA, New-York.

842

843 Neale DB, Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science*, **9**, 325–30.

845

846 Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, USA, New York.

847

848 Neves LG, Davis JM, Barbazuk WB, Kirst M (2014) A high-density gene map of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) based on exome sequence capture genotyping. *Genes, Genomes, Genetics*, **4**, 29–37.

850

851 Os H, Stam P, Visser RF, Eck H (2005) RECORD: a novel method for ordering loci on a genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 30-40.

852

853

854

855 Outborg NJ, Pertoldi C, Loeschcke V, et al. (2010). Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics*, **26**, 177–187.

857

858 Parchman TL, Gompert Z, Mudge J, et al. (2012). Genome-wide association genetics of an adaptive trait in lodgepole pine. *Molecular Ecology*, **21**, 2991–3005.

859

860

861 Pavy N, Gagnon F, Rigault P, et al. (2013) Development of high-density SNP genotyping arrays for white spruce (*Picea glauca*) and transferability to subtropical and nordic congeners. *Molecular Ecology Resources*, **13**, 324-336

863

864

865 Pavy N, Pelgas B, Laroche J, et al. (2012) A Spruce gene map infers ancient plant genome reshuffling and subsequent slow evolution in the gymnosperm lineage leading to extant conifers. *BMC Biology*, **10**, 84.

867

868

869 Pavy N, Pelgas B, Beauseigle S, et al. (2008) Enhancing genetic mapping of complex genomes through the design of highly-multiplexed SNP arrays: application to the large and unsequenced genomes of white spruce and black spruce. *BMC Genomics*, **9**, 21.

870

871

872

873 Perdiguer P, Barbero M del C, Cervera MT, et al. (2013) Molecular response to water stress
874 in two contrasting Mediterranean pines (*Pinus pinaster* and *Pinus pinea*). *Plant Physiology*
875 and *Biochemistry*, **67**, 199-208.
876
877 Plomion C, Chancerel E, Endelman JB, et al. (2014) Genome-wide distribution of genetic
878 diversity and linkage disequilibrium in a mass-selected population of maritime pine. *BMC*
879 *Genomics*, **15**, 171.
880
881 Plomion C, Costa P, Bahrman N (1997) Genetic analysis of needle protein in maritime pine.
882 1. Mapping dominant and codominant protein markers assayed on diploid tissue, in a haploid-
883 based genetic map. *Silvae Genetica*, **46**, 161-165.
884
885 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using
886 multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
887
888 Prunier J, Laroche J, Beaulieu J, Bousquet J (2011) Scanning the genome for gene SNPs
889 related to climate adaptation and estimating selection at the molecular level in boreal black
890 spruce. *Molecular Ecology*, **20**, 1702–1716.
891
892 Puritz JB, Matz MV, Toonen RJ, et al. (2014) Demystifying the RAD fad. *Molecular Ecology*
893 **23**, 5937–5942.
894
895 Ribeiro MM, Le Provost G, Gerber S, et al. (2002) Origin identification of maritime pine
896 stands in France using chloroplast single-sequence repeats. *Annals of Forest Science*, **59**, 53-
897 62.

898
899 Rodríguez-Quilón I, Santos-del-Blanco L, Grivet D, et al. (2015) Local effects drive
900 heterozygosity-fitness correlations in an outcrossing long-lived tree. Submitted.
901
902 Rohdewald P (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol®), an
903 herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical*
904 *Pharmacology and Therapeutics*, **40**, 158-168.
905
906 Santos CS, Pinheiro M, Silva AI, et al. (2012) Searching for resistance genes to
907 *Bursaphelenchus xylophilus* using high-throughput screening. *BMC Genomics*, **13**, 599.
908
909 Santos-del-Blanco L, Climent J, González-Martínez SC, Pannell JR (2012) Genetic
910 differentiation for size at first reproduction through male *versus* female functions in the
911 widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Annals of Botany*, **110**, 1449-1460.
912
913 Serra-Varela MJ, Grivet D, Vincenot L, et al. (2015) Does phylogeographic structure relate to
914 climatic niche divergence? A test using maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). in review
915
916 Stranger BE, Stahl EA, Raj T (2011) Progress and promise of genome-wide association
917 studies for human complex trait genetics. *Genetics*, **187**, 367-383.
918
919 Touriño S, Selga A, Jiménez A, et al. (2005) Procyamidin fractions from pine (*Pinus pinaster*)
920 bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and
921 antiproliferative effect in melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**,
922 4728-4735.

923 Vision TJ, Brown DG, Shmoys DB, *et al.* (2000) Selective mapping: A strategy for
 924 optimizing the construction of high-density linkage maps. *Genetics*, **155**, 407–420.

925

926 Wachowiak W, Balk PA, Savolainen O (2009) Search for nucleotide diversity patterns of
 927 local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus*
 928 *sylvestris* L.). *Tree Genetics and Genomes*, **5**, 117–132.

929 Weigel D (2012) Natural variation in *Arabidopsis*: from molecular genetics to ecological
 930 genomics. *Plant Physiology*, **158**, 2–22.

931

932 Westbrook JW, Resende MFR, Munoz P, *et al.* (2013). Association genetics of oleoresin flow
 933 in loblolly pine: discovering genes and predicting phenotype for improved resistance to bark
 934 beetles and bioenergy potential. *New Phytologist*, **199**, 89–100.

935

936 **Figure and table legends**

937

938 **Figure 1** Strategy for developing SNPs segregating in three full-sib progenies (CxM, LxC,
 939 LxM), from high-throughput sequencing of the parental lines (C, L and M).

940

941 **Figure 2** Strategy for developing new SNPs in candidate genes.

942

943 **Figure 3** Comparison between the two F2 genetic linkage maps (F2_N in blue and F2_O in
 944 white). Segregation distortion regions are indicated in orange.

945

946 **Figure 4** Bayesian clustering analysis for $K=2$, showing the French Atlantic (red) and
 947 Portuguese (green) maritime pine gene pools. The red and green portions of each bar
 948 (individual tree) indicate the probability of genetic ancestry (y-axis) for each cluster.

949

950 **Table 1** Characteristics of the F2 genetic linkage maps. F2_N: map obtained from the 9 k-
 951 array (this study), F2_O: map constructed with data from Chancerel *et al.* (2013) and F2_C:
 952 composite map generated from the F2_N and F2_O maps.

953

954 **Table 2** Genetic diversity estimates for French Atlantic and Portuguese maritime pine
 955 populations.

956

957 **Supporting Information**

958

959 **Supplemental Table 1** List of SNP arrays already developed for maritime pine and
960 associated research questions.

961 **Supplemental Table 2** List of SNP markers already developed for maritime pine

962 **Supplemental Table 3** List of SNP markers with sequence, dbSNP accession, type of SNP,
963 corresponding contig ID in PineV3 and functional annotation, and linkage group assignment
964 on the F2, CL, ML, CM linkage maps.

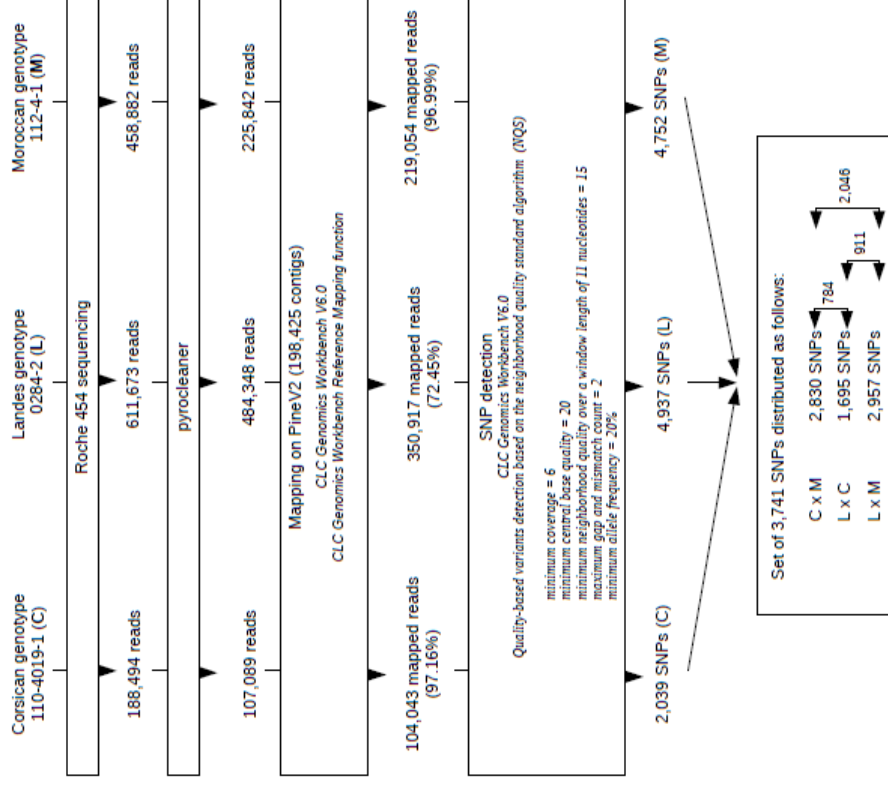
965 **Supplemental Figure 1** Number of SNPs developed over the last five years for maritime pine
966 and interdependence of studies (for more details see Supplemental Table 2). Studies from de
967 Miguel *et al.* (2014) in orange, Chancerel *et al.* (2013) in blue, Chancerel *et al.* (2011) in
968 green, Lepoittevin *et al.* (2010) in red, and unpublished in black.

969 **Supplemental Figure 2** **Synonymous and non-synonymous substitutions.** (A)
970 Synonymous (S) and non-synonymous (NS) mutations at the three codon positions. (B)
971 Proportion of transitions and transversions.

972 **Supplemental Figure 3** Distribution of minor allele frequency (MAF from France [A] and
973 Portugal [B]) and folded site frequency spectrum (SFS from France [C] and Portugal [D]).
974 The expected distribution of minor allele variants is skewed towards an excess of rare
975 variants. According to Hartl and Clark (1998), more than one third of all polymorphisms
976 would be expected to have a frequency below 5%, reflecting purifying selection.

977

978 **Figure 1**



979

980

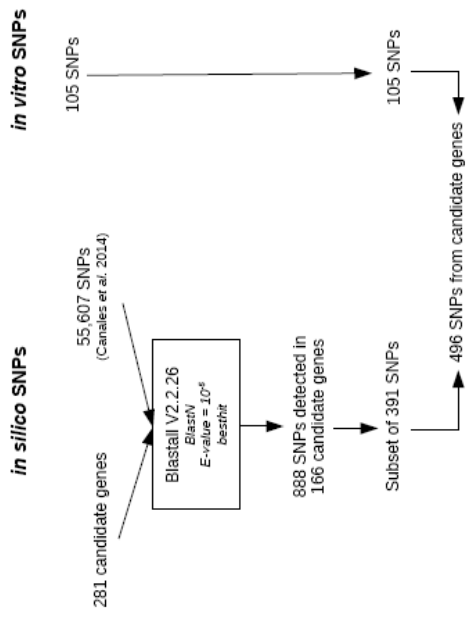


Figure 3

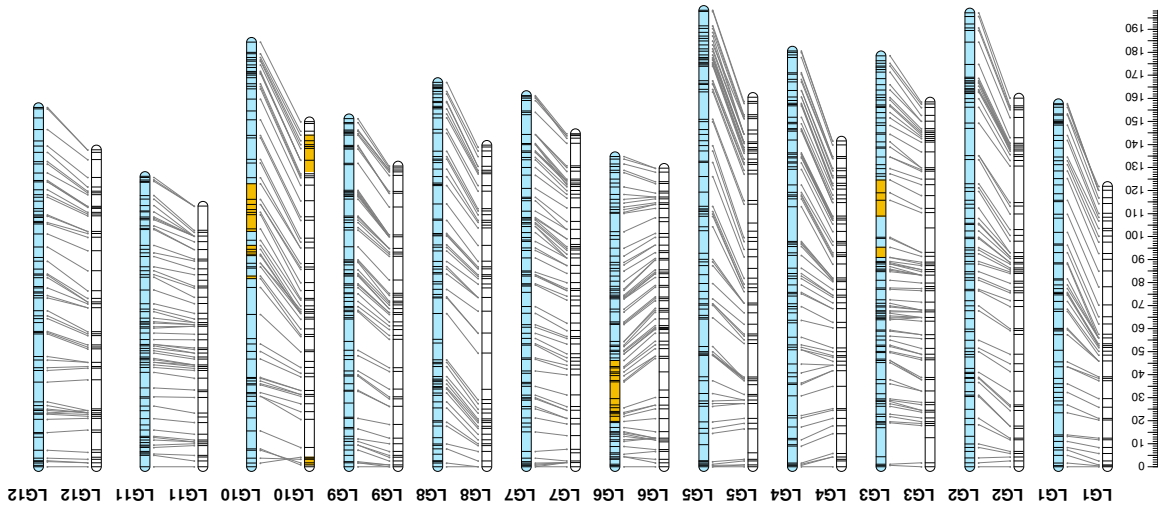


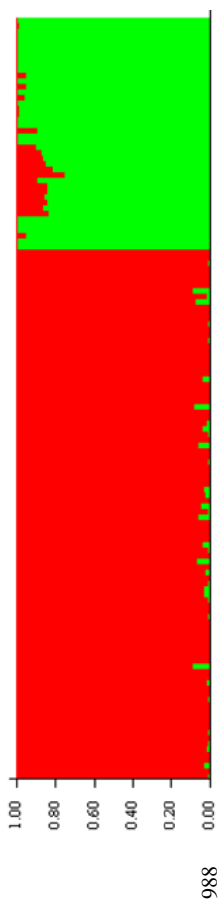
Table 1

LG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Size (cM)	157.7	197.2	178.5	180.6	198.2	134.8	161.2	166.9	151.17	184.4	126.2	156	1,992.9
Number of SNPs	157	152	190	176	199	163	155	155	184	148	156	191	2,052
Number of unique positions	65	81	88	77	80	80	76	79	74	66	68	67	901
Distance between SNPs (cM)	1.01	1.31	0.94	1.03	1	0.83	0.9	1.08	0.83	1.25	0.81	0.82	0.98
Distance between unique positions (cM)	2.46	2.47	2.05	2.38	2.51	1.71	2.15	2.14	2.07	2.84	1.88	2.36	2.25
Distorted SNPs (%)	0	0	7.9	0	0	16	0	0	0	18.9	0	0	3.6
Size (cM)	121.8	160.1	158.4	141.5	160.5	129.7	144.6	139.7	130.6	149.9	113.2	137.6	1,687.6
Number of SNPs	106	117	147	138	126	113	124	93	134	107	130	146	1,481
Number of unique positions	41	57	60	54	56	58	58	47	45	54	49	50	629
Distance between SNPs (cM)	1.16	1.38	1.09	1.03	1.28	1.16	1.18	1.5	0.98	1.41	0.88	0.95	1.17
Distance between unique positions (cM)	3.04	2.86	2.69	2.67	2.92	2.28	2.54	3.04	2.97	2.83	2.36	2.81	2.75
Distorted SNPs (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	2.75
Size (cM)	124.1	160.1	159.3	142.2	160.5	131.3	144.6	139.7	132.2	155.4	123.7	138.8	1,711.7
Number of SNPs	179	177	221	191	219	188	201	174	207	173	194	229	2,353
Number of unique positions	64	81	95	75	88	88	83	81	75	76	74	75	955
Distance between SNPs (cM)	0.7	0.91	0.72	0.75	0.74	0.7	0.72	0.81	0.64	0.9	0.64	0.61	0.74
Distance between unique positions (cM)	1.97	2	1.69	1.92	1.84	1.51	1.76	1.75	1.79	2.07	1.69	1.88	1.82

Table 2

Population	N	% mono	All SNPs			Common polymorphic SNPs		
			Loct #	MAF	<i>H_e</i>	Loct #	MAF	<i>H_e</i>
French Atlantic	46	0.242	5,016	0.201	0.266	3,981	0.254	0.336
Portugal	50	0.241	5,016	0.198	0.263	3,981	0.250	0.332
Portugal	42	0.227	5,016	0.187	0.253	3,981	0.236	0.319

Figure 4



1 Supplemental Table 1

2

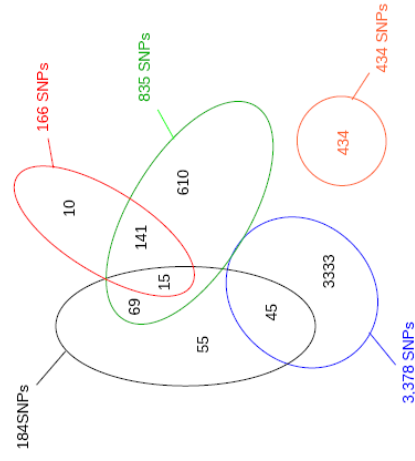
array	Plant material	# SNPs ^a	Facility (genotyping)	Main type of SNPs	Associated projects	Platform	Utility	Reference
1	450 Elite trees of the breeding program Elite trees of the breeding program (160 G0, 161 G1)	384 ⁴	GENOTOUL (2009)	Candidate genes+ in silico	ANR GenoQB Noveltree	Illumina VeraCode	evaluate Illumina SNP- assay for maritime pine Association mapping	Lepoittevin et al. 2010 Lepoittevin et al. 2012
2	Provenance progeny test (Tresneps/Digenfor)	384 ²	BIOGECO (2010)	Candidate genes+in silico	ANR boost-SNP Digenfor Noveltree	Illumina VeraCode	Association mapping	Cabezas et al. 2015
3	Three-generation outbred and inbred pedigrees	1,536 ³	CNG (2010)	Candidate genes-in silico	Evoltree Noveltree	Illumina Golden Gate	Linkage mapping Genetic structure and modelling	Chancerel et al. 2011 unpublished
4	Clonal collection (CLONAPIN)	384 ⁴	CRG (2010)	Candidate genes-in silico	Evoltree Noveltree Adapcon	Illumina VeraCode	Genetic association with climate Heterozygosity-fitness correlations	Jaramillo-Correa et al. 2015 unpublished
5	Three-generation inbred pedigree (472 trees)	384 ^{4,6,6} (2 panels) +2 sets of mass arrays	BIOGECO (May 2011 - May 2012)	In silico mainly	ANR boost-SNP Noveltree Sustainpine	Illumina VeraCode Sequenom Mass-array	QTL mapping	Marguerit et al. 2014 unpublished
6	186 G0 and 500 G1 trees of the breeding program Three-generation outbred and inbred pedigrees Full-sib pedigree	10,593 ⁷ (12k bead types)	Private company (July-Oct 2011)	In silico mainly	Noveltree Sustainpine ANR boost-SNP	Illumina Infinium	genomic prediction Structure, long distance LD and genetic diversity map Linkage mapping	Isik et al. 2015 Plomion et al. 2014 Chancerel et al. 2013
7	1,536 ³ 384 ⁴ coca x coca	1,536 ³ 384 ⁴	CNG (2010) CRG (2010)	Candidate genes-in silico	Evoltree Noveltree Mapinsq	Illumina VeraCode and Goldengate	Linkage mapping	De Miguel et al. 2012
8	Full-sib pedigree: coca x coca	1,536 ⁸	CNIO (2012)	In silico	Mapinsq Sustainpine ProCoGen	Illumina Goldengate	454 Transcriptomics + SNP identification + Linkage mapping	unpublished
9	Full-sib pedigree g01 x oria	1,536 ³ 384 ⁴ 10,593 ⁷	CNIO (2012) CNG (2010) CRG (2010) Private company (2012)	Candidate genes-in silico	Sustainpine Mapinsq ProCoGen	Illumina Goldengate and VeraCode	Linkage & QTL mapping	De Miguel et al. 2014

9	Short-environmental gradients (Valencia)	384 ⁴	CRG (2011)	Candidate genes+in silico	Link Tree VaMPiro	Illumina VeraCode	Environmental-dependent adaptation along small clines	unpublished
10	Populations with contrasted fire regime	384 ⁴	CRG (2011)	Candidate genes+in silico	Link Tree VaMPiro	Illumina VeraCode	Environmental-dependent adaptation along small clines Association mapping in natural populations Demography and fine-scale genetic structure	Budde et al. (2014) unpublished

^a same number indicates identical SNP-array

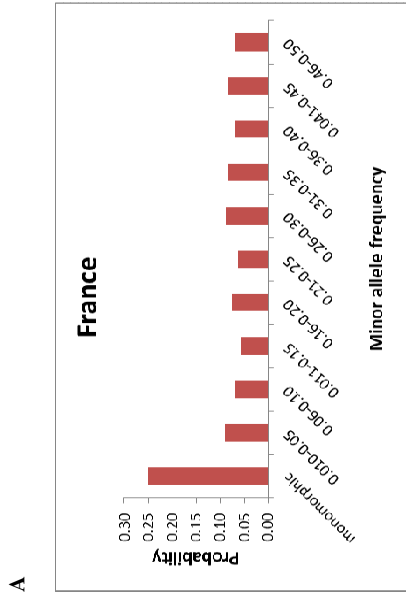
- 3
- 4 • Budde KB, Heuertz M, Hernández-Serrano A, et al. (2014) *In situ* genetic association for serotiny, a fire-related trait, in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *New Phytologist* **201**, 230-241
- 5 • Cabezas JA, González-Martínez SC, Collada C, et al. (2015). Nucleotide polymorphisms in a pine ortholog of the Arabidopsis degrading enzyme cellulase KORRIGAN are associated with early growth performance in *Pinus pinaster*. *Tree Physiologist* (in press).
- 6 • Chancerel E, Lamy JB, Lesur I, et al. (2013) High density linkage mapping in a pine tree reveals a genomic region associated with inbreeding depression and provides clues to the extent and distribution of meiotic recombination. *BMC Biology* **11**, 50.
- 7 • Chancerel E, Lepoittevin C, Le Provost G, et al. (2011) Development and implementation of a highly-multiplexed SNP array for genetic mapping in maritime pine and comparative mapping with loblolly pine. *BMC Genomics* **12**, 368.
- 8 • de Miguel M, de María N, Guevara MA, et al. (2012) Annotated genetic linkage maps of *Pinus pinaster* Ait from a central Spain population based on microsatellites and gene based markers. *BMC Genomics* **13**, 527.
- 9 • de Miguel M, Cabezas JA, de María N, et al. (2014) Genetic control of functional traits related to photosynthesis and water use efficiency in *Pinus pinaster* Ait. drought response: integration of genome annotation, allele association and QTL detection for candidate gene identification. *BMC Genomics* **15**, 464
- 10 • Isik F, Bartholomé J, Farjat A, et al. (2015) Genomic selection in maritime pine. *Plant Science* (in press).
- 11 • Jaramillo-Correa JP, Rodríguez-Quiñón I, Grivet D, et al. (2015) Molecular proxies of climate maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae). *Genetics* **199**, 793-807.
- 12 • Lepoittevin C, Frigerio JM, Garnier-Géré P, et al. (2010) *In vitro* vs *in silico* detected SNPs for the development of a genotyping array: What can we learn from a non-model species? *PLOS ONE* **5**, e11034.
- 13 • Lepoittevin C, Harvengt L, Plomion C, Garnier-Géré P (2012) Association mapping for growth, straightness and wood chemistry-traits in the *Pinus pinaster* Aquitaine breeding population. *Trees Genetics and Genomes* **8**, 113–126.
- 14 • Marguerit E, Bouffier L, Chancerel E, et al. (2014) The genetics of water-use efficiency and its relation to growth in maritime pine. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4757-4768.
- 15 • Plomion C, Chancerel E, Endelman JB, et al. (2014) Genome-wide distribution of genetic diversity and linkage disequilibrium in a mass-selected population of maritime pine. *BMC Genomics* **15**, 171.

Reference	Number of SNPs	Note
Lepoittevin et al. (2010)	166	These SNPs belong to a 384-SNPs Veracode genotyping array comprising 184 SNPs detected in a set of 40 resequenced candidate genes (<i>in vitro</i> SNPs) and 200 SNPs screened from ESTs (<i>in silico</i> SNPs). These SNPs have been used to genotype 456 individuals.
Chancerel et al. (2011)	835	These SNPs belong to a GoldenGate genotyping array comprising 1,536 SNPs detected through the resequencing of amplicons (707 <i>in vitro</i> SNPs) and from ESTs (829 <i>in silico</i> SNPs). These SNPs have been used to genotype 80 offspring from two mapping populations.
Chancerel et al. (2013)	3,378	These SNPs belong to an Illumina genotyping array comprising 12k assays, consisting in a set of 10,224 SNPs identified in 17 cDNA libraries, 223 SNPs already identified by Lepoittevin et al. (2010), 132 SNPs detected in comparative orthologous sequences between pine and spruce, and 14 SNPs detected in a gene fragment including at least one SNP associated with growth in Lepoittevin et al. (2012).
Lavigne et al. (in prep)	184	These SNPs belong to two 384-SNPs Veracode genotyping arrays where SNPs derived from RNAseq data of the H12 accession used in the present study, <u>—</u> and an already designed 1,536-GoldenGate SNP array (Chancerel et al. 2011).
De Miguel et al. (2014)	434	These SNPs belong to an Illumina genotyping array comprising 1,536 SNPs designed using a <i>P. pinaster</i> gene catalog obtained from 454 sequencing of cDNA libraries constructed with different tissues from <u>—</u> siblings submitted to different growing conditions (i.e. drought stress versus control plants). These SNPs have been used to genotype 323 offspring from different mapping pedigrees (Gal1056 x Oriac6, Coca x Coca).

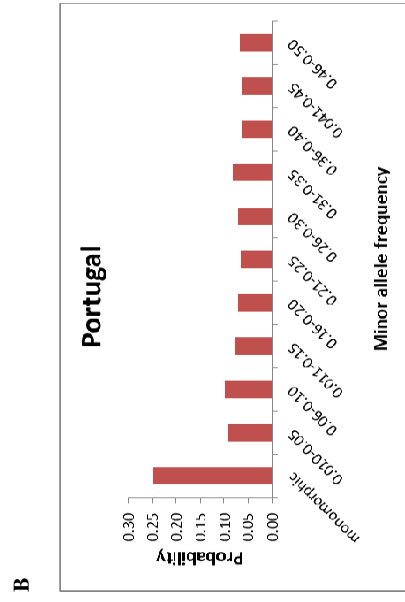


Supplemental Figure 2

45
46
47
48
49
50
51



52
53
54
55

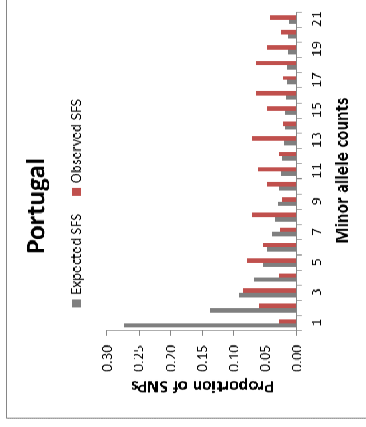


56
57

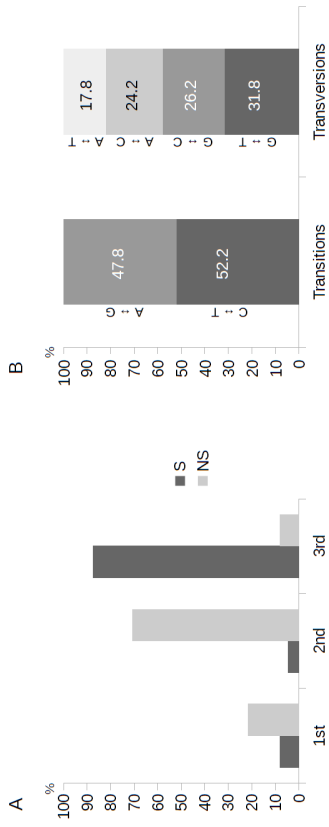
58
59



60
61
62
63



64
65
66



Annexe 2

Daily stem radius fluctuations in maritime pine: variability between full-sibs and environmental effects

(In revision in Annals of Forest Science)

Hélène Lagraulet^{1,2}, Didier Bert^{1,2}, Alexandre Bosc³, Régis Burlett^{1,2}, Yech'an Laizet^{1,2}, Jérôme Bartholomé^{1,2,4}, André Granier⁵, Hervé Cochard⁶, David Frank^{7,8}, Patrick Fonti⁷, Christophe Plomion^{1,2}, Jean-Marc Gion^{1,2,4*}

¹ INRA, BIOGECO, UMR 1202, F-33612 Cestas, France.

² University of Bordeaux, BIOGECO, UMR 1202, F-33400 Talence, France.

³ INRA, ISPA, UMR 1391, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

⁴ CIRAD, UMR AGAP, F-33612 Cestas, France.

⁵ INRA, UMR EEF 1137, INRA/University of Nancy, Champenoux, France.

⁶ INRA, UMR547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France.

⁷ Swiss Federal Research Institute WSL, Zürcherstrasse 111, 8903 Birmensdorf, Switzerland.

⁸ Oeschger Center for Climate Change Research, Zähringerstrasse 25, 3012 Bern, Switzerland.

Daily stem radius fluctuations in maritime pine: variability between full-sibs and environmental effects

Hélène Lagraulet^{1,2}, Didier Bert^{1,2}, Alexandre Bosc³, Régis Burllett^{1,2}, Yech'an Laizet^{1,2}, Jérôme Bartholomé^{1,2,4}, André Granier⁵, Hervé Cochard⁶, David Frank^{7,8}, Patrick Fonti⁷, Christophe Plomion^{1,2}, Jean-Marc Gion^{1,2,4,*}

1 INRA, BIOGECO, UMR 1202, F-33612 Cestas, France.

2 University of Bordeaux, BIOGECO, UMR 1202, F-33400 Talence, France.

3 INRA, ISPA, UMR 1391, F-33140 Villenave d'Omon, France.

4 CIRAD, UMR AGAP, F-33612 Cestas, France.

5 INRA, UMR EEF 1137, INRA/University of Nancy, Champenoux, France.

6 INRA, UMR547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France.

7 Swiss Federal Research Institute WSL, Zürcherstrasse 111, 8903 Birmensdorf, Switzerland.

8 Oeschger Center for Climate Change Research, Zähringerstrasse 25, 3012 Bern, Switzerland.

Hélène Lagraulet : helene.lagraulet@pierroton.inra.fr

Didier Bert : bert@pierroton.inra.fr

Alexandre Bosc : alexandre.bosc@pierroton.inra.fr

Régis Burllett : regis.burllett@u-bordeaux.fr

Yech'an Laizet : ylaizet@pierroton.inra.fr

Jérôme Bartholomé : jerome.bartholome@pierroton.inra.fr

André Granier : agranier@nancy.inra.fr

Hervé Cochard : Herve.Cochard@clermont.inra.fr

David Frank : david.frank@wsl.ch

Patrick Fonti : patrick.fonti@wsl.ch

Christophe Plomion : plomion@pierroton.inra.fr

Jean-Marc Gion : gion@pierroton.inra.fr *

Short title: Daily stem radius fluctuation

Contribution of the co-authors

H Lagraulet conducted the statistical analyses and wrote the manuscript with C Plomion and JM Gion. D Bert, R Burllett, J Bartholomé and JM Gion set up the experiment. Y Laizet and H Lagraulet designed a bioinformatic pipeline to process the dendrometer data. D Bert and H Lagraulet followed the experiment over three years. A Bosc, A Granier, H Cochard, D Frank and P Fonti contributed actively ideas along the project. JM Gion conceived and coordinated the research project.

Funding

This study was supported by grants from the European Union FP7 (PROCOGEN project, n° 289841) and FEDER (ABIOPEN project, no. Presage 32973). HL received a PhD fellowship from INRA (EFPA division and ACCAF metaprogramme) and Région Aquitaine (Contrat Conseil Régional d'Aquitaine project, n°20111203004).

Acknowledgements

We thank INRA Experimental Unit UE0570 for setting up and monitoring the trial. We also thank Anthony Rechler, André Mabilala, Annie Raffin, Laurent Bouffier, Raphael Dulhoste, Raphael Ségura, Frédéric Lagane and Benjamin Denceausse for their contributions to the experimental set-up. Climatic data were obtained from the INRA CLIMATIK network.

Total number of characters: 40242

Number of tables: 4

Number of figures: 6

Daily stem radius fluctuations in maritime pine: variability between full-sibs and environmental effects

Key message: Daily stem radius fluctuation is described for the first time within a large full-sib family of a forest tree species: *Pinus pinaster*. The remarkable level of variability observed between genotypes and across different climatic environments opens the way to study the genetic architecture of this dynamic trait and its interplay with climatic factors.

Abstract

- In long-lived perennial plants, daily and seasonal stem radius fluctuations constitute a major dynamic trait in the response to climatic drivers. Extent of within-family variability of this trait is lacking to study its genetic architecture.
- This study examines the between full-sib variability and climatic effects of daily stem radius fluctuation.
- Point dendrometers were placed on a plot of 117 five-year-old maritime pine trees obtained from a controlled cross involving two genotypes from contrasting ecotypes (western rift in Morocco and Atlantic coast in France). The daily response was characterized over three growing seasons, by two phenotypic variables: maximum daily shrinkage (MDS), a component related to hydraulic functioning, and day-to-day fluctuations of the maximum radius (Δm_{xtr}), a component related to growth. Tree diameters were also measured at the end of each growing season. Environmental data (temperature, relative humidity, soil water content, wind speed and global radiation) were recorded to estimate potential evapotranspiration (PET) and soil water potential (Ψ_{soil}) and to analyze the effect of the environment on these two variables.
- The variability of daily response components was remarkably high within this full-sib family and significant environmental effects on trait variation were detected. As expected Δm_{xtr} was highly correlated to annual growth increment and this holds true over environmental classes of increasing water shortage. We also found that fast growing trees displayed higher MDS plasticity, suggesting this trait as an important component of radial growth performance.

- This study opens up new applied perspectives for the early selection of biomass production in this species and provides the basis for further investigation of the genetic architecture of daily stem radius fluctuations and its interplay with environmental factors.

Key words *Pinus pinaster* , radial growth , dendrometer , radius daily fluctuation , within-species variability

1 Introduction

Maritime pine, *Pinus pinaster* Ait, is an economically and ecologically important species native to Southwestern Europe. Its high timber quality, drought resistance, and rapid growth rate have led to this species being widely planted in this region. It is the most frequently planted species in mainland France, covering over 1.1 million hectares, corresponding to 7% of the total forest area and producing about 30% of the total wood harvest (IGN 2012, FCBA memo 2013). Most of the French plantations of this species are located in Southwestern France along the Atlantic coast (Aquitaine), where they cover around 800,000 hectares.

A high level of variability in biomass production has been reported within this ecotype and used by breeders to develop high yielding varieties (Bouffier et al. 2008). Across the whole distribution area, the large variability in growth performance, revealed in common garden experiments, has been attributed to local adaptation to water availability (Harfouche et al. 2003). Water shortage is a well known abiotic constraint limiting plant growth, and the effect of its scarcity has been well documented in conifer species (Badalotti et al. 2000; Calamassi et al. 2001; Edwards et al. 1995; Sands et al. 1977; Zobel et al. 2001) including Maritime pine (Sabaté et al. 2002). Therefore, wood productivity of many coniferous plantations may be seriously affected by drying out in the summer and the trend towards warming predicted by current climate model simulations (IPCC 2013), as already shown by Loustau et al. (2005) for the intensively managed Maritime pine forest in the Aquitaine region.

Repeated observations (e.g. tree diameter and height) are commonly used to monitor biomass accumulation (Husch et al. 2003). Modeling approaches have been extensively developed to characterize temporal trends in biomass accumulation (Mäkelä et al. 1997; Pretzsch et al. 2002; Solomon et al. 1986; Stage 1973; Vancelay 1994) and to study its genetic basis (Danjoni 1994, Kremer 1981a, 1981b). These models have been used to establish statistical links between inter-annual and long-term growth and climatic variables, but a more comprehensive understanding of the impact of the environment on intra-annual growth trajectories requires daily monitoring. From such short-term observations it would also be possible to identify processes that determine the long-term growth dynamics and susceptibility to climate change. It would be also possible to develop more efficient and cost-effective breeding programs (early selection) and facilitate the discovery of genetic factors (i.e. quantitative trait loci, QTL) underlying growth dynamic variation and their interplay with environmental factors.

Physiological studies based upon dendrometer measurements have shown that the dynamics of water within the plant lead to the cyclic deformation of tissues on a daily scale (Mencuccini et al. 2013; Sevanto et al.

2011; Steppe et al. 2006; Zweifel et al. 2007). These deformations are induced by the evaporative demand of the air and the associated transpiration from leaves (Angeles et al. 2004; Bréda et al. 2006; Dixon and Joly 1895; Dobbertin and Braug 2001; Milburn 1996; Zimmerman and Pospíšilová 1983). The water potential gradient drives the water up through the stem and circulates, in a radial direction, between the xylem and the bark (Sevanto et al. 2011; Steppe et al. 2012; Zweifel et al. 2001). These two processes are coupled to an observable shrinkage or expansion of elastic tissues in the radial direction (Zweifel et al. 2014), buffering water potential throughout the plant (Cruziat et al. 2002). The timing and magnitude of daily variations in stem size are generally determined principally by changes in transpiration rates and soil water content (Cermak et al. 2007; Kozlowsky and Winget 1964). These daily cycles are highly dependent on local climatic conditions and can change rapidly with weather conditions (e.g. King et al. 2012 in European larch and Norway spruce, Vieira et al. 2013 in Maritime pine). The maximum daily shrinkage (MDS) of the trunk diameter (Garnier and Berger 1986) is thus a relevant parameter for the analysis of daily fluctuations of water balance in tissues.

Tree stem size also varies due to the secondary (i.e., radial) growth resulting from cell division in the cambium and subsequent cell expansion (Deslauriers et al. 2007; Downes et al. 1999; Irvine and Grace 1997; Turcotte et al. 2009; Zweifel et al. 2000). An interaction between hydraulic and carbon-related processes determines the long-term increase in radius. This irreversible growth requires sufficient water transport for an increase in internal cell turgor pressure, leading to cell expansion and facilitating the incorporation of carbohydrates into the structure of the cell (Daudet et al. 2005; Genard et al. 2001; Lockhart 1965; Steppe et al. 2006). This component of stem variation can be assessed by calculating the difference between successive daily maximum trunk radius values (Δm_{XTR}).

Automatic dendrometers, which record stem radius at sub-hourly and micrometer resolution, are a powerful tool for the continuous monitoring of changes in stem radius during the course of the year and for characterizing seasonal tree growth (e.g., Bouriaud et al. 2005; Carrer et al. 1998; Fritts 1961; Hertzog et al. 1995; Tardif et al. 2001). Such measurements have been performed on many tree species around the world (Daubenmire 1945; Daudet et al. 2005; Deslauriers et al. 2003; Drew and Downes 2009; Zweifel et al. 2001; Sevanto et al. 2011; Steppe et al. 2006) including maritime pine (Vieira et al. 2013). Noteworthy, these studies always included a limited number of genotypes within species, precluding statistical tests to evaluate genetic effects on phenotypic variation. The genetic variability of stem radius fluctuations within species and the genetic determinism of this trait thus remain largely unknown. However, evidence of individual variation is crucial for breeding applications and for studying the genetic architecture of quantitative traits through QTL mapping.

In this study, we used high-resolution dendrometer data recorded over three growing seasons, to study the genetic variability and phenotypic plasticity of daily stem radius fluctuations in Maritime pine. We tested the hypotheses that daily stem radius fluctuations are both genetically and environmentally controlled and that cumulative annual radial increment is related to daily response traits. We monitored the annual increment, growth trajectories and daily stem radius fluctuations for 117 genotypes belonging to a single full-sib progeny between parental trees from Morocco (used as female) and France (used as male). By monitoring the trees over three seasonal growing periods, we were able to classify the daily signal according to the main environmental factors (evapotranspiration and soil water potential), making it possible to quantify environmental plasticity of the studied traits. The analyses of these two main factors of variation shed new lights on the determinism of phenotypic variability for daily stem radius fluctuations in this species.

2 Material and methods

2.1 Study site, plant material and experimental design

This study was carried out in the experimental forest of INRA Cestas, France (44°44'36.0"N 0°46'58.7"W) where a factorial design of three connected full-sib families (controlled crosses from three accessions from Landes, Corsica and Morocco), was installed. This setting comprised 1,541 maritime pines (*Pinus pinaster* Ait.) of the same age (plantation in 2006, 5 to 7 years old in the studied period 2011 - 2013). Tree density was 1,250 trees per hectare (4m between lines and 2m between trees on the same line). The canopy was still open at the end of the experiment, and there was therefore no apparent competition for light between trees. Trees monitored for daily stem radius fluctuations for this study belonged to the Morocco x Landes cross (Landes accession # 0284_2 from Cestas in the Aquitaine Region, 44°41'29.4"N 0°51'14.8"W and Moroccan accession # 112_4_1 from Jbel Berkane in the western rift, 34°43'43.0"N 3°47'20.5"W, Online Resource 1). These ecotypes are known to differ in terms of growth performance, stem form, resistance to biotic and abiotic stresses (Debazzac 1964). The original living conditions of the French and Moroccan parents are characterized by a mean annual evapotranspiration of 790 and 1,055 mm, a mean annual precipitation of 817 and 348 mm and a mean annual temperature of 15 and 17°C, respectively. During the study period (March 2011 - February 2014), an annual mean cumulative evapotranspiration of 806 mm was recorded on the experimental site.

2.2 Growth-related traits measured annually

Trunk diameters were measured 20 cm above ground level, with a sliding caliper, at the end (December) of the 2010 and 2011 growing seasons, and with a tape measurement at the end of the 2012 and 2013 growing seasons, because of the stem size evolution. These measurements were used to calculate annual diameter increments, referred to as the 2011, 2012 and 2013 increments. Both techniques have similar precision (0.1 mm).

2.3 Recording of dendrometer data

Point dendrometers were installed, in February 2011, on 117 five-years-old trees, 20 cm above the ground, on the eastern side of the stem (as the prevailing wind was from the west). Trees were selected within the experimental setting, on the basis of their proximity to the datalogger. Two blocks of *ca.* 60 neighbouring trees were selected for measurement (Online resource 2). Each block included one datalogger and two multiplexors (CR1000, Campbell Scientific Ltd. France, Campbell Park Road, 80 Hathern Road, Shepshed, Leicestershire, LE12 9GX, UK), powered by a battery connected to a solar panel. Dendrometers were initially mounted on a PVC half-cylinder and screws (2011 growing season). This setup was subsequently modified such that the dendrometers were mounted on straight aluminium frames, which were both more rigid and better able to accommodate rapid stem diameter growth (in the 2012 and 2013 growing seasons). The radius of each of the trees was measured every five minutes, with an LM10 conductive polymer potentiometer (Radiospare Components, Oxford, UK), from March 2011 to February 2014. We corrected for fluctuations due to frame dilatation as a function of the type of frame (plastic or aluminium) before data analysis. A full description of the technical setting is provided as supplemental information (Online Resource 2).

2.4 Daily stem radius fluctuation-related traits

We analyzed two parameters characterizing daily radius fluctuations: (1) maximum daily shrinkage (MDS), and (2) day-to-day changes in maximum radius value (Δm_{tr}) (Figure 1). MDS and Δm_{tr} were calculated from the maximum and minimum trunk radii (m_{tr} and m_{tr} , respectively) according to the following equations:

$$\text{MDS} = ((m_{\text{tr}2} + m_{\text{tr}1})/2) - m_{\text{tr}1}$$

Eqn 1

276

$$\Delta m_{\text{tr}} = m_{\text{tr}2} - m_{\text{tr}1}$$

Eqn 2

The subscripts "1" and "2" correspond to the day of measurement and the following day, respectively.

These two components are widely used to describe daily stem radius fluctuations. MDS is a mostly hydraulic signal, whereas Δm_{tr} represents a combination of hydraulic and growth components. We used the mean of two consecutive maximal radii to estimate the growth component and to remove it from the daily hydraulic signal for measurements of MDS. It should be noted that Δm_{tr} , which is classically used to describe only the pure growth component, can be negative in our dataset. This reveals the presence of a hydraulic signal superimposed on Δm_{tr} measurements (see also King et al. 2012). We excluded 32 of the 1,075 days of the experiment (3%) from the dataset because they displayed values out of sensor range, attributed to electric disruption.

2.5 Environmental variables

Penman-Monteith potential evapotranspiration (PET, mm, Monteith 1965) was calculated hourly and cumulated daily. Air temperature and relative humidity were measured on each block at five-minute intervals, with hourly averaging. Global radiation (GR, W/m²) and wind speed (m.s⁻¹) were measured at a weather station located ~300 m from the experimental trial.

Volumetric soil water content (SWC) was measured with reflectometer probes (Campbell Scientific CS616). Each block included two probes buried at 15 cm depth, one probe at a depth of 30 cm and one at a depth of 45 cm. Measurements were averaged daily for each depth and summed over the profile for the calculation of soil water content at time *i* (SWC_{*i*}, mm) (Eqn 3). We assumed that the 15 cm and 30 cm depth probes explored a 15 cm soil layer and we extrapolated the 45 cm depth probe values over 70 cm, to estimate water content at a depth of 1 m.

From soil water content, the relative extractable water (REW_{*i*}) was calculated at time *i*, as follows:

$$\text{REW}_i = (\text{SWC}_i - \text{SWC}_{\text{wp}}) / (\text{SWC}_{\text{fc}} - \text{SWC}_{\text{wp}})$$

Eqn 3

Where subscripts WP and FC refer to permanent wilting point and field capacity measured on site, respectively.

277

Soil water potential (Ψ_{soil} , MPa) was then estimated with a non-rectangular hyperbola fitted to previous measurements performed on this soil type:

$$\Psi_{\text{soil}} = \frac{c}{(a+b\text{REW})^2 - 3.2ab\text{REW} + 0.5) + 1.6} + c \quad \text{Eqn 4}$$

In which $a=1.6$, $b=8.0$, and $c=-1.7$

Days were also grouped into classes of PET and Ψ_{soil} . Each environmental variable was classified into five groups, each corresponding to 20% of the variability observed in the experiment: $x < 1.5$, $1.5 < x \leq 3$, $3 < x \leq 4.5$, $4.5 < x \leq 6$ and $x > 6$ for PET (mm) and $0 > x \geq -0.4$, $-0.4 > x \geq -0.5$, $-0.5 > x \geq -0.6$, $-0.6 > x \geq -0.7$ and $x < -0.7$ for Ψ_{soil} (MPa). This way, trait variation could be analyzed along an environmental gradient.

2.6 Relationships between daily stem radius fluctuation components and diameter increment

To analyze the relationships between daily stem radius fluctuation components and diameter increment we first calculated Pearson correlation coefficients between Δm_{tr} (annual sum or mean over the environmental gradient defined above), and diameter increment (annual increment, and total increment over the period studied). Second we used the following approach to assign a predictive value for radial growth to daily stem radius fluctuation components in a range of environmental conditions: i) trees were sorted by cross and ranked according to their increase in diameter, ii) categories were defined, each encompassing 20% of the ranked individuals (from the smallest to the largest diameter increment), iii) mean differences in MDS and Δm_{tr} between sets of extreme climatic conditions (PET=0 vs. PET>6, $\Psi_{\text{soil}}=0$ vs. $\Psi_{\text{soil}}<-0.7$) were calculated for each category, and finally iv) Tukey Honest Significant Differences tests were performed for the comparison of categories.

2.7 Statistical analysis

We implemented a linear mixed-effect model (*R*-packages lme4, Bates et al. 2013 and lmerTest, Kuznetsova et al. 2013, R core development team 2013) taking into account the dependence structure of the data for fixed and random effects. We estimated environmental (PET, Ψ_{soil}) effects on MDS and Δm_{tr} . The

genotypes (individual trees) were considered as random genetic effects (Eqn 5). We also integrated the interactions between random and fixed effects in the models.

$$Y = X\beta + Z\mu + \epsilon \quad \text{Eqn 5}$$

With,

- Y: vector of observations (here MDS or Δm_{tr})
- β : vector of fixed effects (here PET and Ψ_{soil}).
- μ : vector of random effects (individual effect and interactions with PET and Ψ_{soil})
- ϵ : vector of residuals
- X and Z: incidence matrices linking the observations Y to the effects β and μ , respectively.

A variance was fitted for each random effect (genetic variance among full-sibs and residual variance).

The same way, we used a linear model to test the individual effect separately, on MDS and Δm_{tr} , in each environmental category described above.

3 Results

3.1 Environmental variations

Meteorological conditions varied considerably between years for the three years of measurement (2011, 2012 and 2013). At the experimental site, monthly mean temperature ranged from 1.8°C (February 2012) to 23°C (July 2013), with an overall mean value of 13.1°C, and monthly mean precipitation ranged from 4 mm (February 2012) to 212 mm (December 2011), with an overall mean value of 86 mm (Figure 2A). Minimum daily soil water potential (Ψ_{soil}) also varied considerably over time ranging from -0.17 MPa (winter period, early spring) to -0.83 MPa (September 2012), with a mean value of -0.27 MPa. Values were minimal from June to December in 2011, from July to September in 2012 and from the end of August to September in 2013. Daily potential evapotranspiration (PET) ranged from 0 mm (December-January 2011, 2012 2013 and January 2014) to 6.4 mm (June 2011), with a mean value of 1.8 mm. Values were minimal during winter conditions (December-January) and maximal in the summer (June, July and August). Nevertheless, annual PET did not vary to a large extent: 839, 808 and 773 mm in 2011, 2012 and 2013, respectively (Figure 2B).

3.2 Phenotypic variability of radial growth trajectory

Out of the 117 initially monitored trees, 8 (6%) were removed from the dataset due to a high rate of missing values (>30%). The final analysis thus concerned 109 trees. We plotted the radial variations obtained from daily mean dendrometer values for the whole dataset over the study period (Figure 2C). Initial diameters were set to zero, for better comparison of radial variations among individual trees. Overall the growth trajectories were similar for all trees. As expected, low rates of stem size increase, were observed in June 2011, August 2012 and September 2013 (indicated by horizontal arrows in Figure 3C), corresponding to the periods of lowest SWC, and therefore Ψ_{soil} and highest PET (Figure 2B). Over the 1,075 days studied, the coefficients of phenotypic variation ranged from 11 to 30% (see Online Resource 3). The largest trees had a double radial increment compared to those of the smallest trees (37.02 mm vs 19.75 mm of radial increment during the studied period) at the end of the study period (February, 2014).

3.3 Seasonal dynamics of daily stem radius fluctuations

Two parameters were used to describe the seasonal dynamics of MDS and Δm_{tr} : the daily cross mean (red dots in Figure 3) and the intra-cross variability (grey dots). Daily mean MDS fluctuated over the years studied, displaying a linear increase during the growing season, followed by a linear decrease in winter (from 325 μm to 15 μm , see Figure 3A). Δm_{tr} fluctuated considerably as well during the growing season (from 233 μm to -75 μm) and plateaued out around zero during the resting phase (Figure 3B). Both MDS and Δm_{tr} displayed high levels of intra-cross variability, particularly during the growing season. We therefore analyzed the covariation of climatic data and daily stem radius fluctuation components for the growing periods only (see next section).

3.4 Effects of environmental and genetic factors on daily stem radius fluctuations

Two approaches were used to investigate both genetic and environmental effects, on stem radius fluctuations during the growing season. Mean circadian cycles were first categorized by the 10 environmental classes described in the Materials and Methods section to assess their evolution across an environmental gradient. Similar patterns were observed for all individuals among these classes (Figure 4). As expected, the amplitude of the daily cycle increased with PET, due to an increasing internal gradient of water potential. With decreasing Ψ_{soil} , the amplitude of the daily cycle initially increased slightly (from the 0 MPa to -0.4 MPa class

280

to the -0.5 MPa to -0.6 MPa class) and then decreased, as for lower Ψ_{soil} values (<0.6 MPa). The mixed linear model revealed highly significant effects of PET and Ψ_{soil} for both variables (Table 1A).

In a second approach we considered the mean daily values of MDS and Δm_{tr} , to decipher general dependence to the PET and Ψ_{soil} gradients, separately (Figure 5). We found that MDS increased linearly with PET, with 33% increases from PET<1.5 to PET>6 (Figure 5A). A different pattern was observed with decreasing Ψ_{soil} (Figure 5B): MDS increased from 0 MPa to -0.5 MPa (25% increase) and then decreased from -0.5 MPa to the lowest Ψ_{soil} values (35% decrease). Conversely, Δm_{tr} decreased linearly with increasing PET: from 65 μm for PET<1.5 to -45 μm for PET>6 (Figure 5C). A similar pattern was observed for decreasing Ψ_{soil} values, with a 71% decrease from 0 > Ψ_{soil} > -0.7 MPa, with the same tipping point as for MDS (around -0.55 MPa, Figure 5D). Thus, PET and Ψ_{soil} had similar effects on Δm_{tr} , but not on MDS.

With respect to random effects (Table 1B), the variance of the interaction term "PET: id" was negligible, that of " Ψ_{soil} : id" was of similar magnitude to that of the residual term for both traits, suggesting a strong genotype x water shortage interaction effect, and much higher than that of the individual effect. Coefficients of variations were also determined for each PET and Ψ_{soil} category, in order to estimate individual variability (Table 2). High individual variability for MDS (from 23% to 47%) and extremely high variability for Δm_{tr} (up to 326%) were observed. Noteworthy, this variability was about an order of magnitude greater than that observed for the annual radial increments (11% to 30%).

3.5 Relationship between daily stem radius fluctuation components and diameter increment

We found remarkably high significant correlations (Pearson p-values <0.05) between annual sum of Δm_{tr} and annual diameter increment within the same growing season (Table 3). However, the strength of this correlation decreased between different seasons, suggesting Δm_{tr} to be under environmental control. To study the variation of the correlation between Δm_{tr} and radial increment of individuals through different environmental conditions, days were separated into classes of increasing water shortage and correlations were calculated between mean Δm_{tr} and total radial increment over the study period (2011-2013). Correlations were found to range from non significant to high for the more to the less constraint environmental classes, respectively (Table 4). Correlations between mean of MDS and total diameter increment were not significant.

We then used the approach described in the Materials and Methods section to assign a predictive value to daily stem radius fluctuation components for total radial growth. We found that the categories of trees with the

281

largest diameter increments presented significantly higher levels of MDS variation than those with the smallest diameter increments (Figure 6), while no significant difference was found for Δm_{xtr} (data not shown). This result suggests a relationship between MDS plasticity and annual diameter increment.

4. Discussion

The amount of genetic variation available within species, its mode of transmission (heritability), and selection intensity (natural selection in response to environmental cues in natural population or truncation selection in breeding programs) are key factors predicting the genetic response to selection of all organisms. The role of this evolutionary process over a small number of generations is particularly relevant in forest trees, because climate change is occurring over the time scale of only a few generations of these long-lived species. Locally adapted populations are generally observed for most forest tree species, but it has been suggested that trees may adapt rapidly to changes in climate occurring over short time scales, thanks to high level of standing genetic variation. Common garden experiments have provided important information about the level and structure of genetic variability for so-called "adaptive" traits (i.e. related to fitness) in many forest tree species (reviewed in Alberto et al. 2013). Most traits (including growth) have been shown to display high levels of variation both within and between populations. The within-population variation observed has been attributed to the remarkable amount of standing genetic variation in trees due to high levels of gene flow, high fecundity and the accumulation of mutations in populations of large effective size (Petit and Hampe 2006). The between-population variation observed has been attributed to local adaptation to environmental heterogeneity, due to large geographic ranges (Savolainen et al. 2007). As a first step toward a large scale investigation of within species genetic variability and the genetic architecture of daily stem radius fluctuation components in Maritime pine, we developed here a pilot study based on high-resolution dendrometers to analyse the variability of daily stem radius fluctuations in a single full-sib progeny, and its interplay with environmental conditions driven mostly by the evaporative demand (PET) and the soil water availability (Ψ_{soil}). A time trend analysis of daily stem radius fluctuations and its two components showed seasonal dynamics, following the pattern of environmental variation, with the amplitude of the daily cycle increasing with increasing PET and to a certain extent with decreasing Ψ_{soil} .

4.1 Seasonal dynamics of radial increment and daily radius fluctuation components

The analysis of radial growth curves over three growing periods showed that relative decreases in growth rate corresponded to periods of highest water stress conditions i.e lowest Ψ_{soil} and highest PET for all individuals (see the plateau in figure 3C). This observation suggests that the cessation of growth is tightly synchronized with decreasing soil water content, with growth stopping when soil water content falls below a certain threshold, corresponding to water shortage (Granier et al. 1995). Individual growth patterns also showed high levels of phenotypic variability. This second observation confirms that trees growing at the same site and subjected to the same climate exhibit different growth dynamics (Rathgeber et al. 2011), depending on their genetic composition.

MDS fluctuated over the year, with a linear increase during the growing period and a linear decrease during the winter (Figure 3). As expected, MDS increased linearly with increasing PET (Figure 5), due to an increasing internal water potential gradient (in response to an increase in evaporative demand). However, the trees studied in this setting were not submitted to extreme climatic conditions during the study period, otherwise, MDS would decrease again in conditions of severe stress, as suggested by (Granier and Berger 1986). Also, the patterns observed might differ for trees growing in conditions of persistent extreme drought stress (e.g., the conditions of Morocco).

We found that Δm_{xtr} fluctuated considerably over the year, displaying low levels of variation around zero outside the growing season (Figure 3). Under favorable conditions, the radius of the trees increases, due to secondary growth (Drew and Downes 2009, 2010; Rossi et al. 2008; De Schepper et al. 2012). In conditions of high transpiration demand, the stem exchanges water between its elastic tissues (inner bark and cambium, including dividing and enlarging cells and the phloem) and the transpiration stream. The day-to-day difference may therefore be negative and proportional to this loss of water (Drew et al. 2011; King et al. 2012 Zweifel et al. 2000). Consequently, Δm_{xtr} linearly decreased with PET during the growing period (Figure 5) and remained close to zero in the winter, during which only fluctuations in stem internal storage were observed.

4.2 Individual variability of daily radius fluctuation components

Analyses focusing on the growing period revealed high levels of variability in the daily response to climatic drivers between individuals (Figure 4). The coefficients of variation for MDS and Δm_{xtr} displayed very high levels of inter-individual variability (Table 2), suggesting that the genetic background of individuals influenced their hydraulic functioning under fluctuating environmental conditions. Variance component analysis

for MDS and Amxtr showed significant environment and individual effects. The phenotypic variability of the daily response was thus found to be genetically and environmentally controlled.

4.3 Physiological interpretation

It is well known that stomata progressively close until the afternoon, keeping water potentials above the xylem cavitation threshold (Loustau et al. 1996). This stomatal closure has physiological consequences, in the form of photosynthesis decrease and slower secondary growth, due to the allocation of carbon to higher-ranking physiological processes, such as root growth (Chaves et al. 2002; Oribe et al. 2003; Zweifel et al. 2006). As a result, trees decrease their metabolic rates and enter quiescence (Cherubini et al. 2003; McDowell et al. 2008). During the summer, trees are unable to compensate for the daily loss of water, resulting in the most negative Δm_{xtr} values. Our results also suggest that the mechanisms controlling stomatal function are under strong genetic control in agreement to recent results about the genetics of water use efficiency in maritime pine (Marguerit et al. 2014). Indeed, a higher MDS would lead to a larger stomatal aperture, thereby facilitating carbon acquisition and growth. The relationships between growth performance and daily stem radius fluctuations are consistent with this hypothesis. As a matter of fact, individuals with higher levels of MDS variation (in response to water shortage) also presented larger radial increments over the period studied. This result suggests that MDS could be used as a proxy for radial growth performance.

5 Conclusion

This study is the first to report the variability of daily stem radius fluctuations within a full-sib progeny and the effect of environmental conditions. Remarkably, daily traits were found to display extremely high levels of variability between full-sibs and were found to display significant environment (PET, ψ_{soil}) effect. We also found that MDS plasticity was positively correlated with radial increment, suggesting a relationship between the plasticity of daily functioning and cumulative radial growth. Daily stem radius fluctuations are thus a good proxy for the estimation of radial growth within the range of environmental conditions tested. Further research directions include: i/ the development of a more complex modelling of the daily signals of individual trees to extract information about other traits, based on the underlying physiological mechanisms, ii/ the analysis of the ecotypic variability, which is of main relevance in such a scattered distributed species over a range of environmental conditions in its natural range, and iii/ the dissection of the genetic architecture (number, location and effect of quantitative trait loci) of daily response traits to better understand the relationships between daily response and cumulative growth. An understanding of the roles of phenotypic plasticity, genetic variability, and the interactions between them in the determination of growth-related traits in a biological organism is of fundamental importance for deciphering the mechanisms of adaptation to environment disturbances. In breeding programs, this knowledge is a prerequisite to develop sustainable varieties that will perform well across the wide range of climatic conditions throughout the life-span of a tree.

6 References

- Alberto FJ, Aitken SN, Alía R, González-Martínez SC, Hänninen H *et al.* (2013) Potential for evolutionary responses to climate change – evidence from tree populations. *Global Change Biology* 19:1645-1661.
- Angeles G, Bond B, Boyer JS, Bodrihb T, Burns MJ *et al.* (2004) The Cohesion-Tension Theory. *New Phytologist* 163: 451–452.
- Badalotti A, Anfodillo T, Grace J. (2000) Evidence of osmoregulation in *Larix decidua* at Alpine treeline and comparative responses to water availability of two co-occurring evergreen species. *Annals of Forest Science* 57: 623-633.
- Bates D, Maechler M, Bolker B. (2013) lme4: Linear-mixed Effects Models Using Eigen and S4 Classes. Retrieved from: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4> (R package version 0.999999-2).
- Bouffier L, Raffin A, Kremer A. (2008) Evolution of genetic variation for selected traits in successive breeding populations of maritime pine. *Heredity* 101: 156-165.
- Bouriaud O, Leban JM, Bert D, Deleuze C. (2005) Intra-annual variations in climate influence growth and wood density of Norway spruce. *Tree Physiology* 25: 651-660.
- 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: 625-44.
- Calamassi R, Rocca GD, Falusi M, Paolettinib E, Strati S. (2001) Resistance to water stress in seedlings of eight European provenances of *Pinus halepensis* Mill. *Annals of Forest Science* 58: 663-672.
- Carrer M, Anfodillo T, Urbinati C, Carraro V. (1998) High-altitude forest sensitivity to global warming: results from long-term and short-term analyses in the Eastern Italian Alps. In: Beninston M, Innes JL (eds) *The impacts of climate variability on forests*. Springer, Berlin 171–189.
- Cernaik J, Kucera J, Bauerle WL, Phillips N, Hinkleley TM. (2007) Tree water storage and its diurnal dynamics related to sap flow and changes in stem volume in old-growth Douglas-fir trees. *Tree Physiology* 27: 181–198.
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP *et al.* (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Cherubini P, Gartner BL, Tognetti R, Braker OU, Schoch W *et al.* (2003) Identification, measurement and interpretation of tree rings in woody species from Mediterranean climates. *Biol Rev Camb Philos Soc* 78: 119-148.
- Cruiziat P, Cochard H, Ameglio T. (2002) Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science* 59: 723–752.
- Danjon F. (1994) Stand Features and Height Growth in a 36-Year-Old Maritime Pine (*Pinus-Pinaster Ait*) Provenance Test. *Silvae Genetica* 43: 52-62.
- Daubenmire RF. (1945) An improved type of precision dendrometer. *Ecology* 26: 97-8.
- Daudet FA, Ameglio T, Cochard H, Archilla O, Lacombe A. (2005) Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations. *Journal of Experimental Botany* 56: 135–144.
- De Schepper V, van Dusschoten D, Copini P, Jahnke S, Steppke K. (2012) MRI links stem water content to stem diameter variations in transpiring trees. *Journal of Experimental Botany* 63: 2645-53.
- Debazac EF. (1964) *Manuel des conifères*. ENGREF, Nancy, 172p.
- Deslauriers A, Morin H, Urbinati C, Carrer M. (2003) Daily weather response of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) stem radius increment from dendrometer analysis in the boreal forests of Quebec (Canada). *Trees* 17: 477–484.
- Deslauriers A, Rossi S, Anfodillo T. (2007) Dendrometer and intraannual tree growth: what kind of information can be inferred? *Dendrochronologia* 25: 113–124.
- Dixon HH, Joly J. (1895) *On the ascent of sap*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 186: 563–576.
- Dobbertin M, Braung P. (2001) Crown defoliation improves tree mortality models. *Forest Ecology and Management* 141: 271-84.
- Downes G, Beadle C, Worledge D. (1999) Daily stem growth patterns in irrigated *Eucalyptus globulus* and *Pinus* in relation to climate. *Trees* 14: 102–111.
- Drew DM, Downes GM, Battaglia M. (2010) CAMBIUM, a process-based model of daily xylem development in *Eucalyptus*. *Journal of Theoretical Biology* 264: 395-406.
- Drew DM, Downes GM. (2009) The use of precision dendrometers in research on daily stem size and wood property variation: A review. *Dendrochronologia* 27: 159-177.
- Drew DM, Richards AE, Downes GM, Cook GD, Baker P. (2011) The development of seasonal tree water deficit in *Callitris intratropica*. *Tree Physiology* 31: 953–964.

Edwards DR, Dixon MA. (1995) Mechanisms of drought response in *Thuja occidentalis* L. II. Post-conditioning water stress and stress relief. *Tree Physiology* 15: 129-133.

Ehrenberger W, Rüger S, Fitzke R, Vollenweider P, Günthardt-Goerg M, *et al.* (2012) Concomitant dendrometer and leaf patch pressure probe measurements reveal the effect of microclimate and soil moisture on diurnal stem water and leaf turgor variations in young oak trees. *Functional Plant Biology* 39: 297-305.

Fritts HC. (1961) An evaluation of three techniques for measuring radial tree growth. *Bulletin of the Ecological Society of America* 42: 54-55.

Garnier E, Berger AA. (1986) Effect of water stress on stem diameter changes of peach trees growing in the field. *Journal of Applied Ecology* 23: 193-209.

Genard M, Fishman S, Vercambre G, Huguenot JG, Bussi C *et al.* (2001) A biophysical analysis of stem and root diameter variations in woody plants. *Plant Physiology* 126: 188-202.

Granier A, Badeau V, Breda N. (1995) Modélisation du bilan hydrique des peuplements forestiers. *Revue Forestière Française* XLVII: 59-68.

Harfouche A. (2003) Retrospective early test for adult vigor of Pinus pinaster families grown under two water regimes. Implications for early selection. *Annals of Forest Science* 60: 539-547.

Herzog KM, Häslér R, Thum R. (1995) Diurnal changes in the radius of a subalpine Norway spruce stem: their relation to the sap flow and their use to estimate transpiration. *Trees* 10: 94-101.

Husch B, Beers TW, Kershaw JA. (2003) *Forest mensuration*. John Wiley & Sons, New Jersey, USA

Intrigliolo DS, Castel JR. (2004) Continuous measurement of plant and soil water status for irrigation scheduling in plum. *Irrigation Science* 23: 93-102.

Irvine J, Grace J. (1997) Continuous measurements of water tensions in the xylem of trees based on the elastic properties of wood. *Planta* 202: 455-461.

King G, Fonti P, Nievegelt D, Bungen U, Frank D. (2012) Climatic drivers of hourly to yearly tree radius variations along a 6°C natural warming gradient. *Agricultural Forest Meteorology* 168: 36-46.

Kozłowski TT, Winget CH. (1964) Diurnal and seasonal variation in radii of tree stems. *Ecology* 45: 149-55.

Kremer A. (1981a) Genetic-Control of Height Growth in Pinus-Pinaster .2. Interannual Pattern, Genotypexyear Interaction. *Annales Des Sciences Forestieres* 38: 331-355.

Kremer A. (1981b) Genetic-Control of Height Growth in Pinus-Pinaster (Pinus-Pinaster Ait) .3. Evolution of the Components of the Phenotypic and Genotypic Variance. *Annales Sciences Forestières* 38: 355-375.

Kuznetsova A, Christensen RHB, Brockhoff PB. (2013) lmerTest: Tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package). R-Version: 1.1-0. <http://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/index.html>

Lockhart JA. (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8: 264-275.

Loustau D, Berbigier P, Roumagnac P, ArrudaPacheco C, David JS *et al.* (1996) Transpiration of a 64-year-old maritime pine stand in Portugal .1. Seasonal course of water flux through maritime pine. *Oecologia* 107: 33-42.

Loustau D, Bosc A, Colin A, *et al.*. (2005) Modeling climate change effects on the potential production of French plains forests at the sub-regional level. *Tree Physiology* 25: 813-823.

Mäkelä A, Vänninen P, Ikonen VP. (1997) An application of process-based modeling to the development of branchiness in Scots pine. *Silva Fennica* 31: 369-380.

Marguerit E, Bouffier L, Chancerel E, Costa P, Lagane F *et al.* (2014) The genetics of water-use efficiency and its relation to growth in maritime pine. *Journal of Experimental Botany* 1.

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N *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.

Mencuccini M, Hölttä T, Sevanto S, Nikinmaa E. (2013) Concurrent measurements of change in the bark and xylem diameters of trees reveal a phloem-generated turgor signal. *New Phytologist* 198: 1143-54.

Milburn JA. (1996) Sap ascent in vascular plants: Challenges to the cohesion theory ignore the significance of immature xylem and the recycling of Munch water. *Annals of Botany* 78: 399-407.

Monteith JL. (1965) Evaporation and environment. In G.E. Fogg (ed.) *Symposium of the Society for Experimental Biology. The State and Movement of Water in Living Organisms*. Academic Press. Inc., NY. 19: 205-234.

Oribe Y, Funada R, Kubo T. (2003) Relationships between cambial activity, cell differentiation and the localization of starch in storage tissues around the cambium in locally heated stems of *Abies sachalinensis* (Schmid) Masters. *Trees* 17: 185-192.

Petit RJ and Hampe A. (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 37: 187-214.

Pretzsch H, Biber P, Durský J. (2002) The single tree-based stand simulator SILVA: construction, application and evaluation. *Forest Ecology and Management* 162: 3–21.

Rathgeber CBK, Rossi S, Bontemps JD. (2011) Cambial activity related to tree size in a mature silver-fir plantation. *Annals of Botany* 108: 429–438.

Rossi S, Deslauriers A, Gricear J, Seo JW, Rathgeber CBK *et al.* (2008) Critical temperatures for xylogenesis in conifers of cold climates. *Global Ecology and Biogeography* 17: 696–707.

Sabate S, Gracia CA, Sanchez A. (2002) Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. *Forest Ecology and Management* 162: 23–37.

Sands R, Clarke A. (1977) Response of radiata pine to salt stress. I. Water relations, osmotic adjustment and salt uptake. *Functional Plant Biology* 4: 637–646.

Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knuuti T. (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 595–619.

Sevanto S, Hölttä T, Holbrook NM. (2011) Effects of the hydraulic coupling between xylem and phloem on diurnal phloem diameter variation. *Plant, Cell & Environment* 34: 690–703.

Simonneau V, Duchemin B, Helson D, Er-Raki S, Olliso A, Chehbouni AG. (2007) The use of high-resolution image time series for crop classification and evapotranspiration estimate over an irrigated area in central Morocco. *International Journal Remote Sensing* 29: 95–116.

Solomon DS, Hosmer RA, Hayslett HT Jr. (1986) A two-stage matrix model for predicting growth of forest stands in the Northeast. *Canadian Journal of Forest Research*. 16: 521–528.

Stage AR. (1973) Prognosis model for stand development. U.S. Forest Service. Research. Paper. INT-137.

Steppe K, Cocharad H, Lacoite A, Ameglio T. (2012) Could rapid diameter changes be facilitated by a variable hydraulic conductance? *Plant Cell and Environment* 35: 150–7.

Steppe K, De Pauw DJW, Lemeur R, Vanrolleghem PA. (2006) A mathematical model linking tree sap flow dynamics to daily stem diameter fluctuations and radial stem growth. *Tree Physiology* 26: 257–73.

Tardif J, Flannigan M, Bergeron Y. (2001) An analysis of the daily radial activity of 7 boreal tree species, North-western Québec. *Environmental Monitoring and Assessment* 67: 141–160.

Turcotte A, Morin H, Krause C, Deslauriers A, Thibeault-Martel M. (2009) The timing of spring rehydration and its relation with the onset of wood formation in black spruce. *Agricultural and Forest Meteorology* 149: 1403–1409.

Vancey JK. (1994) Modelling forest growth and yield, applications to mixed tropical forests. CAB International. Wallingford 312 p.

Vieira J, Rossi S, Campelo F, Freitas H, Nabais C. (2013) Seasonal and daily cycles of stem radial variation of *Pinus pinaster* in a drought-prone environment. *Agricultural and Forest Meteorology* 180: 173–181.

Zimmermann MH, Pospíšilová, J. (1983) Xylem structure and the ascent of sap. *Biologia Plantarum* 26: 165–165.

Zobel DB, Riley L, Kitzmiller JH, Sniezko RA. (2001) Variation in water relations characteristics of terminal shoots of Port-Orford-cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*) seedlings. *Tree Physiol* 21: 743–749.

Zweifel R, Drew DM, Schweingruber F, Downes GM. (2014) Xylem as the main origin of stem radius changes in *Eucalyptus*. *Functional Plant Biology* 41: 520–534.

Zweifel R, Item H, Hasler R. (2000) Stem radius changes and their relation to stored water in stems of young Norway spruce trees. *Trees* 15: 50–57.

Zweifel R, Item H, Hasler R. (2001) Link between diurnal stem radius changes and tree water relations. *Tree Physiology* 21: 869–877.

Zweifel R, Steppe K, Sterck FJ. (2007) Stomatal regulation by microclimate and tree water relations: interpreting ecophysiological field data with a hydraulic plant model. *Journal of Experimental Botany* 58: 2113–2131.

Zweifel R, Zimmermann L, Zeugin F, Newbery DM. (2006) Intra-annual radial growth and water relations of trees: implications towards a growth mechanism. *Journal of Experimental Botany* 57: 1445–1459.

7 Tables

Table 1. Mixed effect model (type 3 with Satterthwaite's approximation for degrees of freedom) using

Maximum Daily Shrinkage (MDS, 10⁶m) and day-to-day fluctuations of maximum radius value (Δmxtr, 10⁶m) as dependent variables. A. Independent variables: Evapotranspiration (PET) and soil water potential (Ψsoil), are used as fixed effect. B. The individual and its interaction with PET and Ψsoil are considered as random effects.

A		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Denom	Pr(>F)
model : MDS = PET + Ψsoil + (1 id) + (1 PET:id) + (1 Ψsoil:id)							
PET	1	4.1200	4.1200	1165.93	38524	<10 ⁻¹⁶	
Ψsoil	1	1.1211	1.1211	455.03	18506	<10 ⁻¹⁶	
model : Δmxtr = PET + Ψsoil + (1 id) + (1 PET:id) + (1 Ψsoil:id)							
PET	1	12.476	12.476	5192.98	56702	<10 ⁻¹⁶	
Ψsoil	1	1.133	1.133	597.15	26561	<10 ⁻¹⁶	

B		Variance	Std.Dev.
model : MDS = PET + Ψsoil + (1 id) + (1 PET:id) + (1 Ψsoil:id) + ε			
PET:id		6.852e-05	0.008278
Ψsoil:id		5.369e-04	0.023172
id		1.891e-04	0.013750
Residual		2.464e-03	0.049637
model : Δmxtr = PET + Ψsoil + (1 id) + (1 PET:id) + (1 Ψsoil:id) + ε			
PET:id		0.000e+00	0.000000
Ψsoil:id		1.913e-04	0.013830
id		3.279e-05	0.005726
Residual		1.897e-03	0.043558

Table 2. Descriptive statistics of daily fluctuations variables (Maximum Daily Shrinkage, MDS, 10⁶m and day-to-day fluctuations of maximum radius value, Δmxtr, 10⁶m) across environmental classes. The data shown correspond to three complete growing seasons for 10 environment classes of potential evapotranspiration (PET) and soil water potential (Ψsoil). Mean, standard deviation (sd), coefficient of variation (CV) are shown. The number of days corresponding to each category is given (Nbr of days).

PET (mm)	Nbr of days	MDS			Δmxtr		
		mean (μm)	sd (μm)	CV	mean (μm)	sd (μm)	CV
< 1.5	117	135 ± 63	0.47	67	± 62	0.92	
1.5 to 3	207	144 ± 54	0.37	46	± 45	0.98	
3 to 4.5	158	149 ± 47	0.32	35	± 37	1.06	
4.5 to 6	31	175 ± 46	0.26	18	± 32	1.82	
> 6	3	201 ± 46	0.23	-43	± 30	0.68	
Ψ soil (MPa)							
0 to -0.4	363	138 ± 53	0.39	56	± 49	0.88	
-0.4 to -0.5	43	174 ± 56	0.32	47	± 48	1.02	
-0.5 to -0.6	43	185 ± 49	0.27	21	± 42	2.01	
-0.6 to -0.7	29	173 ± 62	0.36	17	± 54	3.26	
< -0.7	38	124 ± 40	0.32	17	± 43	2.59	

Table 3. Pearson correlation coefficients between sum of day-to-day fluctuations of maximum radius value (Δmxtr, mm) and annual diameter increment. Significant coefficients (5% type I error risk) are indicated. NS: non significant.

Sum of Δmxtr	Annual diameter increment		
	2011	2012	2013
2011	0.69	0.37	NS
2012	0.33	0.85	0.31
2013	NS	NS	0.66

Table 4. Pearson correlation coefficients between mean of day-to-day fluctuations of maximum radius value (Δm_{xtr} , mm) by environmental classes (as defined in the Materials and Methods section) and diameter increment over the studied period (2011-2013). Significant coefficients (5% type I error risk) are indicated. NS: not significant. The number of days corresponding to each category is given (Nbr of days).

	Nbr of days	Total diameter increment (2011-2013)
PET (mm)		
< 1.5	117	0.57
1.5 to 3	207	0.53
3 to 4.5	158	0.37
4.5 to 6	31	NS
> 6	3	NS
Mean Δm_{xtr} value		
Ψ_{soil} (MPa)		
0 to -0.4	363	0.66
-0.4 to -0.5	43	0.25
-0.5 to -0.6	43	0.25
-0.6 to -0.7	29	NS
< -0.7	38	NS

8 Figures captions

Figure 1. Schematic diagram of daily radius fluctuations. Daily maximum (m_{xtr}) and minimum (m_{min}) trunk radius values, maximum daily shrinkage (MDS) and day-to-day maximum trunk radius fluctuations (Δm_{xtr}) are indicated in the y-axis. Hour of the day (local time) in the x-axis.

Figure 2. A. Cumulative monthly precipitation (mm) (blue bars, y-axis, left) and mean temperatures ($^{\circ}C$, red line, y-axis, right) over the study period (x-axis). B. Daily Penman-Monteith potential evapotranspiration (PET, mm) (gray bars, y-axis, left) and soil water potential (Ψ_{soil} , MPa) over a depth of 1 m profile (black dots, y-axis, right). C. Radius increment for the 109 Maritime pine full-sibs from March 2011 to February 2014 (5- to 7-year-old trees). Thick red line represents the mean of the cross.

Figure 3. Seasonal variation of daily stem radius fluctuations: A. maximum daily shrinkage (MDS, μm) and B. day-to-day fluctuations of maximum radius (Δm_{xtr} , μm). Grey dots represent individual trees from the Morocco x Landes cross; red dots represent the daily means over the study period (x-axis).

Figure 4. Mean circadian cycle, categorized by environmental potential evapotranspiration (PET, mm) and soil water potential (Ψ_{soil} , MPa) classes; as explained in the Materials and Methods. Daily stem radius fluctuations are centered on zero and expressed in mm. Data were assessed over three growing seasons, from March 2011 to February 2014, and values were averaged hourly. Averaged signals for the Morocco x Landes cross are shown in red; standard deviations are shown in grey.

Figure 5. Relationship between daily stem radius fluctuation components and potential evapotranspiration (PET, mm) and soil water potential (Ψ_{soil} , MPa): (A and B) maximum daily shrinkage (MDS, μm) and (C and D) day-to-day fluctuations of maximum radius (Δm_{xtr} , μm). Red dots represent mean values for trees from the Morocco x Landes cross. Black dots and lines show the changes in mean value (all trees considered) by PET or Ψ_{soil} category, as described in the Materials and Methods.

Figure 6. Variation of maximum daily shrinkage (MDS, mm) for the Morocco x Landes cross under contrasting potential evapotranspiration (PET, mm) conditions. Trees are classified into five categories, according to their overall radial increment during the three years of the experiment. Each category corresponds to 20% of the variation in mean radial increment, from the worst to the best 20%. The letters on the bars correspond to the categories in the Tukey Honest Significant Differences test.

9 Figures

Figure 1

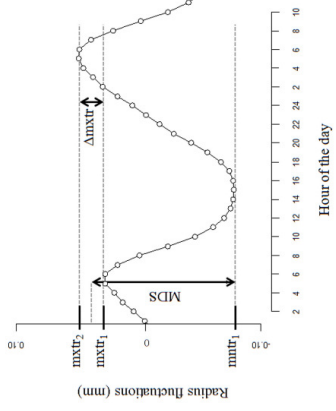


Figure 2

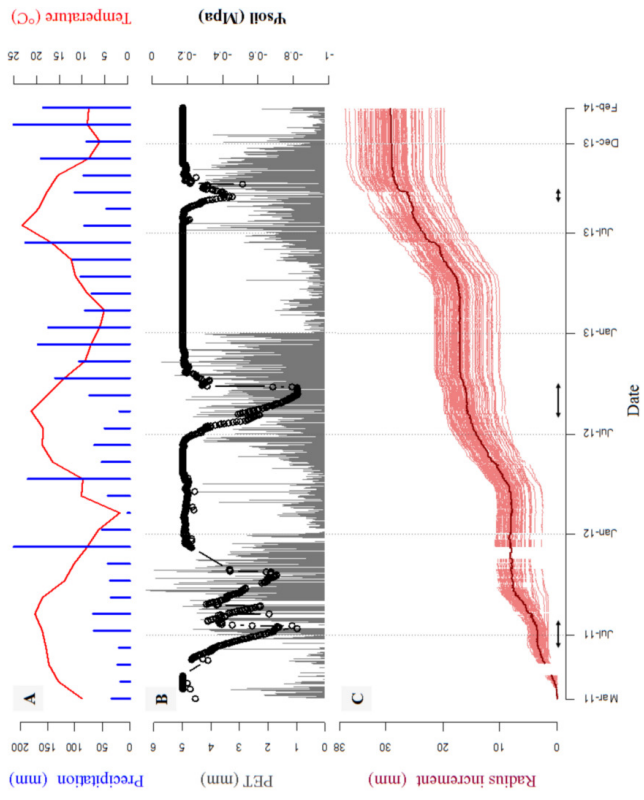


Figure 3

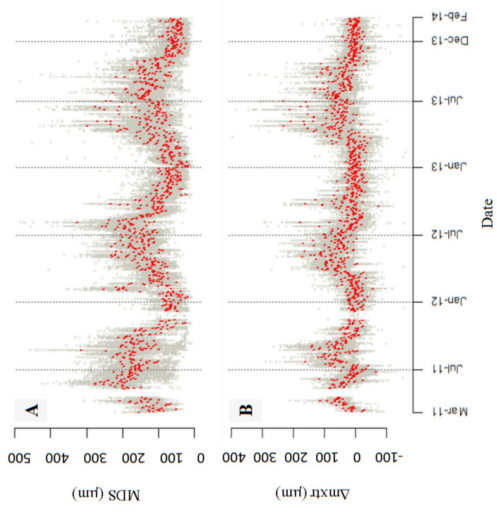


Figure 4

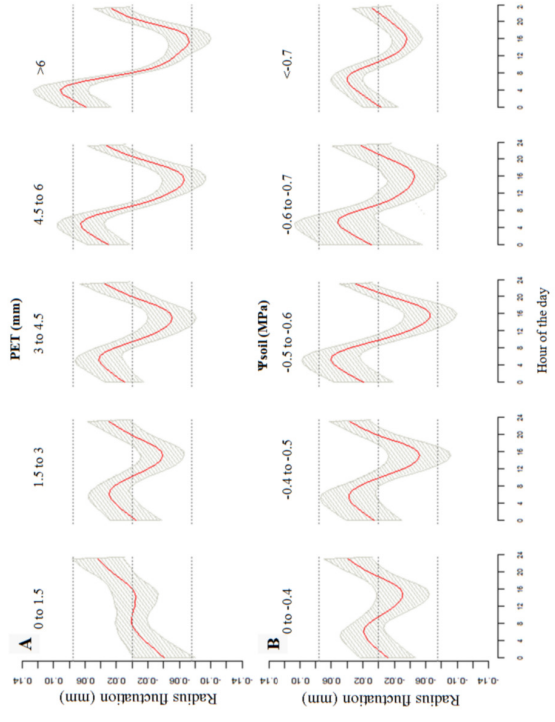


Figure 5

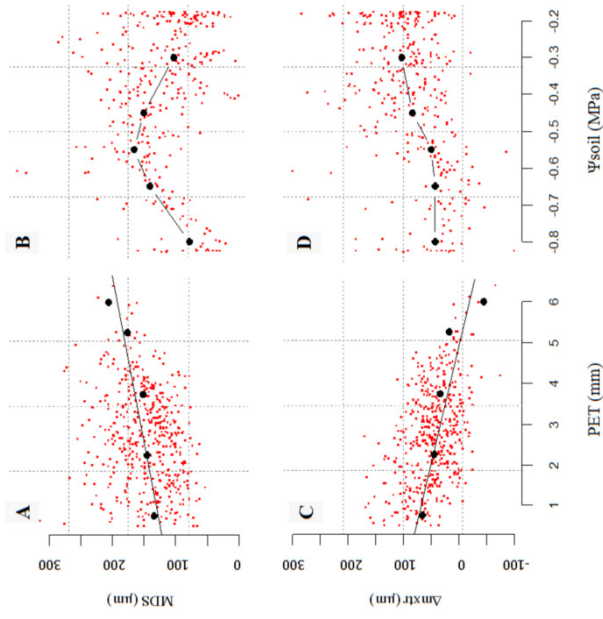
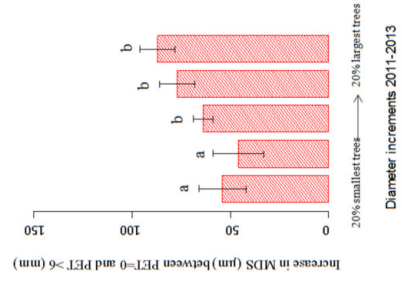


Figure 6



10 Online supplementary material captions

Online resource 1. Geographic origin of the parental trees used in the controlled crosses. The geographic area covered by maritime pines is shown in gray (according to Burbank et al. 2004).

Online resource 2. Experimental settings and data preprocessing. A. Point dendrometers used in the experiment, with the two different support systems used: plastic (A) and aluminum (B). B. Map of plot 4, showing all the pines and the subset fitted with dendrometers.

Online resource 3. Time trend of phenotypic coefficients of variation for radial increment curves.

Online Resource 1

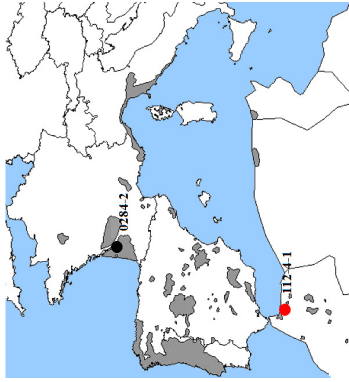
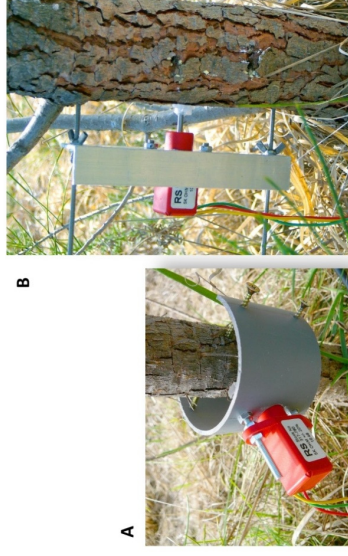


Figure OR1. Geographic origin of the parental trees used in the controlled crosses. The geographic area covered by maritime pines is shown in gray (according to Burban et al. 2004).

Online Resource 2

Experimental settings and data preprocessing

Point dendrometers were installed on 239 pines, 20 cm above ground level, on the east side of the stem, in February 2011. The dendrometers were mounted on a PVC half-cylinder and screws (2011 growing season), and then on an aluminium frame, which was better suited to the rapid increases in stem diameter (in 2012-2013). Stem radius was measured with 10 mm stroke linear motion potentiometers (Radiospare Components, Oxford, UK). A regulated voltage of 2.5 V was applied to the fixed terminals (Vref) with a 0.2% precision switching regulator (TSRN 1-2425, TRACO power). The mobile terminal then generated a linear voltage output (V) related to the change in the radius of the stem. Both Vref and V were measured at 20-second intervals, with a datalogger (CR1000, Campbell Scientific). The V/Vref ratio was calculated at five-minute intervals and stored as the raw data. Each of the four plots contained one datalogger with a deported multiplexer (AM16/32, Campbell Sci) to extend acquisition capability. Autonomous operations were made possible by the use of a battery recharged via a solar panel (S1.A and S1.B).



OR2.A. Point dendrometers used in the experiment, with the two different support systems used: plastic (A) and aluminium (B).

The amplitude of daily radius variations was much smaller than annual growth, so high resolution measurements were required, to obtain precise data. We reduced noise and drift by minimizing voltage variations with electronic controllers. The sensitivity of the measurement system to temperature was checked and shown to be negligible, with four control microdendrometers, for which the mobile part of the system was blocked. Temperature-induced variations of the frame were corrected on the basis of their linear dependence on air temperature, as calibrated with sensors attached to aluminium bars. Corrected voltage ratio values were then converted into mm with a linear equation that we fitted for each sensor in the laboratory. The dendrometers had a 10 mm stroke and therefore had to be moved backwards twice per year.

Online Resource 3

Coefficients of variation for radial increment curves

The phenotypic coefficients of variation for the mean radius values measured for each individual showed that the variability of individual mean daily radius values was between 12% and 28% and decreased over time.

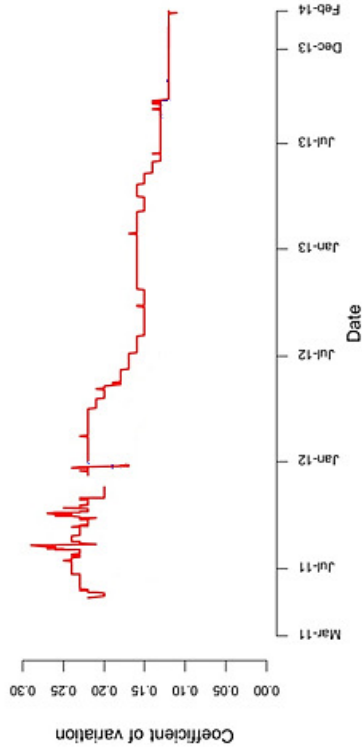
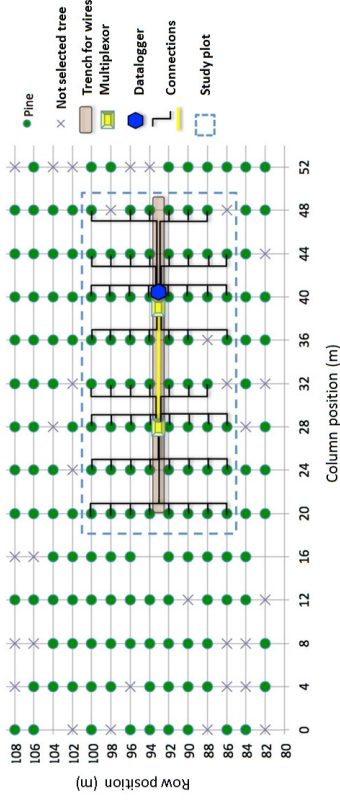


Figure OR3. Time trend of phenotypic coefficients of variation for radial increment curves in the Morocco x Landes cross.



OR2.B. Map of plot 4, showing all the pines and the subset fitted with dendrometers.

Data files were processed with a Python script (combine_datGUL.py, Copyright 2013 Yec'han Laizet), which concatenated the entire dataset. File processing included the following routines:

- Duplicated time steps were skipped,
- Missing records were completed with "empty" values,
- Erroneous values below 100 or above 10,000 were set to "empty".

All other values were evaluated by calculating the difference (delta) with respect to the last non-empty value from previous time steps.

The script the corrected or did not correct the time step value, according to the delta value obtained, as follows. Delta values between 101 and 1000, corresponding to expected variation, were not modified. Delta values between 1001 and 10,000 are expected when the detector is recalibrated. Every "subsequent" time step value (including those with delta values between 101 and 1000) was shifted back to the previous non-empty time step value, preserving the difference.

Annexe 3

GENETIC ARCHITECTURE OF PHENOTYPIC PLASTICITY: WOOD FORMATION AS A STUDY CASE

Hélène Lagraulet^{1,2}, Emilie Chancere^{1,2}, Frédéric Lagane^{1,2}, Laurent Bouffier^{1,2}, Christophe Boury^{1,2}, Elisa Marguerit^{3,4,5}, Philippe Rozenberg⁶, Jean-Marc Gion^{1,2,7}, Christophe Plomion^{1,2}

¹INRA, BIOGECO, UMR 1202, F-33610 Cestas. ²INRA, ISV, EGFV, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon. ³Univ. Bordeaux, BIOGECO, UMR 1202, F-33400 Talence. ⁴INRA, AGPF URO588, F-45075 Orléans Cedex 2. ⁵Bordeaux Sciences Agro, ISV, EGFV, UMR 1287, F-33135 Gradignan. ⁶CIRAD, UMR AGAP, Campus de Baillarguet TA 10C, F-34398 Montpellier Cedex 5. ⁷Univ. Bordeaux, ISV, EGFV, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon.

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

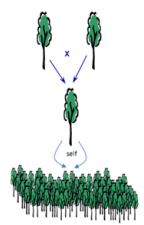
Perennial plants must deal with many environmental changes during their long life time. Coupled with their sessile nature, such feature has stimulated phenotypic plasticity as a key adaptation mechanism in these organisms. The objective of this study is to analyze the seasonal variation of the genetic architecture of...

- Vascular cambium activity: *Early Wood (EW) and Late Wood (LW) radial growth*
- Tracheid thickness: *EW and LW density*

..... to explore the genetic architecture (number, position and effect of major quantitative trait loci (QTLs) of this adaptive plastic response.

PLANT MATERIAL

- *Pinus pinaster* three-generation inbred pedigree (500 individuals)



MENCRDENSITY RELATED TRAITS

- 7 years followed retrospectively by X-ray analysis
- 2 contrasted seasons: early wood (EW) and late wood (LW)

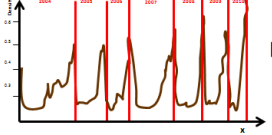


Figure 1: Example of wood density profile

- EWs: early wood ring surface (mm)
- LWS: late wood ring surface (mm)
- mEI: mean early wood density (kg.m⁻³)
- mEL: mean late wood density (kg.m⁻³)
- pBF: percentage of late wood (%)
- Hets: heterogeneity of values

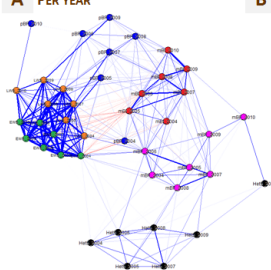
GENOTYPING AND QTL MAPPING

- Illumina Veracode and MassArray assays
- Linkage map construction with JoinMap v4.1:
 - 248 SNPs
 - 12 linkage groups
 - 1754 cM
- Multiple Interval Mapping (MIM) procedure (MultiQTLV2.6):
 - Single and multiple annual ring analyses
 - Genome-wide threshold (5%).
$$z_{chr} = 1 - \left\{ 1 - [1 - (1 - \alpha_g)^{1/M}] \right\}^M$$

(Saintagne et al. 2004, HEREDITY Volume:92 Issue:1 Pages:20-30)

CORRELATION STRUCTURE

A PER YEAR



B AVERAGE OVER 7 YEARS

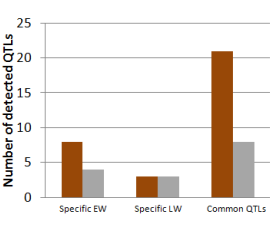
- Low correlations between seasonal (early and late) wood surface and density
- High correlations between years for the same trait

Figure 2: Correlation structure for significant phenotypic correlations among 5 densitometry related traits in *Pinus pinaster* F2 progeny, followed across 7 years (2004-2010). (A) Phenotypic correlations of weighted means across 7 years (2004-2010); (B) Phenotypic correlations for each year measurement. Red lines represent negative correlations and blue lines represent positive correlations; the length of an edge between two vertices/trait indicates the relative strength of this pair-wise correlation within the network.

OVERALL QTL RESULTS

- Polygenic control : all the 12 linkage groups bear QTL
- Low to moderate QTL effects (4 to 12 % of phenotypic explained variation)
- Relative year-to-year stability for QTLs of the same trait
- 2 types of QTL:
 - a) co-locating QTLs between EW and LW
 - b) specific QTLs for EW or LW

EXAMPLE FOR WOOD DENSITY



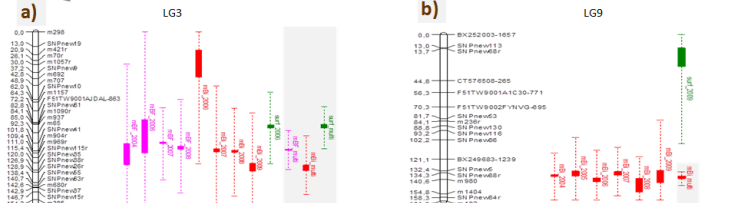


Figure 3: Examples of detection of QTLs for wood density related traits across 7 years (2004-2010) and in multi-environment analysis (grey background) on the genetic map of *Pinus pinaster*.

INTERPRETATION

- Presence of key molecular factors involved in xylogenesis regardless of environmental conditions (Common QTLs)
- Wood formation is regulated by different genes (trigger by the environment) or the same set of genes responding differentially to seasonal climatic variation (specific QTLs). These genes could control the rate of cambial cell division and duration of daughter cell radial expansion and/or the duration of secondary cell wall thickening.

FUTURE WORK

Expression profiling between EW and LW (transcriptome, proteome) → functional insights into the nature of the genes involved in this plastic response.