



HAL
open science

Effet des relations sources-puits en carbone sur le taux de photosynthèse chez le riz. Implications pour l'amélioration variétale dans un contexte de changement climatique.

Denis Fabre

► To cite this version:

Denis Fabre. Effet des relations sources-puits en carbone sur le taux de photosynthèse chez le riz. Implications pour l'amélioration variétale dans un contexte de changement climatique.. Amélioration des plantes. Montpellier SupAgro, 2020. Français. NNT : 2020NSAM0026 . tel-04083826

HAL Id: tel-04083826

<https://theses.hal.science/tel-04083826>

Submitted on 27 Apr 2023

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En écophysiologie et adaptation des plantes

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Portée par

CIRAD – UMR AGAP

EFFET DES RELATIONS SOURCES-PUITS EN CARBONE SUR
LE TAUX DE PHOTOSYNTHESE CHEZ LE RIZ

IMPLICATIONS POUR L'AMELIORATION VARIETALE DANS
UN CONTEXTE DE CHANGEMENT CLIMATIQUE

Présentée par Denis FABRE

Le 14 décembre 2020

Sous la direction de :

Delphine LUQUET (Directrice de thèse)
et Xinyou YIN (co-Directeur de thèse)

Devant le jury composé de

Jean ALRIC, CR CNRS, CEA-Cadarache, St Paul Lez Durance

Nadia BERTIN, DR INRAE, Avignon

Bertrand MULLER, DR INRAE, Montpellier

Vincent ALLARD, CR INRAE, Clermont-Ferrand

Delphine LUQUET, Chercheur, CIRAD, Montpellier

Xinyou YIN, Chercheur, Wageningen University & Research, Wageningen NL

Olivier ROUPSARD, Chercheur, CIRAD, Montpellier

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur (Président)

Examineur

Directrice de thèse

Co-Directeur

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Résumé

L'augmentation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone (eCO_2) associée au changement climatique pourrait affecter les processus physiologiques fondamentaux des plantes et par là, les rendements agricoles. Les céréales de type C_3 comme le riz présentent une réponse génotypique variable du niveau de photosynthèse ainsi que de la production en biomasse et en grain au eCO_2 . Cela suggère une variabilité génétique à la fois dans la réponse des organes sources (feuilles) et puits (en croissance ou de réserve) en carbone (C). Concevoir des génotypes optimisant les relations sources-puits en C pourrait donc contribuer à augmenter la production des cultures dans des climats futurs. Cependant, l'étude de ces relations et des rétroactions en jeu reste complexe, car impliquent de nombreux processus physiologiques et biochimiques agissant au niveau des organes source ou puits en C impactant le fonctionnement de la plante entière. Comprendre le lien entre ces processus et ces échelles biologiques est de fait un enjeu majeur à relever.

Cette thèse a pour objectif d'explorer, par une approche intégrative de la biochimie de l'organe (métabolisme carboné) à la croissance de la plante entière, l'impact des relations sources-puits en C sur la régulation de la photosynthèse. Elle s'intéresse en particulier à la limitation par TPU (Trioses-Phosphates Utilization), un paramètre peu étudié de la photosynthèse qui pourrait intervenir à cette interface.

Une expérimentation a été menée sur un génotype de riz (IR64) pour étudier la dynamique des paramètres photosynthétiques au long de la journée, dans des situations contrastées d'équilibre source-puits en C en phase de remplissage des grains. Pour cela, des plants contrôles ont été comparés à des plants pour lesquels la panicule du brin maître a été supprimée (limitation de puits) sous deux conditions de CO_2 : 400ppm et 800ppm pendant 14 jours à partir d'épiaison (augmentation de la source). Les paramètres photosynthétiques ont été mesurés sur la feuille drapeau du brin maître, puis cette feuille et l'entre-noeud adjacent ont simultanément été prélevés pour le dosage des teneurs en sucres non structuraux. Une diminution de la photosynthèse en fin de journée a pu être observée ; celle-ci était proportionnelle à la limitation de l'utilisation du C par les puits, en particulier en situation d'ablation de panicule et à 800ppm de $[CO_2]$. TPU s'est avéré le paramètre photosynthétique le plus explicatif de cette variation journalière de photosynthèse. Une corrélation négative a été mise en évidence entre TPU et deux indicateurs d'une limitation de la capacité de puits de la plante : la concentration en saccharose de la feuille drapeau (source), et le rapport entre la surface foliaire de la feuille drapeau du brin maître (source) avec le nombre d'épillets de la panicule adjacente (puits), appelé ratio source-puits local en C.

Une seconde expérimentation a été conduite pour évaluer la variabilité génétique de ces résultats. Pour cela, cinq variétés de riz de type *indica* contrastant pour le ratio source-puits local en C ont été comparées sous CO_2 ambiant (400ppm) et élevé (800ppm à partir d'épiaison, mais aussi sur le cycle complet. Une relation négative entre ce ratio et la réponse i) de la capacité photosynthétique à l'augmentation du CO_2 (représentative de TPU), ii) de la production de biomasse aérienne et de grain, a pu être observée. Ce résultat suggère le rôle clef de la capacité et de la plasticité phénotypique des puits en C dans la réponse au eCO_2 chez le riz et plus largement pour les espèces C_3 .

Ces résultats soulignent le rôle pivot et intégrateur que peut jouer le paramètre TPU pour expliquer les variations de photosynthèse en lien avec l'équilibre sources-puits en C de la plante. Il est discuté pourquoi et comment ce paramètre devrait être davantage pris en compte dans les modèles de croissance des plantes et peuplements en vue de mieux prédire les rendements sous les climats futurs. Ces résultats sont également discutés en termes de pistes de recherche et d'applications à venir dans un contexte d'évaluation et amélioration variétale.

Mots clefs : Changement climatique, augmentation du CO_2 , photosynthèse, plasticité phénotypique, riz, ratio sources-puits, saccharose, trioses-phosphates utilisation (TPU).

Abstract

The increase in atmospheric carbon dioxide (eCO₂) concentration associated with climate change could affect plant physiological processes and thereby crop productivity. C₃-type cereals such as rice exhibit variable genotypic response to eCO₂ in terms of photosynthesis, biomass and grain production. This suggests that genetic variability exists in the response to CO₂ of both carbon (C) source (leaves) and sink (growing, storing) organs. Designing genotypes optimizing C source-sink relationships could therefore contribute to increasing crop productivity in future climates. However, studying these relationships and related feedbacks remains complex, as they involve numerous physiological and biochemical processes acting at the level of both C source or sink organs together affecting the whole plant functioning and growth. Understanding the links between these processes and biological scales is therefore a challenge to be tackled.

The aim of this thesis is to explore, based on an integrative approach from organ biochemistry (C metabolism) to the whole plant growth, the impact of C source-sink relationships on the regulation of photosynthesis. A particular focus will be done on TPU limitation (Trioses-Phosphates Utilization), an understudied photosynthesis parameter that could act at this interface.

An experiment was carried out on a single rice genotype (IR64) to study the diurnal dynamics of photosynthetic parameters under contrasted situations of plant C source-sink balance during grain filling. Control plants were compared to plants with the panicle pruned on the main stem (sink limitation) under two CO₂ conditions: 400ppm and 800ppm (source increase) for 14 days from heading. Photosynthetic parameters were measured on the flag leaf of the main stem. This leaf and adjacent internode were simultaneously sampled in order to analyze nonstructural sugar contents. Photosynthesis exhibited a decrease at the end of the day; this decrease was proportional to the C sink limitation and was thus the most pronounced for panicle pruned plants at 800ppm of [CO₂]. TPU appeared as the most explicative parameter of photosynthesis regulation by C sink limitation. In addition, a negative correlation was found between TPU and two indicators of a limitation of plant C sink capacity: flag (source) leaf sucrose concentration, and the ratio between the flag leaf area of the main stem (source) and grain number on the adjacent panicle (sink), called the local C source-sink ratio.

A second experiment was carried out to assess the genetic variability of these results. Five *indica*-type rice cultivars, contrasting in above-mentioned local C source-sink ratio, were compared under ambient (400ppm) and eCO₂ (800ppm from heading, but also over the whole cycle). A negative relationship between this ratio and the response to eCO₂ of i) photosynthetic capacity (representative of TPU), ii) above-ground biomass and grain production, was observed. These results suggested the key role of C sink capacity and phenotypic plasticity in enhancing rice productivity and more broadly C₃ species under eCO₂.

This work highlights the key role played by TPU in explaining photosynthetic variations in response to plant C source-sink balance. It is discussed why and how this parameter should be further considered in plant and crop growth models in order to better predict yields in future climates. Results are also discussed with respect to future research and application avenues in the context of plant evaluation and breeding.

Keywords: Climate change, CO₂ enrichment, photosynthesis, rice, sink feedback, source–sink, sucrose, triose phosphate utilization (TPU).

Remerciements

Entreprendre un exercice de thèse « sur le tard » a constitué une aventure passionnante, notamment lorsque le sujet occupait déjà de près ou de loin mon quotidien professionnel depuis presque une vingtaine d'années passées au CIRAD. Avantage et paradoxe de ce contexte, on réalise que plus grande est la connaissance de notre champ scientifique, plus grande en est son ignorance sur certains aspects. Ainsi, cette parenthèse de trois années a été une occasion formidable d'avoir pu me consacrer à l'exploration de certains pans des limitations de la photosynthèse dans l'espoir d'en réduire certaines « zones d'ombre », et pouvoir intégrer ces recherches avec les travaux de l'équipe « PhenoMEn » dont je dépends.

Je tiens pour cela à remercier le département BIOS du CIRAD, l'UMR AGAP et le service formation pour avoir supporté les coûts financiers de cette thèse. Merci de votre confiance, et pour m'avoir laissé l'opportunité de conduire ce projet à bien et sereinement, en conjuguant mes activités au sein de l'équipe et la responsabilité du plateau d'écophysiologie.

Le résultat de ce travail est avant tout le fruit de réflexions, d'échanges et d'interactions passionnantes avec les personnes et collègues qui nous entourent. Elles ont été particulièrement riches sur le plan scientifique, et les objectifs n'auraient pu être atteints sans la confiance et l'expérience d'un grand nombre de personnes qui ont joué chacun à leur niveau, un rôle important sur le cours de ce travail.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement les membres du jury, Jean Alric et Nadia Bertin rapporteurs de ce travail de thèse, Bertrand Muller et Vincent Allard, examinateurs, et aussi Olivier Rouspard, membre invité. Merci pour le temps précieux que vous avez investis à la lecture de ce manuscrit et juger de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Delphine Luquet et Xinyou Yin mes deux directeurs de thèse, mais aussi Michael Dingkuhn, pour leur investissement sans faille, leur rigueur scientifique et échanges passionnants toujours avisés devant un sujet complexe, ainsi que pour leur apport très constructif dans l'amélioration des articles publiés. Cela a été un immense plaisir d'avoir pu mener cette thèse à vos côtés.

Je remercie très sincèrement l'ensemble des membres et collègues de la superbe équipe « PhenoMEn » et du plateau de phénotypage biochimique (PPB), pour leur appui aux expérimentations, leur bonne humeur et dynamisme qui a fait de cette thèse un moment toujours savoureux au quotidien.

Cette thèse a donné aussi une large part aux expérimentations. Merci aux serristes et équipes techniques intervenues dans la toute nouvelle serre « Abiophen » construite spécialement pour l'étude des plantes au changement climatique. J'ai eu la chance et la primauté de tester ce magnifique complexe technologique en condition réelle, mais être le « bêta testeur » d'une structure de pointe, engageant des expérimentations coûteuses, m'a parfois procuré des sueurs froides qui ont toujours été réglées grâce à votre compétence.

Il me sera malheureusement très difficile de citer tous mes collègues et amis du CIRAD, mais ils savent tous combien je les apprécie.

Pour finir, une grande pensée vers ma famille qui m'a toujours soutenu et supporté pendant ces trois années un peu intenses qui ont parfois un peu grignoté de vie familiale, mais me voilà désormais de retour !

Sommaire

1. INTRODUCTION GENERALE	10
1.1. PHOTOSYNTHESE ET CO ₂ : LES CHALLENGES POUR L'AGRICULTURE DE DEMAIN.....	11
1.2. LE RIZ, CEREALE MAJEURE POUR ASSURER LA SECURITE ALIMENTAIRE	15
1.3. REPOSE AGRO-PHYSIOLOGIQUE DU RIZ A L'AUGMENTATION DE [CO ₂].....	17
1.4. MECANISMES DE LA PHOTOSYNTHESE ET CAPACITE PHOTOSYNTHETIQUE	20
1.4.1. <i>Processus général de la photosynthèse</i>	20
1.4.2. <i>Modèle de Farquhar et capacité photosynthétique</i>	22
1.5. PRINCIPAUX FACTEURS DE L'ACCLIMATATION DE LA PHOTOSYNTHESE FACE A L'AUGMENTATION DU CO ₂ CHEZ LE RIZ.....	26
1.5.1. <i>Régulation par les relations sources-puits en C</i>	27
1.5.2. <i>Régulation par la teneur en azote</i>	29
1.5.3. <i>Régulation par la conductance stomatique</i>	30
1.6. LIMITATION DE LA PHOTOSYNTHESE PAR TPU	31
1.7. MODELISATION DES PLANTES ET TPU	35
1.8. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	37
1.9. OPTIMISATION DE L'EXPERIMENTATION LIEE AU CHAPITRE 2.....	39
1.9.1. <i>Considération des paramètres environnementaux</i>	39
1.9.2. <i>Considération des paramètres de la photosynthèse</i>	40
2. IS TRIOSE PHOSPHATE UTILIZATION INVOLVED IN THE FEEDBACK INHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS IN RICE UNDER CONDITIONS OF SINK LIMITATION?	43
2.1. INTRODUCTION	44
2.2. MATERIAL AND METHODS.....	46
2.2.1. <i>Plant material and growth conditions</i>	46
2.2.2. <i>Leaf photosynthesis measurement</i>	47
2.2.3. <i>Sugar content analysis</i>	48
2.2.4. <i>Leaf Nitrogen Content and Mass per Area</i>	49
2.2.5. <i>Plant growth and biomass measurements</i>	49
2.2.6. <i>Statistical analysis</i>	49
2.3. RESULTS	50
2.3.1. <i>Photosynthetic parameter responses to C source-sink imbalance</i>	50
2.3.2. <i>Plant growth response to C source-sink imbalance</i>	53
2.3.3. <i>Correlations between photosynthetic and biochemical parameters</i>	53
2.4. DISCUSSION	56
2.4.1. <i>Photosynthesis down-regulation under C sink limitation</i>	56
2.4.2. <i>TPU effect on photosynthesis under sink limitation</i>	58
2.4.3. <i>Sugar partitioning effect on photosynthesis and TPU regulation</i>	60
2.5. ACKNOWLEDGMENTS	62
2.6. TABLES & SUPPLEMENTAL MATERIAL – CHAPTER 2	63
3. GENOTYPIC VARIATION IN SOURCE AND SINK TRAITS AFFECTS THE RESPONSE OF PHOTOSYNTHESIS AND GROWTH TO ELEVATED ATMOSPHERIC CO₂	68
3.1. INTRODUCTION	69
3.2. MATERIAL AND METHODS.....	71
3.2.1. <i>Plant material and growth conditions</i>	71
3.2.2. <i>Leaf photosynthesis measurement</i>	72

3.2.3.	<i>Sugar content analysis</i>	73
3.2.4.	<i>Leaf Nitrogen and Potassium Content</i>	74
3.2.5.	<i>Plant growth, biomass and yield component measurements</i>	74
3.2.6.	<i>Statistical analysis</i>	75
3.3.	RESULTS	75
3.3.1.	<i>Local C source-sink ratio</i>	75
3.3.2.	<i>Photosynthetic parameters</i>	76
3.3.3.	<i>Plant growth and yield components</i>	78
3.3.4.	<i>Nonstructural carbohydrate (NSC) response to e-CO₂ treatments</i>	80
3.4.	DISCUSSION	81
3.4.1.	<i>Local source-sink ratio: a driver of leaf photosynthetic capacity under e-CO₂</i>	82
3.4.2.	<i>Impact on dry matter accumulation and grain yield</i>	84
3.4.3.	<i>Implications for crop modelling and phenotyping</i>	85
3.5.	ACKNOWLEDGMENTS	87
3.6.	TABLES & SUPPLEMENTAL MATERIAL – CHAPTER 3	87
4.	DISCUSSION GENERALE	90
4.1.	ANALYSE D'UN DESEQUILIBRE SOURCE-PUITS SUR LES LIMITATIONS DE LA PHOTOSYNTHESE :.....	91
4.1.1.	<i>Niveau d'implication de TPU et ses conséquences</i> :.....	91
4.1.2.	<i>Comment est régulé TPU ?</i>	94
4.2.	CONSEQUENCE DE LA VARIABILITE LOCALE DU RATIO SOURCE-PUITS EN C.....	95
4.2.1.	<i>Implication sur le niveau de capacité photosynthétique</i>	95
4.2.2.	<i>Implication pour la sélection dans un contexte d'élévation du CO₂</i>	97
4.3.	OPPORTUNITES DE FUTURES RECHERCHES	100
4.3.1.	<i>Développer une approche holistique pour l'étude des relations sources-puits</i>	100
4.3.2.	<i>Incorporer une rétroaction de l'équilibre source-puits en C dans les modèles</i>	102
4.4.	PERSPECTIVE D'AMELIORATION POUR LE PHENOTYPAGE DES PLANTES SOUS eCO ₂	106
4.4.1.	<i>Quantifier rapidement les limitations biochimiques de la photosynthèse</i>	106
4.4.2.	<i>Utiliser la signature spectrale des feuilles pour estimer la capacité photosynthétique</i>	108
	CONCLUSION :	110
	BIBLIOGRAPHIE	111
	ANNEXES	136

Liste des Figures

Chapitre 1 :

Figure 1-1 : Évolution de la concentration en dioxyde de carbone dans l'atmosphère.....	11
Figure 1-2 : Production de riz mondiale par pays	16
Figure 1-3 : Représentation simplifiée de la phase claire de la photosynthèse	21
Figure 1-4 : Représentation simplifiée du cycle de Calvin (phase obscure)	22
Figure 1-5 : Réponse modélisée du taux de photosynthèse (A) en fonction de la [CO ₂] intercellulaire (C _i)	25
Figure 1-6 : Les principales voies de sortie du carbone et phosphate du cycle de Calvin	26
Figure 1-7 : Influence des conditions environnementales sur la dynamique des relations sources-puits	29
Figure 1-8 : Mécanisme de l'exportation du saccharose et des triose-phosphates hors du chloroplaste	33
Figure 1-9 : Projection de l'assimilation de CO ₂ (A) en réponse à la concentration chloroplastique en CO ₂ (C _c) et à la température foliaire.	35
Figure 1-10 : Représentation schématique du lien entre mesures expérimentales et modèles.....	37
Figure 1-11 : Les limitations biochimiques de la photosynthèse en fonction de la concentration intercellulaire en CO ₂	42
Figure 1-12 : Courbe de réponse du flux électronique (ETR) en fonction de la concentration intercellulaire de CO ₂	42

Chapitre 2 :

Figure 2-1: Effect of pruning and CO ₂ treatment on photosynthetic parameters.....	51
Figure 2-2 : Mean A/C _i curves for all treatment combination (panel A) and corresponding mean ϕ PSII/C _i curves (panel B)	52
Figure 2-3 : Relationship between TPU and net photosynthesis (A).....	55
Figure 2-4 : Relationship between TPU and Leaf sucrose content	55
Figure 2-5 : Relationship between TPU and local source-sink ratio.....	56

Chapitre 3 :

Figure 3-1 : Net photosynthetic rate at the ambient CO ₂ level (A ₄₀₀) of the flag leaf on the main stem of five rice cultivars grown at two CO ₂ levels: ambient (400 μ mol mol ⁻¹) and elevated (800 μ mol mol ⁻¹) in two greenhouse compartments.....	76
Figure 3-2 : Relationship between A _{max800} /A _{max400} (ratio of photosynthetic capacity (A _{max}) measured at saturating [CO ₂], for plants grown at elevated (800 μ mol mol ⁻¹ [CO ₂]) to plants grown at ambient (average value over 5 replicates at 400 μ mol mol ⁻¹), versus local C source-sink ratio.....	77
Figure 3-3: A/C _i (panel A) and corresponding ϕ PSII/C _i curves (panel B) of five rice cultivars, grown at 800 μ mol mol ⁻¹	78
Figure 3-4 : Dynamics of tillering of 5 rice cultivars grown under ambient (400 μ mol mol ⁻¹ , white filled color) and elevated CO ₂ (800 μ mol mol ⁻¹ , black filled color)	79
Figure 3-5 : Correlations with local source-sink ratio and PCA analysis	80

Liste des Images

Image 1-1 : Système FACE avec un traitement octogonal chez le riz. Site de Tsukuba, Japon.....	14
Image 1-2 : Impact du [CO ₂] sur le développement du riz pour des variations de 30 à 800 ppm.	18
Image 1-3 : Résultat partiel de la méta-analyse de l'impact du CO ₂ sur le riz.....	19
Image 1-4 : Les deux phytotrons (Snijders MC1750) ayant servi à l'expérimentation liée au chapitre 2.....	40
Image 2-1: Le proxy "sources-puits local en C" (Surface foliaire de la feuille drapeau / nombre d'épillets de la panicule adjacente)	67
Image 4-1 : Vue d'ensemble de l'essai mené en serre lié au chapitre 3, avec les deux compartiments différentiellement régulés pour la [CO ₂], 400 vs 800 µmol mol ⁻¹	95
Image 4-2: Exemple d'une courbe de type RACiR.....	107
Image 4-3 : Description du spectre électromagnétique et ses longueurs d'onde. La barre inférieure affiche le domaine de l'hyperspectral.....	109

Liste des Tables

Table 2-1: Photosynthesis characteristics.....	63
Table 2-2: Nonstructural carbohydrate contents, raw data.....	64
Table 3-1: Summary of a 2-way analysis of variance for growth, biochemical and physiological traits	87
Table 3-2 : Summary of a 2-way analysis of variance for biochemical and physiological parameters	88

Tables Supplémentaires

Table S 2-1: Summary of 3-way analysis of variance of physiological flag leaf variables:.....	63
Table S 2-2: Summary of 3-way analysis of variance of nonstructural carbohydrate concentrations.....	64
Table S 2-3: Summary of 3-way analysis of variance of plant biomass and morphological variable	65
Table S 2-4: Plant growth characteristics.....	65
Table S 2-5: Type III test of fixed effects for co-variance analysis for TPU with carbohydrates and treatment ..	66
Table S 3-1: Description of the 5 cultivars selected within the PRAY diversity panel for the present study:	89

Liste des acronymes et abréviations

Symbole	Définitions	Unités
A_{net}	Assimilation nette de CO ₂ mesurée en condition ambiante de CO ₂	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
A_{max}	Capacité photosynthétique	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
ADP	Adénosine diphosphate	
ATP	Adénosine triphosphate	
C_i	Concentration de CO ₂ dans l'espace intercellulaire	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
C_c	Concentration de CO ₂ dans le chloroplaste	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
ETR	Taux de transport des électrons entre les photosystèmes	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
E4P	Erythrose 4-phosphate	
F6P	Fructose 6-phosphate	
G3P	Glyceraldehyde 3-phosphate	
g_m	Conductance mesophyllienne	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$
g_s	Conductance stomatique	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
IRGA	Analyseur de gaz par infra-rouge	
J_{max}	Capacité maximale du transport d'électron	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
K_c	Constante de Michaelis-Menten de l'activité de la Rubisco pour le CO ₂	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
K_o	Constantes de Michaelis-Menten de l'activité de la Rubisco pour l'O ₂	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate réduit	
PAR	Radiation photosynthétique active	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
PEP	Phosphoenolpyruvate	
P_i	Inorganic Phosphate	
PGA	Acide 3-phosphoglycérique	
PSII	Photosystème II	
R_d	Taux de respiration mitochondriale diurne	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphate	
SBP	Sedoheptulose bisphosphate	
TP	Triose Phosphate	
TPU	Taux d'utilisation des Trioses Phosphates	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
V_{cmax}	Vitesse maximale de carboxylation du RuBP par la Rubisco	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Xu5P	Xylulose 5-phosphate	
Y(II)	Rendement du photosystème II	Sans dimension
Γ_*	Point de compensation au CO ₂ en l'absence de respiration mitochondriale	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
α	Fraction des produits de la photorespiration (glycolate) qui retourne dans le chloroplaste	Sans dimension

1. Introduction générale

Guide de lecture :

Ce mémoire est composé de quatre chapitres (identifiables par un code couleur spécifique en coin de page). Le premier est une introduction générale, débutant par le contexte général du sujet étudié, et se terminant par les objectifs du projet de recherche. Les chapitres principaux suivants (2 et 3) ont été publiés dans des revues scientifiques à comité de lecture et sont de fait rédigés en anglais et au format exigé par ces revues. Le dernier chapitre (4) est une synthèse, discussion et conclusion de l'ensemble des recherches conduites, présentant des implications plus larges allant de l'échelle physiologique à l'agroécosystème, et ouvre sur des perspectives de futures recherches ou développements, en lien avec le phénotypage et la modélisation des plantes dans un contexte de sélection variétale des plantes cultivées de demain.

1.1. Photosynthèse et CO₂ : Les challenges pour l'agriculture de demain

La concentration en CO₂ atmosphérique ([CO₂]) a augmenté régulièrement (plus de 35%) depuis les années 1850 avec la fin de l'ère préindustrielle, où l'on observait une concentration moyenne stable depuis au moins 1000 ans et d'environ 280 ppm. Cette augmentation s'est accélérée depuis le milieu des années 1960 jusqu'à atteindre la concentration de 415 ppm en 2020 à l'échelle mondiale (NOAA Mauna Loa Observatory, Hawaii, **Figure 1-1**). Cela représente une augmentation de plus de 145%. Les scénarii d'évolution du [CO₂] prédit par l'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC 2014) à l'horizon 2050 vont de 600 à 800 ppm, ce qui d'un point de vue de l'impact sur l'agriculture n'est pas sans conséquence. Le taux de CO₂ atmosphérique est plus élevé aujourd'hui qu'il ne l'a jamais été au cours des deux derniers millions d'années. À titre de comparaison, il a fallu plus de 5000 ans pour que la concentration en CO₂ augmente seulement de 80 ppm à la fin du dernier âge glaciaire (GIEC, 2007).

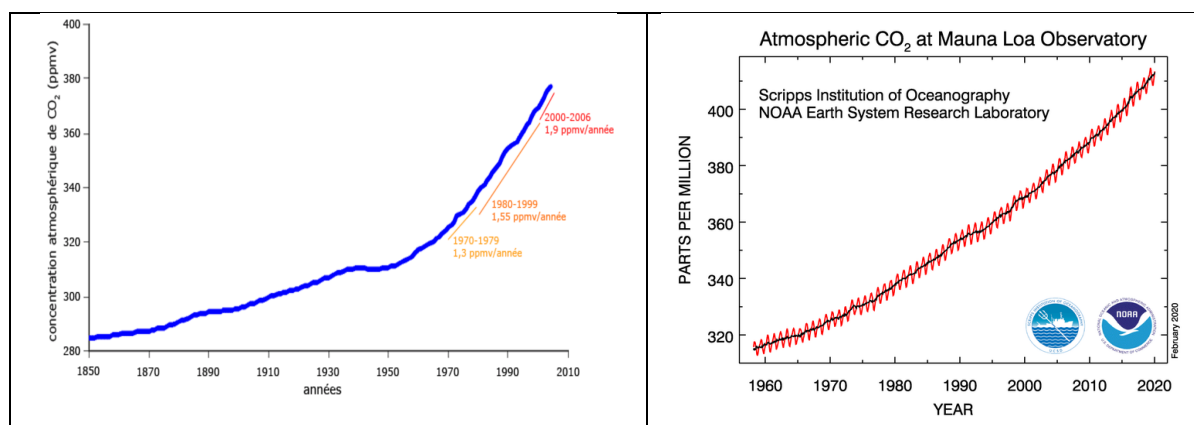


Figure 1-1 : Évolution de la concentration en dioxyde de carbone dans l'atmosphère.

(noaa.gov, 2020)

Le CO₂ provient principalement des émissions des combustibles fossiles (charbon, pétrole et gaz) qui représentent à eux seuls 87% de l'énergie utilisée dans le monde. D'autres sources d'émissions résident dans certains procédés industriels, la déforestation et l'agriculture intensive qui en modifiant la couverture des terres, entraînent parallèlement une augmentation des concentrations d'autres gaz à effet de serre (GES), modifiant les bilans radiatifs. Une des conséquences est l'augmentation des températures qui pourraient augmenter parallèlement de 2 à 4,8°C à l'horizon 2100 (IPCC 2014), impactant indirectement et de façon drastique sur le cycle des précipitations.

La prise de conscience d'un changement climatique a conduit à l'adoption par 196 pays, de la convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques lors du sommet de la terre à Rio en 1992. Elle a été suivie par la signature d'un protocole en 1997 (Kyoto) puis d'accords successifs dont celui de Paris en décembre 2015, imposant des caractères contraignants pour limiter les émissions de gaz à effet de serre.

Pourtant, les « puits » de carbone océaniques (physiques et biologiques) et continentaux (stockage dans les sols et les plantes) fonctionnent à plein régime captant près de la moitié des émissions anthropiques et atténuent ainsi la transformation de la composition chimique de l'atmosphère.

Même si l'augmentation de température peut encore être contenue si les nations respectent ces différents accords, l'augmentation du [CO₂] semble davantage inéluctable, et moins maîtrisable. **Celle-ci est considérée comme le facteur majeur du changement climatique qui affectera le développement des plantes et leur production** (Porter *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2014; Kromdijk and Long, 2016; Becklin *et al.*, 2017).

Trois facteurs expliquent cette accélération :

- une augmentation des émissions de carbone, qui dépasse les prévisions les plus pessimistes,
- une inversion de l'évolution du rapport "émission de carbone/croissance économique",
- une réduction de l'efficacité des puits naturels du carbone.

Dans les prochaines décades, les plantes seront donc très probablement confrontées à des températures et des concentrations en CO₂ plus élevées, une demande évaporative plus grande et des contraintes hydriques à la fois plus longues, fréquentes et sévères (Diffenbaugh *et al.*, 2015). Les effets directs ou indirects des nombreux facteurs du changement climatique impactant sur le fonctionnement des plantes sont ainsi devenus des sources d'incertitudes majeures dans la prédiction des rendements futurs (Asseng *et al.*, 2013; Wallach *et al.*, 2014). Dans ces conditions, il apparaît impératif de mieux comprendre la physiologie des plantes sous [CO₂] élevé (eCO₂) afin de :

- i) prédire l'effet du changement climatique sur les productions des cultures
- ii) orienter la sélection et amélioration variétales de plantes mieux adaptées aux climats de demain.

En même temps, l'augmentation de la population humaine exerce une pression forte sur l'agriculture et la production de nourriture afin de subvenir aux besoins croissants, sachant que les 2/3 des calories sont directement ou indirectement issues de quatre céréales majeures : riz, blé, maïs et soja. À ce rythme, il est estimé un besoin supplémentaire de 87% de ces produits alimentaires primaires, dont près de 30% imputables au riz (Kromdijk and Long, 2016) pour subvenir à la population mondiale en 2050, estimée à 9,8 milliards en 2050 (Nations unies, 2017). Ces projections indiquent que la sécurité alimentaire constitue un challenge majeur du 21^e siècle. Certaines études montrent que les pays en voie de développement sont plus vulnérables aux changements climatiques globaux en raison de la prédominance de l'agriculture dans leur économie, du niveau de température moyen actuel dans leur pays et l'intensification d'évènements extrêmes (Parry *et al.*, 2001). De ce fait, le changement climatique pourrait avoir des conséquences dramatiques, particulièrement dans ces pays (Nelson, 2009; Soussana *et al.*, 2010) ou près d'un milliard de personnes vivent en dessous du seuil de malnutrition ('The State of Food Insecurity in the World 2015'). Augmenter la production globale de biomasse pour les besoins en nourriture et d'énergie pourrait s'envisager en augmentant les surfaces cultivées, mais cela poserait des problèmes vis-à-vis de la conservation de la biodiversité, de la régulation des cycles hydrologiques ou de la séquestration du carbone (Balmford *et al.*, 2005). Durant ces soixante dernières années, la surface totale des terres cultivées n'a d'ailleurs augmenté que de 10,5% (FAOSTAT 2016). Il a été suggéré de préférentiellement augmenter les rendements agricoles en exploitant de façon plus raisonnée dans le futur les surfaces de terres actuellement utilisées (Foley *et al.*, 2015). Si l'extension des terres cultivables n'est pas souhaitable ou suffisante pour couvrir les futurs besoins en nourriture ou bioénergie, les rendements par unité de surface doivent pouvoir augmenter en améliorant les pratiques agricoles (van Ittersum *et al.*, 2013). Une alternative est aussi d'utiliser l'amélioration génétique pour augmenter les rendements des systèmes de cultures. Ceci a déjà permis d'augmenter la production des quatre cultures majeures (riz, blé, maïs, soja) durant la révolution verte, représentant ensemble 66% des calories consommées globalement (Ray *et al.*, 2013). Cependant, le taux actuel d'amélioration (0,9-1,6 % par an) n'est pas suffisant pour couvrir les futurs besoins en nourritures estimés à 2,4 % par an (Ray *et al.*, 2013).

D'un autre côté, les analyses théoriques prédisent que **des augmentations significatives de rendement peuvent être obtenues en améliorant le niveau de photosynthèse des cultures** (Zhu *et al.*, 2010; Ort *et al.*, 2015; Yin and Struik, 2017; Foyer *et al.*, 2017; Nuccio *et al.*, 2017). Certains succès ont déjà été obtenus dans cette voie en manipulant les propriétés ou activités

enzymatiques liées au système photosynthétique (Raines, 2011; Simkin *et al.*, 2015; Carmo-Silva *et al.*, 2015).

Augmenter le taux de photosynthèse chez les céréales et notamment du riz s'avère être, dans ce contexte de changement global, un des moyens efficaces pour contribuer à augmenter la productivité attendue (Yoshida and Horie, 2009; Makino, 2011; Ziska *et al.*, 2014; Ort *et al.*, 2015; Kromdijk and Long, 2016; Simkin *et al.*, 2019).

D'un point de vue physiologique, l'augmentation du $[CO_2]$ peut être considérée comme avantageuse pour les plantes, ce gaz constituant avant tout leur « nourriture » de base via la photosynthèse. Cette dernière utilise en effet l'énergie lumineuse et le CO_2 comme substrats pour fabriquer sucres, cellulose et amidon, leur permettant ainsi de se développer et croître. Le devenir des plantes face à ces changements rapides de l'environnement, et la compréhension des potentiels impacts sur le développement des plantes sont devenus des sujets de débats depuis plusieurs années. En effet, des études menées dans des dispositifs expérimentaux permettant de contrôler et d'enrichir le niveau de CO_2 au champ, appelés FACE, *Free Air CO₂ Enrichment* (McLeod and Long, 1999), ont permis d'étudier au champ l'effet des interactions entre pratiques culturales et conditions environnementales, sur les fonctions et structures des plantes, et ainsi quantifier leurs réponses au CO_2 . **(Image 1-1)**

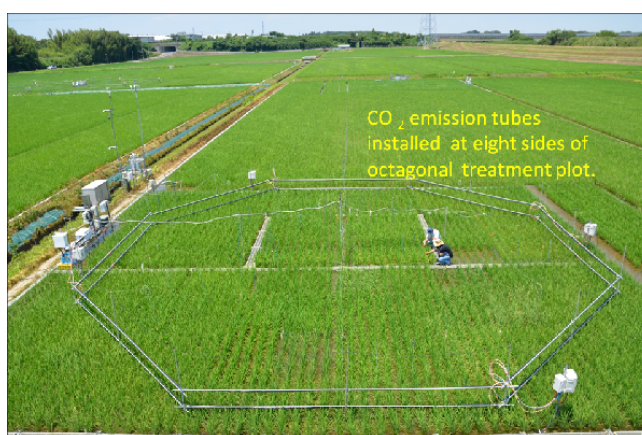


Image 1-1 : Système FACE avec un traitement octogonal chez le riz.
Site de Tsukuba, Japon (<http://www.naro.affrc.go.jp>)

De telles études sont essentielles pour améliorer la capacité des modèles de cultures à prédire les rendements pour des scénarii agro-climatiques futurs (Wullschleger *et al.*, 2002; Medlyn *et al.*, 2015). En général, sans limitation nutritionnelle et hydrique particulière, l'augmentation de $[CO_2]$ montre des effets positifs chez les espèces C_3 sur leur niveau de photosynthèse et potentiellement sur leur rendement (Norby *et al.*, 2010; Warren *et al.*, 2014; Fitzgerald *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017b). L'impact est moindre chez les espèces C_4 (Ruiz-Vera *et al.*, 2015) qui atteignent la capacité maximale de fixation du $[CO_2]$ sous les concentrations actuelles, en raison d'une carboxylation déjà optimale sans photorespiration.

Pourtant, chez le riz plus spécifiquement (espèce C_3), bien que l'effet positif du $[CO_2]$ soit confirmé (Kobayashi *et al.*, 2006; Ainsworth, 2008; Hasegawa *et al.*, 2013, 2016b; Kumar *et al.*, 2017b), de grandes variations entre cultivars existent notamment sur le rendement en grains (3 à 36%) mais aussi sur la photosynthèse (Zhu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Allen *et al.*, 2020). Cela suggère des différences d'adaptations et de régulations de mécanismes physiologiques en réponse au $[CO_2]$.

La **capacité de puits** des plantes, c'est-à-dire la capacité d'accumuler de la biomasse et notamment des assimilats carbonés (White *et al.*, 2016), et certains traits fonctionnels liés à leur réponse (plasticité) au CO_2 pourraient être un facteur déterminant de leur performance dans les climats futurs (Franks *et al.*, 2014; Sakai *et al.*, 2019). Certains paramètres directement liés aux processus photosynthétiques des feuilles, donc à la **capacité de la source**, pourraient être également impliqués (Lombardozzi *et al.*, 2018; Simkin *et al.*, 2019).

Les organes des plantes peuvent en effet être considérés comme des organes sources ou puits (Turgeon, 1989) : Les organes sources sont généralement actifs photosynthétiquement et capables d'exporter des assimilats carbonés (feuilles matures par exemple), et les organes puits qui sont photosynthétiquement inactifs, sont des importateurs d'assimilats carbonés. Ces derniers peuvent à leur tour être divisés au moins en deux grandes classes : puits d'utilisation ou de stockage. Les puits d'utilisation sont métaboliquement très actifs et en croissance rapide, comme les méristèmes, les jeunes feuilles et organes immatures. Les puits de stockage sont notamment des tiges chez les céréales, mais aussi des racines, et les graines dans lesquelles les carbohydrates (C) importés sont accumulés sous forme d'amidon, de saccharose, acide gras ou protéines. Ils sont généralement spécialisés pour assurer des processus essentiels comme l'acquisition minérale (racines), ou la reproduction (graines).

1.2. Le riz, céréale majeure pour assurer la sécurité alimentaire

Le riz (*Oryza sativa L.*), céréale annuelle de la famille des *Poaceae*, est l'une des plus importantes céréales au monde constituant la nourriture de base de près de la moitié de la population mondiale, loin devant le blé et le maïs ('IRRI - Rice Almanac, 4th edition'). La demande a doublé depuis les cinquante dernières années et une augmentation de 30% est à prévoir à l'horizon 2050. À ce jour, le rendement annuel continue d'augmenter, bien que de manière ralentie depuis les trois dernières décades, du fait d'une augmentation sensible des surfaces cultivées (166Mha). Néanmoins, les niveaux actuels de production (760Mt) ne pourront subvenir aux besoins attendus en 2050 (Ray *et al.*, 2013; Rebolledo *et al.*, 2016).

Avec une consommation annuelle moyenne de 10kg/habitant dans les pays occidentaux, celle-ci peut osciller entre 80 et 200kg/habitant en Asie. À l'échelle mondiale, les plus grands

producteurs sont de loin la Chine et l'Inde, suivis de l'Indonésie, Bangladesh, Vietnam et Myanmar ; l'essentiel étant produit en conditions irriguées. (Figure 1-2)

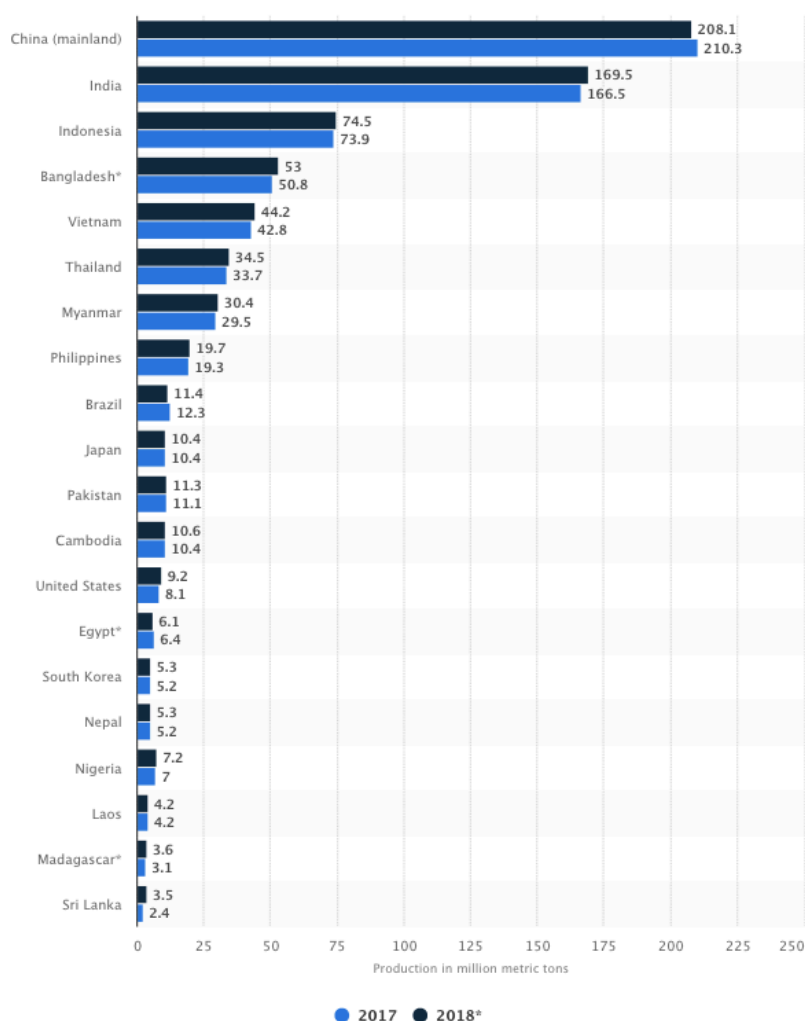


Figure 1-2 : Production de riz mondiale par pays

(FAO 2018)

Bien que l'Asie domine aussi au niveau mondial en matière de consommation, cette dernière augmente sensiblement sur d'autres continents comme en Afrique où la consommation a doublé depuis 50 ans (Guinée, Liberia, Sierra Leone) et dans l'océan indien (Comores et Madagascar) (FAO STAT 2018). Sur le continent africain, le riz est devenu un produit très stratégique et prioritaire pour la sécurité alimentaire. La consommation augmente plus rapidement que pour tout autre produit de base majeur du fait de la croissance démographique importante, de l'urbanisation rapide et de l'évolution des habitudes alimentaires (Wopereis *et al.*, 2013). Il s'agit de la plus importante source d'apports caloriques en Afrique occidentale et la troisième pour l'ensemble du continent africain.

Le riz en raison de la distribution géographique de sa culture (50°N à 35°S) représente la céréale cultivée la plus vulnérable au changement climatique. Outre l'augmentation du [CO₂], Cette culture devra être adaptée à des aléas climatiques de plus en plus extrêmes : Hausse des

températures coïncidant à des phases critiques de développement (Welch *et al.*, 2010; Jagadish *et al.*, 2016), périodes de submersion complète ou partielle (Mackill *et al.*, 2010), salinité parfois causée par l'élévation du niveau de la mer (Moradi and Ismail, 2007; Singh *et al.*, 2016), ou sécheresse et pénurie d'eau très problématique dans le cas du riz pluvial qui constitue le principal mode cultural en Afrique notamment (Bouman *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2007).

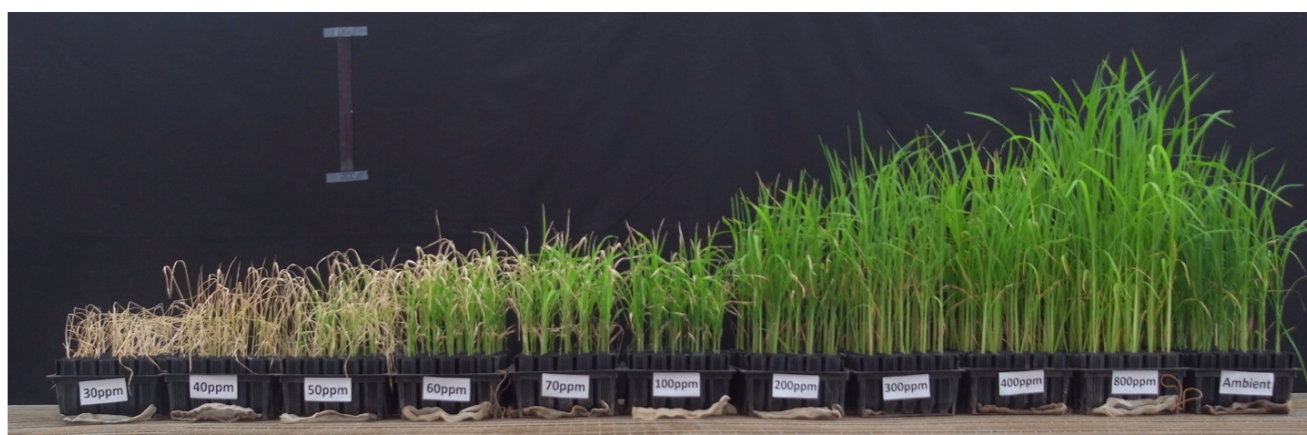
Une augmentation de la production céréalière et notamment du riz sera donc nécessaire d'ici 2050 (Mohanty *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2013) pour répondre à la demande d'une population mondiale grandissante et aux changements des modes alimentaires. Comprendre comment et par quels mécanismes physiologiques les changements climatiques affecteront le fonctionnement des plantes est fondamental afin de prédire aux mieux les rendements des cultures dans le futur.

Dans ce contexte, l'initiative internationale AgMIP (www.agmip.org) utilise la modélisation des cultures pour prédire les rendements en situation agro-climatiques futures. Les modèles de culture permettent de façon générale une représentation simplifiée du fonctionnement et de la production d'une culture donnée en interaction avec le climat, le sol et les pratiques agricoles (Elliott and Müller, 2014). Les simulations réalisées démontrent que les baisses de rendement relatives au réchauffement ne seront pas compensées par l'effet positif de l'augmentation du [CO₂]. Ces simulations reposent cependant sur la réponse de variétés actuelles et suggèrent que des variétés mieux adaptées au changement climatique pourraient en contrecarrer les effets négatifs prédits à l'horizon 2050. D'autre part, les études menées par AgMIP démontrent que les simulations de plusieurs modèles sont nécessaires à combiner pour améliorer la prédiction des rendements et en quantifier l'incertitude. Cinq modèles semblent en moyenne nécessaires pour réduire cette incertitude à un niveau comparable à l'incertitude d'essais agronomiques. **Cela montre une faiblesse importante de ces modèles dans le contexte du changement climatique. Plusieurs études suggèrent que ces faiblesses concernent notamment la réponse des plantes au [CO₂] en termes de capacité photosynthétique, mais aussi de croissance et développement (Li *et al.*, 2015a; Lombardozzi *et al.*, 2017, 2018)**

1.3. Réponse agro-physiologique du riz à l'augmentation de [CO₂]

Les essais aux champs en système FACE décrits précédemment montrent de façon générale que la majorité des céréales de type C₃, ont des productions de biomasse et des rendements de 10 à 20% supérieurs sous des concentrations aux alentours de 600 ppm de [CO₂] (Long *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2006; Ainsworth, 2008; Hasegawa *et al.*, 2016b), vs. 10% au maximum pour les espèces C₄ (Leakey, 2009). Ces différences de réponse du rendement au [CO₂], ont été en partie expliquées par une réponse variable des génotypes de riz

en termes de nombre de panicules émises (Hasegawa *et al.*, 2013). Cela confirme le rôle essentiel joué par la capacité des puits en carbone et leur plasticité en réponse au [CO₂] (Zhu *et al.*, 2014; Nakano *et al.*, 2017). De façon générale, une augmentation de [CO₂] accélère le développement et l'accumulation de la biomasse chez les plantes C₃ et en particulier chez le riz (nombre de talles, densité de panicules, poids des grains) (**Image 1-2**). Néanmoins, l'effet positif du [CO₂] sur le rendement et le niveau de photosynthèse chez les C₃ est inégal d'une étude à une autre. En effet **de grandes variations existent non seulement entre espèces, mais aussi à l'intérieur d'une même espèce entre génotypes** (ex. chez le riz: Adachi *et al.*, 2014; Makino and Mae, 1999; Shimono *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2014).



© IRRI C4 Rice project

Image 1-2 : Impact du [CO₂] sur le développement du riz pour des variations de 30 à 800 ppm.

Comme toutes les plantes à mécanisme de type C₃, le riz utilise l'enzyme Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase) pour la fixation du CO₂. La Rubisco a également une affinité pour l'O₂. Bien que cette double affinité inhibe fortement l'activité photosynthétique (*via* la photorespiration), la photosynthèse répond généralement positivement à l'enrichissement en [CO₂], résultat de l'inhibition de la fonction oxygénase de la Rubisco. Cependant, des taux de photosynthèse sous-optimaux ont souvent été rapportés chez les plantes cultivées en atmosphère enrichie en CO₂ (Adachi *et al.*, 2014; Kromdijk and Long, 2016). A travers une méta-analyse conduite au travers de 125 essais en FACE et milieux contrôlés (couvrant des augmentations en [CO₂] de 600 à 800 ppm), (Wang *et al.*, 2015) a montré que la réponse de la photosynthèse au [CO₂] est encore plus variable que le rendement, et que celle-ci est davantage marquée au sein de la sous espèces *Indica* présentant une forte disparité, par rapport à la sous espèces *Japonica*. (**Image 1-3**)

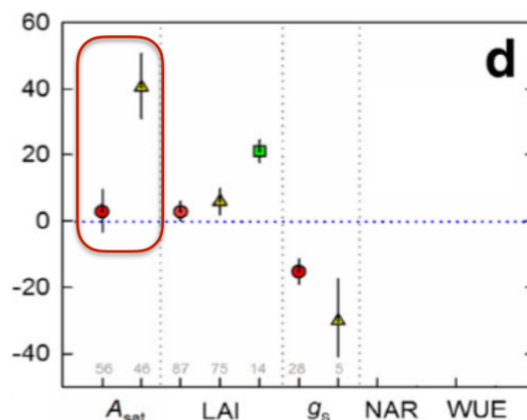


Image 1-3 : Résultat partiel de la méta-analyse de l'impact du CO_2 sur le riz

L'étude montre des variations (%) importantes du niveau de photosynthèse (A_{sat} entre cultivars de riz appartenant à des sous-espèces différentes sous $[CO_2]$ élevé (Rouge : Japonica, Jaune : Indica). Est aussi mentionné la réponse du Leaf Area Index (LAI) et de la conductance stomatique (g_s). (Wang *et al.* 2015)

Il est communément admis que dans les premiers temps d'expositions au eCO_2 la photosynthèse nette des feuilles est augmentée, due à la fois à l'enrichissement du substrat et à l'inhibition de la photorespiration (Long *et al.*, 2004). Cependant cette stimulation diminue graduellement au cours du temps d'exposition. Après une plus longue exposition (jours à semaines), le taux de photosynthèse nette tend à décroître (Chen, 2005). Ce phénomène appelé 'acclimatation' est généralement accompagné d'une altération des paramètres biochimiques de la photosynthèse impliquant une baisse des capacités de carboxylation, et d'activités ou teneurs en Rubisco. Une des voies d'explication serait que la production d'assimilat au niveau des feuilles par la photosynthèse, le métabolisme carboné et la force de puits des plantes, sont étroitement liés et en interaction (Paul and Foyer, 2001; Kaschuk *et al.*, 2009; Zhang and Turgeon, 2009; Körner, 2015; Ludewig and Sonnewald, 2016).

Les relations sources-puits en C constitueraient en effet un mécanisme crucial pour l'adaptation des plantes au eCO_2 , afin qu'elles puissent maintenir des niveaux de photosynthèse optimaux. Cet aspect, constituant un point essentiel de ce travail de thèse, sera plus largement expliqué au chapitre 1.5.1.

De nouvelles approches expérimentales plus intégratives sont de fait nécessaire pour améliorer notre compréhension des mécanismes de régulation de la photosynthèse.

Une vision intégrée des processus physiologiques et biochimiques opérant à des échelles plus fines permettrait de mieux comprendre comment et quand les capacités des sources et des puits interagissent et peuvent limiter la croissance et le rendement (White *et al.*, 2016; Burnett *et al.*, 2016).

1.4. Mécanismes de la photosynthèse et capacité photosynthétique

Afin de mieux comprendre les effets du CO₂ sur la régulation de la photosynthèse, nous rappellerons brièvement dans cette partie ses principaux aspects et processus limitants, au sens biochimique du terme.

1.4.1. Processus général de la photosynthèse

La photosynthèse est le processus utilisé par les plantes pour convertir la lumière généralement provenant du soleil, en énergie chimique qui servira de carburant pour assurer leur développement. Cette énergie chimique est stockée sous forme de carbohydrates comme les sucres, qui sont synthétisés à partir du CO₂ atmosphérique et d'eau. Ce processus complexe et très sophistiqué peut-être divisé en deux phases distinctes : La phase claire (lumineuse), et la phase obscure.

La phase claire a lieu dans les membranes des thylakoïdes au niveau du photosystème II (PSII). La conversion de l'énergie lumineuse en un flux électronique débute par l'excitation des molécules de chlorophylles a et b par un système d'antennes collectrices (**Figure 1-3**). Cette énergie d'excitation est transférée localement de proche en proche vers un centre réactionnel où un pigment spécial assure une première séparation de charge. La chlorophylle excitée va ainsi céder un électron à un accepteur d'électron (la phéophytine), avant d'être à nouveau réduite par les molécules d'H₂O. Le transfert d'électron est alors initié, et parallèlement de l'oxygène et des protons sont produits.

Ces électrons sont pris en charge par une chaîne de transport d'électrons composés d'une succession de plusieurs molécules (plastoquinones, plastocyanine, ferredoxine..), permettant leur transfert du PSII vers le photosystème I (PSI) jusqu'à un accepteur final NADP⁺, ainsi réduits en NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Ce transfert d'électron peut à ce stade servir directement à la photosynthèse, mais aussi cette énergie peut être dissipée pour servir aux processus de photorespiration (flux d'électron pour l'oxygénation).

Parallèlement, lors de ce transport d'électrons et des réactions d'oxydoréduction, la production d'H⁺ dans le lumen des thylakoïdes crée un gradient électrochimique aboutissant à la synthèse d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) lors du passage des protons à travers les ATP synthases, du lumen vers le stroma.

In fine, les deux métabolites hautement énergétiques ainsi produits, **NADPH et ATP seront utilisés pour réaliser la fixation du CO₂ sur le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) par l'enzyme Rubisco**, la formation de triose-phosphate **et la régénération du RuBP** au sein d'un cycle métabolique appelé cycle de Calvin.

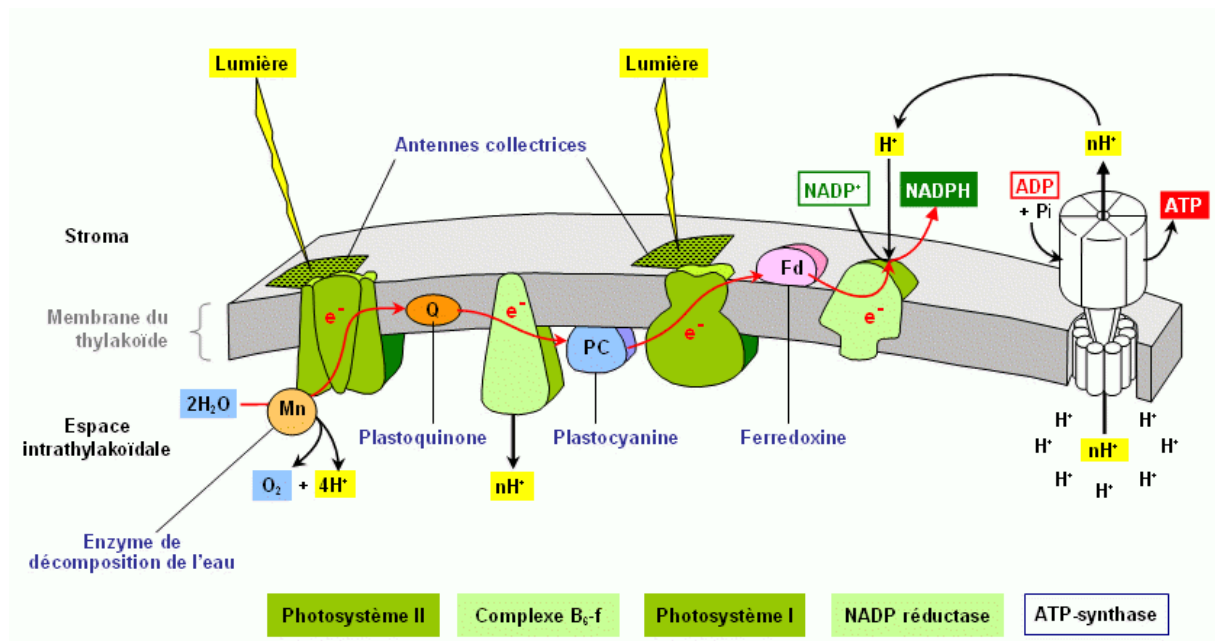


Figure 1-3 : Représentation simplifiée de la phase claire de la photosynthèse

La phase obscure (ou cycle de Calvin) débute au niveau du stroma des chloroplastes par l'action principale de l'enzyme Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase) qui a la particularité d'accepter indifféremment le CO_2 ou l' O_2 comme substrat, d'où une perte de rendement de photosynthèse proche de 50% chez les espèces C_3 . Le processus débute avec la **fixation** du CO_2 , via la Rubisco, par laquelle le CO_2 se combine avec un sucre à 5 carbones, le ribulose 1,5-biphosphate (RuBP), conduisant à la production de 2 molécules à 3 atomes de carbone (3-phosphoglycérate, ou 3PGA), d'où l'appellation du cycle C_3 . (**Figure 1-4**)

La deuxième phase du cycle de Calvin correspondra à la **réduction** du 3-phosphoglycérate. Celui-ci sera tout d'abord phosphorylé par de l'ATP pour donner l'acide biphospho-glycérique, qui sera lui-même réduit par le NADPH pour former le 3-phosphoglycéraldéhyde (G3P) qui est un sucre.

Un sixième des trioses-phosphates (TP) formés vont entrer dans les réactions métaboliques de la plante. Ils seront principalement transformés en saccharose, après exportation dans le cytoplasme, à l'aide de transporteurs spécifiques qui couplent la sortie des trioses-phosphates par l'entrée de phosphates inorganiques (Pi). Au niveau du cytosol s'ensuit alors la synthèse de saccharose à l'aide d'une enzyme clé, la sucrose-phosphate synthase (SPS).

Les cinq sixièmes des trioses qui ne sont pas exportés et restent dans le chloroplaste seront utilisés pour la **régénération** de la molécule RuBP afin de pouvoir être réutilisés dans le cycle de Calvin. Une suite de réactions enzymatiques, nécessitant ATP, NADPH et Pi permet cette régénération.

Le bilan des réactions est donc la consommation de 3 molécules d'ATP et de 2 molécules de NADPH- H^+ par molécule de CO_2 incorporée soit 9 ATP et 6 NADPH- H^+ consommés pour former un triose.

Les produits de la photosynthèse peuvent être mis en réserve soit sous forme d'amidon dans le chloroplaste, soit exportés vers le cytoplasme où ils sont convertis en saccharose. La mise en réserve sous la forme d'amidon ou l'exportation vers le cytoplasme est soumise à un phénomène de compétition qui est régulé par des modifications subtiles des concentrations en trioses-phosphates et de phosphates inorganiques, ainsi que par l'activité d'une enzyme cytosolique, la fructose-2,6-bisphosphate.

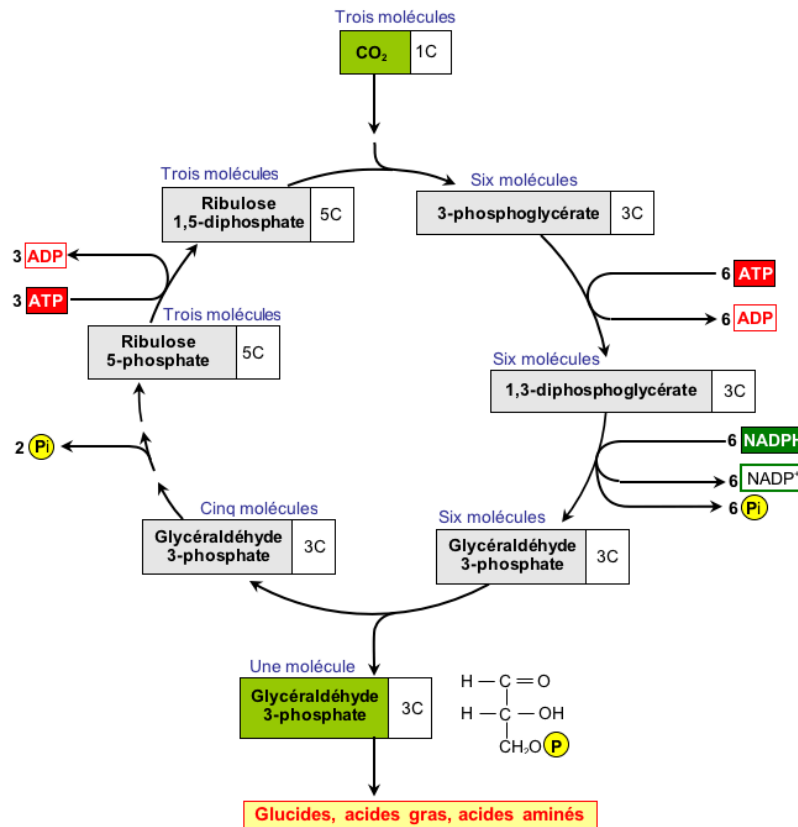


Figure 1-4 : Représentation simplifiée du cycle de Calvin (phase obscure)

1.4.2. Modèle de Farquhar et capacité photosynthétique

Le terme « modèle » est très souvent employé avec ambiguïté dans le domaine des sciences agronomiques. En effet, un modèle peut-être un diagramme de processus métaboliques, une hypothèse verbale sur le fonctionnement d'un mécanisme biologique, une représentation numérique d'une plante ou d'une protéine, un algorithme statistique expliquant des relations entre variables, ou aussi un jeu d'équations mathématiques qui décrivent comment un système biologique peut fonctionner, avec un certain niveau d'abstraction. C'est cette dernière définition qui nous intéresse dans cette partie. (Motta and Pappalardo, 2013; Jones et al., 2017)

Il existe un grand nombre de modèles de photosynthèse qui diffèrent en fonction de l'échelle spatiale, de la question de recherche considérée, ou du niveau de détail auquel les mécanismes sous-jacents sont décrits. Le but n'est pas ici de décrire ces modèles, mais de donner un aperçu

des grandes fonctions du plus utilisé d'entre eux pour décrire le système photosynthétique à l'échelle foliaire, et auquel nos recherches font référence.

Le modèle de photosynthèse de Farquhar (désigné souvent par « FvCB » pour Farquhar, Von Caemmerer et Berry) est l'un des plus importants modèles de l'histoire des recherches sur la photosynthèse, qui a donné lieu à un éventail de modèles d'assimilation du CO₂ pour des applications diverses (Von Caemmerer, 2013). Il permet d'étudier plus en détail les mécanismes biochimiques qui composent la photosynthèse et sa réponse au CO₂. Il a été développé au début des années 1980 (Farquhar *et al.*, 1980; von Caemmerer, 2000). Il s'agit d'un modèle intégrant les échanges gazeux, les cinétiques enzymatiques des réactions biochimiques de la Rubisco liées à la fixation du CO₂, et le flux d'électron dans les membranes photosynthétiques. Le métabolisme photosynthétique y est décrit de manière mécaniste, la feuille étant considérée comme un milieu homogène et les chloroplastes sont supposés fonctionner tous de la même manière. Ce modèle est généralement couplé aux modèles de fonctionnement des plantes, pour améliorer leurs prédictions (Wu *et al.*, 2016; Marshall-Colon *et al.*, 2017), ou extrapolé à des modèles globaux de cycle du carbone (Zhu *et al.*, 2004). L'importance de simuler avec précision la photosynthèse dans un contexte de changement climatique prenant au mieux en compte les fluctuations de lumière, de température et l'augmentation du CO₂ devient cruciale. Fondamentalement, ce modèle permet d'estimer à minima 3 processus fondamentaux déterminant et limitant le taux d'assimilation du CO₂, et donc la photosynthèse nette (A_{net}) des plantes de type C₃ :

- Le taux de carboxylation maximal (V_{cmax}), relatif à la fixation du CO₂ par le RuBP
- Le flux électronique en condition de lumière saturante (J_{max}), relatif à la régénération du RuBP par les réactions lumineuses et la production d'ATP/NADPH (*via* le transport d'électrons)
- Le taux d'utilisation des triose-phosphates (TPU) relatif à la régénération du RuBP par l'utilisation des trioses-phosphates et la production de P_i, et donc lié à la production des sucres : saccharose et amidon.

Le modèle originel de Farquhar partait du principe que la pression partielle de CO₂ sous les stomates (C_i) était la même que dans les chloroplastes (C_c). Or, le CO₂ diffuse selon un gradient de pression partielle entre l'atmosphère et les sites enzymatiques de carboxylation de la Rubisco dans les chloroplastes des cellules assimilatrices du mésophylle. Pour cela, deux grandes étapes de sa diffusion doivent être distinguées : (i) la diffusion dans la phase gazeuse intercellulaire intervenant sur une longue distance dans un espace en trois dimensions, (ii) puis la diffusion en phase liquide, intervenant sur une distance très courte dans la cellule. Cette résistance additionnelle (appelée résistance mésophyllienne) a été implémentée dans les versions actuelles

du modèle de Farquhar pour améliorer la précision de ses paramètres (Evans, 2013; Flexas *et al.*, 2013; von Caemmerer and Evans, 2015), tout comme la respiration de jour (R_d) (Yin *et al.*, 2011) et la limitation par TPU qui a été parfois incorporée, et qui sera particulièrement approfondie dans ce manuscrit.

Dans ce modèle, l'assimilation nette (A_{net}) de CO_2 par la feuille est déterminée par une solution analytique combinant le minimum de ces 3 limitations :

- . Limitation par la Rubisco (A_c)
- . Limitation par la régénération du RuBP provenant du flux linéaire d'électron (A_j)
- . Limitation par la régénération du RuBP relatif à l'utilisation des trioses-phosphates (A_p)

$$\text{Ainsi : } A = \min(A_c, A_j, A_p) - R_d$$

Parmi ces limitations A_c et A_j sont les plus couramment utilisées. La limitation par les trioses-phosphates ou TPU (A_p) ayant été introduite ultérieurement par (Sharkey, 1985).

Les différentes limitations de la photosynthèse peuvent-être évaluée classiquement à l'aide d'appareils de mesure de la photosynthèse utilisant des analyseurs infrarouges combinés à un module de mesure de la fluorescence chlorophyllienne (discuté au chapitre 1.9.2). Succinctement, en modifiant la concentration externe en CO_2 autour de la feuille et en mesurant la photosynthèse, la conductance stomatique et la transpiration, il est ainsi possible de calculer la concentration intercellulaire de CO_2 dans la feuille (C_i) (Sharkey, 1985) ou mieux, la concentration de CO_2 au niveau du site de carboxylation (C_c) par connaissance de la conductance mésophyllienne (g_m) (Harley *et al.*, 1992; Flexas *et al.*, 2008, 2014; Sharkey, 2012).

Les différentes parties de la courbe $A-C_i$ ou $A-C_c$ d'allure asymptotique renseignent ainsi sur les trois limitations majeures de la photosynthèse (**Figure 1-5**): La première portion de la courbe (faible C_i), correspond à la limitation par la capacité de carboxylation de la Rubisco (V_{cmax}) pour la fixation du CO_2 via son substrat (RuBP), la partie suivante à C_i intermédiaire, à la régénération du RuBP par le flux électronique (J_{max}) via la production d'ATP et NADPH, et la dernière partie à fort C_i , à la limitation par les triose-phosphates (TPU) liée à la capacité de production de phosphate inorganique (P_i) essentiellement lors de la synthèse de saccharose et d'amidon. Lorsqu'une limitation par TPU de la photosynthèse est atteinte on observe une baisse typique du flux électronique (Electron Transport Rate, ETR) lorsque celui-ci est mesuré conjointement par fluorescence, et une insensibilité de la photosynthèse nette à l'augmentation du CO_2 , voire parfois une légère baisse, attribuée à l'utilisation directe d'acide aminé comme la glycine et la sérine et leurs exportations hors de la feuille (Harley and Sharkey, 1991).

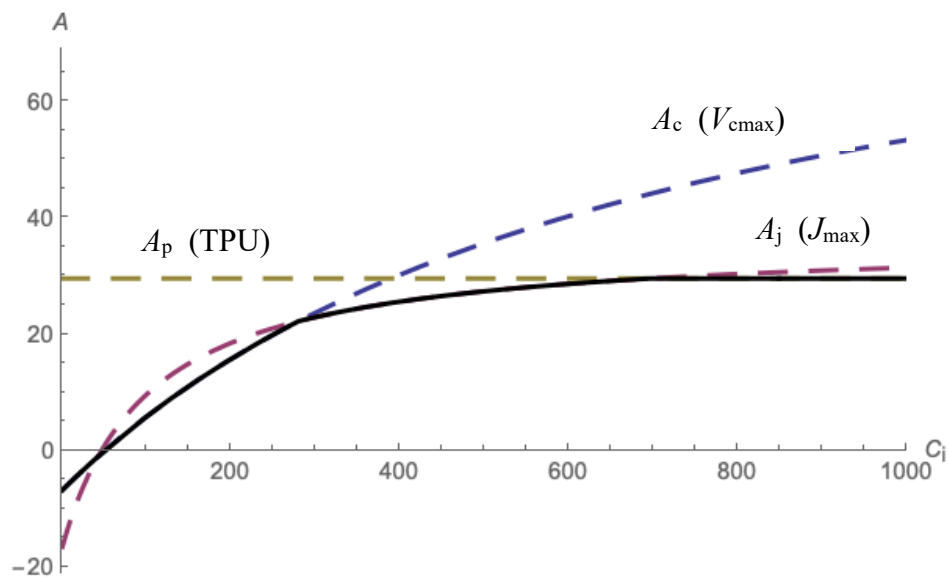


Figure 1-5 : Réponse modélisée du taux de photosynthèse (A) en fonction de la $[CO_2]$ intercellulaire (C_i)

Courbe A/C_i (noire) avec :

A : assimilation nette de carbone, en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et C_i : concentration intercellulaire de CO_2 , en $\mu\text{mol mol}^{-1}$
 Les trois limitations biochimiques de la photosynthèse (A_c , A_j et A_p) sont représentées en pointillés.

Le taux maximal de photosynthèse d'une feuille, ou capacité photosynthétique (A_{max}), mesuré en condition saturante de CO_2 et de lumière, est donc essentiellement (mais pas exclusivement) déterminé par la capacité d'utilisation des trioses-phosphates (TPU) pour la production d'amidon et de saccharose (McClain and Sharkey, 2019). Le taux de synthèse du saccharose a été mesuré entre 35 et 50% de l'assimilation totale du carbone (Sharkey, 1985; Escobar-Gutiérrez and Gaudillère, 1997; Abadie *et al.*, 2018) alors que pour l'amidon ce taux est très variable et dépendant des conditions de culture de la plante diminuant généralement avec la durée de photopériode (Sulpice *et al.*, 2014; Mengin *et al.*, 2017).

Une limitation de la capacité photosynthétique et donc de la capacité de TPU est de ce fait liée au relargage de phosphate (P_i) provenant du cycle de Calvin dont une des productions provient de l'activité de la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) dans le chloroplaste pour la synthèse d'amidon. Il existe d'autres voies par lesquelles le carbone est exporté du cycle de Calvin. Toute voie du métabolisme carboné commençant par un intermédiaire phosphorylé de ce cycle et finissant par une molécule non phosphorylée sera impliquée dans la capacité de TPU (**Figure 1-6**).

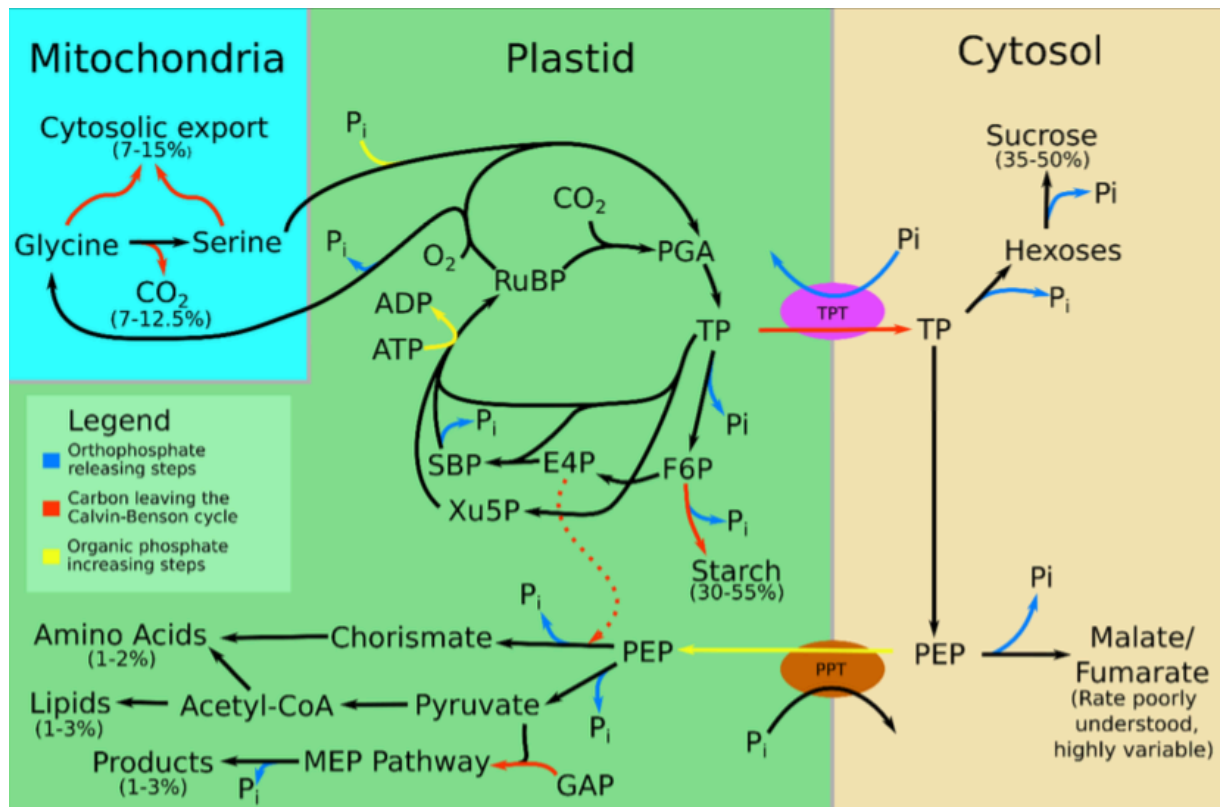


Figure 1-6 : Les principales voies de sortie du carbone et phosphate du cycle de Calvin

(McClain et al. 2019)

Cette limitation par TPU est généralement observée uniquement lorsque la plante photosynthétise très rapidement (forte teneur en CO_2 , forte lumière..), et elle est donc difficilement observable en condition ambiante (Yang et al., 2016; McClain and Sharkey, 2019). De ce fait elle est actuellement très peu, voire pas, considérée (Ellsworth et al., 2015; Busch and Sage, 2017; McClain and Sharkey, 2019).

Cette limitation fera l'objet d'un chapitre particulier (chapitre 1.6) et constitue un point central de ce manuscrit, où nous chercherons à comprendre son niveau d'implication dans la régulation de la photosynthèse dans une situation de $e\text{CO}_2$, au regard des relations sources-puits en C. À ce jour, cette limitation est considérée uniquement chez les plantes C_3 et les plantes C_4 ne seraient pas impactées (Collatz et al., 1992).

1.5. Principaux facteurs de l'acclimatation de la photosynthèse face à l'augmentation du CO_2 chez le riz

Comme vu auparavant, l'effet primaire d'une augmentation du CO_2 tend à augmenter dans un premier temps (heures à jours) le niveau de photosynthèse, jusqu'à observer parfois (ou non) une diminution, appelée communément phénomène d'acclimatation (Long et al., 2004; Reich et al., 2006) si l'enrichissement dure plusieurs semaines (long terme).

La définition de l'anglicisme correspondant « acclimation » est toutefois subjective suivant l'interprétation que l'on en fait, à savoir une vision négative (dans le cas d'une inhibition de la photosynthèse parfois observée sur le long terme), ou positive (dans le cas d'une stimulation, maintenue également sur le long terme). Ce terme peut-être de fait ambigu parce qu'il ne reflète pas la nature du processus qui contrôle le niveau de photosynthèse. Chez le riz, cette acclimation peut être très variable (positive et négative) au niveau inter et intra génotypes (Hasegawa *et al.*, 2013, 2016b).

Dans la suite du manuscrit, afin de simplifier les choses, nous emploierons le terme d'acclimation pour exprimer une baisse du niveau de photosynthèse, le sens négatif que l'on trouve majoritairement dans la littérature. Pour une définition ou de plus amples considérations sur ce terme, voir (Sage, 1994)

1.5.1. Régulation par les relations sources-puits en C

Dans les études sur la réponse des plantes à l'élévation de CO₂, **l'hypothèse de la régulation de la photosynthèse par les relations sources-puits en C revient de façon régulière et constitue la première hypothèse**, largement débattue dans la communauté scientifique depuis des décennies (Burnett *et al.*, 2016; Sweetlove *et al.*, 2017; Chang and Zhu, 2017; Sonnewald and Fernie, 2018). Des questions récurrentes continuent d'exister entre agronomes, physiologistes, biochimistes et parfois modélisateurs, sur le fait de savoir si la croissance de la plante est limitée par la source (photosynthèse) ou par le puits (épillets ou nouvel organe végétatif non photosynthétique). Différentes hypothèses ont été soulevées suivant la sensibilité scientifique :

Pour les agronomes, la notion de remobilisation des réserves carbonées est indirectement considérée *via* la notion d'indice de récolte (Harvest Index, rapport entre le poids en matière sèche des grains et le poids en matière sèche totale des organes aériens) pour sélectionner les variétés à haut rendement (Yang and Zhang, 2010; Tang *et al.*, 2017). Il est en effet courant de trouver en agronomie des études s'intéressant aux manipulations des organes sources ou puits pour en faire varier le ratio au niveau de la plante (Shinano *et al.*, 2006; Shimono *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2016). Bien que des réponses contradictoires soient parfois mentionnées quant à la réponse de la photosynthèse au eCO₂, il est toutefois largement admis que la maintenance de la stimulation de la photosynthèse sous eCO₂ serait directement reliée à la capacité de puits de la plante à utiliser les carbohydrates (Leakey *et al.*, 2012; Ruiz-Vera *et al.*, 2017). D'après cette hypothèse, une plante avec une faible capacité de puits est plus propice à subir une acclimation de la photosynthèse sur le long terme en réponse à l'augmentation de CO₂ (Ainsworth and Long, 2005; Ainsworth, 2008).

D'un point de vue des physiologistes, c'est davantage la nature et la répartition des carbohydrates entre les organes sources et puits qui est un élément central de la régulation de

la photosynthèse (Gibon *et al.*, 2009; Stitt and Zeeman, 2012; Sulpice *et al.*, 2014; Sharkey, 2015; Mengin *et al.*, 2017). Lors d'une limitation de la photosynthèse par la source en C, la concentration en carbohydrates peut être faible si la plante présente une capacité de puits suffisante pour utiliser les assimilats produits (Kaschuk *et al.*, 2009). En revanche, dans le cas d'une situation de puits limités, la production d'assimilats peut dépasser la capacité d'utilisation des carbohydrates. Cela se traduit par une diminution de l'exportation de saccharose, son accumulation et une mise en réserve de sucres dans les feuilles ou plus fréquemment les tiges (Murchie *et al.*, 2009). Dans cette situation, des gènes codant pour les enzymes de la photosynthèse notamment pour la Rubisco, plus particulièrement ceux codant pour sa petite sous unité *rbcS*, sont réprimés, ainsi que ceux impliqués dans la régénération du RuBP. Le taux de photosynthèse est alors réduit par l'accumulation de sucres dans les feuilles, notamment chez les plantes C₃ (Moore *et al.*, 1999; Urban, 2004; Franck *et al.*, 2006; McCormick *et al.*, 2008; Velez-Ramirez *et al.*, 2014) et plus particulièrement chez le riz (Shimono *et al.*, 2009; Morita *et al.*, 2016). Certains auteurs (Moore *et al.*, 1999) proposent que le cycle du saccharose soit le composant régulateur principal de la photosynthèse lorsqu'il y a une diminution de l'activité des puits, et que le ratio hexose/saccharose élevé serait associé à une diminution de la capacité photosynthétique. Dans ce cas, l'amidon servirait de réservoir tampon qui permettrait de stocker les hexoses de façon temporaire (Paul and Pellny, 2003) et sa concentration élevée serait aussi associée à des niveaux de photosynthèse faible.

Enfin, du point de vue des biochimistes, l'acclimatation de la photosynthèse par les relations sources-puits s'expliquerait principalement par la disponibilité des phosphates inorganiques (P_i) au niveau des chloroplastes, aussi bien dans le court terme que le long terme (Herold, 1980; Paul and Foyer, 2001). Ces composés étant produits lors du processus de la photosynthèse pendant la synthèse de saccharose et d'amidon, constituent un élément central de l'entretien du cycle de Calvin impliqué dans la synthèse d'ATP et donc dans la régénération du ribulose biphosphate (RuBP) (Sharkey, 1985; Leegood and Furbank, 1986).

De façon générale l'équilibre entre l'activité des organes sources et puits en carbohydrates (C) chez les plantes conditionne l'allocation des ressources entre eux et de fait la productivité des plantes (Griffiths *et al.*, 2016a; Sonnewald and Fernie, 2018). La plasticité phénotypique des plantes, en modifiant le nombre et la taille des organes, pourrait-être un facteur déterminant de la régulation des relations sources-puits en C, notamment en réponse à l'augmentation du [CO₂].

Les relations sources-puits en C d'une plante sont généralement impactées par l'environnement direct de la plante agissant sur son niveau de photosynthèse, sa croissance et son développement et son statut carboné (Lemoine *et al.*, 2013; Osorio *et al.*, 2014; White *et al.*, 2016) en générant des différences de concentration en carbohydrates du fait de la régulation des flux entre types

d'organes (Paul and Foyer, 2001; Dingkuhn *et al.*, 2007; Patrick and Colyvas, 2014) (**Figure 1-7**) (Körner, 2015). L'influence de la force des puits et son impact sur le fonctionnement des sources ont été beaucoup moins étudiés, ce qui s'avère de plus en plus limitant pour comprendre la variabilité du rendement des cultures dans un environnement climatique changeant (Smith *et al.*, 2018).

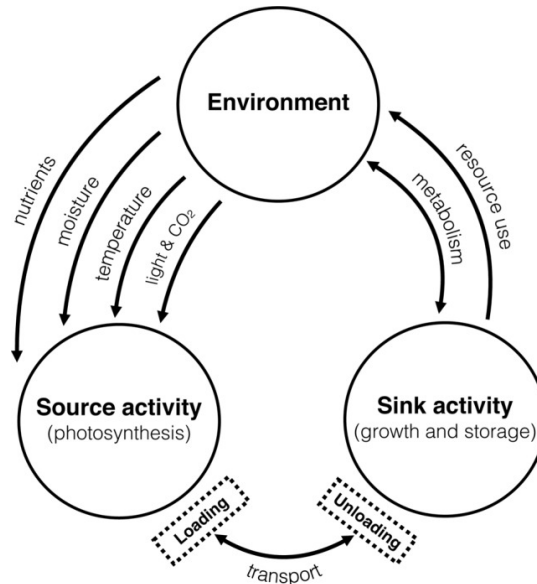


Figure 1-7 : Influence des conditions environnementales sur la dynamique des relations sources-puits

(Smith *et al.* 2018)

1.5.2. Régulation par la teneur en azote

Tout comme le carbone, l'azote est un macronutriment indispensable au développement de la plante intervenant dans les processus physiologiques de synthèse du complexe servant à la capture de la lumière, ou de molécules signal pour influencer des processus cellulaires à travers la régulation d'expression de gènes (Palenchar *et al.*, 2004). Le ratio carbone/azote (C/N) est important pour la croissance de la plante. Dans une situation de eCO₂ stimulant la photosynthèse, la disponibilité en nutriment et la demande notamment en azote est importante. Avec un ratio C/N élevé dans le sol, il y a une réduction de prélèvement d'azote dans la plante pouvant réduire le taux de protéine dans les grains jusqu'à 15% chez le riz sous eCO₂ (Taub and Wang, 2008). Cela peut avoir de sérieuses conséquences économiques et sanitaires, notamment dans les pays en voie de développement.

La distribution spatiale de l'azote montre une forte corrélation avec la teneur en Rubisco chez le riz (Seneweera *et al.*, 2011), suggérant une forte dépendance avec le niveau de photosynthèse. L'élévation de [CO₂] provoque une réallocation de l'azote foliaire des pools les moins limitants vers les pools les plus limitants (Makino and Mae, 1999). Certains paramètres comme l'âge de la feuille ou le niveau d'éclairage impactent directement la réallocation entre les pools de capture énergétique *via* la chlorophylle, et de carboxylation *via* la Rubisco (Evans, 1989;

Makino *et al.*, 1997; Makino, 2003). Ainsi la teneur foliaire massique en azote (Nm) et en chlorophylle chez le riz tend à baisser de 10 à 15% (Nakano *et al.*, 1997; Ainsworth, 2008). Plusieurs autres pistes ont été envisagées pour expliquer le phénomène d'acclimatation au eCO₂ comme des problèmes de dilution de l'azote dans la plante dû à un excès de photoassimilats, ou une diminution du flux d'azote au sein de la plante associée à une baisse de transpiration foliaire par la fermeture stomatique (Shimoda, 2012).

Toujours chez le riz, la forme de l'azote apporté a aussi son importance, et la forme nitrate (NO₃⁻) semble plus efficace que la forme ammonium (NH₄⁺) pour le bon développement de la plante (Zhou *et al.*, 2011). Il est aussi possible qu'une partie de cet azote soit réallouée vers des pools non photosynthétiques, comme la proline, protéine osmo-protectante qui peut s'accumuler de façon importante dans la feuille.

Bien que la cause exacte ne soit pas élucidée, le phénomène d'acclimatation de la photosynthèse sous eCO₂ est bien réel, particulièrement chez les plantes dont la disponibilité en azote est faible (Taub and Wang, 2008), et il est associé généralement à une baisse importante de la teneur en Rubisco. Cela suggère que l'apport d'azote dans les futures conditions climatiques devra pouvoir subvenir à l'augmentation de l'assimilation carbonée. Au-delà d'une modification des itinéraires techniques, cela pourrait se faire aussi en optimisant de façon plus physiologique le 'Nitrogen Use Efficiency' (NUE ou rapport $A/[N]$), ou en utilisant des voies moléculaires pour son optimisation en particulier chez les céréales (Kant *et al.*, 2012). Enfin, certains auteurs (Myers *et al.*, 2014; Bloom, 2015) préviennent aussi qu'une déficience azotée sous l'influence du eCO₂ affectera non seulement la productivité, mais aussi la qualité nutritionnelle des grains.

1.5.3. Régulation par la conductance stomatique

Les stomates jouent un rôle majeur pour les échanges gazeux dans la plante par leur contrôle direct sur les flux entre la plante et l'atmosphère. Chez les céréales, la conductance stomatique (g_s) est un paramètre clef qui détermine le niveau de photosynthèse et le rendement (Roche, 2015). Lorsque la fermeture des stomates limite l'entrée du CO₂ gazeux dans les cavités intercellulaires, on parle de limitation diffusive ou stomatique de la photosynthèse qui est souvent réversible. Dans le cas d'une altération de la capacité photosynthétique (souvent irréversible si les structures sont altérées), on parle alors de limitation métabolique ou non diffusive de la photosynthèse. Il est à noter que cette diffusion du CO₂ est positivement et fortement corrélée chez le riz avec la teneur en azote foliaire (Xiong *et al.*, 2015). La fonction majeure des stomates est de maximiser le taux de diffusion du CO₂ entrant dans la feuille, tout en minimisant les pertes en eau, ce qui se fait de façon continue en étant très influencé par les conditions environnementales (Ball *et al.*, 1987).

Toutes les expérimentations en FACE ou en milieu contrôlé en situation de eCO₂ montrent une baisse de la conductance stomatique (Ainsworth and Rogers, 2007), résultant dans une baisse

de la transpiration et donc de la photosynthèse (Katul *et al.*, 2010) qui n'est pas toujours proportionnelle. Cette non-proportionnalité provient de l'augmentation de la température foliaire accompagnant la fermeture stomatique qui peut elle-même agir sur des processus enzymatiques de la photosynthèse. Les observations micro-météorologiques en FACE chez le riz montrent une baisse de l'évapotranspiration (Yoshimoto *et al.*, 2005), en ligne avec les mesures de conductance stomatique observées généralement (Bernacchi *et al.*, 2007).

Bien que dans ce contexte l'efficacité de transpiration (A/g_s), et donc d'un point de vue agronomique le 'Water Use Efficiency' (WUE) soit augmentée, la fermeture stomatique engendre une baisse du refroidissement de la feuille ('cooling'), et donc une augmentation de la température de surface (Luo *et al.*, 2002), phénomène qui serait potentiellement aggravé par une augmentation de la température de l'air. Ceci pourrait expliquer une part de la baisse de photosynthèse et du rendement (Figueiredo *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2016), bien que d'autres études n'aillent pas dans ce sens (Baker and Jr, 1993). Une méta-analyse réalisée chez le riz (Wang *et al.*, 2015) montre que cette réponse de la photosynthèse à cette combinaison de facteurs serait variable entre zones climatiques, avec un effet d'autant plus négatif sur le rendement là où les températures de l'air sont déjà les plus chaudes.

D'autres études suggèrent aussi qu'une accumulation de saccharose dans les feuilles lors d'une diminution de la force de puits provoquerait une augmentation d'acide abscissique (ABA) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les cellules du mésophylle, provoquant une fermeture des stomates, qui pourrait être un facteur de diminution de la photosynthèse chez certaines plantes (Xu *et al.*, 2014)

1.6. Limitation de la photosynthèse par TPU

Comme exposé au chapitre 1.4.2, les processus biochimiques de la photosynthèse nette peuvent être interprétés par a minima 3 paramètres fondamentaux : V_{cmax} (traduisant l'activité de la Rubisco à travers la capacité de carboxylation du RuBP), J_{max} (régénération du RuBP par le flux électronique) et TPU (relatif à la régénération du RuBP par la conversion des trioses-phosphates en sucres, principalement saccharose et amidon).

Lorsque la photosynthèse est limitée par la capacité de la Rubisco, le niveau de photosynthèse répond très rapidement à une augmentation du CO_2 , ce qui explique la forme exponentielle du début d'une courbe A/C_i . Cette limitation est relativement insensible à la température à $[CO_2]$ ambiant et à l'oxygène à cause de la photorespiration (Cen and Sage, 2005; Sage and Kubien, 2007).

La phase suivante, régénération du RuBP par le flux électronique via la production d'ATP et NADPH, peut-être limitée par le niveau de lumière et le cycle enzymatique du cycle de Calvin. À ce stade on observe encore une hausse du niveau de photosynthèse en augmentant la teneur en CO₂. Cette phase peut-être sensible à la température en raison de la dépendance avec le taux de transport d'électrons (June, 2005; Cen and Sage, 2005; Sage and Kubien, 2007).

Dans certaines conditions, lorsque le [CO₂] devient encore plus élevée et l'éclairement saturant, l'assimilation nette de CO₂ peut être limitée par la vitesse d'utilisation des trioses-phosphates (TP) au niveau du chloroplaste (Sharkey, 1985; von Caemmerer, 2000) réduisant la synthèse d'amidon et de saccharose. Dans ce cas, la concentration en P_i décroît dans le chloroplaste, car il se trouve fixé sous forme organique et la photosynthèse atteint une limitation par TPU (Sharkey and Vanderveer, 1989) devenant insensible à l'augmentation de [CO₂] et parfois décline (Leegood and Furbank, 1986). **Cette limitation paraît donc par essence intimement liée aux carbohydrates et aux relations sources-puits en C dans la plante.** Pourtant celle-ci demeure largement sous étudiée depuis la fin des années 1980, notamment du fait de la difficulté de la mettre en évidence à la fois techniquement par les courbes de réponse au CO₂ et du fait qu'elle ne s'exerce généralement que dans des situations à CO₂ élevé ou faible température. Elle a pourtant déjà été observée chez le riz en condition particulière de faible déficit de pression de vapeur (VPD) sous CO₂ ambiant (Winder *et al.*, 1998). Avec les techniques modernes d'analyse de la photosynthèse couplées avec la mesure de fluorescence chlorophyllienne évaluant le flux électronique (ETR) en parallèle, il devient pourtant plus aisé de déceler ces limites de transition et ainsi mieux la détecter. L'ETR devrait baisser lorsque l'on atteint la limitation par TPU, malgré l'augmentation du CO₂ (Sharkey *et al.*, 2007).

Ce paramètre est très sensible à la température notamment en raison de la sensibilité de certaines enzymes du métabolisme carboné en particulier la sucrose-phosphate synthase (Leegood and Edwards, 1996) ou la nitrate réductase (Leegood and Edwards, 1996; Busch *et al.*, 2018). Il est plus particulièrement impacté lors de température basse ce qui explique pourquoi une limitation par TPU n'est pas toujours observée dans les conditions environnementales classiques.

Un point essentiel est que le processus de synthèse des sucres s'accompagne toujours d'une libération de P_i qui permettront une production efficace d'ATP pour continuer la photophosphorylation et la régénération du RuBP (Kiirats *et al.*, 2009), d'où le nom également associé à cette limitation de « limitation par la régénération des P ».

Le mécanisme supposé repose sur le fait que les phosphates deviennent alors limitants pour la synthèse d'ATP, et provoquent donc une diminution du ratio ATP/ADP servant entre autres à régénérer le RuBP. En ce sens, une limitation de la photosynthèse par TPU peut être considérée comme une limitation du RuBP tout comme l'est J_{max} (mais ici par la synthèse des sucres et la disponibilité des P_i).

TPU pourrait donc constituer un facteur important de la régulation de la capacité photosynthétique dans un contexte de changement climatique (Sharkey, 2016; Lombardozzi *et al.*, 2018; McClain and Sharkey, 2019). **Ce paramètre se situe à l'interface entre la production et la consommation des produits de la photosynthèse, et paraît donc logiquement en lien avec le statut sources-puits en carbone de la plante. Ce dernier aspect n'a jamais été démontré expérimentalement, et les mécanismes physiologiques de son ajustement sont encore mal connus** (Yang *et al.*, 2016).

Une force de puits importante pourrait agir sur TPU en augmentant le taux d'utilisation des TP pour la synthèse de saccharose et le recyclage des P_i qui reviennent en échange (1:1) dans le chloroplaste (**Figure 1-8**), bien que cela ne soit pas directement démontré (Paul and Foyer, 2001; Paul and Pellny, 2003).

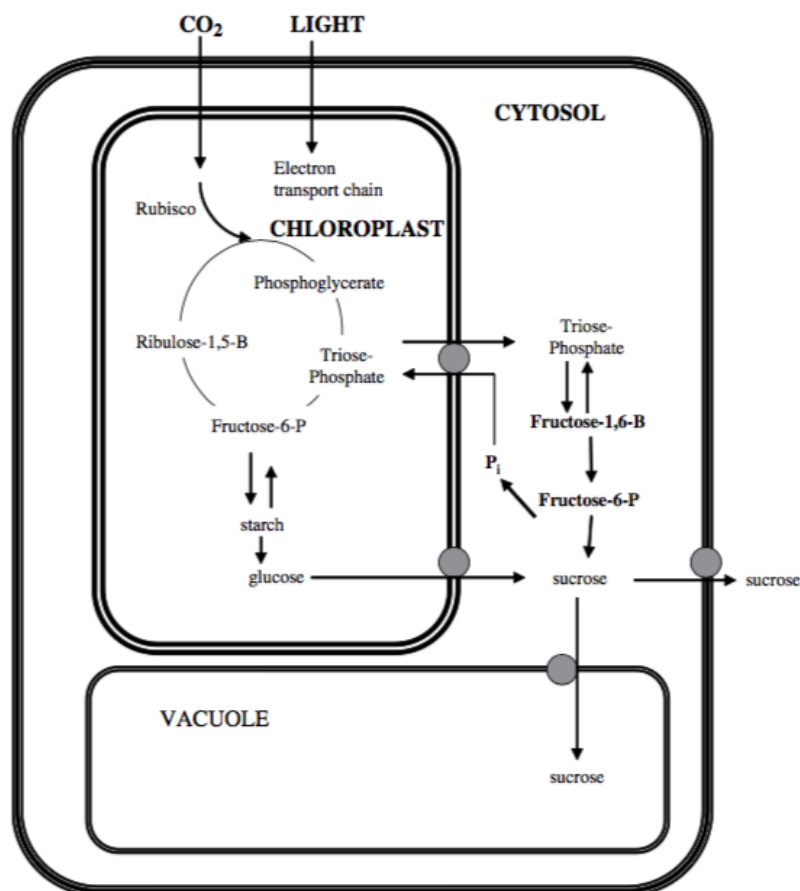


Figure 1-8 : Mécanisme de l'exportation du saccharose et des triose-phosphates hors du chloroplaste

Les TP issus du cycle de Calvin servent à la régénération du RuBP, mais sont aussi convertis en saccharose (dans le cytosol) ou en amidon (dans le chloroplaste), générant ainsi des phosphates inorganiques (P_i), participant à la synthèse d'ATP nécessaire à la régénération du RuBP pour maintenir la photosynthèse. (Kaschuk *et al.*, 2009)

Le seuil de capacité de TPU n'est pas fixé, mais semble adaptatif (McClain and Sharkey, 2019). Il a été mentionné que des plantes transférées en eCO_2 pouvaient présenter une capacité d'adaptation du TPU en augmentant par exemple le taux de régénération des phosphates (Sage

et al., 1989). Également, lors d'expérimentations sous contraintes hydriques sur le tabac, des plantes transgéniques surexprimant une oxydase alternative (AOX) liée à la concentration de phosphate ont pu éviter une limitation par TPU et donc une baisse du niveau de photosynthèse contrairement aux témoins (Dahal *et al.*, 2014a, 2015).

Le caractère d'adaptabilité de ce paramètre montre qu'il peut influencer l'investissement métabolique de la plante et ainsi permettre un maintien de la production de triose-phosphate, mais uniquement pour ajuster le niveau de photosynthèse requis. La concentration en phosphate dans le chloroplaste et la capacité à les régénérer sont strictement régulées ; ainsi la capacité de TPU doit se trouver normalement juste en excès du niveau maximal de photosynthèse (A_{max}), pour que la plante ne soit pas pénalisée. Si cet ajustement n'est pas possible, la photosynthèse subit cette limitation qui peut s'avérer dangereuse pour l'appareil photosynthétique en raison de stress oxydatif généré au niveau du photosystème (Pammenter *et al.*, 1993)

L'augmentation du $[CO_2]$ liée au changement climatique augmentera a priori la fréquence et la sévérité de cette limitation de la photosynthèse. Cependant, celle-ci étant très dépendante de la température comme vue précédemment, il est difficile de prédire quel effet dominera étant donné l'augmentation des températures également impliquée par le changement climatique. Au niveau ambiant actuel de $[CO_2]$ (415 ppm), la photosynthèse est davantage limitée par des problèmes de carboxylation chez les plantes C_3 , voire de régénération du RuBP par le flux électronique, et de ce fait cette limitation est largement ignorée et très peu étudiée.

Une étude théorique récente en modélisation a pourtant montré que l'intervalle de concentration en CO_2 et de T° pour lequel la photosynthèse pouvait être impactée par TPU était significatif (Busch and Sage, 2017) (**Figure 1-9**), ce qui pourrait constituer un biais important dans la modélisation de la photosynthèse dans les futurs scénarios climatiques (Rogers Alistair *et al.*, 2016; Busch *et al.*, 2018).

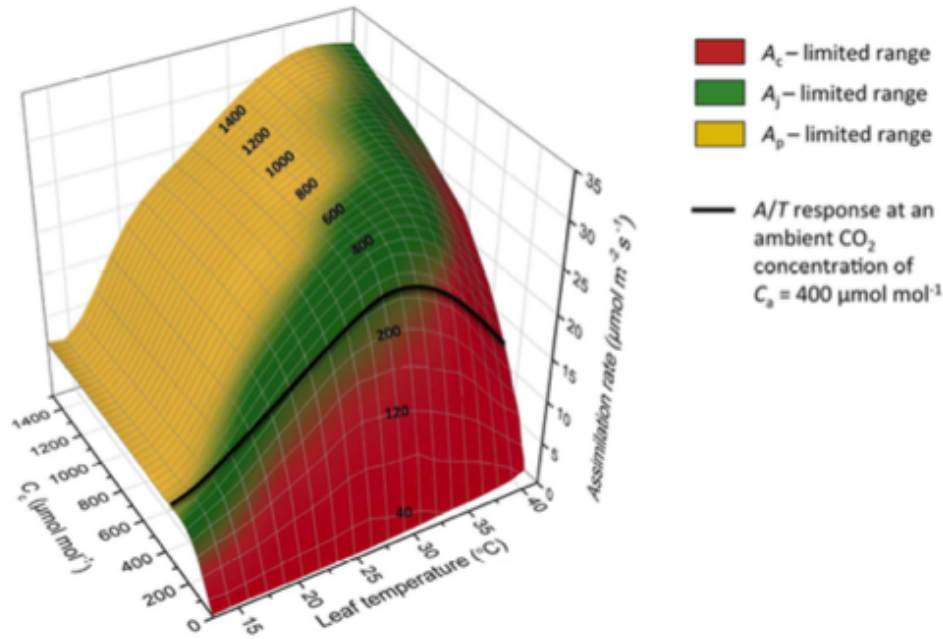


Figure 1-9 : Projection de l'assimilation de CO₂ (A) en réponse à la concentration chloroplastique en CO₂ (C_c) et à la température foliaire.

Les différentes couleurs indiquent le processus de limitation de la photosynthèse qui est impliqué. Rouge (V_{cm_{ax}}), Vert (J_{max}), Jaune (TPU). (Bush *et al.* 2017)

1.7. Modélisation des plantes et TPU

Les modèles de fonctionnement des plantes sont aujourd'hui largement utilisés et appliqués à l'analyse quantitative de la croissance et du rendement (White *et al.*, 2011; Matthews *et al.*, 2013). En fonction des formalismes mathématiques employés et des objectifs, peuvent être distingués les modèles statistiques, empiriques, et mécanistes ; ils peuvent être aussi différenciés selon leur niveau de détail du point de vue de l'architecture de la plante comme les modèles FSPM (Functional-Structural Plant Models), ou écophysologiques travaillant au niveau du fonctionnement des organes ou de la plante (Luquet *et al.*, 2006; Dingkuhn *et al.*, 2007). Les changements environnementaux ont le potentiel d'affecter comme nous venons de le voir le fonctionnement de la plante, notamment par une modification des relations sources-puits en C. L'augmentation des rendements potentiels passera en particulier par une augmentation des niveaux de photosynthèse (Yoshida and Horie, 2009; Evans, 2013; Ort *et al.*, 2015; Foyer *et al.*, 2017), ce qui doit donc amener les modèles à mieux prendre en compte les relations sources-puits en C et leur régulation par le changement climatique (Chang and Zhu, 2017). Ces derniers doivent en effet pouvoir simuler ces processus sous des régimes de lumières fluctuants (diminuant la source), de températures très variables (affectant positivement ou négativement la source) et de eCO₂ (augmentant la source). L'effet de stress biotiques devrait

par ailleurs être de plus en plus important à prendre en compte (Pandey *et al.*, 2017). Beaucoup d'efforts sont faits dans ce sens depuis une dizaine d'années (Vanuytrecht *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015a)

La plupart des modèles actuels tentent déjà de répondre à ces questions (Arnold and Nikoloski, 2011; Gent and Seginer, 2012; Fatichi *et al.*, 2014) et utilisent parfois des modules de calculs de la photosynthèse permettant d'évaluer plus précisément ce type de scénario, dont le module de calcul de la photosynthèse de Farquhar, le plus utilisé (Farquhar *et al.*, 1980). Le couplage entre des modèles de culture fonctionnant à l'échelle de la canopée en général, à des modèles de fonctionnement biochimique de la feuille (type Farquhar), est de plus en plus préconisé afin d'améliorer leur prédiction dans ce contexte (Wu *et al.*, 2016). Pourtant, les modèles peinent encore à prédire la photosynthèse en situation de eCO₂ (Asseng *et al.*, 2013; Lombardozzi *et al.*, 2017, 2018; Fatichi *et al.*, 2019) et notamment chez le riz (Li *et al.*, 2015a; Hasegawa *et al.*, 2017). La plupart du temps ces modèles biochimiques prennent uniquement en compte les limitations majeures standard comme V_{cmax} et J_{max} , et sont très rarement implémentés de la limitation par TPU. Quand intégrée, cette limitation n'est pas représentée de façon mécaniste (Rogers Alistair *et al.*, 2016; Lombardozzi *et al.*, 2018). En effet, dans le cas d'une simulation de la photosynthèse où cette limitation existe et n'est pas prise en compte, on peut s'attendre à surévaluer le taux de régénération du RuBP, car celle-ci aura été calculée en utilisant uniquement la limitation J_{max} (et donc la régénération du RuBP uniquement par le flux d'électrons). D'ailleurs, la limitation TPU est très souvent assimilée et englobée à la limitation J_{max} dans les modèles photosynthétiques, par simplification et méconnaissance des mécanismes de sa régulation. Comme toutes les composantes biochimiques de la photosynthèse doivent travailler de concert en stricte stœchiométrie, il n'est pas étonnant d'observer une relation entre la capacité de carboxylation (V_{cmax}) et la capacité d'utilisation des trioses-phosphates (TPU). Souvent cette relation simplifiée est utilisée en modélisation pour suppléer à une réelle inclusion de la limitation TPU. Une étude récente (Lombardozzi *et al.*, 2018) a conclu que cette approximation surestime largement la quantité de CO₂ fixée par les plantes dans la plupart des modèles, en raison de la non-prise en compte de cette limitation. La conséquence potentielle mentionnée dans cette dernière étude est que les modèles climatiques, ne prenant pas en compte cette limitation, prédisent une quantité additionnelle de carbone de 9 gigatonnes qui pourraient se retrouver dans l'atmosphère avant la fin du siècle.

Mieux comprendre les limitations de la photosynthèse par les sources et les puits en C est donc un domaine de recherche où la connaissance peut-être encore largement améliorée (White *et al.*, 2016). Pouvoir intégrer dans les modèles de culture l'impact d'une limitation de la photosynthèse par TPU est un des aspects importants à considérer, surtout dans un cadre de changement climatique pour l'étude des relations sources-puits (Sharkey, 2016; Asseng *et al.*,

2017; Lombardozzi *et al.*, 2017, 2018). Les équations les plus récentes la décrivant (Busch *et al.*, 2018), ne prennent pas encore en compte ce feedback, bien que celles-ci ont amélioré la prédiction de la photosynthèse nette en incorporant des paramètres liés à la photorespiration.

Bien que la modélisation reste l'un des meilleurs moyens pour prédire la croissance de la plante dans le cadre du changement climatique (Bouman and Tuong, 2001), elle repose encore trop sur des hypothèses et concepts partiellement démontrés (Poorter *et al.*, 2013), (**Figure 1-10**).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous ne chercherons pas à vérifier si l'incorporation du paramètre TPU pourrait permettre d'améliorer la prédiction des rendements futurs par les modèles de cultures mais plutôt d'évaluer, par l'expérimentation, si et dans quelles situations le fait d'omettre ce paramètre peut limiter la capacité prédictive de ces modèles. Ce travail permettra donc de faire des recommandations sur la façon d'améliorer les modèles de culture dans ce contexte.

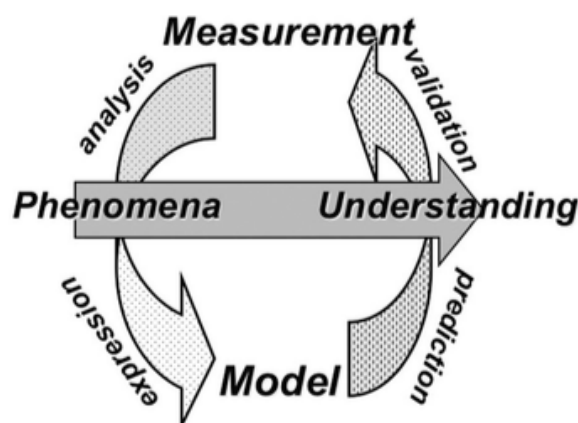


Figure 1-10 : Représentation schématique du lien entre mesures expérimentales et modèles.

Représentation schématique du lien entre mesures expérimentales et modèles : Les mesures sont généralement liées à la modélisation à travers des approches d'analyses, de définition d'expressions mathématiques, de validation et de prédiction, pour comprendre un phénomène réel ou anticiper une situation future (Cho *et al.* 2012)

1.8. Objectifs du projet de recherche

Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre l'impact des relations sources-puits en C sur la régulation de la photosynthèse, notamment au travers du métabolisme carboné dans les organes sources et puits chez le riz. Elle s'adresse particulièrement à la régulation de l'une de ses limitations biochimiques, TPU. Une recherche par thème sur le Web of Science avec le terme « Triose-Phosphate Utilization » dans le cadre de la photosynthèse donne seulement 79 articles traitants du sujet depuis 1975 à ce jour. En comparaison, le terme « photosynthesis » apparaît 89837 fois...

Plus globalement, les objectifs de ce travail de thèse s'intègrent dans ceux de mon équipe au CIRAD (UMR AGAP, Équipe PhenoMEn) : Etudier le fonctionnement morfo-physiologique des plantes en réponse à leurs agro-climats actuels et futurs, pour identifier des traits d'intérêt pour l'amélioration variétale, concevoir des idéotypes variétaux ou culturaux (Génotype x Environnement x pratiques Culturelles : GxExC) notamment en utilisant la modélisation écophysiologique. Une des hypothèses clés de cette équipe est que la plasticité du développement et des relations sources-puits en carbone dans la plante sont des leviers majeurs de son adaptation à l'environnement. Le focus est sur les plantes monocotylédones, notamment le riz, le sorgho et le palmier à huile.

Le chapitre suivant (**chapitre 2**) a pour objectif d'étudier de façon détaillée au cours de la journée, quand et comment un déséquilibre sources-puits affecte les processus photosynthétiques. Il repose sur une expérimentation spécifique visant à manipuler (ablation de panicules et augmentation de CO₂) le ratio source-puits en C chez un génotype de riz pour analyser et quantifier l'impact sur les processus de la photosynthèse, en particulier TPU et sa relation avec le métabolisme carboné.

Ce chapitre a déjà fait l'objet d'une publication dans *Journal Of Experimental Botany*.

Le **chapitre 3** vise à évaluer si les concepts et résultats du chapitre 2 se vérifient lorsque la variabilité du ratio source-puits en C est d'origine génétique. L'impact de cette variabilité sera aussi évalué au niveau de la réponse de la croissance et du rendement final en grain.

Ce chapitre a déjà fait l'objet d'une publication dans *Plant Cell and Environment*.

Le **chapitre 4** sera rédigé sous la forme d'une discussion générale sur les résultats obtenus et leur implication, et exposera des perspectives à courts et moyens termes liés à ce travail en termes d'analyses physiologiques, de phénotypage et de modélisation des plantes, intervenant en amont de la sélection et amélioration variétale des plantes cultivées de demain. Pour finir, nous présenterons les grandes lignes d'un article d'opinion publié en co-auteur dans la revue « *Current Opinion in Plant Biology* » figurant en annexe de ce mémoire, intégrant une partie de nos résultats combinés avec ceux de la littérature.

1.9. Optimisation de l'expérimentation liée au chapitre 2.

1.9.1. Considération des paramètres environnementaux

Mieux comprendre comme un processus hautement dépendant de l'environnement, la photosynthèse, et notamment montrer comment l'une de ses composantes, TPU, un des paramètres les plus difficiles à détecter et modéliser (Bernacchi *et al.*, 2013) pouvait être impacté par les relations sources-puits, nous a conduit naturellement à mener notre expérimentation en environnement strictement contrôlé. Maximiser les chances de mettre en évidence si une relation existe entre ces processus complexes, implique de travailler sur un dispositif très contrôlé avec des plantes présentant un déséquilibre source-puits fort, en jouant à la fois sur la source (ici la concentration de CO₂) et le puits (ablation ou non de panicule). Travailler avec un niveau de CO₂ élevé permet d'augmenter le niveau de substrat pour la photosynthèse et diminue la photorespiration (Farquhar *et al.*, 1980). Cela augmente le taux de prélèvement potentiel du carbone par la plante et amplifie la source vers un déséquilibre source-puits plus fort.

Deux phytotrons (Snijders MC1750) ont été utilisés (**Image 1-4**), régulés exactement de la même manière (photopériode jour/nuit 12h/12h, T°C 29/22, humidité 65/80%, lumière proche de la saturation photosynthétique à 1300 micromoles/m²/s de rayonnement photosynthétique actif, PAR), différenciés uniquement par la concentration en CO₂ à partir d'épiaison (400 et 800 ppm), et contenant chacun des plantes avec et sans panicules. Nous avons choisi de travailler sur une variété de riz (IR64) pour privilégier le nombre de répétitions biologique en rapport à la place disponible dans les phytotrons. Les analyses ont été réalisées pendant la phase de remplissage du grain, car à ce stade phénologique, le nombre de puits secondaire potentiel pouvant briser l'expérimentation (nombre de talles et système racinaire) est fixé et n'évolue plus, tout comme la surface foliaire. La durée d'enrichissement en CO₂ s'est faite pendant 15 jours après épiaison, durée suffisante pour ne pas être considérée comme un enrichissement sur le très court terme qui ne fait que booster la photosynthèse. De plus, cette durée correspond à la phase active et linéaire de remplissage du grain de riz (Cho *et al.*, 1988), permettant de créer un différentiel de force de puits important entre les plantes.

Le partitionnement du carbone assimilé en amidon et saccharose constitue un point important de la régulation de la photosynthèse par le statut source-puits (Smith and Stitt, 2007), où de multiples facteurs et mécanismes contrôlant ce partitionnement restent un champ de recherche particulièrement fertile (Sharkey, 2015; Mengin *et al.*, 2017). Ainsi, la photopériode joue un rôle clef dans le métabolisme carboné, et la mise en relation des carbohydrates avec les paramètres de la photosynthèse nécessite d'avoir et de mesurer des plantes parfaitement uniformes. Pour cela, nous avons travaillé avec une photopériode constante (12/12) pour ne pas

perturber le cycle circadien et le partitionnement des sucres, notamment de l'amidon (Sharkey, 2017). Les plantes ont été randomisées, permutées régulièrement et irriguées quotidiennement jusqu'aux mesures finales, où les plantes ont été prélevées et mesurées toujours au même moment de la journée pour garder le cycle journalier d'activation de la photosynthèse.

De plus, afin d'éviter tout phénomène d'acclimatation bien connu par un manque éventuel d'azote, notamment sous CO_2 élevé (Nakano *et al.*, 1997; Ainsworth and Long, 2005), deux niveaux de fertilisations ont été apportés (en fond et à l'initiation paniculaire pour éviter tout biais de carence nutritionnelle pendant la phase de remplissage pouvant impacter les mesures ultérieures). L'expérimentation a été répétée deux fois pour s'assurer de la reproductibilité.



Image 1-4 : Les deux phytotrons (Snijders MC1750) ayant servi à l'expérimentation liée au chapitre 2.

1.9.2. Considération des paramètres de la photosynthèse

Un des points cruciaux de cette expérimentation concerne la mesure de la photosynthèse et particulièrement ici l'évaluation de ses paramètres biochimiques à l'aide des courbes de réponse au CO_2 (**Figure 1-11**) pour évaluer les trois principales limitations de la photosynthèse : V_{cmax} (capacité de carboxylation du ribulose bisphosphate, RuBP), J_{max} (régénération du RuBP par le flux électronique au niveau du thylakoïdes), TPU (régénération du RuBP par la capacité d'utiliser les trioses-phosphates à travers la synthèse de saccharose et d'amidon). À la concentration actuelle de CO_2 et température ambiante, la limitation par la carboxylation du RuBP (V_{cmax}) est prédominante, alors qu'à température plus élevée la régénération du RuBP (via J_{max}) devient le facteur limitant de la photosynthèse (Sage and Kubien, 2007).

La photosynthèse est un processus qui décroît naturellement au long de la journée (Koyama and Takemoto, 2014). Afin de pouvoir quantifier précisément l'impact réel d'un déséquilibre source-puits sur ces paramètres, nous avons analysé comment ses composantes biochimiques

(V_{cmax} , J_{max} et TPU) et diffusive (g_s , g_m) pouvaient évoluer au long de la journée, ce qui à notre connaissance n'a jamais été fait sur le riz. Sur les deux expérimentations au final, 120 plantes ont été analysées en termes de courbe de réponses et prélèvement biochimiques, ciblant quatre moments de la journée (+1 heure, +5 heures, +9 heures et +11 heures après éclairage).

La limitation par TPU a été très peu observée dans des gammes de températures raisonnable et proche de l'ambient, hormis sur des études portant sur la pomme de terre douce (Cen and Sage, 2005) ou le coton (Wise *et al.*, 2004). En effet, cette limitation étant très sensible à la température bien davantage que V_{cmax} et J_{max} (Bernacchi *et al.*, 2013), toutes les courbes de réponse au CO_2 ont été effectuées à l'aide de deux analyseurs de photosynthèse WALZ GFS-3100, entièrement vérifiés et calibrés en usine juste avant, équipés d'une chambre de mesure de 8cm^2 avec mesure de fluorescence intégrée, dont l'ensemble du microclimat autour de la feuille mesurée a été contrôlé tout au long de la courbe. La taille importante de la chambre de mesure utilisée (8cm^2) permet de limiter les fuites et les effets de bords observés classiquement avec utilisation d'une chambre de volume réduit (Long and Bernacchi, 2003; Wang *et al.*, 2012). Les courbes de réponses obtenues ont été analysées par l'utilitaire développé par (Sharkey, 2016), à partir d'une courbe A/C_c enlevant ainsi tout effet de résistance de diffusion dans la feuille (contrairement aux courbes A/C_i). Pour cela, la conductance mésophyllienne (g_m) a été estimée en même temps lors du fitting de la courbe, et le niveau de photorespiration (R_d) estimé indépendamment par la méthode de (Yin *et al.*, 2011). Les courbes de réponse comprenaient un nombre de points suffisamment important (14 points), pour éviter une surparamétrisation des paramètres estimés, en laissant le temps nécessaire pour une parfaite stabilisation de la photosynthèse à chaque niveau de CO_2 . Afin d'obtenir un maximum de précision sur les paramètres, chaque courbe de réponse s'est donc déroulée sur presque 2 heures (par plante), tel que préconisé dans la littérature (Wang *et al.*, 2017).

La détection de la limitation par TPU a toujours été un challenge méthodologique en raison de la difficulté à clairement identifier la séparation entre J_{max} et TPU lorsque celle-ci existe, car ces deux limitations surviennent dans des conditions parfois proches (Bernacchi *et al.*, 2013).

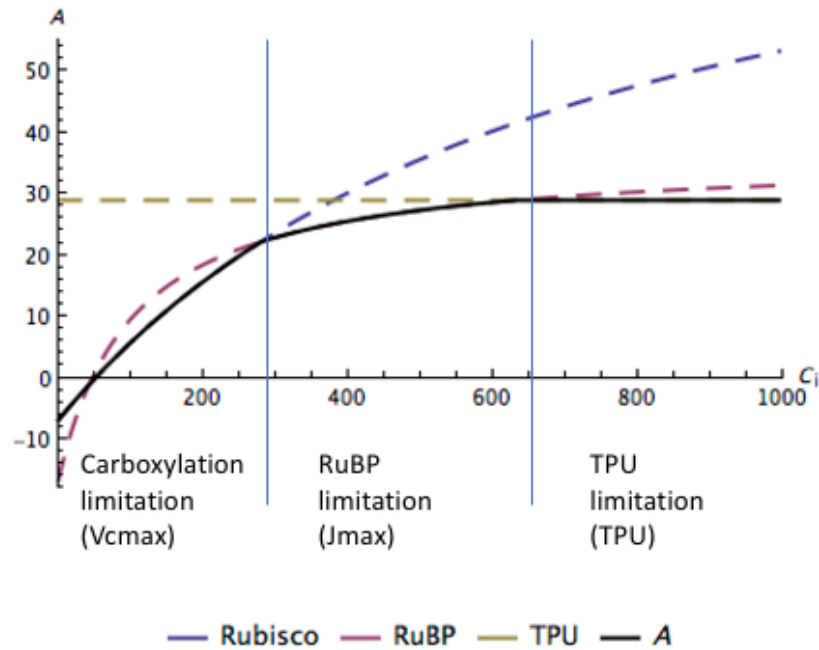


Figure 1-11 : Les limitations biochimiques de la photosynthèse en fonction de la concentration intercellulaire en CO₂

Nous avons utilisé en complément la mesure de fluorescence chlorophyllienne qui a été évaluée en même temps que les points de mesures de photosynthèse, pour être certains de déterminer correctement les différentes limitations et confirmer l'existence ou non d'une limitation par TPU. En effet, le rendement photochimique du PSII (ϕ PSII), ou son dérivé le flux d'électron (electron transport rate, ETR) commence à décliner à fort [CO₂], lorsque la limitation de la photosynthèse est attribuable à TPU. Cet aspect est particulièrement important à prendre en compte lors de l'utilisation des procédures de fittings de modèles. Lors de notre étude, la limitation par TPU a ainsi bien été confirmée pour certaines situations. Une courbe typique obtenue d'une limitation par TPU est présentée en exemple ci-dessous. (**Figure 1-12**)

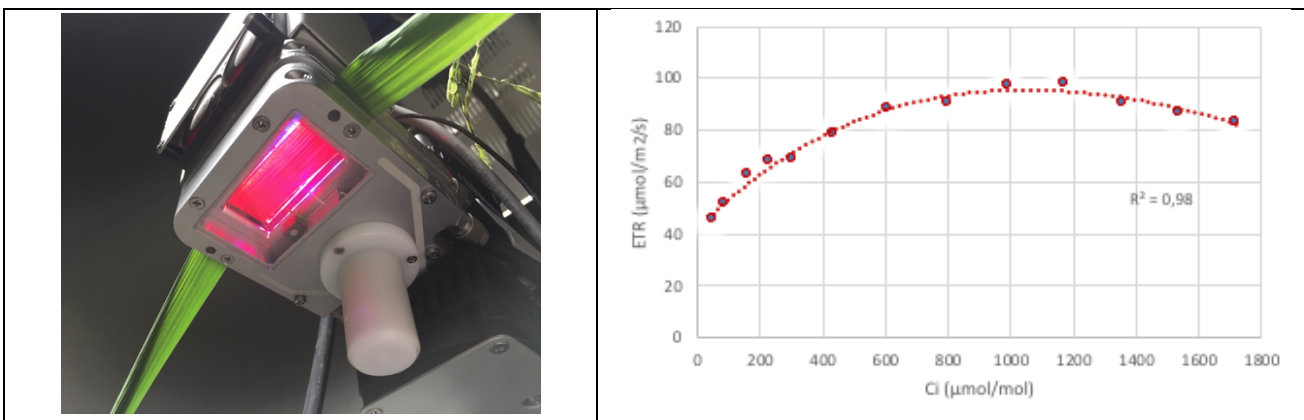


Figure 1-12 : Courbe de réponse du flux électronique (ETR) en fonction de la concentration intercellulaire de CO₂

La mise en évidence expérimentale de la baisse du paramètre ETR pour les hautes concentrations en CO₂ met en évidence une limitation de la photosynthèse par TPU.

2. Is Triose Phosphate Utilization involved in the feedback inhibition of photosynthesis in rice under conditions of sink limitation?

Denis Fabre^{1,2}, Xinyou Yin³, Michael Dingkuhn^{1,2}, Anne Clément-Vidal^{1,2}, Sandrine Roques^{1,2}, Lauriane Rouan^{1,2}, Armelle Soutiras^{1,2}, Delphine Luquet^{1,2}

1: CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France.

2: Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

3: Centre for Crop Systems Analysis, Department of Plant Sciences, Wageningen University & Research, Wageningen, Netherlands

Published in **Journal of Experimental Botany**, in June 2019 (doi:10.1093/jxb/erz318)

A companion paper (Insight section of Journal of Experimental Botany) written by Thomas Sharkey was published after (October 2019 – doi:10.1093/jxb/erz393)

Keywords :

Rice; CO₂ enrichment; triose phosphate utilization; source-sink; photosynthesis; sink feedback; sucrose; climate change.

Abstract :

This study aimed to understand the physiological basis of rice photosynthetic response to C source–sink imbalances, focusing on the dynamics of the photosynthetic parameter triose phosphate utilization (TPU). Here, rice (*Oriza sativa* L.) *indica* cultivar IR64 were grown in controlled environment chambers under current ambient CO₂ concentration until heading, and thereafter two CO₂ treatments (400 and 800 μmol mol⁻¹) were compared in the presence and absence of a panicle-pruning treatment modifying the C sink. At 2 weeks after heading, photosynthetic parameters derived from CO₂ response curves, and non-structural carbohydrate content of flag leaf and internodes were measured three to four times of day. Spikelet number per panicle and flag leaf area on the main culm were recorded. Net C assimilation and TPU decreased progressively after midday in panicle-pruned plants, especially under 800 μmol mol⁻¹ CO₂. This TPU reduction was explained by sucrose accumulation in the flag leaf resulting from the sink limitation. Taking together, our findings suggest that TPU is involved in the regulation of photosynthesis in rice under elevated CO₂ conditions, and that sink limitation effects should be considered in crop models.

2.1. Introduction

Increasing world population and negative effects of global climate change on agricultural production require increased and more climate-resilient crop yields (Ainsworth, 2008; von Caemmerer *et al.*, 2012; Ort *et al.*, 2015). Rice (*Oryza sativa* L.) is the staple food for almost half of the population on Earth (GRiSP, 2013). To meet rice demand in 2050, its production has to increase by 2.4% annually until 2050 (Mohanty *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2013). This must be achieved in the context of climate change that is expected to have mostly negative effects on crop yields (Porter *et al.*, 2014). But air CO₂ elevation (e-CO₂), expected to reach 600 to 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ in 2050 (IPCC 2016), will affect C₃ crops like rice positively if efficiently used by photosynthesis. To achieve the production goal, leaf photosynthesis is a key leverage for improving crops (Lawson *et al.*, 2012; Evans, 2013; Long *et al.*, 2015; Ort *et al.*, 2015), including rice (Yoshida *et al.*, 2008; Yoshida and Horie, 2009; Makino, 2011).

A key requirement for achieving high crop productivity is to optimize carbon source-sink balance in the plants. E-CO₂ can perturb plant carbon (C) source-sink balance as it can increase C source more than the sink (White *et al.*, 2016), leading to leaf carbohydrate accumulation that may down-regulate photosynthesis (Paul and Foyer, 2001; Shimono *et al.*, 2010; White *et al.*, 2016; Burnett *et al.*, 2016). Source-sink interactions have been intensively studied during the last two decades (Chang *et al.*, 2017). Whether and when plant growth and production is limited by C source (chiefly, photosynthesis) or sink (demand for organ growth) is still a key research question for agronomists, plant physiologists, biochemists and crop modelers (Burnett *et al.*, 2016).

In a monocarpic grain crop like rice, the study of source-sink interactions is particularly relevant during grain filling (Yang and Zhang, 2010; Tang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018). Some studies used pruning to experimentally manipulate the C source (leaf) and/or sink (grains) (Cock and Yoshida, 1973; Nakano *et al.*, 1995; Shinano *et al.*, 2006; Shimono *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2016; Hasegawa *et al.*, 2016b; Nakano *et al.*, 2017), in some cases combined with an e-CO₂ treatment. Conflicting results were reported regarding the response of photosynthesis to e-CO₂ but all studies agreed that plants with larger sink capacity benefitted more from e-CO₂.

Several physiological studies dealt with the role of non-structural carbohydrate (NSC) in C source-sink relationships under abiotic constraints such as drought (e.g. Dingkuhn *et al.*, 2007). Experimental manipulations of plant C source and/or sink strength demonstrated that photosynthetic rate depends on C sink strength (Ainsworth and Bush, 2011; Lemoine *et al.*, 2013; Osorio *et al.*, 2014). Accumulation of NSC commonly occurs in leaves of plants grown

under e-CO₂ but down-regulation of photosynthesis is not always observed (Leakey *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015), suggesting that feedbacks on photosynthesis are complex.

Part of this complexity might be explained by partitioning of leaf NSC between sucrose and starch, controlled by stresses such as water deficit (Luquet *et al.*, 2008), time of day (Bläsing *et al.*, 2005; Gibon *et al.*, 2006; Kölling *et al.*, 2015) or day length (Sulpice *et al.*, 2014; Pokhilko and Ebenhoh, 2015; Sharkey, 2015; Mengin *et al.*, 2017). Accumulation of starch, a stationary reserve that unlike sucrose is not a metabolical signal nor an osmotic agent, may help prevent starvation during long dark periods, enhance post-stress recovery growth or simply buffer periods of low transport activity to sinks. Plants lacking in sink capacity show reduced phloem loading. Rice, however, is particularly effective in its capacity to export NSC from source leaves, suggesting that its photosynthetic response to e-CO₂ should be efficient (Makino and Mae, 1999), but little is known on the mechanisms.

Biochemical studies on C source-sink relationships have focused on two key parameters: the utilisation of triose phosphate produced in the Calvin-Benson cycle for sucrose and starch synthesis, and ribulose biphosphate (RuBP) regeneration by inorganic phosphate (P_i) recycling, which is related to sugar turnover (Sharkey, 1985; Leegood and Furbank, 1986; Paul and Foyer, 2001; Paul and Pellny, 2003). Analysis of leaf photosynthesis classically considers three limiting steps according to a biochemical photosynthesis model (the FvCB model hereafter) described by Farquhar *et al.* (1980), later extended by Sharkey (1985), involving the key parameters: i) Rubisco activity (V_{cmax}), ii) photosynthetic electron transport rate (J_{max}) determining the ability to regenerate RuBP substrate for Rubisco, and iii) Triose Phosphate Utilization (TPU) driving the synthesis of sucrose from sugar precursors in the Calvin-Benson cycle. Thereby, TPU acts as a short-term sink that commits carbon to end-products and is closely linked to triose phosphate conversion into sucrose or starch. High sink capacity accelerates the utilization of triose phosphate for sugar synthesis and export *via* phloem. It accelerates P_i recycling and RuBP regeneration in the Calvin-Benson cycle (Paul and Foyer, 2001; Paul and Pellny, 2003; Kaschuk *et al.*, 2009; Gibson *et al.*, 2011; Kant *et al.*, 2012). TPU limitation occurs primarily at high CO₂ or sink-limited situations (Sharkey, 1985; Leegood and Furbank, 1986).

The FvCB model is commonly used as a module in crop models (Wu *et al.*, 2016). Currently, photosynthesis is thought to be limited mainly by either V_{cmax} or J_{max} , whereas TPU has received less attention and is mostly ignored by crop models (von Caemmerer, 2000; Long and Bernacchi, 2003) because its regulation is largely unknown (Yang *et al.*, 2016). However, TPU as a link between sugar production (source) and consumption (sink) may become functionally important for crop models when addressing future climatic scenarios and e-CO₂ (Busch and

Sage, 2017), particularly in sink-limiting situations (Asseng *et al.*, 2017; Lombardozzi *et al.*, 2017).

As the relations between source and sink activities at the plant, organ and process levels are complex, there is a need to integrate the different levels. The present study integrates these levels to study how extreme source-sink imbalances affect photosynthetic processes in flag leaves of rice, and specifically, to explore the role of *TPU* in the regulation of photosynthesis under such imbalances. A dedicated experiment was designed to observe the response of photosynthetic parameters, including *TPU*, at mid grain-filling stage to a 14-day period of e-CO₂ (source enhancement) and to panicle pruning (sink removal). Furthermore, we sought to observe leaf and stem NSC (starch, sucrose, hexoses) concentration as physiological indicators of sink or source restrictions. Lastly, we sought to observe the diurnal dynamics of these parameters because photosynthetic products tend to build up during the day. Results are expected to provide insights on whether *TPU* might influence photosynthetic rate in current and future climatic scenarios, and should thus be considered in crop modelling.

2.2. Material and methods

2.2.1. Plant material and growth conditions

Seeds of high yielding *indica* rice cultivar from the Philippines, IR64, were germinated on wet filter paper and transplanted to 4L pots filled with EGO 140 substrate (17%N-10%P-14%K, pH = 5). Basal fertilizer was applied using Basacot 6 M (Compo Expert) at 2 g l⁻¹, 11%N-9%P-19%K +2%Mg. A second application was performed (topdressing) just before the heading stage to avoid post-floral nitrogen deficiency. Experiment was undertaken twice in the same growth chambers, in November 2016 (Exp1) and February 2017 (Exp2), using the same environmental conditions.

For each experiment, 60 plants were grown and divided between two identical growth chambers (microclima MC1750E, Snijders, Netherlands) at CIRAD, Montpellier, France. The two chambers were maintained at 12-h photoperiod, with day/night temperatures of 29/22°C, air humidity of 65/80% and daytime radiation of 1200 μmol photons m⁻² s⁻¹ photosynthetically active radiation (PAR) at plant tops. The 30 pots per chamber were rotated regularly to compensate for heterogeneity. They were arranged at 35-cm plant spacing in a completely randomized design with five replicates (potted plants). Pots were irrigated to maintain soil moisture at field capacity level.

At heading stage (80 days after transplanting), all panicles of half of the plants in each growth chamber were excised (pruning treatment PR, first experimental factor). Non-PR plants were called controls. The second factor was CO₂ treatment: In chamber 1, CO₂ level was continuously controlled and maintained at 400 μmol mol⁻¹ during the whole experiment (ambient treatment); in chamber 2, CO₂ level has been controlled at 400 μmol mol⁻¹ until the onset of heading, then switched to 800 μmol mol⁻¹ (e-CO₂ treatment) for 15 days, the main period of grain filling (Cho *et al.*, 1988). At the end of the e-CO₂ period, physiological and biochemical measurements were performed. The combination of PR and CO₂ treatments at grain filling stage was chosen to achieve maximal C source-sink differences and to avoid the appearance of new sinks (panicles) during differential treatments.

For Exp1 in each growth chamber, photosynthesis, biochemical and biomass measurements (see details below) were carried out at three times of day: morning, midday, and afternoon, at +1h, +6h, and +9h after dawn, respectively, on 5 consecutive days. Measurements were done on a total of 60 plants (2 PR treatments x 3 times of day of sampling x 2 e-CO₂ levels x 5 biological replications).

For Exp2, in each growth chamber and for each treatment, photosynthesis, biochemical and biomass measurements were carried out at midday, afternoon and evening; at +6h, +9h and +11h after dawn, respectively. As for Exp1, these were done for 5 consecutive days, resulting in a total of 60 measured plants.

2.2.2. Leaf photosynthesis measurement

Leaf photosynthesis parameters were measured on the flag leaf on the main culm 2 weeks after heading, using two portable photosynthesis systems (GFS-3100, Walz, Germany) identically calibrated and used to measure simultaneously plants at each CO₂ level. The measurements were made *in situ* using saturating PPFD light (1500 μmol m⁻² s⁻¹ of PAR), controlled leaf temperature at 29°C, relative humidity in the cuvette set at 65%, and constant air flow rate through the cuvette of 800 ml min⁻¹. We used a large exchange area cuvette of 8 cm² to limit border effects known to affect photosynthesis measurement at high [CO₂] (Long and Bernacchi, 2003). Net photosynthesis CO₂ response curves (A/C_i) were obtained over a range of external CO₂ levels in the following order: 400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 and 2000 μmol mol⁻¹. At each step, gas exchange variables were recorded upon reaching steady-state (7-8 min per step, coefficient of variation <1%). In subsequent analysis, net photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s) and intercellular CO₂ concentration (C_i) were determined as the value measured at the 400 μmol mol⁻¹ CO₂ step of the curve. Chlorophyll fluorescence was measured for each CO₂ step simultaneously using Walz PAM-fluorimeter

3055FL, integrated into the photosynthesis equipment. The steady-state fluorescence yield (F_s) was measured after registering the gas-exchange parameters. A saturating light pulse (8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during 0.8 s) was applied to achieve the light-adapted maximum fluorescence (F_m'). The operating PSII photochemical efficiency (ϕPSII) was determined as $\phi\text{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$.

To fit the FvCB model of C_3 photosynthesis to experimental data, we used non-linear fitting procedure developed by Sharkey (2016), version 2. In the present study, Rubisco catalytic constants were adapted for rice (*Oryza sativa*) with values taken from (Hermida-Carrera *et al.*, 2016). The three main photosynthesis limitations, maximum carboxylation rate (V_{cmax}), electron transport rate (J_{max}), and triose phosphate utilization (TPU), were estimated simultaneously, along with mesophyll conductance (g_m), by minimizing the sum of squares of the residuals. Independent measurements of day-time respiration (R_d) were made on some plants using the procedure of Yin *et al.* (2011), and an average value of R_d was used as a constant in the fitting procedure to avoid over-parameterization. Fluorescence measurements of ϕPSII were used to study the rate-limiting process for each level on the CO_2 curve, particularly to study the transition to TPU limitation as ϕPSII declines at high C_i (Sharkey 2016). To allow treatment comparisons, all parameters were scaled to a constant temperature of 25°C. In total, 120 CO_2 response curves were analyzed.

2.2.3. Sugar content analysis

Immediately after A/C_i curve measurements, the same leaf was sampled to measure non-structural carbohydrate content (NSC: starch, sucrose, glucose, fructose). Segments of the corresponding culm (top internode below the peduncle and bottom-most elongated internode) were also analyzed. Prior to grinding by ball grinder (Mixer mill MM 200, Retsch, Germany), the samples were frozen in liquid nitrogen. Sugars were extracted 3x from 20 mg samples with 1 mL of 80% ethanol for 30 min at 75°C, then centrifuged 10 min at 9500 g (Mikro 200, Hettich centrifuge). Soluble sugars (sucrose, glucose, and fructose) were contained in the supernatant and starch in the sediment. Supernatant was filtered in the presence of polyvinyl polypyrrolidone and activated carbon to eliminate pigments and polyphenols. After evaporation of solute with Speedvac (RC 1022 and RCT 90, Jouan SA, Saint Herblain, France), soluble sugars were quantified by high performance ionic chromatography (HPIC, standard Dionex) with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). The sediment was solubilized with 0.02 N NaOH at 90°C for 1.5 h then hydrolyzed with α -amylglucosidase at 50°C, pH 4.2 for 1.5 h. Starch was quantified as described in Boehringer (Pomeranz and Meloan, 1994) with 5 μL of hexokinase (glucose-6-phosphate dehydrogenase), followed by photometry of NADPH at 340 nm (spectrophotometer UV/VIS V-530, Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

2.2.4. Leaf Nitrogen Content and Mass per Area

On each plant, segments of the leaf used for measuring the CO₂ curve were used for determining the nitrogen content in % dw (Nm; mg N g⁻¹ dw of leaf blade) and specific leaf area (SLA; cm² g⁻¹). Nitrogen content per leaf area (Na; g N m⁻²) was obtained as Nm divided by SLA. The area of each sample was measured with a leaf area meter (LI-3100, LI-COR, Lincoln, NE, USA) then oven-dried until constant weight (48 h at 70°C). Total nitrogen (N) was analyzed based by Dumas combustion method using a LECO TruMac Nitrogen analyzer, and potassium content (K) was measured in addition in Exp2 using an ICP-OES spectrometer 700 Series (Agilent Technologies). A relative indicator of chlorophyll content, SPAD, was also measured on the same leaf using a SPAD-502 (Minolta, Ltd., Japan).

2.2.5. Plant growth and biomass measurements

After sampling for biochemical analyses, all the aerial parts of plants were collected. Leaf blade, sheath, culm and panicle dw per plant (DM) were measured after drying samples at 70°C during 48 h (adding *a posteriori* the DM of organ segments sampled previously). Tillers and panicles were counted and total plant green leaf area measured, using a leaf area meter (LI-3100 LI-COR, Lincoln, NE, USA). A proxy for the source-sink ratio was estimated at the time of photosynthesis measurements as the main-culm flag leaf area to fertile spikelet number ratio.

2.2.6. Statistical analysis

A three-way analysis of variance (ANOVA) of pruning treatment (PR), CO₂, sampling time and interaction effects on each measured parameter was performed for each experiment combined using the PROC MIXED method of the SAS package (SAS Institute Inc., NC, USA, version 9.04). A multiple comparison of means and Tukey's test ($\alpha=0,05$) was then performed.

Carbohydrate variables were log-transformed to stabilize variance. An analysis of covariance was performed to study the relationship between TPU, sugar contents, CO₂ and pruning treatments, using the PROC GLIMMIX method of the SAS package. Blocking effects (time of the day) were considered as random effects (Piepho *et al.*, 2003). No experiment effect was observed on parameters measured at the same time in both experiments (illustrated by box plots in Fig. S 2-1 for A, TPU and flag leaf sucrose content only).

2.3. Results

2.3.1. Photosynthetic parameter responses to C source-sink imbalance

Under ambient $[\text{CO}_2]$, leaf photosynthesis (A) was significantly reduced by PR treatment ($P < 0.001$, Table S 2-1), mainly in the afternoon during which A declined for all treatments. This was supported by a significant interaction observed between pruning treatment and time of day of measurement ($P < 0.001$, Table S 2-1). This result was amplified under elevated $[\text{CO}_2]$, with a reduction of A by 50% in the evening for PR compared to control plants (Fig. 2-1A).

No significant effects of the experimental factors were observed on leaf chlorophyll content (SPAD). Stomatal conductance (g_s) decreased along the day at both CO_2 concentrations, with significant effects of time of day ($P < 0.001$, Table S 2-1). g_s was significantly decreased by PR treatment ($P < 0.001$) which interacted with $[\text{CO}_2]$ ($P < 0.05$) without any significant variation of intercellular CO_2 concentration (C_i) (Table 2-1). Decrease of g_s was significant only in the afternoon under ambient $[\text{CO}_2]$ but already from midday onwards under elevated $[\text{CO}_2]$.

Before estimating g_m and the other parameters that are commonly derived from A/C_i curves, we assessed the shape of A/C_i response curves (replicate means) for each treatment along the day (Fig. 2-2A). Within high C_i levels, A responded little to a change in C_i . It even declined with increasing C_i for the PR-treated plants (Fig. 2-2A), suggesting an inhibition of A by TPU limitation. It is difficult to rely on only A/C_i curves to determine the transition from RuBP-regeneration limitation to TPU limitation since they usually occur together under high $[\text{CO}_2]$ (Long and Bernacchi, 2003; Bernacchi *et al.*, 2013). We used chlorophyll fluorescence-based data on the operating efficiency of PSII electron flow (ϕPSII) measured concomitantly with A to detect the C_i above which TPU limited A . When this is the case, ϕPSII declines (Sharkey, 2016). The decline of ϕPSII was observed above a C_i of $825 \mu\text{mol mol}^{-1}$ in the evening, in plants exposed to ambient $[\text{CO}_2]$ and pruning treatment (Fig. 2-2B, left). It occurred at C_i above 742 and $363 \mu\text{mol mol}^{-1}$ under elevated CO_2 condition in the afternoon and in the evening, respectively (Fig. 2-2B, right). As these C_i thresholds were mostly higher than the C_i at A measurement (Fig. 2-2B), TPU did not limit A under the experimental conditions. However, under the most severe sink limitation (PR, $800 \mu\text{mol mol}^{-1} [\text{CO}_2]$, evening) TPU was close to limiting levels.

We applied the procedure of Sharkey (2016) to fit each A/C_i curve to derive estimates of g_m and biochemical photosynthetic parameters. All values of g_m were high, $> 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ (Table 2-1), values known not to limit photosynthesis. Therefore, our estimates of g_m did not explain differences in A among treatments or times of day.

A significant decrease was observed for V_{cmax} in response to PR treatment (for both experiments: $P < 0.001$, Table S 2-1). However, this reduction depended on CO_2 treatment (interaction PR x CO_2 at $P < 0.05$, Table S 2-1) and was significant only in the afternoon and

evening under elevated CO₂ (Table 2-1). Mean reduction in PR was 29% compared to control in the afternoon under elevated CO₂ (Fig. 2-1C). Regarding J_{max} , a significant effect of PR treatment was observed ($P < 0.001$, Table S 2-1), despite no significant numerical decrease of J_{max} in PR treatment compared to control as shown in Table 2-1 and Fig. 2-1D. A time-of-day effect was also observed ($P < 0.05$).

Although A/C_i curves for control plants grown at 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ [CO₂] did not show TPU limitation (Fig. 2-2), TPU was significantly reduced by PR treatment ($P < 0.001$, Table S 2-1). A decline of TPU afternoon was observed in both [CO₂] treatments (Fig. 2-1B), resulting in a highly significant time-of-day effect ($P < 0.001$). This decrease was particularly strong under e-CO₂ when combined with PR treatment, which led to significant interaction effects (PR x CO₂, $P < 0.05$). In this latter situation, significant differences between control and PR plants were observed in the afternoon. The decrease of TPU caused by PR in the evening was 40% under elevated [CO₂] and 13% under ambient [CO₂] (Fig. 2-1B).

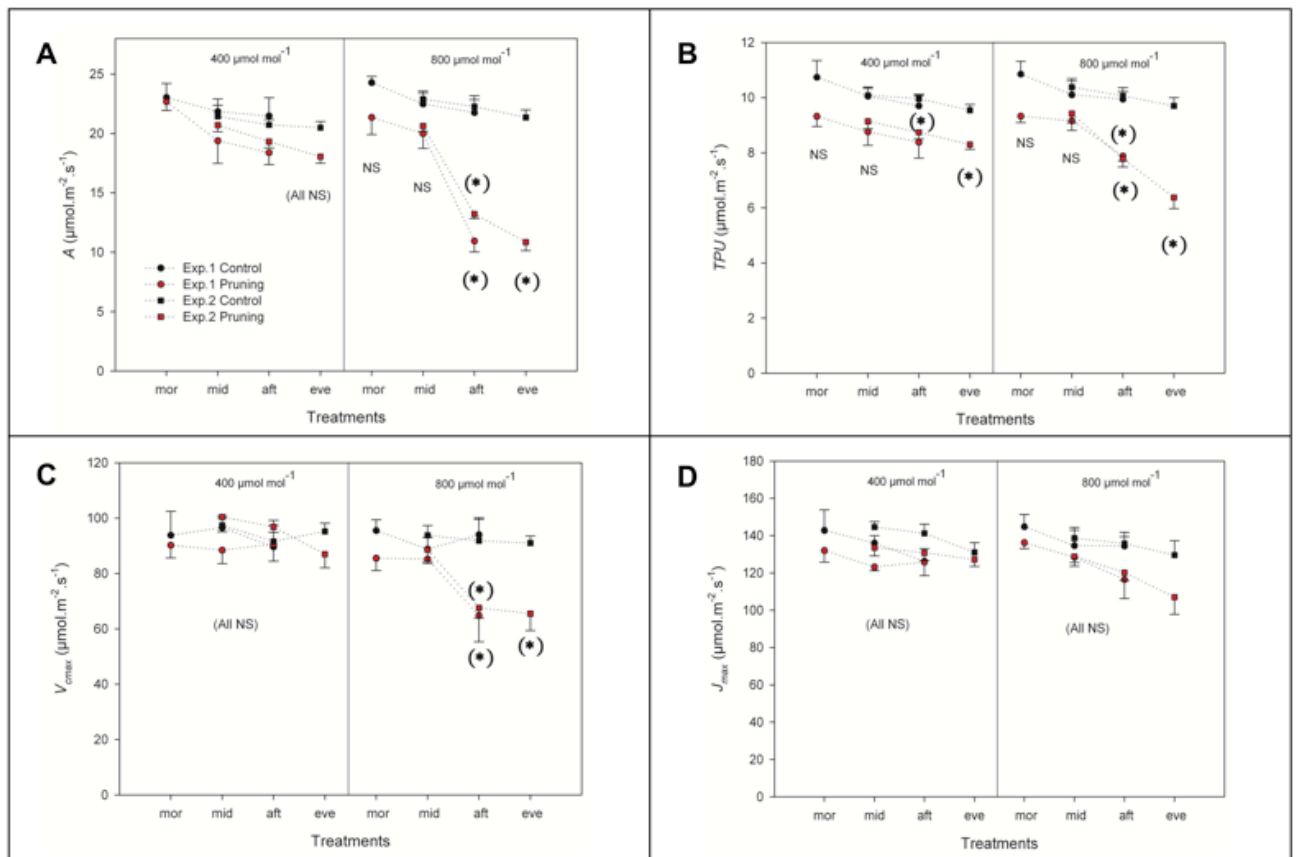


Figure 2-1: Effect of pruning and CO₂ treatment on photosynthetic parameters

A) Net assimilation rate (A); (B) triose phosphate utilization (TPU); (C) maximum carboxylation rate of Rubisco (V_{cmax}); and (D) maximum rate of electron transport (J_{max}). Measured at 2 weeks after heading on the flag leaf on the main culm of plants of IR64 rice genotype at two CO₂ levels (400 and 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), in two growth chambers for experiments 1 and 2. Black symbols: Control (plants with panicles); and red symbols: PR (plants with panicle pruned). Measurements were carried out in the morning (mor), midday (mid), afternoon (aft), and evening (eve) periods. *Significant difference at $P < 0.05$ (Tukey HSD test) among values. NS: not significant. Each point represents the mean of five values \pm SE.

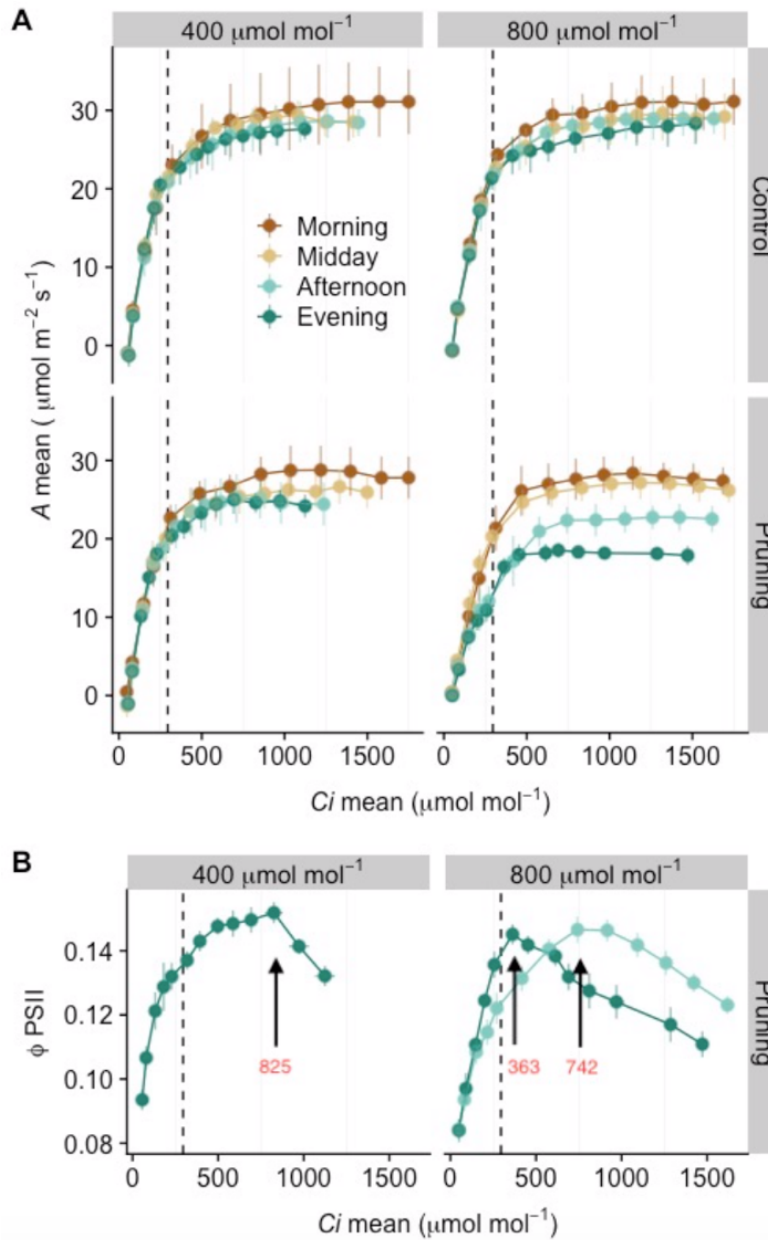


Figure 2-2 : Mean A/Ci curves for all treatment combination (panel A) and corresponding mean φPSII/Ci curves (panel B)

for experiments 1 and 2 (shown only for Pruning treatment, which caused significant TPU decline). Dashed lines indicate mean C_i value (290 μmol mol⁻¹) for photosynthesis measurement at treatment CO₂ level (400 or 800 μmol mol⁻¹). Arrows in (B) indicate the C_i level at which TPU limitation may begin to occur. The CO₂ concentrations indicated in the headers are treatment conditions and not those administered when measuring CO₂ response, which comprised 14 different levels. Each point represents the mean of five values ± SE.

Leaf sucrose concentration in PR plants was significantly higher than in control plants in the afternoon (P<0.001 for both PR and time-of-day effects, Table S 2-2). No interaction effects between these factors were observed. The [CO₂] effect on leaf sucrose was smaller (P<0.05). Hexose concentration in the flag leaf was not affected by any of the experimental factors.

PR reduced sucrose concentration in the basal internode on the main culm ($P < 0.001$, Tables 2-2 and S 2-2), without significant variations during the day. Similar results were observed for hexose concentration in the lower internode, but at about 35-fold lower concentrations than sucrose (Table 2-2). As soluble sugar content (hexose and sucrose) was similar in basal and upper internodes, results are presented only for basal internodes.

PR increased starch concentration in both top and bottom internodes on the main culm ($P < 0.001$; Tables 2-2 and S 2-2), whereby no interaction between CO_2 and PR treatments was observed. No time-of-day effect was observed for starch concentration in internodes.

No PR and CO_2 effects were observed on leaf starch concentration, but there was a significant time-of-day effect ($P < 0.001$, Tables 2-2 and S 2-2), causing a continuous increase of leaf starch concentration during the day (Table 2-2).

2.3.2. Plant growth response to C source-sink imbalance

PR significantly increased culm dry matter (by 50-60%, $P < 0.001$, Table S 2-3 and Table S 2-4) and sheath dry matter (by 12-20%, $P < 0.001$). No $[\text{CO}_2]$ effect and no interaction between factors were observed (Table S 2-3). Panicle dry weight sampled two weeks after heading in the control plants was 280% higher under elevated $[\text{CO}_2]$ compared to ambient $[\text{CO}_2]$ ($P < 0.001$, Table S 2-3 and Table S 2-4), suggesting a strong stimulation of CO_2 enrichment on grain filling. By contrast, none of the factors affected plant total leaf dry matter, tiller number, panicle number and the SLA of the flag leaves used for photosynthesis measurement (Table S 2-3). The same was true for nitrogen and potassium contents of the flag leaf, except for a significant reduction ($P < 0.05$) of nitrogen content under elevated $[\text{CO}_2]$, particularly on control plants (Table S 2-3 and S 2-4). Dry matter of plant roots was also measured at the end of the experiments. No significant effect of experimental factors were observed (data not presented).

2.3.3. Correlations between photosynthetic and biochemical parameters

A positive linear correlation was observed between A and TPU ($R^2 = 0.64$, $P < 0.001$) across all combinations of $[\text{CO}_2]$ and pruning treatments, and across all times of day (Fig. 2-3). The strongest treatment-specific correlation was observed when PR treatment was combined with high $[\text{CO}_2]$, i.e. for the treatment combination causing the highest C source-sink ratio ($R^2 = 0.72$, $P < 0.001$). The corresponding correlation between A and V_{cmax} was also significant but weaker ($R^2 = 0.60$; data not presented).

Analysis of covariance was performed to study the relationship between nonstructural carbohydrate and *TPU* variations. Flag leaf sucrose concentration was by far the most predictive factor of *TPU* variation ($P < 0.001$) (Table S 2-5). This was supported by the negative, linear correlations ($R^2 = 0.66$ for controls, $R^2 = 0.40$ for PR) observed between flag leaf sucrose concentration and *TPU* (Fig. 2-4). The two linear correlations showed a similar slope (-5.4 for control and -6.1 for pruned) but with lower *TPU* value at the intercepts in the case of pruned plants. An effect of starch concentration in the lower internodes was also observed ($P = 0.01$) but it was smaller than that of leaf sucrose.

Finally, a negative correlation was found between *TPU* and plant C source-sink ratio measured two weeks after heading (R^2 of 0.45, $P < 0.01$; Fig. 2-5), defined as the ratio of flag leaf area over fertile spikelet number of the corresponding panicle (measured only for Exp2).

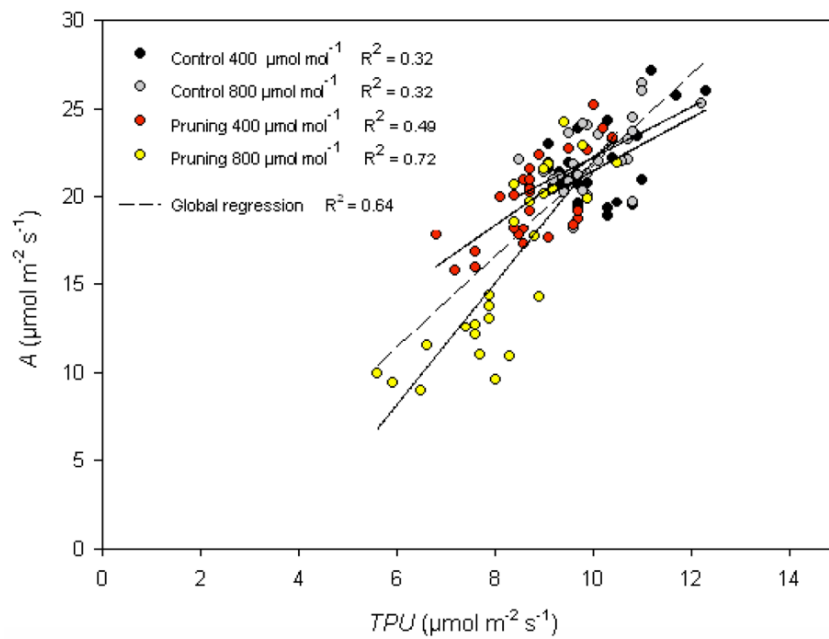


Figure 2-3 : Relationship between TPU and net photosynthesis (A)

in experiments 1 and 2 and for each combination of CO_2 x panicle pruning treatment.

With panicle and 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (black symbols), with panicle and 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (gray symbols), panicles pruned and 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (red symbols), panicles pruned and 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (yellow symbols). Each point represents a single value.

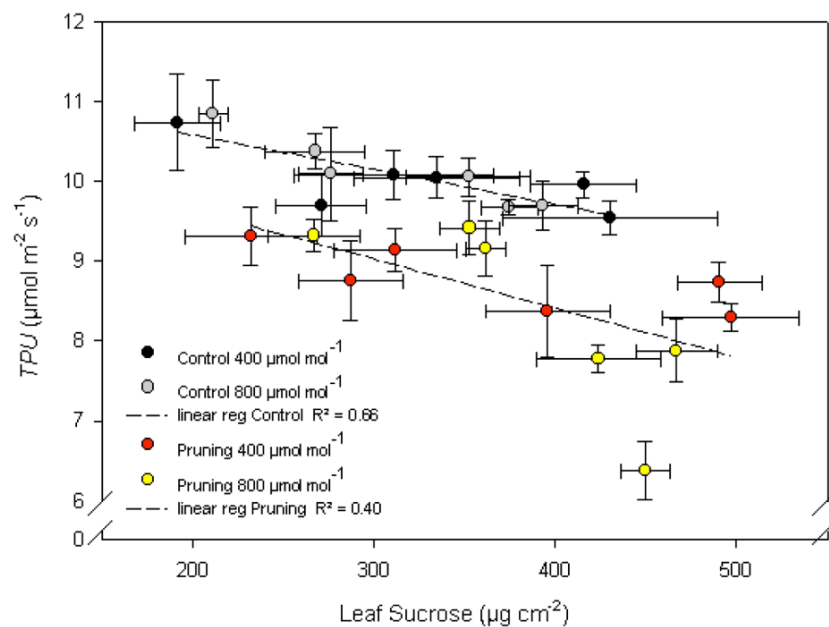


Figure 2-4 : Relationship between TPU and Leaf sucrose content

in experiments 1 and 2, separating control and panicle pruning treatment. With panicle at 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (black symbols), with panicle at 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (grey symbols), panicles pruned at 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (red symbols), panicles pruned at 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (yellow symbols). Dashed lines represent linear regression for both pruning treatments.

Each point is the average of five values and is presented with horizontal and vertical standard errors.

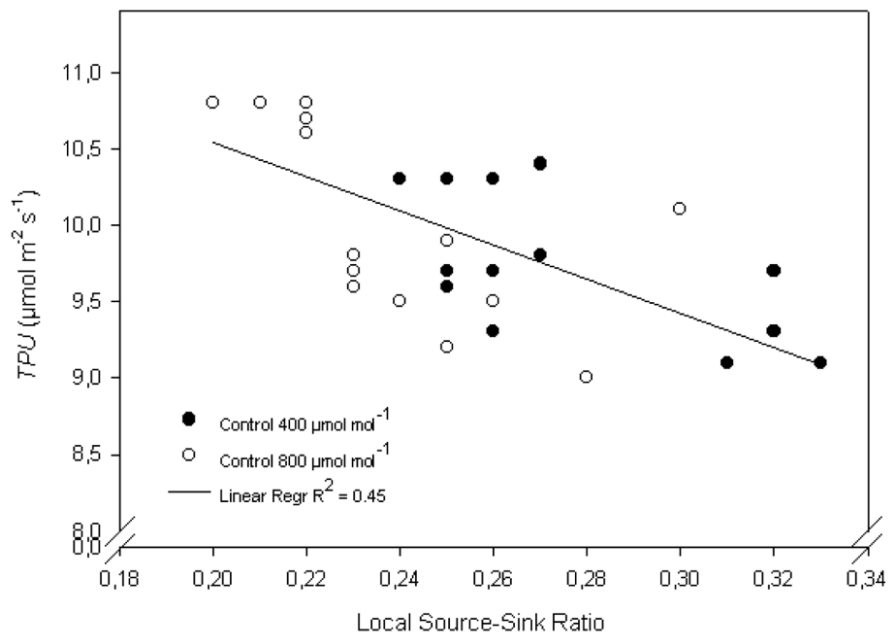


Figure 2-5 : Relationship between TPU and local source-sink ratio

(defined as flag leaf area / spikelet number on the main culm) in experiments 2. Line represents linear regression and each point represents a single value.

2.4. Discussion

The physiology and biochemistry of leaf photosynthesis of major crops such as rice are well studied. So are the relations between sources, sinks and the formation of grain yield at the plant or crop scale. These processes are necessarily inter-dependent but little is known on the feedbacks causing interaction. We hypothesized that (1) source-sink imbalances are locally expressed as variations of *TPU* in the leaf, and (2) *TPU* would limit photosynthetic rate when C_i exceeds a critical level. To test the hypothesis, we manipulated the source with CO_2 enrichment and the sink with panicle pruning. The results confirmed hypothesis (1). However, in our experiment's C_i did not exceed critical levels causing *TPU* limitation for *A* (Hyp.2), although it came close to that level in the afternoon under combined pruning and e- CO_2 . The strong reductions of *A*, accompanied by local accumulation of assimilates, confirmed the presence of feedback inhibition of photosynthesis under sink limitation.

2.4.1. Photosynthesis down-regulation under C sink limitation

Elevated $[CO_2]$ enhances plant C source capacity in C_3 plants and potentially, if plant sinks are insufficiently plastic, the C source-sink ratio. Our study showed that photosynthesis decreased along the day. The extent of the decrease depended on C sink limitation induced by sink pruning

and/or source stimulation with CO₂. Declining photosynthesis along the day was previously reported under non-modified C source-sink balance (Ishihara and Saitoh, 1987; Yang *et al.*, 2008; Koyama and Takemoto, 2014). Our observations on control plants under ambient [CO₂] confirmed this trend, whereby enhanced source and pruned sinks further amplified it. Reductions in *A* attained 50% for both factors combined at the end of the day despite constant light resources. Sink limitation effects of this magnitude have not been noticed for rice previously. A similar effect, however, has been reported for wheat (King *et al.*, 1967) after removing ears under ambient [CO₂].

In the present study, CO₂ enrichment was applied during two weeks following heading. A small but significant reduction of N content per leaf area was observed under high [CO₂], particularly in control plants. As indicated by leaf N concentration per unit dry mass, which was 36 mg g⁻¹ for the elevated CO₂ treatment, N was above the empirical observation to affect growth, reported to be 28 mg g⁻¹ (Seneweera *et al.*, 2005: study made at 700 μmol mol⁻¹ CO₂). Leaf N concentration can decrease under CO₂ enrichment due to dilution, causing reduced photosynthesis (Ainsworth and Long, 2005; Leakey *et al.*, 2009; Nakano *et al.*, 1995; Yin 2013). This was avoided in this study by limiting CO₂ treatment to two weeks, at a stage when leaves were not expanding anymore. It was also reported that under elevated CO₂ and sink limitation, a high leaf N content could alleviate a photosynthetic down-regulation during the day (Makino *et al.*, 1997; Seneweera *et al.*, 2002). In our experiments, however, a diurnal decline of photosynthesis happened in all treatments despite ample N resources.

We also investigated leaf potassium concentration in Exp2 because K deficiency potentially affects photosynthesis through stomatal responses *via* osmoregulation in guard cells (Weng *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013), and also assimilate transport in phloem (Gerardeaux *et al.*, 2010). No potassium deficiency was observed that could explain the observed variations in photosynthesis.

A reduction of stomatal conductance was observed under sink pruning treatment, as reported for many plants, e.g., citrus (Urban, 2004; Nebauer *et al.*, 2011) and coffee (DaMatta *et al.*, 2008). Compared to control plants, panicle-pruned plants showed a smaller increase of photosynthetic rate in response to e-CO₂, whereby pruning always reduced stomatal conductance. However, there was no significant difference in *C_i* between control and pruned plants when measured at a given atmospheric [CO₂]. Pruning thus decreased *A* at an unchanged *C_i* level, indicating that the photosynthetic capacity of the leaf was affected. Shimono *et al.* (2010) also reported that rice plants with pruned panicles under ambient and elevated CO₂ had unaltered *C_i* levels. (Damour *et al.*, 2010) reviewed models of stomatal conductance and

explained the commonly observed stability of C_i with a co-regulation of g_s and A , based on mechanisms that are still controversial.

No CO_2 effect was observed on stomatal conductance, in contrast to reports by Ainsworth (2008) and Yoshimoto et al. (2005). In our study, a supplemental dose of N fertilizer was applied just before heading stage. This might have maintained high stomatal conductance as previously shown in rice (Shimoda, 2012; Shimoda and Maruyama, 2014). Similar to another study evaluating short-term CO_2 enrichment effects on mesophyll conductance (Tazoe et al., 2009), no PR and CO_2 effect was observed on mesophyll conductance g_m , a parameter known to be sensitive to environment and estimation method (Singsaas et al., 2004; Flexas et al., 2008; Pons et al., 2009; Sun et al., 2014). In our experimental conditions involving a 14-day CO_2 enrichment, g_m was very high and thus did not limit photosynthesis. Rice generally has high g_m as compared with other species (van der Putten et al., 2018), probably because rice leaves have high chloroplasts coverage on the mesophyll cell periphery (Busch et al., 2013). Therefore, g_m was not responsible for the decline in A observed under sink limitation. In addition, no difference was observed for SLA, a morphological trait that can affect genotypic photosynthetic capacity (Dingkuhn et al., 1998).

The down-regulation of photosynthesis observed under elevated CO_2 in the afternoon under C source-sink imbalance is a phenomenon that escapes observation if photosynthesis time courses are studied day-to-day and not within the day. This phenomenon is not captured in measurements at daily intervals (e.g., Makino and Mae, 1999), commonly done in the morning or at noon (Pérez-Harguindeguy et al., 2013). Our results suggest that it is crucial to capture diurnal changes of photosynthesis when studying source-sink effects on photosynthetic rate, or when estimating cumulative photosynthesis for a day.

2.4.2. TPU effect on photosynthesis under sink limitation

Generally, there are transitions from one limiting factor to another, although they may be masked by a concomitant decline of several factors through feedbacks. Along A/C_i curves, A is limited by Rubisco activity (characterized by V_{cmax}) at low C_i , by RuBP regeneration (characterized by J_{max}) at higher C_i , and potentially by TPU at even higher C_i . A TPU limitation is characterized by a lack of sensitivity of A to, or by a slight decline of A with, increases of CO_2 partial pressure (Sharkey, 1985). TPU limitation can be further ascertained by a decline of ϕ_{PSII} with increasing C_i (Sharkey, 2016). When TPU limitation occurs, photosynthesis is affected by shortage of P_i (Sharkey and Vanderveer, 1989; Paul and Foyer, 2001) needed for ATP synthesis. In the absence of a strong C sink, TPU can be rate-limited by sucrose synthesis, thereby decreasing P_i recycling rate (Paul and Pellny, 2003). This limited regeneration is

reflected in the rate at which the intermediate products of CO₂ fixation (triose-phosphate) are converted to starch and sucrose and accumulated locally.

The patterns of diurnal decline of *TPU* generally mirrored those of *A* (Fig. 2-1), resulting in a highly significant correlation between the two variables (Fig. 2-3). This correlation in itself, however, is not proof of a rate limitation by *TPU*. The *A/C_i* curves in Fig. 2-2A suggest that with increasing sink limitation (combinations of factors e-CO₂, pruning, time of day), *A* tended to plateau, or even decline, at high *C_i* values. Chlorophyll fluorescence-based quantum yield efficiency, measured concurrently with gas exchange under exposure to 14 levels of [CO₂], indicated the critical *C_i* above which *TPU* limited *A* for each treatment (Fig. 2-2B). In most of the situations studied, the critical *C_i* incurring *TPU* limitation was higher than the observed *C_i*. In one particular situation, however (e-CO₂, pruning, evening), the critical *C_i* was 363 μmol mol⁻¹ and thus, similar to the observed *C_i* value. Consequently, although *TPU* decreased most strongly among the biochemical photosynthetic parameters under sink limitation, it probably did not limit *A* except, possibly, for the treatment causing the strongest source-sink imbalance.

Further studies should determine if *TPU* can limit *A* in a climate change context with elevated ambient CO₂, and/or under lower temperatures to which *TPU* is very sensitive (Cen and Sage, 2005; Busch and Sage, 2017), and for plants having lesser phenotypic plasticity and assimilate transport capacity than rice. *TPU* limitations have been reported under low temperature (Sage and Sharkey, 1987; Sage and Kubien, 2007) or high CO₂ environments (Sharkey *et al.*, 1986a; Cen and Sage, 2005). In such cases, mutual adjustment of *V_{cmax}* and *TPU* is observed, as these parameters decrease concurrently and in strict stoichiometry (McClain and Sharkey, 2019). Indeed, we observed a strong decrease of *V_{cmax}* at high [CO₂] in the pruned plants (Fig. 2-1) concurrently with *TPU*, suggesting a co-adjustment. Changes in *V_{cmax}* may have contributed to the observed decrease in photosynthesis under e-CO₂ (Makino *et al.*, 2000; Shimono *et al.*, 2010), possibly due to a loss of Rubisco (Long *et al.*, 2004). It was also shown that *TPU* limitation activates energy-dependent quenching (*q_E*), resulting in a deactivation of Rubisco (Sharkey *et al.*, 1986a; Sage *et al.*, 1989). To enable photosynthesis, the carbon reduction cycle needs to regenerate RuBP, consuming ATP and NADPH produced through photosynthetic electron transport in the chloroplast. This process can be evaluated by *J_{max}* parameter (RuBP regeneration) which can also limit photosynthesis. Although we observed a significant decrease in *J_{max}* during the day in response to sink pruning, variations were too small to explain the observed variation of *A*. The two parameters correlating most with *A* were *V_{cmax}* and *TPU*, suggesting a tight coordination between *TPU* and Rubisco capacity.

Our findings suggest that *TPU* and *A* of rice generally decline in the afternoon, and particularly when sink is restricted. This may potentially cause overestimation of whole-day photosynthesis

in crop models that do not consider rate limitations to assimilate export from the leaf (Lombardozzi *et al.*, 2017, 2018). *TPU* is situated at the interface between production and consumption (or removal) of photosynthates. Thus, the mechanisms controlling this parameter can only be understood in a whole-plant context including assimilate transport and partitioning among sinks (Yang *et al.*, 2016).

2.4.3. Sugar partitioning effect on photosynthesis and TPU regulation

Similar to our results, Morita *et al.*, (2016), Shimono *et al.* (2010), Thompson *et al.* (2017) and Zhu *et al.* (2016) found that leaf sucrose concentration increased more than hexose concentrations under e-CO₂. No increase in starch concentration in the flag leaf was observed under those conditions (Shimono *et al.*, 2010). This can be explained by the large capacity of rice to accumulate carbohydrates in culm. Moreover, leaf starch concentration in the flag leaf (100 to 300 $\mu\text{g cm}^{-2}$) was below empirical critical values (600 $\mu\text{g cm}^{-2}$) reported to affect photosynthesis in rice (Weng and Chen, 1991), suggesting that leaf starch accumulation did not affect *A*.

We observed an increase in starch concentration in culm internodes in panicle-pruned plants, probably because internodes acted as alternative sinks for the panicle. Culm sucrose remobilization decreased under pruning and possibly explained the increase in starch. It may have acted as a physiological signal regulating photosynthesis as reported for sugarcane (McCormick *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018).

Flag leaf sucrose concentration was identified as the main nonstructural carbohydrate affected by pruning treatment and [CO₂], showing a continuous increase along the day. Photosynthesis is inhibited by leaf carbohydrate accumulation (Goldschmidt and Huber, 1992; Paul and Pellny, 2003). In this study, a negative linear relation was observed between *TPU* and leaf sucrose content. A theory of *TPU* control by P_i availability, mediated by sugar production, was proposed by Paul and Pellny (2003). According to this theory, *TPU* can limit photosynthetic rate through a reduced export carbon from the Calvin-Benson cycle, which in turn is related to the rate at which sugar phosphates are dephosphorylated and end-products are produced. Thus, the production and export of sucrose is essential for sustaining photosynthesis. We suggest that in our study, leaf sucrose was exported to plant sinks such as the panicle in control plants, preventing excessive build-up in the leaf. For panicle-pruned plants, sucrose could not be exported sufficiently during the afternoon. Some export occurred to the top internode, where starch concentration increased, but sucrose concentration increased in the flag leaf due to the smaller sink (Huber and Huber, 1992; Paul and Foyer, 2001). In this case, sucrose-phosphate synthase (SPS) feedback inhibition occurs because of an increase in the phosphorylation state of the enzyme (Huber *et al.*, 1989). It has been shown that SPS is a substrate for SnRK1 protein

kinases, modulating SPS activity when sucrose accumulates (Sugden *et al.*, 1999). Inhibition of sucrose synthesis may reduce export of TP from the chloroplast, causing a drop in P_i in the cytosol, leading to decrease in *TPU* (Paul and Pellny, 2003).

While the negative correlation between *TPU* and flag-leaf sucrose concentration showed a similar slope for the panicle-pruned and control plants, *TPU* was lower in the pruning treatment at any given sucrose concentration (reduced intercept, Fig. 2-4). Thus, the *TPU* vs. [sucrose] relationship was not the same for control and panicle-pruning treatments, and [sucrose] alone could not explain the *TPU* decline under C source-sink imbalance. Possibly, additional feedbacks on *TPU* occurred, e.g. via phloem sucrose concentration. Sucrose concentration in the leaf phloem depends on the rate of sucrose loading at the source and unloading at the sink end (Chiou and Bush, 1998; Li *et al.*, 2003). Panicle pruning probably led to high sucrose concentrations in the leaf phloem as sucrose transport is mainly operated by phloem in rice (Regmi *et al.*, 2016). Photo-assimilates would build up in the mesophyll (Chiou and Bush, 1998) and decrease *TPU* as previously described.

The ratio of flag-leaf area over the fertile spikelet number of the corresponding panicle provides a rough proxy for local C source-sink ratio during grain filling. It correlated negatively with *TPU* (Fig. 2-5), suggesting that morphology-based phenotypic plasticity causing variation in C source-sink ratio can affect *TPU*. A recent study also reported the effect of sink strength on sucrose partitioning that may be used to increase grain yield in rice (Morey *et al.*, 2018). More research is needed to understand how whole-plant source-sink interactions affect crops' ability to utilize rising CO₂ levels, particularly with respect to regulatory processes affecting the sources and sinks. Trehalose 6-phosphate (T6P), a physiological proxy molecule for sucrose, acts in higher plants as a signal of sugar availability, thereby regulating sink activity at cellular level (Nunes *et al.*, 2013). It was recently reported that transformation and over-expression in maize floral tissues of the rice Trehalose Phosphate Phosphatase1 gene (using the MADS6 promoter) not only stimulated grain sinks and yield but also increased photosynthetic rate of leaves adjacent to the maize cobs (Oszvald *et al.*, 2018). The T6P sugar signaling system is probably involved in plant source and sink acclimation to e-CO₂ but little is currently known how (Thompson *et al.*, 2017).

Our study provided new insights into the effect of C source-sink relationships on rice photosynthesis and in particular, its parameter *TPU*. A significant down-regulation of photosynthesis (up to 50%) was demonstrated during the 2nd half of the day in response to sink limitation. *TPU* strongly decreased along with *A* and it was negatively correlated with flag-leaf sucrose concentration, suggesting sugar feedback inhibition of *A*. It is suggested that photosynthesis measurements performed in the morning, as commonly practiced, may not

reliably represent the plant's diurnal photosynthetic performance, particularly under CO₂ enrichment or sink limitation.

Although *TPU* decline mirrored the decline of *A* under sink limitation, its rate-limiting effect on *A* could not be confirmed, except possibly at the end of the day for the combination of e-CO₂ and panicle pruning. Only under these specific conditions, the observed *C_i* was similar to the critical *C_i* above which quantum yield efficiency decreased. The decrease in *TPU* under sink limitation thus caused a substantial decrease in potential photosynthesis (*A_{max}*), but as *V_{cmax}* was down-regulated along with *TPU*, plants probably avoided a potentially damaging *TPU* limitation to actual photosynthesis. This may be different in plants that poorly adjust sinks and assimilate transport to increased assimilation potential. However, in the present study, sink limitation did have strong inhibitory effects of photosynthetic rate, particularly in the afternoon, associated with decreasing *TPU* and *V_{cmax}*, and a local build-up of photosynthetic products. Because the drop in photosynthetic rate under sink limitation was substantial, it will be interesting to explore the photosynthetic responses of genotypes differing in source-sink ratio (and in the adaptive plasticity of sinks) to CO₂-enriched environments.

2.5. Acknowledgments

This work was financially supported by CIRAD, French Agricultural Research Centre for International Development; <http://www.cirad.fr>). We thank Audrey Dardou, Paul Pruvost, Christian Chaine, Remy Michel for their valuable assistance in technical support, and the biochemical phenotyping platform of the AGAP research unit at CIRAD.

2.6. Tables & Supplemental material – Chapter 2

Table 2-1: Photosynthesis characteristics

A : for Exp1 and B : for Exp2, measured two weeks after heading on the flag leaf on the main culm of IR64 plants grown under two [CO₂] levels with panicle pruned at heading (PR) or not (Control). Values are means ± standard error (n=5). For each column within a [CO₂] level, values followed by different letters differ significantly (P<0.05).

A	[CO ₂] 400 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _s (mmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i (μmol mol ⁻¹)	V _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _m (μmol m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	SPAD
				Control	23,03 ± 1,18 a	598,15 ± 21,21 a	321,82 ± 9,67 a	93,80 ± 8,66 a	142,80 ± 10,98 a	10,74 ± 0,60 a	12,65 ± 0,57 a
			Morning	21,84 ± 0,96 a	572,50 ± 28,37 a	309,75 ± 2,35 ab	96,50 ± 3,13 a	136,00 ± 3,55 a	10,05 ± 0,26 ab	13,10 ± 0,62 a	45,01 ± 0,74 a
			Midday	21,48 ± 1,54 a	525,32 ± 59,35 a	316,57 ± 6,15 ab	89,60 ± 7,78 a	126,20 ± 6,75 a	9,70 ± 0,37 ab	11,93 ± 0,95 a	44,40 ± 0,54 a
			Afternoon								
			PR	22,68 ± 0,74 a	541,06 ± 45,72 a	311,16 ± 6,33 ab	90,20 ± 4,55 a	132,00 ± 6,24 a	9,32 ± 0,36 ab	12,48 ± 0,16 a	47,00 ± 1,87 a
			Morning	19,38 ± 1,89 a	393,47 ± 91,60 ab	286,36 ± 15,43 ab	88,40 ± 4,85 a	123,20 ± 1,98 a	8,76 ± 0,49 ab	12,58 ± 0,72 a	46,86 ± 1,17 a
			Midday	18,38 ± 1,00 a	281,24 ± 33,01 b	277,85 ± 8,39 b	90,60 ± 6,13 a	125,80 ± 7,23 a	8,38 ± 0,57 b	12,38 ± 0,56 a	47,28 ± 0,92 a
			Afternoon								
B	[CO ₂] 800 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _s (mmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i (μmol mol ⁻¹)	V _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _m (μmol m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	SPAD
			Control	24,28 ± 0,47 a	709,38 ± 27,47 a	326,58 ± 4,73 a	95,50 ± 3,51 a	144,75 ± 5,92 a	10,85 ± 0,41 a	13,21 ± 0,73 a	45,25 ± 0,80 a
			Morning	22,48 ± 0,109 a	662,15 ± 33,46 ab	327,55 ± 3,01 a	88,80 ± 4,24 a	134,60 ± 8,35 a	10,10 ± 0,58 a	13,01 ± 0,64 a	46,14 ± 0,27 a
			Midday	21,76 ± 1,41 a	576,29 ± 84,55 ab	317,58 ± 13,10 ab	94,00 ± 5,54 a	134,40 ± 5,01 a	9,94 ± 0,27 a	12,20 ± 1,06 a	47,04 ± 1,06 a
			Afternoon								
			PR	21,36 ± 1,29 a	576,28 ± 85,35 ab	312,40 ± 8,89 ab	85,50 ± 3,97 ab	136,25 ± 2,86 a	9,33 ± 0,20 ab	12,44 ± 0,66 a	46,16 ± 0,65 a
			Morning	19,98 ± 1,22 a	431,54 ± 55,71 b	301,39 ± 6,68 ab	85,20 ± 1,59 ab	128,40 ± 4,83 a	9,16 ± 0,35 ab	12,21 ± 0,53 a	47,05 ± 0,75 a
			Midday	10,94 ± 0,92 b	168,36 ± 9,15 c	282,15 ± 7,11 b	64,80 ± 9,51 b	116,40 ± 10,06 a	7,88 ± 0,39 b	12,50 ± 0,44 a	44,58 ± 1,70 a
			Afternoon								
B	[CO ₂] 400 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _s (mmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i (μmol mol ⁻¹)	V _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _m (μmol m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	SPAD
			Control	21,44 ± 0,94 a	465,18 ± 38,50 a	291,70 ± 6,82 a	97,40 ± 3,50 a	144,60 ± 2,97 a	10,08 ± 0,30 a	12,12 ± 0,78 a	44,98 ± 1,24 a
			Morning	20,73 ± 0,46 ab	427,13 ± 37,20 ab	280,29 ± 6,75 ab	91,60 ± 7,59 a	141,20 ± 4,98 a	9,96 ± 0,16 a	12,93 ± 0,51 a	44,30 ± 1,53 a
			Midday	20,49 ± 0,52 ab	375,91 ± 5,72 ab	278,72 ± 9,05 bc	95,2 ± 2,95 a	131,00 ± 5,21 a	9,54 ± 0,21 ab	11,97 ± 0,89 a	44,06 ± 0,67 a
			Evening								
			PR	20,70 ± 0,56 ab	395,71 ± 36,66 ab	277,95 ± 5,77 ab	100,40 ± 5,31 a	133,60 ± 4,50 a	9,14 ± 0,27 abc	11,87 ± 0,85 a	45,48 ± 0,85 a
			Morning	19,32 ± 0,52 ab	296,42 ± 32,02 bc	251,56 ± 5,49 bc	96,80 ± 1,98 a	130,80 ± 4,21 a	8,74 ± 0,24 bc	11,30 ± 0,65 a	44,30 ± 1,49 a
			Midday	18,06 ± 0,55 b	261,15 ± 11,78 c	228,23 ± 12,32 c	87,00 ± 4,91 a	127,20 ± 3,72 a	8,30 ± 0,17 c	11,15 ± 0,72 a	45,09 ± 0,98 a
			Evening								
B	[CO ₂] 800 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _s (mmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i (μmol mol ⁻¹)	V _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _m (μmol m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	SPAD
			Control	22,89 ± 0,51 a	560,16 ± 32,49 a	302,28 ± 6,24 a	93,80 ± 3,56 a	138,60 ± 5,79 a	10,38 ± 0,21 a	13,80 ± 0,59 a	47,80 ± 0,68 a
			Morning	22,26 ± 0,60 a	420,84 ± 39,11 b	289,06 ± 10,12 ab	91,80 ± 8,34 a	135,80 ± 5,97 a	10,06 ± 0,29 a	10,02 ± 0,50 c	46,76 ± 1,28 a
			Midday	21,35 ± 0,64 a	360,9 ± 10,46 bc	287,98 ± 13,67 ab	91,00 ± 2,56 a	129,60 ± 7,65 ab	9,70 ± 0,29 a	12,15 ± 0,51 abc	46,02 ± 0,56 a
			Evening								
			PR	20,63 ± 0,45 a	409,25 ± 13,58 b	279,86 ± 5,06 ab	88,60 ± 4,30 ab	128,80 ± 3,30 ab	9,42 ± 0,33 a	12,98 ± 0,72 ab	47,94 ± 1,69 a
			Morning	13,21 ± 0,37 b	275,55 ± 6,62 c	258,18 ± 2,12 b	67,60 ± 3,66 b	120,20 ± 4,27 ab	7,78 ± 0,07 b	10,62 ± 0,75 bc	47,50 ± 0,98 a
			Midday	10,85 ± 0,65 b	147,47 ± 6,35 d	256,23 ± 4,05 b	65,50 ± 5,47 b	107,00 ± 8,22 b	6,38 ± 0,35 c	10,10 ± 0,49 c	47,08 ± 0,73 a
			Evening								

Table S 2-1: Summary of 3-way analysis of variance of physiological flag leaf variables:

Net photosynthesis level (A), stomatal conductance (g_s), internal CO₂ concentration (C_i), maximal rate of carboxylation (V_{max}), light saturated rate of electron transport (J_{max}), Triose phosphate utilization (TPU), chlorophyll content (SPAD) in response to panicle pruning treatment (PR), air CO₂ concentration (CO₂) and time of days (Sampling) and their interactions. Data from Exp1 and Exp2 measured at two weeks after heading on IR64

Variable	A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _s (mmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i (μmol mol ⁻¹)	V _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU (μmol m ⁻² s ⁻¹)	g _m (μmol m ⁻² s ⁻¹ Pa ⁻¹)	SPAD
PR	***	***	***	***	***	***	ns	ns
CO ₂	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sampling	***	***	***	ns	*	***	**	ns
[CO ₂] x PR	***	*	ns	*	ns	*	ns	ns
[CO ₂] x Sampling	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PR x Sampling	***	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns

Table 2-2: Nonstructural carbohydrate contents, raw data

A : for Exp1 and B : for Exp2, measured two weeks after heading in the flag leaf and the upper and lower internode on the main culm of IR64 plants grown under two air CO₂ levels, with panicle pruned at heading (PR) or not (Control). Values are means ± standard errors (n=5). For each column within a [CO₂] level, values followed by different letters differ significantly (P<0.05).

A	[CO ₂] 400 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch upper internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch lower internode (mg g ⁻¹ DM)
				Control						
		Morning		191,17 ± 23,57 b	150,67 ± 37,61 a	16,02 ± 4,95 a	11,65 ± 4,40 a	83,07 ± 35,01 a	134,76 ± 44,89 b	245,23 ± 60,21 b
		Midday		234,21 ± 45,89 ab	205,92 ± 15,09 a	28,76 ± 6,61 a	5,27 ± 0,79 ab	125,66 ± 19,73 a	187,78 ± 23,86 ab	275,73 ± 67,09 ab
		Afternoon		270,82 ± 24,87 ab	190,22 ± 38,72 a	25,75 ± 3,81 a	5,36 ± 1,01 ab	82,85 ± 12,73 a	163,16 ± 14,42 ab	233,97 ± 70,05 b
			PR							
		Morning		231,81 ± 36,16 b	103,53 ± 23,33 a	20,48 ± 6,40 a	2,19 ± 0,50 b	84,39 ± 31,10 a	311,88 ± 30,32 a	519,13 ± 22,72 a
		Midday		286,91 ± 28,58 ab	116,68 ± 7,17 a	26,50 ± 5,43 a	2,27 ± 0,29 b	53,02 ± 11,54 a	311,50 ± 38,84 a	424,59 ± 16,60 ab
		Afternoon		395,74 ± 34,50 a	116,83 ± 35,88 a	26,32 ± 4,18 a	2,93 ± 0,53 b	127,95 ± 35,12 a	323,19 ± 46,70 a	531,41 ± 44,68 a
	[CO ₂] 800 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch upper internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch lower internode (mg g ⁻¹ DM)
			Control							
		Morning		211,07 ± 17,99 d	162,40 ± 26,30 a	20,14 ± 4,95 a	5,39 ± 1,25 a	118,68 ± 57,70 a	466,75 ± 26,74 a	402,95 ± 87,42 a
		Midday		275,96 ± 20,25 cd	134,89 ± 32,73 a	35,35 ± 9,28 a	5,87 ± 2,80 a	140,17 ± 27,54 a	402,87 ± 83,40 a	361,65 ± 83,60 a
		Afternoon		374,44 ± 17,42 ab	109,29 ± 31,38 a	28,02 ± 2,32 a	3,73 ± 0,96 a	299,80 ± 69,52 a	403,31 ± 38,06 a	466,65 ± 55,21 a
			PR							
		Morning		289,59 ± 35,19 bcd	77,14 ± 36,31 a	28,59 ± 2,77 a	1,86 ± 0,77 a	231,67 ± 78,24 a	476,33 ± 71,84 a	580,20 ± 59,77 a
		Midday		361,39 ± 13,51 bc	81,31 ± 25,90 a	37,80 ± 5,49 a	1,82 ± 0,45 a	309,85 ± 85,62 a	357,17 ± 37,35 a	530,03 ± 40,33 a
		Afternoon		466,86 ± 24,82 a	80,86 ± 9,98 a	38,27 ± 1,63 a	2,17 ± 0,28 a	249,24 ± 69,02 a	511,71 ± 56,08 a	641,20 ± 26,05 a
B	[CO ₂] 400 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch upper internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch lower internode (mg g ⁻¹ DM)
			Control							
		Midday		310,98 ± 55,11 b	161,37 ± 10,79 a	22,34 ± 5,64 a	12,99 ± 3,85 ab	44,20 ± 8,28 a	170,36 ± 47,47 ab	156,27 ± 41,56 a
		Afternoon		355,45 ± 28,85 b	180,03 ± 14,49 a	18,05 ± 1,10 a	14,71 ± 2,35 a	70,08 ± 10,64 a	93,63 ± 15,00 b	178,80 ± 35,69 a
		Evening		430,43 ± 59,40 ab	132,44 ± 12,12 a	21,55 ± 3,91 a	13,32 ± 0,83 b	117,66 ± 31,14 a	157,34 ± 55,66 ab	147,55 ± 65,72 a
			PR							
		Midday		311,76 ± 33,78 b	139,35 ± 13,67 a	17,17 ± 1,13 a	8,97 ± 2,03 ab	48,51 ± 8,99 a	170,59 ± 32,28 ab	362,25 ± 51,80 a
		Afternoon		490,53 ± 23,50 ab	141,84 ± 9,84 a	26,10 ± 1,42 a	8,00 ± 2,08 ab	94,55 ± 8,97 a	202,02 ± 19,43 ab	288,21 ± 68,60 a
		Evening		496,92 ± 37,84 a	134,44 ± 20,75 a	28,81 ± 3,65 a	5,72 ± 1,57 ab	128,38 ± 33,51 a	299,98 ± 53,68 a	294,26 ± 63,43 a
	[CO ₂] 800 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch upper internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch lower internode (mg g ⁻¹ DM)
			Control							
		Midday		267,33 ± 27,60 b	105,41 ± 3,38 a	20,17 ± 2,72 a	8,53 ± 4,35 a	53,16 ± 15,27 a	110,36 ± 16,20 b	184,22 ± 55,74 a
		Afternoon		352,10 ± 40,06 ab	93,10 ± 3,78 a	26,24 ± 4,07 a	9,40 ± 2,24 a	104,30 ± 17,14 a	54,03 ± 7,15 b	168,88 ± 60,77 a
		Evening		393,25 ± 18,79 a	106,22 ± 8,73 a	20 ± 2,31 a	3,72 ± 1,07 a	149,94 ± 23,65 a	80,99 ± 16,68 b	164,39 ± 52,57 a
			PR							
		Midday		382,65 ± 16,76 ab	97,01 ± 17,13 a	24,47 ± 3,23 a	4,23 ± 0,83 a	50,82 ± 11,22 a	282,52 ± 32,88 a	352,03 ± 49,52 a
		Afternoon		423,82 ± 33,98 a	85,91 ± 9,68 a	24,15 ± 4,96 a	2,35 ± 0,16 a	104,30 ± 32,82 a	240,88 ± 31,66 a	338,46 ± 37,24 a
		Evening		452,95 ± 12,27 a	96,18 ± 5,58 a	23,70 ± 3,51 a	3,84 ± 0,62 a	131,61 ± 39,77 a	267,47 ± 30,55 a	323,30 ± 37,70 a

Table S 2-2: Summary of 3-way analysis of variance of nonstructural carbohydrate concentrations

Hexose, sucrose, starch in the flag leaf of the upper or lower internode on the main culm, in response to panicle pruning treatment (PR), air CO₂ concentration (CO₂) and time of days (Sampling) and their interactions. Data from Exp1 and Exp2. measured at two weeks after heading on IR64

Variable	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose lower internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch upper internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch lower internode (mg g ⁻¹ DM)
PR	***	***	ns	***	ns	***	***
CO ₂	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sampling	***	ns	ns	ns	***	ns	ns
[CO ₂] x PR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
[CO ₂] x Sampling	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PR x Sampling	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table S 2-3: Summary of 3-way analysis of variance of plant biomass and morphological variable

In response to panicle pruning treatment (PR), air CO₂ concentration (CO₂) and time of days (Sampling) and their interactions. Data from experiments 1 and 2, measured at two weeks after heading on IR64

Variable	Culm DM (g plant ⁻¹)	Sheath DM (g plant ⁻¹)	Total Leaf DM (g plant ⁻¹)	Panicle DM (g plant ⁻¹)	SLA (cm ² g ⁻¹)	N (g m ⁻²)	K (g m ⁻²)	Tillers number	Panicle number
PR	***	***	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns
CO ₂	ns	ns	ns	***	ns	*	ns	ns	ns
Sampling	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
[CO ₂] x PR	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns
[CO ₂] x Sampling	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PR x Sampling	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns

Table S 2-4: Plant growth characteristics

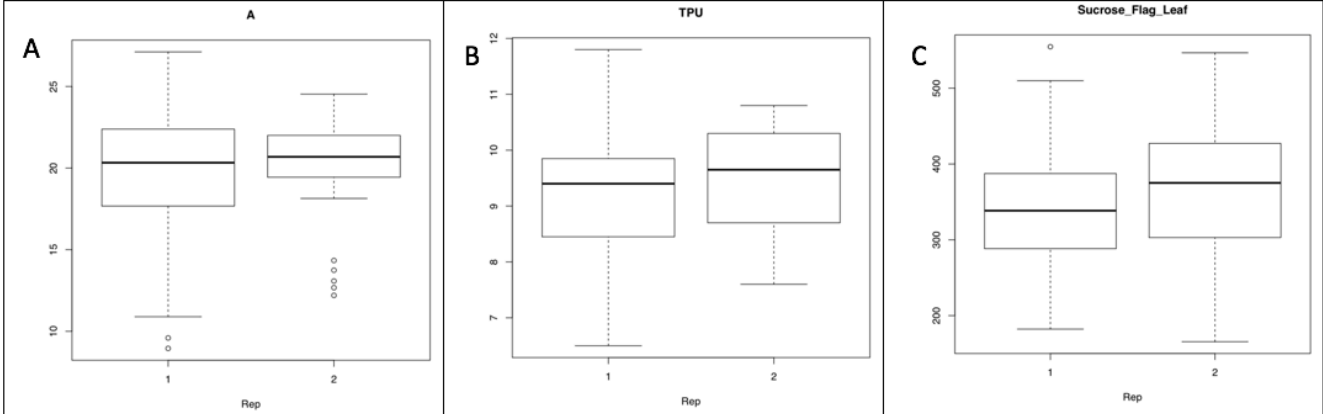
A : for Exp1 and B : for Exp2, measured two weeks after heading on IR64 plants grown under two [CO₂] levels, with panicle pruned at heading (PR) or not (Control). Average values ± standard errors (n=5) are presented. For each column within a [CO₂] level, values followed by different letters differ significantly (P<0.05).

A	[CO ₂] 400 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Culm DM (g plant ⁻¹)	Sheath DM (g plant ⁻¹)	Total Leaf DM (g plant ⁻¹)	Panicle DM (g plant ⁻¹)	SLA (cm ² g ⁻¹)	N (g m ⁻²)	Tillers number	Panicle number	
	Control											
		Morning		10.45 ± 0.45 a	9.10 ± 1.40 a	12.12 ± 0.79 a	6.16 ± 0.84 a	252.78 ± 9.89 a	2.32 ± 0.31 a	16.60 ± 0.92 a	13.40 ± 0.55 a	
		Midday		9.29 ± 1.28 a	9.25 ± 0.81 a	13.04 ± 0.51 a	8.12 ± 0.92 a	243.89 ± 12.61 a	2.24 ± 0.12 a	18.75 ± 1.28 a	14.25 ± 0.61 a	
		Afternoon		9.64 ± 0.97 a	8.79 ± 1.27 a	12.24 ± 0.96 a	7.29 ± 0.58 a	248.17 ± 7.96 a	2.03 ± 0.20 a	14.60 ± 0.67 a	10.40 ± 0.48 a	
		PR										
		Morning		12.39 ± 0.92 a	13.69 ± 0.45 a	12.56 ± 0.28 a	/	241.48 ± 7.64 a	2.07 ± 0.14 a	17.20 ± 1.28 a	13.40 ± 0.42 a	
		Midday		11.98 ± 1.27 a	10.93 ± 1.79 a	13.85 ± 1.82 a	/	258.12 ± 18.96 a	1.98 ± 0.08 a	18.00 ± 0.63 a	11.40 ± 0.54 a	
		Afternoon		12.90 ± 1.47 a	11.03 ± 1.47 a	12.79 ± 0.90 a	/	247.13 ± 12.78 a	2.11 ± 0.14 a	15.00 ± 0.77 a	11.40 ± 0.98 a	
B	[CO ₂] 800 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Culm DM (g plant ⁻¹)	Sheath DM (g plant ⁻¹)	Total Leaf DM (g plant ⁻¹)	Panicle DM (g plant ⁻¹)	SLA (cm ² g ⁻¹)	N (g m ⁻²)	Tillers number	Panicle number	
	Control											
		Morning		8.78 ± 0.79 b	12.21 ± 0.89 a	10.28 ± 0.44 a	10.71 ± 1.28 a	232.60 ± 13.85 a	1.90 ± 0.18 a	16.00 ± 0.96 a	13.50 ± 0.71 a	
		Midday		10.38 ± 0.97 ab	10.99 ± 1.83 a	11.03 ± 1.27 a	11.63 ± 0.94 a	243.16 ± 14.23 a	1.95 ± 0.14 a	15.20 ± 1.20 a	12.60 ± 0.74 a	
		Afternoon		11.65 ± 1.16 ab	11.98 ± 1.88 a	10.39 ± 1.97 a	11.50 ± 1.26 a	238.19 ± 16.42 a	1.87 ± 0.31 a	15.80 ± 0.73 a	12.80 ± 0.59 a	
		PR										
		Morning		12.58 ± 1.53 a	14.88 ± 1.07 a	11.99 ± 0.27 a	/	248.41 ± 18.81 a	1.73 ± 0.11 a	15.40 ± 1.93 a	13.20 ± 0.89 a	
		Midday		13.74 ± 1.28 a	12.63 ± 1.33 a	10.38 ± 0.58 a	/	239.04 ± 15.91 a	1.96 ± 0.16 a	15.60 ± 1.77 a	10.60 ± 0.75 a	
		Afternoon		13.38 ± 1.61 a	11.62 ± 0.77 a	11.92 ± 0.64 a	/	225.61 ± 15.36 a	1.81 ± 0.12 a	17.20 ± 0.48 a	13.00 ± 1.32 a	
B	[CO ₂] 400 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Culm DM (g plant ⁻¹)	Sheath DM (g plant ⁻¹)	Total Leaf DM (g plant ⁻¹)	Panicle DM (g plant ⁻¹)	SLA (cm ² g ⁻¹)	N (g m ⁻²)	K (g m ⁻²)	Tillers number	Panicle number
	Control											
		Midday		7.60 ± 0.54 a	12.39 ± 0.34 a	15.65 ± 0.64 a	3.45 ± 0.38 a	209.17 ± 16.2 a	2.05 ± 0.26 a	1.15 ± 0.27 a	16.40 ± 1.72 a	12.00 ± 0.36 a
		Afternoon		7.73 ± 0.75 a	13.09 ± 0.36 a	16.40 ± 0.45 a	3.58 ± 0.19 a	224.07 ± 12.3 a	1.84 ± 0.16 a	0.95 ± 0.07 a	16.60 ± 1.12 a	12.00 ± 0.31 a
		Evening		7.47 ± 1.04 a	12.00 ± 0.60 a	15.00 ± 0.33 a	2.83 ± 0.24 a	211.76 ± 21.7 a	2.13 ± 0.30 a	1.27 ± 0.45 a	16.20 ± 1.59 a	10.80 ± 0.37 a
		PR										
		Midday		9.47 ± 0.76 a	12.39 ± 0.92 a	14.87 ± 0.79 a	/	221.24 ± 19.4 a	1.97 ± 0.19 a	1.03 ± 0.23 a	14.80 ± 1.11 a	11.60 ± 0.74 a
		Afternoon		10.91 ± 1.05 a	13.36 ± 0.63 a	16.14 ± 0.33 a	/	228.10 ± 7.7 a	1.74 ± 0.08 a	0.92 ± 0.08 a	14.40 ± 0.93 a	12.40 ± 0.50 a
		Evening		11.07 ± 1.53 a	13.00 ± 0.63 a	14.15 ± 1.05 a	/	228.20 ± 14.3 a	1.66 ± 0.12 a	0.91 ± 0.13 a	14.00 ± 1.00 a	10.60 ± 1.28 a
B	[CO ₂] 800 μmol mol ⁻¹	Sampling	Treatment	Culm DM (g plant ⁻¹)	Sheath DM (g plant ⁻¹)	Total Leaf DM (g plant ⁻¹)	Panicle DM (g plant ⁻¹)	SLA (cm ² g ⁻¹)	N (g m ⁻²)	K (g m ⁻²)	Tillers number	Panicle number
	Control											
		Midday		9.20 ± 0.46 ab	11.80 ± 0.42 a	15.10 ± 0.59 a	13.20 ± 1.49 a	212.90 ± 17.2 a	1.55 ± 0.07 a	0.89 ± 0.11 a	16.20 ± 0.73 a	13.20 ± 0.80 a
		Afternoon		7.25 ± 1.49 b	10.50 ± 0.93 a	14.40 ± 0.70 a	11.90 ± 0.84 a	213.55 ± 17.9 a	1.78 ± 0.10 a	1.03 ± 0.13 a	14.60 ± 0.68 a	12.20 ± 0.58 a
		Evening		8.05 ± 1.28 ab	11.50 ± 0.92 a	16.20 ± 0.85 a	12.10 ± 1.43 a	208.43 ± 23.2 a	1.42 ± 0.10 a	0.95 ± 0.14 a	17.20 ± 0.86 a	11.40 ± 0.40 a
		PR										
		Midday		12.12 ± 1.26 a	13.30 ± 1.67 a	14.40 ± 2.32 a	/	223.49 ± 7.5 a	1.63 ± 0.07 a	0.99 ± 0.21 a	14.60 ± 1.94 a	12.00 ± 1.78 a
		Afternoon		12.27 ± 1.07 a	14.50 ± 0.25 a	15.00 ± 0.67 a	/	229.38 ± 15.1 a	1.66 ± 0.03 a	0.88 ± 0.11 a	15.80 ± 0.37 a	12.80 ± 0.37 a
		Evening		12.34 ± 1.33 a	13.50 ± 1.74 a	15.20 ± 1.57 a	/	230.79 ± 13.7 a	1.70 ± 0.13 a	0.87 ± 0.10 a	16.20 ± 0.97 a	13.00 ± 1.51 a

Table S 2-5: Type III test of fixed effects for co-variance analysis for TPU with carbohydrates and treatment

Sampling	F-Value	Pr > F
Sucrose flag leaf	14.41	0.0004
Sucrose lower internode	0.00	0.9682
Hexose flag leaf	0.01	0.9180
Hexose lower internode	0.16	0.6891
Starch flag leaf	2.08	0.1549
Starch lower internode	7.10	0.0100
Starch upper internode	2.10	0.1528
CO ₂	1.88	0.1752
PR	44.16	<0.0001

Figure S 2-1: Boxplot on various parameters for the two experiments.



Synthèse du chapitre 2, vers le chapitre 3 :

Dans le chapitre 2, nos résultats montrent une réduction significative de la photosynthèse nette (A) au cours de la journée chez la variété de riz utilisée (IR64), proportionnelle au déséquilibre sources-puits artificiellement générée par des ablations de panicule et / ou des augmentations de $[CO_2]$.

TPU s'est avéré le paramètre photosynthétique le plus explicatif de cette variation journalière de photosynthèse. Une corrélation négative a été mise en évidence entre TPU et deux indicateurs d'une limitation de la capacité de puits de la plante : la concentration en saccharose dans les feuilles sources, et le ratio source-puits local en C, calculé comme le rapport entre la surface foliaire de la feuille drapeau du brin maître (source essentielle au moment du remplissage du grain) avec le nombre d'épillets de la panicule adjacente (puits). (**Image 2-1**)

Dans le chapitre 3, nous évaluons la variabilité génétique de ces résultats. Pour cela, deux expérimentations complémentaires ont été menées en serre sur cinq variétés de riz de type *indica* contrastant pour le ratio source-puits local en C défini :

La première expérimentation (EXP1) a visé à évaluer si une variation naturelle du ratio source-puits local en C impacte directement la réponse de la photosynthèse au $[CO_2]$ et la capacité de TPU. Pour cela, les cinq génotypes ont été comparés sous CO_2 ambiant (400 ppm) et élevé (800 ppm) pendant 15 jours à partir d'épiaison comme dans le chapitre précédent.

La seconde expérimentation (EXP2) a comparé les mêmes génotypes sous CO_2 ambiant et élevé sur le long terme (cycle complet), pour déterminer le rôle joué par la capacité (ratio sources-puits local en C) et la plasticité (nombre de talles et de panicules) des puits de la plante dans sa réponse au $[CO_2]$ en termes de photosynthèse et de production de biomasse aérienne et grain, et par là, l'enjeu de les considérer en sélection variétale dans un cadre d'augmentation du $[CO_2]$.



Image 2-1: Le proxy "sources-puits local en C"
(Surface foliaire de la feuille drapeau / nombre d'épillets de la panicule adjacente)

3. Genotypic variation in source and sink traits affects the response of photosynthesis and growth to elevated atmospheric CO₂

Denis Fabre^{1,2}, Michael Dingkuhn^{1,2}, Xinyou Yin³, Anne Clément-Vidal^{1,2}, Sandrine Roques^{1,2}, Armelle Soutiras^{1,2}, Delphine Luquet^{1,2}

1: CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France.

2: Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

3: Centre for Crop Systems Analysis, Department of Plant Sciences, Wageningen University & Research, Wageningen, Netherlands

Published in **Plant Cell & Environment**, in November 2019 (doi:10.1111/pce.13693)

Keywords :

Carbon assimilation; Climate change; CO₂ enrichment; Local source-sink ratio; *Oryza sativa* L.; Phenotypic plasticity; Sink limitation; Triose Phosphate Utilization (TPU)

Abstract :

This study aimed to understand the response of photosynthesis and growth to e-CO₂ conditions (800 vs. 400 μmol mol⁻¹) of rice genotypes differing in source-sink relationships. A proxy trait called local C source-sink ratio was defined as the ratio of flag leaf area to the number of spikelets on the corresponding panicle, and five genotypes differing in this ratio were grown in a controlled greenhouse. Differential CO₂ resources were applied either during the two weeks following heading (EXP1) or during the whole growth cycle (EXP2). Under e-CO₂, low source-sink ratio cultivars (LSS) had greater gains in photosynthesis, and they accumulated less nonstructural carbohydrate in the flag leaf than high source-sink ratio cultivars (HSS). In EXP2, grain yield and biomass gain were also greater in LSS probably caused by their strong sink. Photosynthetic capacity response to e-CO₂ was negatively correlated across genotypes with local C source-sink ratio, a trait highly conserved across environments. HSS were sink-limited under e-CO₂, probably associated with low triose phosphate utilization (TPU) capacity. We suggest that the local C source-sink ratio is a potential target for selecting more CO₂-responsive cultivars, pending validation for a broader genotypic spectrum and for field conditions.

3.1. Introduction

Over the last 200 years, atmospheric carbon dioxide concentration [CO₂] dramatically increased, attaining 410 μmol mol⁻¹ today. This represents an increase of 35% compared to the pre-industrial level (NOAA Mauna Loa Observatory, Hawaii). Global climate models predict that [CO₂] could reach 600 to 700 μmol mol⁻¹ by 2050 (IPCC 2016). Carbon dioxide is the main substrate for photosynthesis and it is expected to be one of the main climate change factors impacting plant growth (Becklin *et al.*, 2017) and crop production (Rosenzweig *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 2014; Kromdijk and Long, 2016).

As a major staple food, rice will play an important role in this context. Increasing its photosynthetic capacity is thus a challenge for increasing crop yield (Yoshida *et al.*, 2008; Yoshida and Horie, 2009; Makino, 2011; Simkin *et al.*, 2019) and the performance of cropping systems (Lawson *et al.*, 2012; Evans, 2013; Long *et al.*, 2015; Ort *et al.*, 2015; Foyer *et al.*, 2017; Nuccio *et al.*, 2017). Several studies reported inter- and intra-specific variability in rice photosynthetic rate increase under elevated CO₂ (e-CO₂) (Makino and Mae, 1999; Adachi *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). However, an increase in photosynthesis under e-CO₂ was not systematically associated with an increase in grain yield (Kobayashi *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2006, 2015; Ainsworth, 2008; Leakey *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Hasegawa *et al.*, 2016a). One of the main hypotheses to explain this observation is that not only C source capacity but also C sink capacity drives crop production, and that either source or sink capacity alone cannot explain e-CO₂ impacts on yield (Körner, 2015; Ludewig and Sonnewald, 2016; Burnett *et al.*, 2016; Sonnewald and Fernie, 2018).

It has been reported that a C source-sink imbalance characterized by a small sink (demand) combined with a large source capacity (supply) can down-regulate photosynthesis due to the accumulation of end-products in leaf photosynthetic tissues (Paul and Pellny, 2003; Ainsworth and Bush, 2011; Lemoine *et al.*, 2013; White *et al.*, 2016; Ruiz-Vera *et al.*, 2017). Accordingly, an increase in the photosynthetic rate, particularly if caused by e-CO₂, should be accompanied with an increase in sink capacity. With this respect, phenotypic plasticity, the plant capacity to adjust its phenotype to environmental variables, may represent opportunities to improve crops for future environments (Franks *et al.*, 2014).

The C source-sink relationships affecting leaf photosynthetic rate are complex as they involve dynamic feedbacks among different levels of morphological, physiological and biochemical organization. Modelling is an integrative and quantitative way to analyze them (Poorter, Anten & Marcelis 2013; Wu, Song, Oosterom & Hammer 2016). Several models were developed to describe C source-sink interactions as reviewed by Chang and Zhu (2017), but models'

predictive power was found to be low, especially under e-CO₂ (Asseng *et al.*, 2013). Most of these models are inspired by the biochemical model of photosynthesis by Farquhar *et al.* (1980) (FvCB). FvCB is today used as a module within crop models (Yin and Struik, 2017). However, as it takes into account only partially the negative feedback of the accumulation of end-products on photosynthesis (Leegood and Furbank, 1986; Sharkey *et al.*, 1986a; Paul and Pellny, 2003), this model has limitation in dealing with C source-sink imbalanced situations. The feedback is partly controlled by the triose phosphate utilization (TPU) parameter that sets a dynamic maximum leaf photosynthetic capacity (Sharkey *et al.*, 1986a; Paul and Foyer, 2001). TPU has been less studied than other photosynthetic parameters such as maximum carboxylation rate of Rubisco (V_{cmax}). It acts at the interface between the production and the consumption of assimilates (Yang *et al.*, 2016) and may have to be considered when predicting photosynthesis and crop performance under e-CO₂ conditions (Rogers Alistair *et al.* 2016; Busch & Sage 2017; Lombardozzi *et al.* 2018; Busch, Sage & Farquhar 2018; McClain & Sharkey 2019).

In a previous paper (Fabre *et al.*, 2019), we observed strong reductions in leaf photosynthesis in rice subjected to artificially induced sink limitation, through panicle pruning and/or e-CO₂, particularly in the afternoon when sugar translocation probably became a bottleneck. When sucrose accumulated in the leaf, TPU and V_{cmax} decreased. There is limited information, however, on how genotypic variation in C source and sink capacity during grain filling (or their adaptive plasticity) affects the response of photosynthesis and yield to e-CO₂. Genotypic variation in photosynthetic parameters has been reported (Flood *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012), but little is known on how these parameters are associated with genotypic variation in assimilate allocation patterns to sinks. Rice cultivars differ strongly in the biomass and grain yield response to e-CO₂ in open-air FACE field trials (Hasegawa *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). The genotypic differences could in part be explained with panicle sink capacity (Hasegawa *et al.*, 2013) or compensatory tillering ability (Kikuchi *et al.*, 2017).

This paper aims to investigate genotypic variation in the response of photosynthesis and growth to e-CO₂ conditions in rice cultivars, differing constitutively in morphological traits conferring source and sink capacity. We selected five *indica*-type rice cultivars differing in the local C source-sink ratio, characterized here using a proxy parameter, i.e., the ratio of flag leaf size to the grain number of the corresponding panicle. Plants were grown under e-CO₂ (800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) conditions either during early grain filling phase or throughout the whole plant development cycle. The specific objectives were to (1) study the effect in controlled environments of e-CO₂ (800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) on photosynthetic parameters, yield and yield components; (2) observe levels of non-structural carbohydrates (NSC) in leaves and stem internodes; and (3) examine whether responses of these traits to e-CO₂ are associated with genotypic values of local C source-sink

ratio. We will discuss the results with respect to opportunities to breed for traits that would enable a greater genotypic response to the anticipated increase of atmospheric CO₂ resources.

3.2. Material and methods

3.2.1. Plant material and growth conditions

We chose five high-yielding *indica* rice cultivars (WAS182, TEQUING, WAS197, IR52, IR64) out of the 300 accessions in the PRAY *indica* panel (<http://ricephenonetwork.irri.org/>), based on their diversity in local C source-sink ratio (Table S 3-1). As indicated above, the exact local C source-sink ratio is hard to quantify, and we used the ratio of flag leaf area (source) to the fertile spikelet number of the corresponding panicle (sink) on the main stem, according to Fabre *et al.* (2019). For this purpose, field phenomics data were provided by CIAT (Colombia) (Rebolledo *et al.*, 2016) for 2013 and 2014 experiments. In order to minimize others sources of variations, cultivars were selected with similar phenological and morphological traits such as degree days to flowering, tiller and panicle number per plant, plant height, and grain fertility (Table S 3-1).

The five genotypes were germinated on wet filter paper and transplanted into 6-L pots filled with EGO 140 substrate (17%N-10%P-14%K, pH = 5). This pot size is sufficient for rice to avoid reductions in photosynthesis or biomass accumulation along plant cycle (Sage, 1994; Poorter *et al.*, 2012). Basal fertilizer was applied before transplanting using Basacot 6 M (Compo Expert, France) at 2 g l⁻¹, 11%N-9%P-19%K +2%Mg. A second application at 2 g l⁻¹ was performed just before heading stage to avoid post-floral nitrogen deficiency.

Plants were grown from April to August 2018 at the Agronomical Research and International Center for Development (CIRAD, Montpellier, France) in two adjacent, climate-controlled greenhouse compartments. They were grown under natural daylight with supplemental lighting maintaining a 12-h photoperiod using horticultural red-blue LED projectors (Alpheus Radiometrix 15M1006) providing an R/FR ratio of about 1.2. Microclimate was monitored using data-loggers (CR1000 Campbell Scientific) installed in each compartment. Air temperature averaged 29 °C (day) and 22 °C (night) as measured with a PT1000 probe under fan-aspirated shield. Air relative humidity averaged 65% (day) and 80% (night), measured by HMP45 (Vaisala, Helsinki, Finland) and PPFD was measured with a SKP215 (Skye Instrument quantum sensor, Powys, UK) providing on average photosynthetic irradiance of 800 μmol m⁻² s⁻¹ at the top of the canopy level during the daytime. The mean photosynthetically active radiation received by the plants during their life cycle was 7.58 MJ m⁻² d⁻¹.

A total of 336 pots including border pots were arranged at 20-cm spacing among plants in a randomized design with five replications per cultivar and per CO₂ treatment on movable tables. Pots were kept watered at field capacity while maintaining the perforated pot bottoms in 5 cm of standing water. To minimize border effects on each table, border plants on the tables were not used for measurements. The tables were moved weekly to avoid effects of spatial heterogeneity. We used two compartments that were differentiated only by the atmospheric CO₂ level: 400 μmol mol⁻¹ (ambient) in one compartment versus 800 μmol mol⁻¹ (e-CO₂) in the other.

Two complementary experiments (EXP1 and EXP2) were carried out using independent sets of plants within the 336 plants available. EXP1 was dedicated to a physiological characterization of photosynthesis response to variation in plant C source-sink balance during a medium-term e-CO₂ period from heading stage onwards. For this purpose, 25 plants (5 per cultivar) from ambient CO₂ compartment were transferred to the e-CO₂ compartment at heading stage, while 25 others remained in the ambient compartment. At this stage, the spikelet number per panicle is fixed on the main stem (Cock and Yoshida, 1973). The e-CO₂ treatment was continued for a 15 days, corresponding to the first-half grain filling period (Cho *et al.*, 1988). Applying e-CO₂ over this period was chosen to ensure that the five genotypes differed only for their local C source-sink ratio, avoiding the appearance of new sinks (tillers) or the increase of existing ones (spikelets per panicle).

In EXP2, the two CO₂ treatments (ambient and e-CO₂) were differentiated from transplanting to maturity, with 25 plants (5 per genotype) plus border plants placed in each compartment. For each treatment, plants were characterized for growth and development traits along the cycle, photosynthesis and biochemical measurements at 15 days after heading, final biomass and grain production as described hereafter.

Morphological, physiological and biochemical measurements were performed at the end of the 15-d treatment as detailed below, for both experiments. However, measurements of photosynthesis and carbohydrate analyses at two weeks after heading for ambient [CO₂] control treatment were only done on EXP1 plants; but data were also used as reference in EXP2, because growth conditions for the control plants were identical for the two experiments.

3.2.2. Leaf photosynthesis measurement

Photosynthesis measurements were performed *in situ* on the fully expanded flag leaf on the main stem of five plants per cultivar in each treatment, 2 weeks after heading. Comparison

between the CO₂ treatments was made by using simultaneously two infrared gas analyzers (GFS-3100, Walz, Germany) identically calibrated. Leaf net photosynthetic rate at cuvette CO₂ concentration at 400 μmol mol⁻¹ (A_{400}) was evaluated using saturating PPFD light of 1500 μmol m⁻² s⁻¹, controlled leaf temperature at 28°C, relative humidity in the cuvette set to 65%, and constant air flow rate through the cuvette of 800 ml min⁻¹. A large exchange area cuvette of 8 cm² was used to limit border effects known to affect photosynthesis measurements (Long and Bernacchi, 2003). Simultaneously, chlorophyll fluorescence was measured using Walz PAM-fluorimeter 3055FL integrated to the photosynthesis equipment. The steady-state fluorescence yield (F_s) was measured after registering the gas-exchange parameters. A saturating light pulse (8000 μmol m⁻² s⁻¹ during 0.8 s) was applied to achieve the light-adapted maximum fluorescence (F_m'). The operating PSII photochemical efficiency (ϕ PSII) was determined as ϕ PSII = $(F_m' - F_s)/F_m'$. Because a photosynthesis down-regulation related to C sink limitation increases along the day (Fabre *et al.*, 2019), all measurements were made 6 hours after dawn.

Often, the maximum photosynthetic rate is limited by the rate of conversion and use of triose phosphates into starch and sucrose (Sharkey *et al.*, 1986a; McClain and Sharkey, 2019). In EXP1 only, after the measurement for A_{400} , the CO₂ concentration in the measurement cuvette was increased through the following step-wise sequence: 900, 1300 and 1600 μmol mol⁻¹, and waiting for steady-state photosynthesis at each step. This allowed to identify whether the TPU limitation occurred. We also used fluorescence data measured in combination to confirm any TPU limitation, as a decline in ϕ PSII with increasing intercellular CO₂ concentration (C_i) would suggest a TPU limitation (Sharkey, 2016). The leaf photosynthesis rate under saturating light (1500 μmol m⁻² s⁻¹) and CO₂ levels (1600 μmol mol⁻¹) was taken as the maximum leaf photosynthesis capacity level (A_{max}) and this was measured in both CO₂ treatments. Then, the ratio of the average A_{max} of plants grown at e-CO₂ by the average A_{max} of plants grown at ambient CO₂ (A_{max800}/A_{max400}) was calculated.

3.2.3. Sugar content analysis

Immediately after photosynthesis measurement, the same leaf was sampled to determine non-structural carbohydrate content (NSC: starch, sucrose, glucose, and fructose). Prior to grinding with a ball grinder (Mixer mill MM 200, Retsch, Germany), the samples were frozen in liquid nitrogen. The sugars were extracted three times from 20 mg samples with 1 mL of 80% ethanol for 30 min at 75°C, and then centrifuged for 10 min at 9500 g (Mikro 200, Hettich centrifuge). Soluble sugars (sucrose, glucose, and fructose) were contained in the supernatant and starch in the sediment. The supernatant was filtered in the presence of polyvinyl polypyrrolidone and activated carbon to eliminate pigments and polyphenols. After evaporation of solute with Speedvac (RC 1022 and RCT 90, Jouan SA, Saint Herblain, France), soluble sugars were

quantified by high performance ionic chromatography (HPIC, standard Dionex) with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). The sediment was solubilized with 0.02 N NaOH at 90 °C for 1 h 30 min and then hydrolyzed with α -amylglucosidase at 50 °C, pH 4.2 for 1 h 30 min. Starch was quantified as described by Boehringer (Pomeranz and Meloan, 1994) with 5 μ L of a mixture of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (HK/G6P-DH Sigma Aldrich), followed by spectro-photometry of NADPH at 340 nm (spectrophotometer UV/VIS V-530, Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

3.2.4. Leaf Nitrogen and Potassium Content

In EXP1 only, the leaf blade situated below the flag leaf used for gas exchange measurements was analyzed for nitrogen and potassium concentration (expressed in percent of the leaf blade dry matter: Nm or Km [mg g^{-1}]), specific leaf area (SLA [$\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$]). On this basis, nitrogen and potassium content on leaf-area basis (Na or Ka [g m^{-2}]) was determined as Nm or Km divided by SLA. The area of each leaf was measured with a leaf area meter (LI-3100 LI-COR, Lincoln, NE, USA) and the leaf then oven-dried until constant weight (48 h at 70 °C). Total leaf N was analyzed based on Dumas combustion method using a LECO TruMac Nitrogen analyzer, and K content was measured using an ICP-OES 700 series spectrometer (Agilent Technologies). A relative indicator of chlorophyll content (SPAD) was measured on the same leaf using a SPAD-502 (Minolta, Ltd., Japan) in both experiments.

3.2.5. Plant growth, biomass and yield component measurements

After samplings for biochemical analyses performed in EXP1, plant shoots were harvested. Tillers and panicles were counted, and total plant green leaf area was measured using a leaf area meter (LI-3100 LI-COR). Then, total stem and leaf dry matter per plant (DM) were measured separately after drying at 70°C for 48 h and adding DM from organs used for biochemical analyses. Plant height was determined as the vertical distance from the root-shoot junction to the ligule of the flag leaf.

In EXP2, tiller and panicle number, plant height, plant green leaf area and DM were measured at maturity stage as described. Total plant shoot DM (stems + leaves) and plant bulk SLA ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) were calculated on this basis. Grain yield and yield components were calculated according to (Liu *et al.*, 2008): grains were sorted by using a densiometric column and the number of filled (fertile) and empty grains was counted using a grain counter to determine the filled spikelet percentage. Dry weight of ripened grains was determined after oven-drying at 80°C for

72 h. The 1000-grains dry weight was then calculated. Grain yield per m² was computed by multiplying grain production per plant in g by the number of plants per m².

In both experiments, local C source-sink ratio was estimated for each plant by dividing flag leaf blade area and fertile spikelet number on the main stem.

3.2.6. Statistical analysis

Physiological, biochemical traits and yield components were analyzed as a completely randomized design using a two-way analysis of variance of CO₂ treatment, genotype and interaction using R (version 3.5.2, R Foundation for Statistical Computing), after testing for normal distribution. Wherever appropriate, comparison between means was performed using Tukey *post-hoc* test ($\alpha=0.05$). In the absence of normal distribution (e.g. carbohydrate), data were log-transformed to stabilize the variance. Principal component analysis (PCA) was performed using FactoMineR package of the same software to analyze covariation.

3.3. Results

3.3.1. Local C source-sink ratio

In both experiments, a highly significant cultivar effect ($P<0.001$) was noticed for the local C source-sink ratio on the main stem (Tables 3-1 & 3-2) with neither CO₂ treatment effects nor interaction effects. The genotypic differences were conserved between EXP1 and EXP2 as indicated by the linear correlation between this ratio in medium vs. long term e-CO₂ treatments (Fig. S 3-1; $R^2=0.99$, $P<0.01$).

The five genotypes varied in local source-sink ratio (Tukey's test, Tables 3-1 & 3-2): the low source-sink ratio cultivars (LSS) WAS182 and TEQUING (small flag leaf area, large panicle sink potential) and the high source-sink ratio cultivar (HSS) IR52 (large flag leaf area, smaller panicle sink potential). WAS197 and IR64 showed intermediate values. A cultivar effect was also observed for flag leaf area ($P<0.001$) and spikelet number per panicle ($P<0.001$) on the main stem in both experiments, associated with a CO₂ treatment effect in EXP2 for spikelet number ($P<0.01$). The genotypic variability in the local source-sink ratio was explained more by variation in spikelet number (36%) than by flag leaf area (9%). In EXP2, the CO₂ treatment effect enhanced spikelet number in LSS cultivars by +8.3% on average (versus +3.8% in HSS). It enhanced flag leaf area by +17.2% for LSS (vs. +0.2% in HSS). This result suggests a greater plasticity of these traits for LSS cultivars in response to e-CO₂.

3.3.2. Photosynthetic parameters

Strong cultivar, CO₂ and interaction effects ($P < 0.001$, except interaction in EXP2 at $P < 0.01$) were observed in both experiments for leaf net assimilation rate (A_{400}) (Tables 3-1 and 3-2). The interaction arose from the e-CO₂ induced significant increase in A_{400} for LSS cultivars WAS182 and TEQUING (+23% on average in EXP1 and +17% in EXP2), vs a significant decrease in A_{400} for the HSS cultivar IR52 (14% in EXP1 and 7% in EXP2) (Fig. 3-1A, B). This difference in the response to e-CO₂ between HSS and LSS cultivars was in line with our hypotheses.

Because stomatal conductance can affect A_{400} by changing CO₂ intercellular concentration (C_i), the photosynthesis of plants grown in ambient and e-CO₂ should be compared at a same C_i to detect acclimation effects and to distinguish stomatal from non-stomatal effects. Here, variations in A_{400} were not associated with any significant variation of $C_{i\text{-ambient}}$, the C_i for measuring A_{400} , despite a cultivar effect ($P < 0.01$) (Tables 3-1 and 3-2). This suggests that the photosynthetic capacity of the leaf *per se* was affected. No significant variations were observed on leaf chlorophyll content (SPAD) despite a small cultivars effect ($P < 0.05$) only in EXP2.

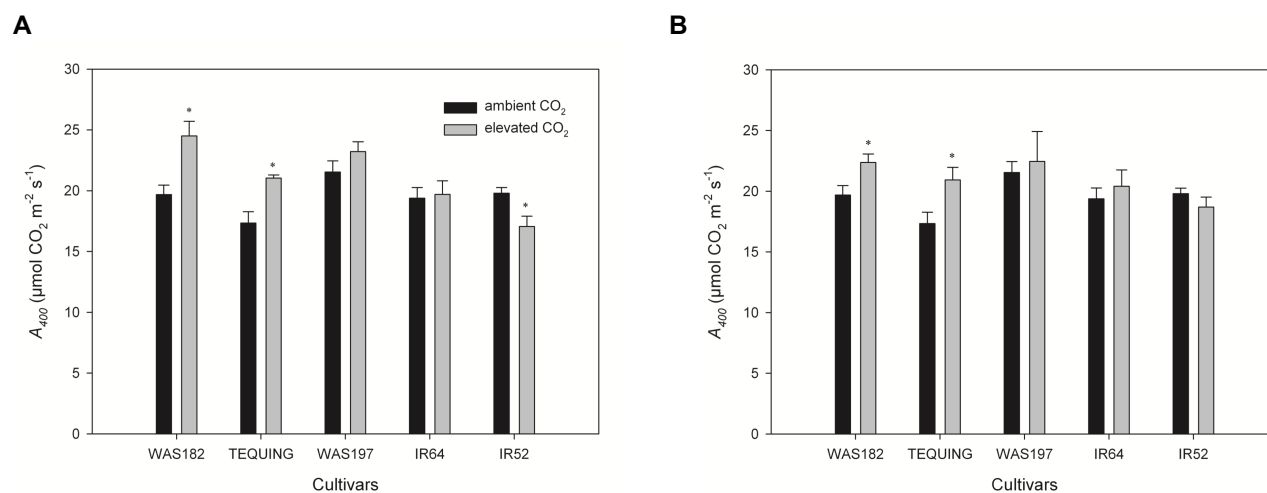


Figure 3-1 : Net photosynthetic rate at the ambient CO₂ level (A_{400}) of the flag leaf on the main stem of five rice cultivars grown at two CO₂ levels: ambient ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated ($800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) in two greenhouse compartments.

Measurements were taken 15 days after heading. Stars indicate significant differences at $p < 0.05$ (Tukey HSD test). Each bar represents the mean of 5 replicates \pm SE.

Panel (A) correspond to EXP1 after 15 days CO₂ enrichment from heading (medium-term)

Panel (B) correspond to EXP2 for an entire cycle CO₂ enrichment (long-term)

Maximum photosynthetic capacity (A_{max}) was measured only in EXP1 (Table 3-1). Strong cultivar, CO₂ and interaction effects were observed ($P < 0.001$). A significant, positive response of A_{max} to e-CO₂ was observed in LSS cultivars only (+20% for WAS182 and +34% for TEQUING) whereas a negative response was observed for the HSS cultivar IR52 (-10%) and IR 64 (-3%). These variations in photosynthetic capacity were not associated with differences in intercellular CO₂ concentration under conditions for measuring A_{max} , denoted as $C_{i-elevated}$ (Table 3-1).

A negative and significant linear correlation ($R^2 = 0.90$, $P < 0.05$) was observed between A_{max} response to e-CO₂ treatment (A_{max} ratio, A_{max800}/A_{max400}) and local source-sink ratio (Fig. 3-2). Under the assumption that A_{max} mainly reflects leaf TPU capacity (McClain and Sharkey, 2019), these results suggest that TPU capacity probably varied with genotypic, local C source-sink ratio. This was supported by a significant cultivar effect on the A_{max} ratio ($P < 0.001$, Table 3-1), indicating a significant enhancement in photosynthetic capacity for LSS cultivars under e-CO₂.

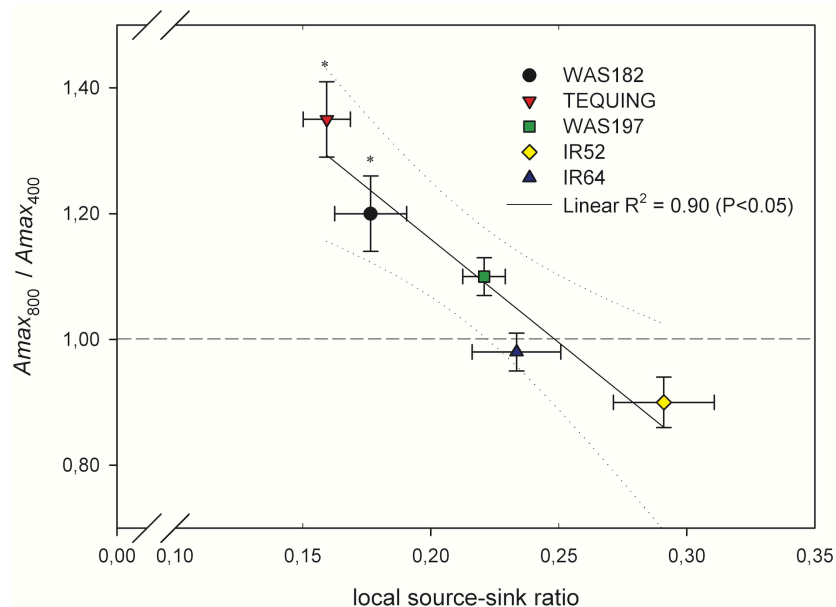


Figure 3-2 : Relationship between A_{max800}/A_{max400} (ratio of photosynthetic capacity (A_{max}) measured at saturating [CO_2], for plants grown at elevated ($800 \mu mol mol^{-1} [CO_2]$) to plants grown at ambient (average value over 5 replicates at $400 \mu mol mol^{-1}$), versus local C source-sink ratio.

Data from EXP1 (15-day CO₂ enrichment from heading) for the five studied rice cultivars were used.

Each point is an average per genotype of 5 replicates \pm SE. Stars indicate significant difference at $p < 0.05$ (Tukey HSD test) compared to ambient (dashed line).

Fluorescence measurements on the efficiency of PSII electron flow ($\phi PSII$) at three cuvette [CO_2] levels can determine whether TPU indeed became limiting for photosynthesis, and if so, at which C_i level it exerted the limitation. In the case of HSS cultivar IR52 and intermediate cultivar IR64, $\phi PSII$ started to decline above a C_i of $680 \mu mol mol^{-1}$ on average, highlighting a

TPU limitation (Fig. 3-3B) under the high CO₂ conditions. However, as C_i thresholds for TPU limitation in terms of φPSII were higher than the C_i observed at A₄₀₀ measurement, probably TPU did not limit A₄₀₀ in any of the cultivars. A decline of φPSII at high cuvette [CO₂] was not observed in LSS cultivars, whereby φPSII values were stable under high CO₂ conditions (Fig. 3-3B).

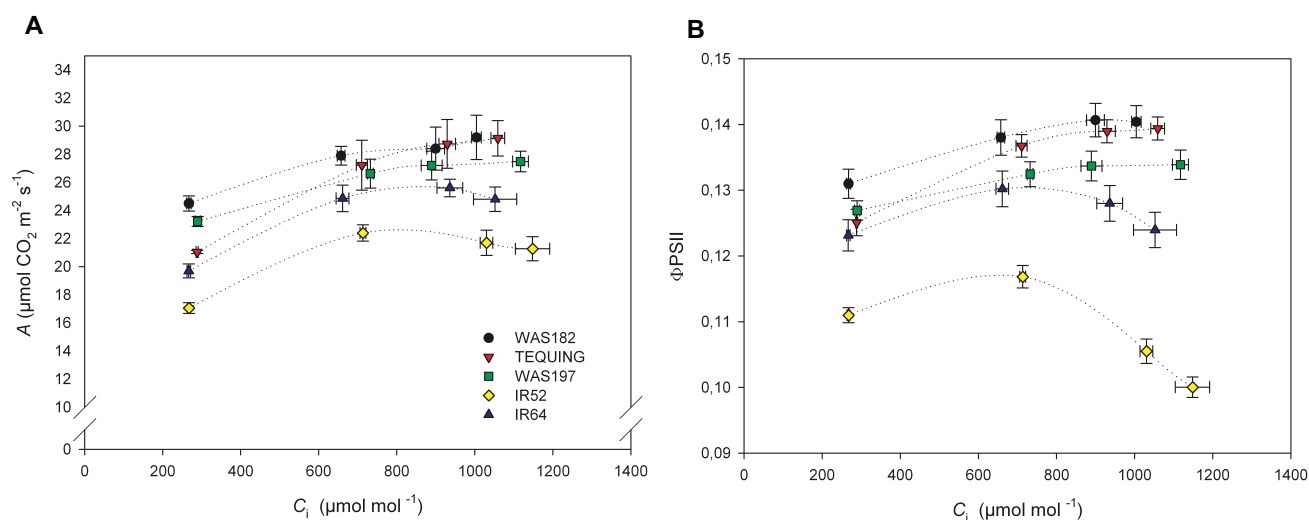


Figure 3-3: A/C_i (panel A) and corresponding φPSII/C_i curves (panel B) of five rice cultivars, grown at 800 μmol mol⁻¹

Data from EXP1. Measurements were taken 15 days after heading. Each point represents the mean of 5 replicates ± SE

3.3.3. Plant growth and yield components

Overall, cultivars presented similar thermal time to flowering ranging from 1271 (WAS182) to 1373-degree days (IR64), with CO₂ effects being absent (data not shown).

In EXP1, no CO₂ treatment effect was observed on tiller and panicle numbers 15 days after heading despite that a cultivar effect was observed on plant height (Table S 3-2), stem DM and leaf DM (P<0.001, Table 3-1). Flag leaf SLA only exhibited a slight cultivar effect (P<0.05, Table S 3-2). The leaf chlorophyll content as indicated by SPAD values did not differ among treatments or cultivars. This was also true for N and K content measured on the leaf below the flag leaf, indicating that no nutritional limitations were induced by treatments. The same applied to EXP2 (Table S 3-2).

In EXP2, significant cultivar and CO₂ effects, but no interactions, were observed for final shoot DM (P<0.001), tiller number (P<0.01) and grain yield (P<0.01, Table 3-2). e-CO₂ enhanced plant shoot DM at maturity by 23% on average in LSS (significantly for TEQUING only), and only by 5% in the HSS cultivar. This could be partly explained by a stronger increase under e-

CO₂ of fertile tiller number at maturity in LSS cultivars (+15% on average) than in the HSS cultivar (3%). During the vegetative stage (45 days after emergence), maximum tiller number was increased by +34% on average for LSS cultivars, vs. +11% for HSS (Fig. 3-4).

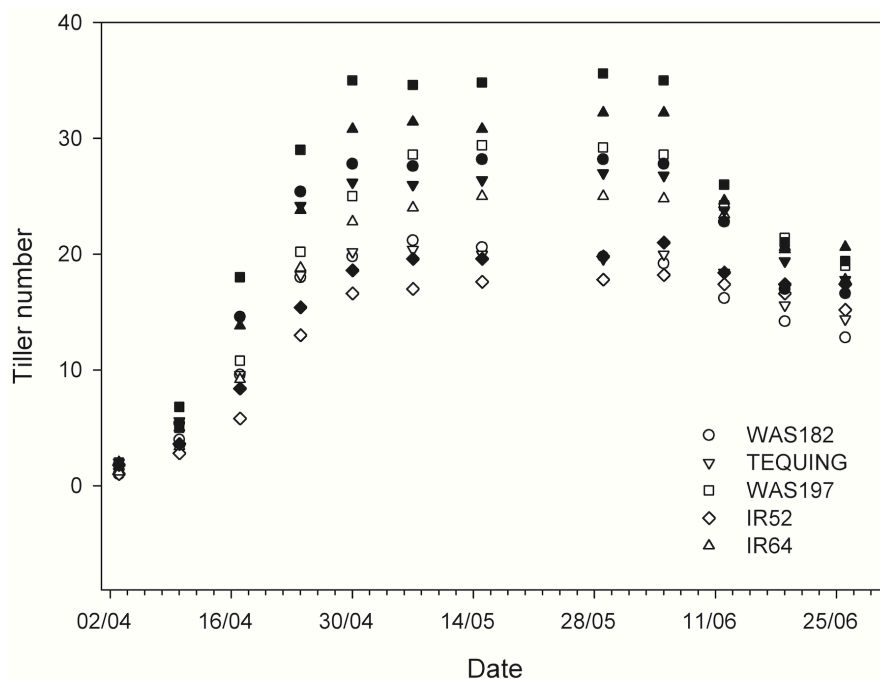


Figure 3-4 : Dynamics of tillering of 5 rice cultivars grown under ambient ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, white filled color) and elevated CO₂ ($800 \mu\text{mol mol}^{-1}$, black filled color)

Data from EXP2. Each point is an average of 5 replicates per genotype and treatment at a given date.

Grain yield increase by e-CO₂ differed among cultivars (13% on average in LSS, only 4% in HSS, Table 3-2). This could not be related to any variation in 1000-grain DM or filled grain percentage, although these yield components showed a slightly higher increase under e-CO₂ in LSS cultivars (+3.5% averaged) compared to the HSS cultivar (1.5%) (Table S 3-2). A significant cultivar effect was however observed on filled spikelet ratio ($P < 0.001$, Table S 3-2), with TEQUING exhibiting the highest value. No significant response to e-CO₂ of plant leaf DM (Table 3-2) and SLA (Table S 3-2) was observed, although small but significant CO₂ and cultivar effects were observed on plant green leaf area ($P < 0.01$, data not presented).

Interestingly, a negative correlation was observed between local C source-sink ratio and the response to e-CO₂ of total shoot DM (Fig. 3-5A, $R^2 = 0.67$, $P < 0.05$) and of grain yield (Fig. 3-5B, $R^2 = 0.76$, $P < 0.05$). This suggests that a positive response of photosynthesis to e-CO₂ in LSS cultivars was translated into positive responses of DM and yield (Fig. 3-5 A,B).

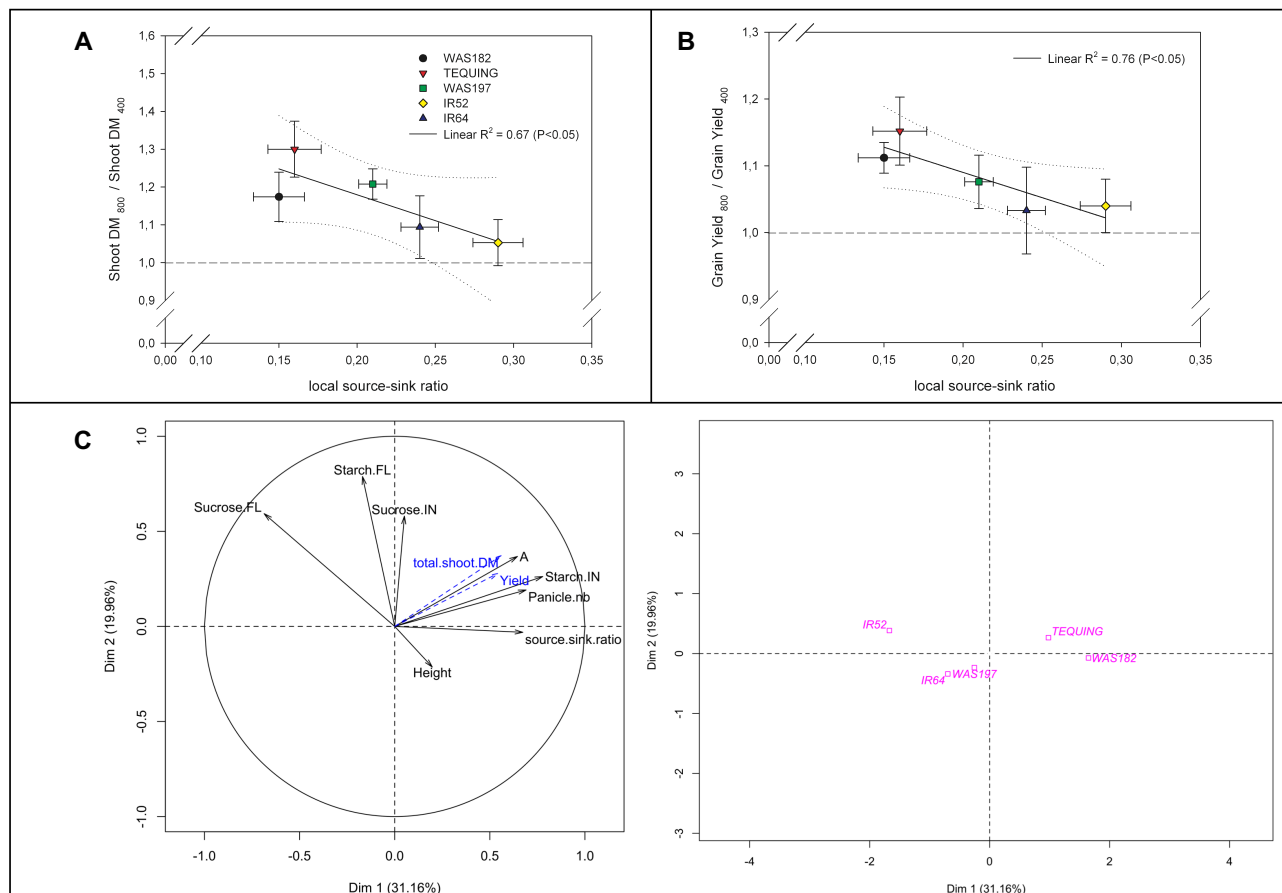


Figure 3-5 : Correlations with local source-sink ratio and PCA analysis

(A) : Relationship between total shoot biomass dry matter (DM) (stems + leaves) response to e-CO₂ and local C source-sink ratio measured at ambient [CO₂] in EXP2. Average values +/- SE are presented. The average is made on 5 replicates, each replicate being computed as the ratio between shoot DM of a plant grown at e-CO₂ (shootDM₈₀₀) and the average (of 5 replicates) shoot DM of plants grown at ambient CO₂ (shootDM₄₀₀)

(B) : Relationship between Grain Yield response to e-CO₂ and local C source-sink ratio measured at ambient [CO₂] in EXP2. Average values +/- SE are presented. The average is made on 5 replicates, each replicate being computed as the ratio between grain yield of a plant grown at e-CO₂ (Grain Yield₈₀₀) and the average (of 5 replicates) grain yield of plants grown at ambient CO₂ (Grain Yield₄₀₀).

Stars indicate significant differences at $p < 0.05$ (Tukey HSD test) compared to ambient (dashed line). Each point represents the mean, in each CO₂ treatment, of 5 values \pm SE

(C) : PCA using morphological (Total shoot DM, grain Yield, Panicle number, local source-sink ratio, plant height), biochemical variables (Sucrose and Starch in the Flag leaf FL and the corresponding Internode IN), and net photosynthetic rate (A₄₀₀) for EXP2. The centroid for each genotype is positioned (magenta squared) on the right part.

3.3.4. Nonstructural carbohydrate (NSC) response to e-CO₂ treatments

In both experiments, a strong cultivar effect ($P < 0.001$) was observed on NSC contents (sucrose, hexose, starch) in both flag leaves and internodes. In EXP1 an additional [CO₂] interaction effect was observed on flag leaf sucrose content. This was associated with a significant increase by +33% and +24% for IR52 and IR64, respectively, whereas LSS cultivars did not show any variation. Conversely, a [CO₂] effect (Table 3-1, $P < 0.001$) was observed on flag leaf starch

content. This effect was positive in all cultivars. Regarding stem starch concentration, no significant effect of [CO₂] was observed, although there was a trend of increased internode starch content under e-CO₂ in LSS cultivars (+25% on average), whereas it was stable in the HSS cultivar.

In EXP2, a [CO₂] effect was observed (Table 3-2, P<0.05) on leaf sucrose content, with a large increase by 40% and 17% in IR52 and IR64, respectively. With regards to stem sucrose and hexose contents, as in EXP1, no [CO₂] or interaction effects were noticed. [CO₂] generally increased leaf starch concentration (Table 3-2, P<0.01).

A PCA was performed (Fig. 3-5C) in order to relate the response to e-CO₂ of shoot DM and grain yield to that of *A₄₀₀*, morphological traits and biochemical traits in EXP2. The first dimension of the PCA explained 31.2 % of the variation observed and was positively correlated to the response to CO₂ of internode starch, panicle number, local source-sink ratio, *A*, total shoot DM and yield (r of 0.77, 0.69, 0.67, 0.64, 0.55, and 0.54 respectively). It was negatively correlated to the response of flag leaf sucrose (r = -0.68). The second dimension of the PCA explained 20.0 % of the variation and was correlated with flag leaf starch and sucrose content (r of 0.78 and 0.59, respectively) and internode sucrose content (r = 0.57). The genotypes were mainly discriminated by the first PCA dimension, with LSS and HSS cultivars well differentiated. Starch in internodes was the most discriminant biochemical variable, LSS genotypes exhibiting the greatest increase under e-CO₂. Conversely, LSS showed the smallest increase of flag leaf sucrose under e-CO₂.

3.4. Discussion

A recent field study (Kikuchi *et al.*, 2017) suggested that rice genotypic differences in growth and yield responses to e-CO₂ depend on the phenotypic plasticity of tillering and panicle size, giving plastic cultivars the capability of adjusting sink capacity to the increased assimilate source. Also, Fabre *et al.* (2019) demonstrated that the removal of the panicle sink causes strong reductions in rice photosynthesis particularly in the afternoon, and this inhibition was most pronounced in plants grown in e-CO₂ treatments. Our results in the present study confirm that constitutive morphological differences, presumably affecting source-sink ratio in rice, affect the plant's ability to efficiently use increased CO₂ resources. We used the proxy parameter flag-leaf area to spikelet number ratio, and called this morphological proxy parameter a "local C source-sink ratio".

3.4.1. Local source-sink ratio: a driver of leaf photosynthetic capacity under e-CO₂

An immediate effect of elevated CO₂ concentration in C₃ plants is to increase the carboxylation efficiency relative to oxygenation, resulting in reduced photorespiration. In a longer term, e-CO₂ possibly increases the efficiency of nitrogen use by reallocating nitrogen from Rubisco (Makino, 2003; Kant *et al.*, 2012; Weber and Bar-Even, 2019). It has also been suggested that a positive response of photosynthetic rates need a well-balanced improvement between sources and sinks of carbon, acting as a crucial factor in the ability of a cultivar to respond to e-CO₂. An increase in sink development (e.g. tiller development, panicle size) has been frequently linked with continued photosynthetic stimulation (Arp, 1991; Lemoine *et al.*, 2013; Ziska *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Our study showed that the flag-leaf photosynthesis (A_{400}) of rice cultivars with low local C source-sink ratio (LSS) responded positively to e-CO₂ whereas this was not the case for HSS genotypes (Fig. 3-1A). This stimulation in LSS genotypes may be caused by the lower carbon source-sink ratio that could be associated to more efficient Rubisco activity (Kasai, 2008; Zhu *et al.*, 2014).

In addition, a strong negative correlation was observed across cultivars between the response of flag-leaf photosynthetic capacity to e-CO₂ (A_{max800}/A_{max400}) and the local C source-sink ratio (Fig. 3-2). Variation in A_{max} for a given genotype, at a given level of light acclimation and abundant N resources, is primarily indicative of variation in TPU capacity, which in turn is the photosynthetic parameter linking the production and the consumption (or export) of assimilates (Yang *et al.*, 2016; Fabre *et al.*, 2019). Sharkey (2016) stated that “When the highest data points of the A/C_i curve do not increase with CO₂, TPU limitation is assumed”. In fact, a decline in ϕ PSII should also occur at increasing C_i when TPU is limiting (Sharkey *et al.*, 1986a; Long and Bernacchi, 2003). This condition was observed in IR52 and IR64 under e-CO₂, but not in LSS cultivars (Fig. 3-3B). The low A_{max} response to e-CO₂ of genotypes having high local C source-sink ratio might therefore indicate a lower TPU capacity in these cultivars, limiting A_{max} . Different levels of sink limitation as indicated by local C source-sink ratio would thus be reflected by differences in flag-leaf TPU capacity.

Although high local source-sink ratio limited A_{400} and A_{max} under e-CO₂ in HSS and intermediate cultivars, downregulation of photosynthesis was not necessarily directly caused by TPU limitation, as also reported by Fabre *et al.* (2019). A decrease in carboxylation rate (V_{cmax}), stomatal conductance and other biochemical parameters may have involved as well (von Caemmerer and Farquhar, 1984; Shimono *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014). Co-adjustment between V_{cmax} and TPU can occur (Sharkey *et al.*, 1988; Sage *et al.*, 1989; McClain and Sharkey, 2019; Fabre *et al.*, 2019). If TPU is too low, plant may be damaged by the excess at the photosystems level (Kiirats *et al.*, 2009). To avoid damage, physiological processes need to

be down-adjusted to avoid outright TPU limitation. As a result, TPU does not become a limiting factor as frequently as one might expect (Sharkey, 2019).

No significant reduction of leaf N or chlorophyll content was observed (Table S 3-2). These factors are known to result from growth under continuous e-CO₂ conditions (Nakano *et al.*, 1995; Ainsworth and Long, 2005). Neither did we observe any K deficiency that was reported to potentially affect photosynthesis through stomatal closure (Wang *et al.*, 2013) and to inhibit assimilate export from leaves and cause assimilate accumulation in the leaf (Gerardeaux *et al.*, 2010).

A decline of photosynthesis under sink limitation, as observed here in HSS cultivars, has often been attributed to end-product accumulation in photosynthetic tissues (Paul and Pellny, 2003). Our data, in line with previous studies on rice (Shimono *et al.*, 2010; Fabre *et al.*, 2019), confirm a greater increase in leaf sucrose content in HSS than LSS cultivars (Table 3-1). The local excess of assimilates may negatively feedback on photosynthetic rate (Huber and Huber, 1992; Iglesias *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2015b; Yang *et al.*, 2016), possibly *via* leaf TPU capacity (Paul and Foyer 2001; Fabre *et al.* 2019). In this case, sucrose-phosphate synthase (SPS) feedback inhibition occurs because of an increase in the phosphorylation state of the enzyme (Huber *et al.*, 1989). It has been shown that SPS is a substrate for SnRK1 protein kinases, modulating SPS activity when sucrose accumulates (Sugden *et al.*, 1999). Inhibition of sucrose synthesis may reduce export of triose phosphate from the chloroplast, causing a drop in Pi in the cytosol (Weiner *et al.*, 1992) that can lead to decreases TPU (Paul and Pellny, 2003).

Flag-leaf starch content also significantly increased under e-CO₂, in line with previous findings under field conditions (Zhu *et al.*, 2016b). However, the values observed (below 100 µg cm⁻²) were smaller than the empirical concentration (600 µg cm⁻²) reported to affect photosynthesis in rice (Weng and Chen, 1991). Thus, this parameter was probably not responsible for limited photosynthetic rates under e-CO₂ here. The LSS cultivars also accumulated more starch in stem internodes under e-CO₂. Stems are alternative or complementary sinks (Morita *et al.*, 2016) and may thus contribute to a more balanced source-sink ratio under e-CO₂ at whole-plant scale. Indeed, the LSS cultivars had greater stem DM.

Increasing the photosynthetic capacity of the flag leaf has been reported to be an important target to improve rice yield potential particularly under e-CO₂ (Chen *et al.*, 2007). According to our results, it is essential to simultaneously improve panicle C sink capacity to avoid photosynthetic efficiency losses caused by sink limitation.

3.4.2. Impact on dry matter accumulation and grain yield

Efforts were made to design rice varieties more productive under long-term e-CO₂, in particular by improving photosynthesis (Raines, 2011). Dry matter production is stimulated by e-CO₂ conditions (Ainsworth, 2008; Shimono *et al.*, 2008, 2009; Roy *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2016) whereby the additional assimilates are accommodated by the plant structure in many species and cultivars by increased branching (Ziska *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2013; Kirschbaum and Lambie, 2015). In the present study, we observed an increase of tillering in response to long-term e-CO₂, particularly for LSS cultivars (Fig. 3-4). This is also in line with (Kikuchi *et al.*, 2017) who observed that rice genotypes with high tillering capacity respond strongly to e-CO₂. Tillering in rice is known to be highly plastic and largely resource driven (Kumar *et al.*, 2016, 2017a), and plant C supply-demand ratio is used to predict tillering in several crop models (Luquet *et al.*, 2006). The plasticity of the panicle sink is also related to branching of the rachis which generates new spikelet positions. It thus can be expected that at e-CO₂, plant shoot apex activity in terms of cell division rates and branching will increase during the tillering phase (Jitla *et al.*, 1997). In line with this, LSS genotypes exhibited a greater increase of tillering compared to HSS genotypes under long-term e-CO₂ (Fig. 3-4). This result suggests that genotypes with the higher constitutive sink capacity also had greater sink plasticity. In fact, studies reported a close correlation between adaptation to CO₂ enrichment and higher sink plasticity (Atwell *et al.*, 1999; Dahal *et al.*, 2014b; Burnett *et al.*, 2016; Kikuchi *et al.*, 2017). However, to our knowledge the genotypic covariation between sink strength and plasticity was never pointed out, in particular for traits involved in different phenological phases. The C source-sink limitation of crop growth under e-CO₂ has been mainly studied during the reproductive phase (Peterhansel and Offermann, 2012; Lawlor and Paul, 2014; White *et al.*, 2016). Our result may have implications for breeding for future climate conditions.

The local C source-sink ratio did not vary with e-CO₂ treatment between EXP1 and EXP2 (Fig. S 3-1); Its component traits flag leaf area and panicle spikelet number both increased slightly under long-term CO₂ exposure (Table 3-2). Cultivars probably maintained this trait ratio at a genotypic level as suggested by (White *et al.*, 2016). The plasticity of flag leaf area and panicle spikelet number was greater in LSS than in HSS cultivars. Greater sink plasticity and sink potential in LSS were associated with higher starch accumulation in internodes (Table 3-2), similar to findings of (McKinley *et al.*, 2018). However, differences between LSS and HSS genotypes in sugar concentrations were not always significant and should be validated for a larger range of genotypes and/or CO₂ conditions. Flag leaf hexose concentration was significantly increased by e-CO₂ (Table 3-2); its positive role in sink strength and sink development was previously reported (Kumari and Asthir, 2016).

Long-term CO₂ enrichment (EXP2) increased plant grain yield (Table 3-2, P<0.01) across cultivars, although the effect was not significant for any given cultivar. This commonly

observed effect is related to increased number of fertile tillers and grains per panicle (Liu *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2017). However, the significant dependency ($P < 0.05$) of e-CO₂-induced grain yield gain on local source-sink ratio, with LSS cultivars being more responsive than HSS (Fig. 3-5B), is new. Studies on wheat demonstrated a positive relationship between grain yield and photosynthesis of the flag leaf during grain filling (Reynolds *et al.*, 2000; Furbank and Parry, 2013). Our results suggest that grain yield gains through increased carbon assimilation require a concomitant increase of the panicle sink, and that rice varieties differ in this respect. Other authors have pointed out that flag leaf photosynthesis and sink capacity should be improved conjointly in rice (Shimono *et al.*, 2009; Hasegawa *et al.*, 2013, 2016a; Ludewig and Sonnewald, 2016; Nakano *et al.*, 2017) and wheat (Reynolds *et al.*, 2017).

Rice grain filling relies on not only newly formed assimilates, but also on remobilized stem NSC reserves. Storage chiefly takes place before heading (Murchie *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016) and continue some days after heading (Wei *et al.*, 2018), followed by remobilization (MacNeill *et al.*, 2017) which compensates for declining photosynthesis during late grain filling period (Yang and Zhang, 2006; Wei *et al.*, 2018). Stem storage activity may resume when the grains are filled. Stems thus undergo a sink to source status transition (Cock and Yoshida, 1973; Chen and Wang, 2008). In the present study, there was a trend towards increased internode starch concentration under e-CO₂ conditions at 15 days after heading for LSS cultivars, although not significant for any given cultivar. It thus seems that LSS cultivars mobilized stem reserves less exhaustively under e-CO₂. The LSS cultivar TEQUING had a remarkably high level of non-mobilized stem reserves in both experiments (Tables 3-1 and 3-2). The present data do not allow interpreting the role of stem reserves in the response of LSS and HSS cultivars to e-CO₂, and more research is needed on the regulation of reserve accumulation and remobilization variable source-sink relations.

Our study provided evidence that the genotypic difference in local C source-sink ratio, as well as in the plasticity of its component traits flag leaf and panicle size, is important for the genetic variation in the ability of rice to translate enhanced CO₂ resources into grain production. This information, in combination with previous findings on the importance of compensatory tillering ability (Kikuchi *et al.*, 2017), provides potential inroads for breeding for higher grain yield under the enhanced CO₂ resources brought about by anthropogenic climate and atmosphere changes.

3.4.3. Implications for crop modelling and phenotyping

Our data suggest that modelling leaf photosynthesis and its genotypic and environmental variability should consider source-sink feedbacks, particularly in an e-CO₂ context. We observed that some simple morphological traits such as flag leaf size and panicle sink size, here

used to calculate a proxy parameter for local source-sink ratio, affect photosynthetic (Fig. 3-2) and even grain yield response (Fig. 3-5B) to e-CO₂ under controlled conditions. These traits and their phenotypic plasticity, as well as the plasticity of tillering (Kikuchi *et al.*, 2017), can be simulated by some crop models, e.g. (Kumar *et al.*, 2016, 2017a).

Feedback effects of sink limitation on photosynthesis may in part explain why inconsistencies are sometimes observed when simulating photosynthetic capacity (Lombardozzi *et al.*, 2017, 2018; Fatichi *et al.*, 2019). In general, even crop models simulating photosynthesis mechanistically, e.g., GECROS (Yin and van Laar, 2005; Yin and Struik, 2017) do not account for biochemical feedback inhibitions of photosynthesis, such as via TPU (Sharkey, 1985; Busch *et al.*, 2018). However, as our study indicated, the interactions between sources and sinks determining crop response to e-CO₂ conditions may in part be predicted on the basis of simpler traits while avoiding excessive model complexity. For this purpose, the present new results need confirmation for a larger segment of genetic diversity and for field conditions.

The phenotyping of larger populations for traits affecting crop e-CO₂ response, both at the levels of morphology and photosynthesis, will serve two applied objectives: (1) the species-wide validation of the traits that would justify their inclusion in generic crop models; and (2) the study of the traits' genetics for the purpose of breeding for cultivars that are more productive under future climatic scenarios (Wang *et al.*, 2016).

This study provided new insights into the role local C source-sink balance, C sink strength and plasticity at different biological scales in determining responses of rice plants to e-CO₂. It demonstrated that morphological traits affecting plant source and sink capacity can drive the genotypic responses of photosynthesis at leaf level, and thereby influence plant production. It suggested that for the grain filling phase, the local C source-sink ratio is a potential target for selecting more CO₂-responsive cultivars, despite pending validation for a broader genotypic spectrum and for field conditions. We thus call for broader phenotyping efforts for such traits and their effect on crop e-CO₂ response, providing genetic information to breeders and a rationale for improving crop models to better predict crop responses to e-CO₂.

If the local sink-source ratio can be confirmed as a reliable proxy trait for genotypic responses to e-CO₂, for rice and potentially other C₃ crops, it will be a useful selection tool for the adaptation to rising atmospheric [CO₂]. However, further research should elucidate interactions of e-CO₂ with other environmental changes associated with climate change, such as rising temperature.

3.5. Acknowledgments

This work was financially supported by CIRAD, French Agricultural Research Centre for International Development; <http://www.cirad.fr>). We thank Audrey Dardou, Christian Chaine, Remy Michel for their valuable assistance in technical support, and the biochemical phenotyping platform from AGAP research unit of CIRAD.

3.6. Tables & Supplemental material – Chapter 3

Table 3-1: Summary of a 2-way analysis of variance for growth, biochemical and physiological traits

Measured two weeks after heading on five rice cultivars grown under two [CO₂] levels (EXPI: 400 μmol mol⁻¹ continuously vs a switch to 800 μmol mol⁻¹ for 15 days from heading). Average values ± SE (n=5) are presented. For each column, values followed by different letters differ significantly (P<0.05)

*** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05, ns – not significant

Cultivar	[CO ₂] grown	Stem DM (g plant ⁻¹)	Leaf DM (g plant ⁻¹)	Main stem panicle spikelets number (SP)	Main stem flag leaf area (FLA) (cm ²)	Main stem C source-sink ratio (FLA/SP)	A ₄₀₀ (μmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i ambient (μmol mol ⁻¹)	A _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i elevated (μmol mol ⁻¹)	Ratio A _{max800} /A _{max400}
WAS182	400	36.8 ± 0.6 ab	14.1 ± 0.7 a	231.4 ± 11.0 a	40.7 ± 3.9 bc	0.17 ± 0.01 de	19.6 ± 0.3 d	283.7 ± 2.0 a	24.2 ± 0.6 bc	1021.0 ± 41.6 a	1.2 ± 0.1 bc
	800	39.3 ± 1.2 a	14.3 ± 0.7 a	238.2 ± 8.9 a	41.4 ± 2.3 bc	0.17 ± 0.01 de	24.5 ± 0.5 a	267.4 ± 5.6 a	29.2 ± 1.6 a	1004.4 ± 12.4 a	
TEQUING	400	38.4 ± 2.2 ab	12.3 ± 0.8 ab	247.4 ± 10.1 a	39.0 ± 1.2 c	0.15 ± 0.00 e	17.3 ± 0.4 e	287.4 ± 6.4 a	21.6 ± 0.5 c	1082.4 ± 39.6 a	1.3 ± 0.1 c
	800	39.3 ± 0.4 a	11.9 ± 0.5 ab	236.2 ± 5.8 a	40.1 ± 4.0 c	0.17 ± 0.01 de	21.0 ± 0.1 cd	288.4 ± 2.6 a	29.1 ± 1.2 a	1059.0 ± 17.6 a	
WAS197	400	29.1 ± 1.9 bc	11.7 ± 0.6 ab	215.4 ± 8.6 ab	47.5 ± 2.4 abc	0.22 ± 0.00 cde	21.5 ± 0.4 bc	289.1 ± 9.1 a	25.0 ± 0.6 abc	1061.2 ± 21.6 a	1.1 ± 0.0 ab
	800	31.5 ± 0.9 abc	11.5 ± 0.7 ab	224.0 ± 4.4 ab	50.8 ± 3.6 abc	0.22 ± 0.01 cd	23.2 ± 0.3 ab	289.9 ± 6.2 a	27.4 ± 0.7 ab	1117.3 ± 20.0 a	
IR52	400	33.6 ± 2.0 abc	12.6 ± 0.7 ab	190.4 ± 7.5 bc	55.4 ± 4.3 ab	0.29 ± 0.01 ab	19.8 ± 0.2 cd	264.2 ± 6.0 a	23.5 ± 0.8 bc	1144.4 ± 19.1 a	0.9 ± 0.0 a
	800	32.7 ± 3.8 abc	12.6 ± 0.7 ab	188.4 ± 10.4 bc	56.7 ± 1.2 a	0.30 ± 0.01 a	17.0 ± 0.4 e	265.5 ± 3.4 a	21.2 ± 0.9 c	1148.1 ± 43.9 a	
IR64	400	26.5 ± 2.4 c	10.2 ± 0.8 b	167.0 ± 12.0 c	38.8 ± 3.7 c	0.23 ± 0.01 bcd	19.3 ± 0.4 d	271.6 ± 5.6 a	25.3 ± 0.7 abc	1046.5 ± 32.6 a	1.0 ± 0.0 ab
	800	26.4 ± 1.9 c	10.0 ± 0.5 b	152.8 ± 7.5 c	39.4 ± 2.0 c	0.25 ± 0.01 abc	19.7 ± 0.5 cd	266.9 ± 4.6 a	24.8 ± 0.9 bc	1052.6 ± 55.0 a	
[CO ₂]		ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	/
Cultivar		***	***	***	***	***	***	**	***	**	***
[CO ₂] \times Cultivar		ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	/
Cultivar	[CO ₂] grown	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose top internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose top internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch top internode (mg g ⁻¹ DM)				
WAS182	400	310.3 ± 15.6 ab	209.2 ± 11.4 ab	10.6 ± 0.3 ab	49.3 ± 8.6 a	40.1 ± 8 abc	136.3 ± 17.3 c				
	800	271.6 ± 13.1 ab	227.3 ± 19 a	11.9 ± 0.7 a	41.3 ± 11.8 a	51.3 ± 9.7 ab	187.6 ± 24.9 bc				
TEQUING	400	336.2 ± 6.4 a	127.0 ± 5.7 de	13.0 ± 0.5 a	8.9 ± 1.2 bc	35.8 ± 4.4 abc	340.3 ± 14.6 ab				
	800	347.6 ± 28.8 a	139.1 ± 20.1 e	13.8 ± 1.2 a	9.3 ± 4.8 c	61.2 ± 5.2 a	383.1 ± 24.5 a				
WAS197	400	276.2 ± 20.9 ab	194.0 ± 7.9 abc	15.9 ± 2.3 a	63.0 ± 5.6 a	43.1 ± 6.6 ab	143.3 ± 21.6 c				
	800	246.1 ± 17.2 abc	198.0 ± 6.3 abc	11.8 ± 1.4 a	43.0 ± 5.1 a	47.6 ± 3.9 ab	185.9 ± 13.1 c				
IR52	400	191.8 ± 13.6 c	157.7 ± 8.6 bcde	6.7 ± 1 b	26.4 ± 3.7 ab	18.6 ± 1.2 c	157.8 ± 12.0 abc				
	800	255.3 ± 23.2 abc	153.2 ± 4.3 cde	9.7 ± 1.6 ab	38.4 ± 3.2 a	30.4 ± 5.3 bc	145.2 ± 37.5 c				
IR64	400	221.4 ± 17.8 bc	194.1 ± 7.1 abc	9.9 ± 1.1 ab	23.4 ± 3.1 ab	20.5 ± 5.1 c	156.2 ± 18.9 c				
	800	274.7 ± 20.8 ab	182.7 ± 7.4 abcd	12.2 ± 1.7 a	23.2 ± 4.3 ab	35.2 ± 7.2 bc	154.6 ± 24.1 c				
[CO ₂]		ns	ns	ns	ns	***	ns				
Cultivar		***	***	***	***	***	***				
[CO ₂] \times Cultivar		*	ns	ns	ns	ns	ns				

Table 3-2 : Summary of a 2-way analysis of variance for biochemical and physiological parameters

Measured two weeks after heading on the flag leaf on the main stem, and plant growth and yield components evaluated at maturity on five rice cultivars grown under two [CO₂] levels (EXP2: 400 vs 800 μmol mol⁻¹ continuously from seedling to maturity). Control (400 μmol mol⁻¹) data for photosynthetic parameters and carbohydrate analyses were taken from EXP1, as environment and sowing date were identical. Average values ± SE (n=5) are presented. For each column, values followed by different letters differ significantly (P<0.05)

*** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05, ns – not significant

Cultivar	[CO ₂] grown	Tiller number per plant	Panicle number per plant	Plant height (cm)	total shoot DM (g)	Grain Yield (g m ⁻²)	Main stem panicle spikelets number (SP)	Main stem flag leaf area (FLA) (cm ²)	Main stem C source-sink ratio (FLA/SP)
WAS182	400	12.0 ± 0.3 a	10.4 ± 0.6 a	81.0 ± 0.6 a	50.3 ± 1.1 abc	598.8 ± 18.1 ab	234.4 ± 7.4 abc	36.2 ± 4.0 c	0.15 ± 0.02 c
	800	14.0 ± 0.3 a	12.2 ± 0.4 a	85.7 ± 1.6 a	59.1 ± 2.5 ab	666.2 ± 13.9 a	247.2 ± 8.8 ab	41.8 ± 1.7 abc	0.17 ± 0.00 c
TEQUING	400	12.4 ± 0.2 a	11.4 ± 0.4 a	84.7 ± 1.1 a	41.5 ± 1.6 c	570.9 ± 20.7 abc	235.6 ± 8.4 abc	38.7 ± 4.7 bc	0.16 ± 0.02 c
	800	13.8 ± 0.6 a	12.8 ± 0.8 a	83.8 ± 1.6 a	54.0 ± 3.0 ab	657.8 ± 13.9 a	261.8 ± 6.0 a	46.1 ± 3.2 abc	0.18 ± 0.01 c
WAS197	400	13.2 ± 0.9 a	12.8 ± 0.8 a	82.0 ± 1.9 a	39.9 ± 1.7 c	610.2 ± 39.6 a	203.4 ± 6.7 cde	41.6 ± 1.3 abc	0.21 ± 0.01 bc
	800	14.0 ± 0.5 a	13.0 ± 0.4 a	82.2 ± 1.1 a	48.2 ± 1.3 abc	656.7 ± 29.6 a	218.6 ± 4.7 bcd	45.8 ± 2.0 abc	0.21 ± 0.01 bc
IR52	400	11.4 ± 0.5 a	11.4 ± 0.5 a	83.0 ± 1.5 a	57.4 ± 2.3 ab	548.5 ± 7.9 abc	184.4 ± 9.6 ef	53.1 ± 3.1 ab	0.29 ± 0.02 a
	800	12.4 ± 0.9 a	11.8 ± 1.1 a	85.2 ± 0.9 a	60.4 ± 2.7 a	573.1 ± 26.1 abc	191.2 ± 6.2 def	53.2 ± 3.3 a	0.28 ± 0.01 a
IR64	400	13.2 ± 0.5 a	12.6 ± 0.5 a	79.4 ± 0.9 a	46.3 ± 2.9 bc	412.2 ± 23.5 c	159.0 ± 4.6 f	39.0 ± 3.0 abc	0.24 ± 0.01 ab
	800	14.0 ± 0.3 a	13.0 ± 1.0 a	80.0 ± 0.9 a	50.6 ± 3.4 abc	426.3 ± 27.1 bc	164.6 ± 4.3 f	38.3 ± 1.2 bc	0.23 ± 0.01 ab
[CO ₂]		**	ns	ns	***	**	**	ns	ns
Cultivar		*	ns	*	***	***	***	***	***
[CO ₂]x Cultivar		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Cultivar	[CO ₂] grown	A ₄₀₀ (μmol m ⁻² s ⁻¹)	C _i ambient (μmol mol ⁻¹)	Sucrose flag leaf (μg cm ⁻²)	Sucrose top internode (mg g ⁻¹ DM)	Hexose flag leaf (μg cm ⁻²)	Hexose top internode (mg g ⁻¹ DM)	Starch flag leaf (μg cm ⁻²)	Starch top internode (mg g ⁻¹ DM)
WAS182	400	19.6 ± 0.3 bcd	283.7 ± 2.0 a	310.3 ± 15.6 a	209.2 ± 11.4 ab	10.6 ± 0.3 abc	49.3 ± 8.6 ab	40.1 ± 8.0 abc	136.3 ± 17.3 c
	800	22.6 ± 0.3 a	277.9 ± 11.2 a	297.4 ± 19.2 ab	245.4 ± 18.3 a	14.1 ± 0.8 ab	46.0 ± 6.5 ab	36.3 ± 4.3 bc	182.2 ± 9.8 bc
TEQUING	400	17.3 ± 0.4 d	287.4 ± 6.4 a	336.2 ± 6.4 a	127.0 ± 5.7 c	13.0 ± 0.5 ab	8.9 ± 1.2 d	35.8 ± 4.4 abc	340.3 ± 14.6 ab
	800	20.9 ± 0.4 abc	274.3 ± 8.3 a	344.1 ± 9.4 a	116.3 ± 7.3 c	18.5 ± 2.1 a	8.3 ± 1.3 d	61.9 ± 10.9 ab	381.0 ± 19.3 a
WAS197	400	21.5 ± 0.4 ab	297.0 ± 5.4 a	276.2 ± 20.9 ab	194.0 ± 7.9 ab	15.9 ± 2.3 ab	63.0 ± 5.6 a	43.1 ± 6.6 abc	143.3 ± 21.6 c
	800	22.4 ± 1.1 a	283.1 ± 10.2 a	289.3 ± 24.6 ab	182.2 ± 9.7 ab	15.1 ± 1.6 ab	55.1 ± 8.5 a	75.2 ± 14.4 a	152.3 ± 19.2 c
IR52	400	19.8 ± 0.2 abcd	264.2 ± 6.0 a	191.8 ± 13.6 c	157.7 ± 8.6 bc	6.7 ± 1.0 c	26.4 ± 3.7 bc	18.6 ± 1.2 c	157.8 ± 13.1 c
	800	18.5 ± 0.3 cd	262.1 ± 6.0 a	267.2 ± 22.5 abc	155.0 ± 15.7 bc	11.7 ± 0.9 ab	30.1 ± 5.2 abc	39.6 ± 11.0 abc	108.3 ± 10.7 c
IR64	400	19.3 ± 0.4 bcd	267.9 ± 4.9 a	221.4 ± 17.8 bc	194.1 ± 7.1 ab	9.9 ± 1.1 bc	23.4 ± 3.1 c	20.5 ± 5.1 c	156.2 ± 18.9 c
	800	20.4 ± 0.6 abc	263.3 ± 4.3 a	258.2 ± 19.9 abc	191.8 ± 12.5 ab	12.4 ± 1.9 ab	23.1 ± 3.4 c	24.2 ± 5.1 c	160.1 ± 30.3 c
[CO ₂]		***	ns	*	ns	***	ns	**	ns
Cultivar		***	**	***	***	***	***	***	***
[CO ₂]x Cultivar		**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Figure S 3-1 : Local C source-sink ratio (flag leaf area / fertile spikelet number on the main stem) measured after a medium-term (15 d from heading, EXP1) vs the same ratio measured after a long-term (EXP2) CO₂ enrichment at 800 μmol mol⁻¹ of five rice cultivars.

Each point represents the mean, in each e-CO₂ treatment, of 5 replicates ± SE

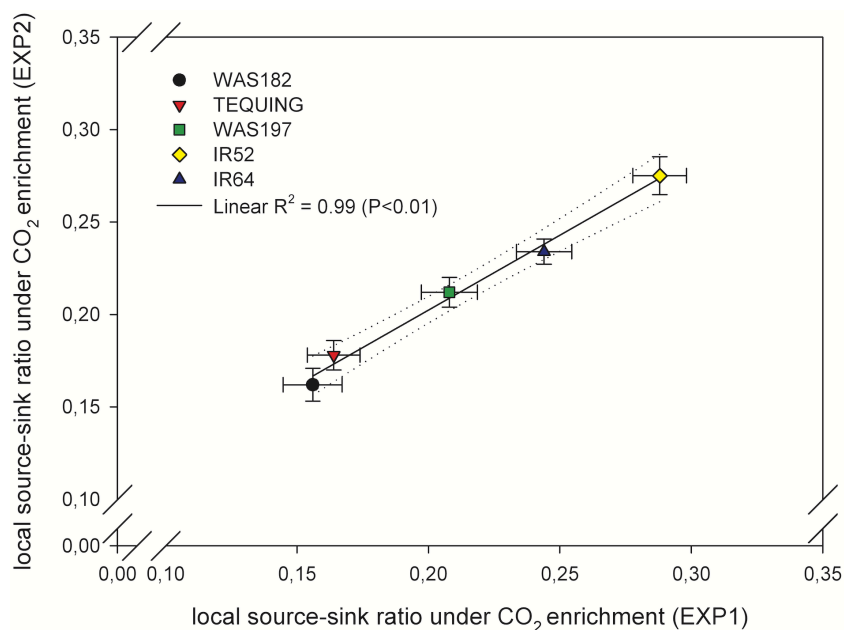


Table S 3-1: Description of the 5 cultivars selected within the PRAY diversity panel for the present study:

Values are mean of the two years (2013, 2014) in field experiments at CIAT, Colombia (Rebolledo et al. 2016). Local C source-sink ratio computed as flag leaf area divided by fertile spike number on the main stem.

Designation	Species	Origin	Degree days to flowering	Tiller number per m ²	Panicle number per m ²	Plant height (cm)	Grain fertility %	Local C source-sink ratio
WAS182	<i>Indica</i>	Senegal	1224	279	258	68	70	0.20
TEQUING	<i>Indica</i>	China	1221	252	244	71	75	0.18
WAS197	<i>Indica</i>	Senegal	1166	312	296	66	78	0.27
IR52	<i>Indica</i>	Philippines	1203	301	270	65	80	0.34
IR64	<i>Indica</i>	Philippines	1165	317	293	61	82	0.32

4. Discussion générale

Les processus qui contrôlent majoritairement la croissance des plantes sous eCO₂ font souvent l'objet de controverse. En effet, une école de pensée soutient que l'assimilation photosynthétique du CO₂ (la source carbonée) en est le facteur déterminant (Ort *et al.*, 2015; De Souza and Long, 2018). Une autre école postule que l'activité des puits en C pilote à la fois la croissance et la régulation du fonctionnement des sources en C, et que de fait les relations sources-puits sont le facteur déterminant de la croissance des plantes en réponse au eCO₂ (Körner, 2015; White *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2018).

Le programme expérimental de la présente thèse a été conçu pour mieux comprendre l'impact de ces relations sur les processus de régulation de la photosynthèse, ce, notamment au travers du métabolisme carboné dans les organes sources et puits chez le riz. Nous avons de fait plus particulièrement analysé le rôle de la limitation de la photosynthèse par TPU, paramètre agissant à cette interface.

Nos recherches ont permis une avancée importante dans la compréhension de cette limitation, et le rôle qu'elle peut jouer lorsque l'activité des puits de carbone dans la plante est inférieure à celle des sources. Les résultats principaux obtenus dans chacun des chapitres sont discutés et analysés ci-après pour en dégager les conséquences et perspectives plus ou moins directes en termes d'analyses physiologiques, de phénotypage, de modélisation et de pistes pour l'amélioration des plantes cultivées de demain.

4.1. Analyse d'un déséquilibre source-puits sur les limitations de la photosynthèse :

Dans une première série d'expérimentations décrites lors du **chapitre 2**, il a d'abord été nécessaire de mettre en évidence cette limitation chez le riz et d'étudier plus spécifiquement, quand et comment un déséquilibre source-puits affecte les processus photosynthétiques ?

Nous avons pour cela utilisé un dispositif hautement contrôlé (phytotrons de type « reach-in »), et pratiqué une diminution artificielle de la capacité de puits sur une variété choisie (IR64) par ablation de panicules, tout en augmentant la source *via* eCO₂, créant ainsi un déséquilibre source-puits propice à observer une limitation par TPU.

4.1.1. Niveau d'implication de TPU et ses conséquences :

Bien que la photosynthèse nette mesurée aux teneurs actuelles de CO₂ (A_{400}) ait décliné significativement au cours de la journée particulièrement sous eCO₂, notre étude a révélé que dans la plupart des situations, TPU n'en était pas systématiquement le facteur limitant apparent. Ce résultat est généralement celui que l'on retrouve dans la littérature et explique en partie

pourquoi cette limitation est souvent ignorée. Cependant, parce que nos mesures ont été menées plusieurs fois par jour, nous avons montré qu'une limitation directe de A_{400} par TPU pouvait intervenir en fin de la journée. Le fait d'avoir analysé l'impact de cette limitation de façon dynamique (ce qui n'a jamais été fait à notre connaissance) montre bien l'existence d'une évolution diurne de ce paramètre. **Dans une situation de fort déséquilibre source-puits, TPU peut donc limiter le niveau de photosynthèse**, observant une baisse significative de 50% dans notre étude. Cette baisse a coïncidé avec l'accumulation de sucres (notamment le saccharose foliaire) en fin de journée, les deux facteurs montrant une corrélation négative. Une des conséquences directes de ce phénomène est que la photosynthèse mesurée communément le matin dans la plupart des expérimentations écophysiologiques (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013), peut ne pas réellement refléter le niveau de photosynthèse réel de la plante. Cela souligne **l'importance de capturer les changements de photosynthèse au cours de la journée lorsque l'équilibre source-puits de la plante peut être affecté** (e.g. eCO_2 , ou capacité de puits réduite).

Un résultat sous-jacent et nouveau que met en évidence notre étude est que **TPU est le paramètre qui reflète le mieux, parmi l'ensemble des limitations étudiées, les changements de photosynthèse au cours de la journée lors d'un déséquilibre source-puits**, sans pour autant en être la plupart du temps le facteur limitant apparent.

Lors du suivi de l'évolution de ce paramètre, nous avons montré grâce à l'analyse combinée des signaux de fluorescence chlorophyllienne mesurée conjointement, que la valeur du paramètre ϕ_{PSII} pouvait subitement baisser (confirmant une limitation par TPU), et cela juste après une phase d'augmentation (indicatrice d'une limitation par V_{cmax}). Dans ce cas précis (Figure 2-2B du chapitre 2 par exemple), cela suggère qu'en cas de fort déséquilibre source-puits, la limitation de la photosynthèse par la Rubisco (V_{cmax}) a cédé directement sa place à la limitation par TPU. De ce fait, le taux maximum du transport d'électrons est donc fixé par TPU et non par le flux électronique des réactions lumineuses (J_{max}) en tant que tel, qui est impliqué dans la régénération du RuBP, et généralement uniquement considéré dans ces conditions.

La conséquence directe est qu'**ignorer TPU dans les études où le déséquilibre source-puits est important peut causer des erreurs sur l'estimation de la capacité de transport des électrons (J_{max}), et sur le niveau prédit de photosynthèse par les modèles.**

Bien que peu fréquente, cette transition directe de V_{cmax} à TPU a aussi été mentionnée par d'autres auteurs (Yang *et al.*, 2016; McClain and Sharkey, 2019) lors d'études sur l'impact de la température.

Il me paraît donc important d'utiliser systématiquement l'analyse des signaux de fluorescence en combinaison des mesures de photosynthèse pour vérifier l'occurrence ou non d'une limitation par TPU. Ceci est en effet rarement réalisé y compris lors des études de type méta-

analyses visant à caractériser les limitations biochimiques de la photosynthèse (Wullschleger, 1993; Kumarathunge *et al.*, 2019).

Une autre implication de notre étude est que **TPU apparaît comme une limitation agissant sur le court terme**. Comme déjà reporté par (Yang *et al.*, 2016), cette limitation repose sur la faculté d'extraire rapidement le carbone du cycle de Calvin via l'utilisation des trioses-phosphates. Cette information étant a priori absente de la littérature sur le sujet, ceci conduit bien souvent à l'ignorer. En effet, à travers les résultats du chapitre 2, nous interprétons que lorsque la photosynthèse se trouve limitée par TPU, ce phénomène est transitoire. Rapidement et comme nous l'avons observé, d'autres composantes de la machinerie photosynthétique sont ajustées à la baisse (diminution conjointe de la capacité de carboxylation (V_{cmax}), confirmée par d'autres études (Sharkey *et al.*, 1986b), de sorte que TPU ne soit plus la limitation apparente de la photosynthèse (A_{400}) sur le long terme. Autrement dit, comme le souligne (Sharkey, 2019) dans son article compagnon à nos résultats, **une limitation par TPU provoque des changements masquant son effet direct et momentané sur la photosynthèse**.

De ce fait, la baisse significative de A_{400} que nous avons observée au cours de la journée n'est pas toujours associée à une limitation apparente par TPU, hormis le moment où le déséquilibre source-puits devient trop important (dans l'après-midi pour les plantes limitées en capacité de puits et exposées au $e\text{CO}_2$). Cela souligne dans ce cas la difficulté, voire l'impossibilité de la plante à pouvoir s'ajuster à partir d'un certain niveau de déséquilibre, ce qui est potentiellement dommageable et impacte directement sur son fonctionnement. Cet effet négatif sur la photosynthèse pourrait sans doute être exacerbé et intervenir plus tôt dans la journée lors de température plus basse, qui agit négativement sur la capacité de TPU (Busch and Sage, 2017)

Un corollaire pourrait-être établi lorsque la photosynthèse est limitée par la régénération du RuBP (J_{max}) : Par exemple comme montré dans l'étude de (Mott *et al.*, 1984), lorsqu'une situation de faible lumière inhibe la régénération du RuBP (baisse de J_{max}), cela va provoquer une baisse de sa concentration, mais très vite, une désactivation de la Rubisco va opérer entraînant une augmentation de la concentration en RuBP. Dans ce cas, la limitation J_{max} n'apparaît finalement plus comme le facteur limitant apparent de la photosynthèse, et laisse V_{cmax} comme limitation apparente principale.

De façon générale, la plante doit donc ajuster en permanence sa capacité de TPU pour que sa valeur se situe toujours à un niveau à peine un peu plus élevé que le plus haut taux de photosynthèse permis par la machinerie photosynthétique (capacité photosynthétique ou A_{max}), dans le but d'éviter des situations provoquant des stress oxydatifs, dommageables pour la plante (Pammenter *et al.*, 1993).

4.1.2. Comment est régulé TPU ?

Cette limitation apparaît comme une condition métabolique qui incorpore de nombreux signaux reflétant l'état du système photosynthétique dans la cellule. La plupart des métabolites dans le chloroplaste sont phosphorylés, et la production de phosphates sous forme de P_i est intimement reliée à la production de sucre, notamment saccharose et amidon. Il n'est donc pas étonnant d'observer comme le montrent nos résultats (Fig. 2-4, chapitre 2) une **relation négative entre la capacité de TPU et l'accumulation en saccharose foliaire au niveau du mésophylle**, qui semble être chez le riz un facteur déterminant de sa régulation, et le signe indirect d'une capacité de puits réduite. La littérature évoque parfois des relations de baisse du niveau de photosynthèse sous eCO_2 en lien avec une augmentation du rapport hexose/saccharose foliaire chez d'autres espèces (Moore *et al.*, 1998). Dans notre cas chez le riz, cela ne s'est pas vérifié, ni pour la photosynthèse ni pour TPU.

Toutefois une deuxième relation négative a été observée pour les plantes limitées en capacité de puits (ablation de la panicule), suggérant un **effet additionnel de la capacité de puits** comme élément de contrôle. Cette hypothèse s'est vérifiée par la mise en évidence d'une relation négative entre TPU et un proxy local du ratio source-puits en C (Fig. 2-5) capturé par le rapport entre la surface foliaire de la feuille paniculaire et le nombre de grains de la panicule adjacente du brin maître. Il est de ce fait probable que la concentration en **saccharose au niveau du phloème participe aussi à la régulation de TPU**, car cette concentration est très dépendante de la force de puits (Regmi *et al.*, 2016). Ces résultats restent cependant partiels à ce stade de notre étude dans la mesure où ce chapitre 2 s'est centré sur un seul génotype, compromettant de fait l'observation de variabilité dans le ratio source-puits.

Ces résultats nouveaux, qui n'avaient jamais été observés à notre connaissance chez le riz, suggèrent plus généralement qu'**il est possible de relier l'impact des déséquilibres source-puits de la plante avec les niveaux de photosynthèse, en considérant TPU comme paramètre d'ajustement** à des pas de temps infra-journaliers. Ils pourraient questionner plus largement la façon de concevoir certains formalismes des modèles de fonctionnement chez les céréales, qui sera discutée ultérieurement, où dans le meilleur des cas (i.e. quand il y a prise en compte des capacités de puits et de source) la croissance est gérée par un pool global de carbohydrate (offre) par rapport à une capacité globale de puits (demande). Cela est généralement le contraire chez les espèces pérennes qui considèrent les relations sources-puits à un niveau local pour ajuster les niveaux de photosynthèses (Baïram *et al.*, 2019).

4.2. Conséquence de la variabilité locale du ratio source-puits en C

Dans la partie suivante de ce travail (**chapitre 3**), nous avons donc logiquement cherché à évaluer si les concepts et résultats du chapitre précédent se vérifiaient lorsque la variabilité locale du ratio source-puits en C était d'origine génétique.

Pour cela, nous avons utilisé un ensemble de 5 variétés de riz, contrastant au niveau de ce proxy, mais présentant des caractéristiques similaires au niveau développemental (phénologie, nombre de panicules par m², hauteur des plantes, fertilité des grains et longueur du cycle) pour minimiser l'impact que pourraient avoir des puits alternatifs. Utiliser des variétés isolignes qui diffèrent sur des caractères de force de puits en phase reproductive aurait été une piste intéressante qui a été préalablement envisagée ; toutefois de telles lignées n'étaient pas disponibles sur ces critères.

L'étude a été menée en serre (**Image 4-1**) pour se rapprocher de conditions plus naturelles, en utilisant deux compartiments contrôlés identiquement au niveau des conditions climatiques, mais contrastés au niveau de la teneur en CO₂ (ambient vs élevé, appliqué pendant 15 jours à partir d'épiaison tout comme l'étude en phytotrons). De plus, une expérimentation complémentaire a été menée sur les mêmes géotypes confrontés à un traitement eCO₂ sur le cycle entier. Le but était d'évaluer la pertinence de ce proxy dans l'évaluation de la croissance et du rendement final en grain.



Image 4-1 : Vue d'ensemble de l'essai mené en serre lié au chapitre 3, avec les deux compartiments différenciellement régulés pour la [CO₂], 400 vs 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

4.2.1. Implication sur le niveau de capacité photosynthétique

Nos résultats ont clairement mis en évidence que **le ratio source-puits local en C a un impact direct sur la capacité de la plante à répondre à l'enrichissement en CO₂.**

Plus ce ratio est bas, ce qui correspond dans notre étude à avoir une surface foliaire active faible (faible source) par épillet à remplir sur la panicule adjacente (importante capacité de puits), plus

la plante répond positivement au niveau de la photosynthèse nette (A_{400}) et au niveau de sa capacité photosynthétique (A_{max}). La forte corrélation entre la variation de la capacité photosynthétique (A_{max} , et donc celle de TPU), et le ratio source-puits local en C (Fig. 3-2), confirme les résultats observés au chapitre 2, à savoir **l'existence d'une interdépendance entre l'équilibre source-puits local en C et la capacité de TPU**.

A contrario, les géotypes ayant un ratio source-puits élevé (comme pour IR52 ou IR64) avec une capacité de puits limitée (nombre de grains), ont présenté un A_{max} diminué en raison d'une limitation par TPU mise en évidence (baisse du paramètre ϕ_{PSII}). Ces géotypes ont également présenté une augmentation notable de la teneur en saccharose foliaire, confortant nos résultats de l'implication de ce sucre comme élément de régulation important.

Dans cette étude, nous n'avons pas décelé d'impact direct de TPU sur A_{400} y compris en fin de journée, le déséquilibre source-puits n'ayant été volontairement pas aussi drastique que dans le chapitre 2 (pas d'ablation de panicules ici). Nous avons toutefois constaté que le seuil d'une limitation par TPU intervenait d'autant plus précocement que la capacité de puits diminuait. Ce seuil a été estimé à $C_i=800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ chez IR64 alors qu'il est estimé à $C_i=600 \mu\text{mol mol}^{-1}$ chez IR52 (Fig. 3-4). Il serait intéressant de poursuivre sur des variétés présentant un ratio source-puits local en C encore plus élevé pour vérifier si certaines variétés peuvent-être déjà naturellement limitée par TPU sous les concentrations actuelles de CO_2 . Certaines de ces variétés avaient été ciblées pour faire partie de cette étude, mais les semences n'étaient pas disponibles au moment de l'essai.

Il apparaît donc évident à travers nos résultats que **la capacité photosynthétique (A_{max}) n'est pas seulement déterminée par des propriétés constitutives de l'appareil photosynthétique** et de l'environnement, car sinon sa valeur serait relativement constante chez une plante donnée. Au contraire, cette valeur décroît au cours de la journée, mais dépend aussi grandement de l'équilibre source-puits local en C. Notre expérimentation démontre qu'un ajustement du ratio source-puits en C est essentiel pour permettre à la plante de maintenir un taux de photosynthèse adapté à la disponibilité des ressources carbonées.

Autrement dit, **l'assimilation du carbone s'adapte à la force des puits disponibles, et de fait ces derniers devraient s'adapter à cette même source en C pour ne pas la limiter en situation de $e\text{CO}_2$. Ces deux composantes sont définitivement indissociables dans un contexte d'amélioration des plantes pour l'adaptation au changement climatique.**

Nous sommes partis de l'hypothèse que TPU, à l'interface entre production et consommation des sucres, pouvait avoir un rôle charnière sur la régulation de la photosynthèse lorsque les relations sources-puits étaient affectées. Cette hypothèse s'est bien confirmée à travers cette étude. Dans le même temps, pouvoir augmenter la capacité photosynthétique de la feuille drapeau (A_{max}) sous $e\text{CO}_2$ a été mentionné comme un levier d'amélioration du rendement chez

le riz (Chen *et al.*, 2007), et de nombreux efforts de recherches ont été menés pour concevoir des variétés de riz plus efficaces. À ce niveau d'implication plus large pour l'agronomie et la sélection, nos résultats soulèvent implicitement de nouvelles questions pour l'amélioration des plantes.

4.2.2. Implication pour la sélection dans un contexte d'élévation du CO₂

Lors de l'évaluation des variétés sous eCO₂ sur le cycle entier, nos résultats ont également suggéré que **le ratio source-puits local en C serait représentatif de la capacité des géotypes à répondre positivement au eCO₂, c.-à-d. à accumuler de la biomasse et avoir un meilleur rendement en grain.**

Dans ce cadre, les géotypes présentant des capacités de puits plus importantes (ratio source-puits en C faible) ont mieux profité de l'enrichissement en CO₂ et ont pu conjointement augmenter leur capacité photosynthétique. Il a été intéressant de noter que ces mêmes géotypes ont également montré une augmentation du tallage en réponse au eCO₂, suggérant que **les géotypes possédant constitutivement une plus forte capacité de puits en phase reproductive présentent aussi une meilleure capacité de puits en phase végétative au travers du tallage, qui est chez le riz une source clé de la plasticité phénotypique** (Kumar *et al.*, 2016, 2017b)

Certaines études chez le soja ou le riz (Zhu *et al.*, 2014; Kumagai *et al.*, 2016; Kikuchi *et al.*, 2017) ont déjà souligné une relation positive forte entre meilleure adaptation à l'augmentation du CO₂ au champ (système FACE), et la plasticité des puits (tallage ou taille des panicules). Cependant, à notre connaissance, **la co-variation génotypique entre la force de puits constitutive et la plasticité n'a jamais été mise en évidence**, en particulier pour des caractères impliqués dans différentes phases phénologiques.

Une meilleure capacité de la plante à développer de nouveaux puits ou des puits plus grands sous eCO₂, semble un élément important d'adaptation aux futurs climats (Ruiz-Vera *et al.*, 2017; Parvin *et al.*, 2020; Lv *et al.*, 2020). Vouloir améliorer purement la photosynthèse n'a pas de sens pour un environnement en eCO₂ si l'on ne considère pas la plante dans son intégralité, notamment aussi le niveau de plasticité des organes puits. Nos résultats pourraient donc avoir des implications sérieuses pour orienter la sélection et l'amélioration variétale pour des conditions climatiques futures, où finalement, de simples traits morphologiques relativement faciles à mesurer comme le ratio source-puits en C local seraient potentiellement des indicateurs d'une meilleure réponse au eCO₂.

Il n'est évidemment pas possible de conclure sur ce point à ce stade, et cela nécessite d'être maintenant validé à plus grande échelle sur une diversité génétique plus large, mais aussi en situation réelle au champ en FACE par exemple, dans un objectif à plus long terme.

En contextualisant nos résultats aux éléments de bibliographie récente, les réponses différentielles sous eCO₂ que nous avons obtenues au niveau de la plasticité du riz présentent certains corollaires à des observations faites sur l'orge (Burnett *et al.*, 2016). Dans cette étude, une variété d'orge annuelle domestiquée a été comparée à une variété sauvage (pérenne). Cette dernière, bien qu'ayant un niveau de photosynthèse inférieur à l'espèce cultivée sous CO₂ ambiant (400 μmol mol⁻¹), a montré une meilleure réponse de la photosynthèse et de biomasse, mais aussi du tallage sous eCO₂. L'espèce sauvage a ici beaucoup mieux profité du CO₂, en raison d'une meilleure plasticité, en produisant des talles supplémentaires. Là aussi, ce caractère semble avoir été un élément important de la réponse positive enregistrée, notamment par le fait que celle-ci ait conféré à la plante une meilleure capacité de puits. A contrario, les variétés d'orge domestiquées sembleraient plus limitées, voire incapables d'atteindre le même niveau de plasticité dans des conditions favorables où la ressource est moins limitante. Ces plantes adopteraient une stratégie de croissance optimale sous les teneurs actuelles de CO₂, mais étant plus limitées en capacité de puits, accumuleraient davantage de carbohydrates, et pourraient ne pas répondre aussi positivement pour des teneurs augmentées.

Cette étude, tout comme une autre récente de (Preece *et al.*, 2018) suggère des **stratégies de croissance plus opportunistes chez certaines céréales, notamment chez les espèces sauvages, pour lesquelles l'utilisation de ressources supplémentaires (comme le CO₂) serait maximisée**. En pouvant émettre plus de talles et donc être davantage plastiques, elles seraient plus à même d'augmenter leurs capacités de puits, augmenter leur photosynthèse et *in fine* leur croissance comparée aux conditions de CO₂ actuelles.

En général, la domestication puis l'amélioration des principales céréales de type C₃ a conduit les sélectionneurs à produire des plantes avec moins de talles stériles (sans épillet), au fil des millénaires, sous des teneurs en CO₂ qui étaient alors relativement stables et basses (260-280 μmol mol⁻¹) par rapport aux valeurs actuelles. Les sélectionneurs ont donc façonné les plantes cultivées pour produire beaucoup de puits reproducteurs et être limitées en ressources carbonées. Cette justification était légitime, car un nombre de talles ne portant pas d'épillets est contre-productif, celles-ci réduisant en général le rendement en grain en détournant les ressources disponibles pour les talles fertiles. En somme, **il se pourrait que la plasticité développementale des céréales annuelles modernes ait été réduite au cours du temps** par la pression de sélection intense dont elles ont fait l'objet. Elles seraient donc beaucoup moins capables de s'adapter lorsque des conditions favorables le permettent (source non limitée par une projection de la disponibilité en carbone qui sera d'ici 2050 presque deux fois plus abondante que lors de la domestication). Plusieurs études sur le blé vont dans ce sens en comparant variétés modernes et ancestrales (Ziska *et al.*, 2004; Borrás *et al.*, 2004; Acreche and Slafer, 2009) où le tallage chez cette espèce a été considérablement réduit.

La plasticité phénotypique est un mécanisme fondamental par lequel les espèces réagissent à un environnement changeant, mais ce caractère est très variable suivant les espèces (Gunderson *et al.*, 2010; Liancourt *et al.*, 2015). Le riz fait un peu exception à ce constat ayant été moins contraint par la sélection à ce niveau-là : Les variétés modernes possèdent toujours un important nombre de talles non productives (Kumar *et al.*, 2016, 2017a), à l'inverse du blé par exemple, ce qui s'explique sans doute par son mode de culture ancestral, souvent par repiquage.

Il est difficile de formuler une théorie plus élaborée à ce niveau, et surtout il ne faut pas tomber dans le piège d'une généralisation. Même s'il **apparaît évident que la capacité de puits et la plasticité ont un rôle important à jouer pour la réponse au CO₂**, nous devons aussi nous poser la question de quel puits est finalement important : augmenter la taille des panicules (phase reproductive) ou leur nombre (phase végétative) et ce, au travers du tallage ou de la fréquence de fertilité des talles ?

Nous n'avançons pas l'idée de revenir à des variétés moins domestiquées ou sauvages, mais toutefois l'utilisation de ces génotypes (ou sous-espèces) peut s'avérer très informative pour comprendre les liens existants entre les sources de plasticité phénotypique agissant sur la croissance et la production ainsi que les déterminants génétiques sous-jacents. Cela pourrait permettre d'affiner la définition i) des proxies à mobiliser dans une optique de phénotypage de la diversité naturelle existante et ii) des idéotypes « physiologiques » à cibler pour les climats futurs. Un tel idéotype devrait pouvoir minimiser son niveau d'acclimatation au eCO₂, tout en maintenant un haut niveau de photosynthèse.

Ceci étant, aux vues des résultats du présent travail, une voie prometteuse me semble **d'adapter la force de puits constitutive de la plante, comme au travers d'un ratio source-puits local adéquat** en ciblant donc davantage la phase reproductive. Ce caractère à l'avantage d'être relativement facile à mesurer dans une optique de phénotypage. Si ces hypothèses sont exactes, il serait intéressant d'étudier aussi les réseaux de gènes et voies physiologiques impliqués dans le contrôle du nombre et de la taille des puits, à la fois pour la phase végétative et reproductive du développement de la plante.

Certains auteurs appellent aussi à une augmentation du ratio global « partie racinaire / partie aérienne » des plantes, communément appelé ratio « root / shoot » dans la littérature, pour améliorer l'adaptation au changement climatique (Korres *et al.*, 2016) et à son atténuation (séquestration de C) ou encore, en activant un puits supplémentaire, pour maintenir la productivité et la qualité des céréales dans un cadre de eCO₂ (Hasegawa *et al.*, 2019). La difficulté et le challenge résidera ici dans la mise en œuvre d'approches expérimentales permettant une caractérisation poussée de la partie racinaire (enracinement, architecture, composition histochimique) dans une optique de phénotypage notamment au champs (FACE), si possible au travers de proxies.

De façon plus ciblée, il me semble important aussi de considérer les récents leviers qu'offrent les avancées de la biologie moléculaire pour spécifiquement modifier la force de puits de la plante en utilisant les outils de transformation génétique, qui même si difficilement acceptables d'un point de vue sociétal, s'avère utile à des fins de recherches pour valider certaines théories et concevoir de nouveaux idéotypes. Par exemple, la voie du Tréhalose-6-Phosphate (T6P), signal de régulation de la concentration en saccharose dans les tissus de la plante, et indicateur de la disponibilité en carbone, semble une voie prometteuse d'amélioration des plantes dans le cadre d'une augmentation du CO₂ atmosphérique (Nuccio *et al.*, 2015, 2017; Griffiths *et al.*, 2016b; Oszvald *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2020). Ces études ont montré qu'il était possible en optimisant la voie du T6P de stimuler le nombre et la taille des grains chez le blé et le maïs, ce qui pouvait donc être une cible prometteuse pour la sélection si des polymorphismes naturels et fonctionnels des gènes respectifs pouvaient être identifiés.

Dans tous les cas, il est évident qu'une meilleure adaptation des plantes au eCO₂ doit impliquer de concevoir les futures recherches de façon concertée avec les programmes de sélection variétale et les agronomes modélisateurs définissant les conditions agricoles de demain. En effet, il ne faut pas oublier d'intégrer des composantes agronomiques comme l'interaction entre la réponse au CO₂ et l'azote et son efficacité d'utilisation ou d'absorption par la plante, aspect particulièrement important pour obtenir une réponse positive de la photosynthèse et du rendement dans ces nouvelles conditions (Sakai *et al.*, 2006, 2019; Wang *et al.*, 2015; Maphosa *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2020).

Ainsi, continuer à mener des expérimentations pertinentes en milieu contrôlé et sur le terrain pour étudier ces processus sur une gamme plus large de variétés modernes et d'espèces sauvages, facilitera demain la mise à disposition de variétés améliorées.

Un article d'opinion issu de ces réflexions a été publié en tant que co-auteur dans la revue « *Current Opinion in Plant Biology* » (Dingkuhn *et al.*, 2020), et en partie des résultats obtenus lors du chapitre 3. Celui-ci figure dans la partie annexe de ce mémoire.

4.3. Opportunités de futures recherches

4.3.1. Développer une approche holistique pour l'étude des relations sources-puits

À travers nos résultats, étayés par de récents travaux sur le riz (Ziska *et al.*, 2014; Kikuchi *et al.*, 2017; Sakai *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2019), tout porte à croire que les traits morphologiques affectant les relations sources-puits en C dans la plante ou sa plasticité, peuvent fortement participer à réguler la réponse génotypique notamment au eCO₂ en termes de

photosynthèse et production. Il me semble donc essentiel de poursuivre l'étude de l'adaptation des plantes au eCO₂ au travers d'approches intégratives et interdisciplinaires intégrant l'écophysiologie, la biochimie et la physiologie moléculaire de l'organe à la plante entière, de façon à relier l'activité du métabolisme carboné (synthèse et allocation/usage/remobilisation, voire expression de gènes) à l'activité du système plante au niveau des sources (activité photosynthétique) et des puits (apparition et dimensionnement des puits en C).

Ce type d'approche est encore peu courante, et doit être envisagée sur le long terme et de façon progressive, en impliquant une large part de recherche expérimentale. Une sélection efficace dans un contexte de eCO₂ pour améliorer le rendement des céréales de types C₃ comme le riz devrait passer par des recherches visant à :

- (i) Mieux définir un concept d'idéotype approprié et des traits physiologiques adaptatifs pour guider les sélectionneurs.
- (ii) Prendre en compte et incorporer dans les modèles du fonctionnement des plantes le concept des relations sources-puits et de l'acclimatation possible au eCO₂.
- (iii) Développer des outils appropriés et évolutifs pour le phénotypage des plantes en conditions de eCO₂, si possible adaptés à des stades précoces et pour le haut débit.

Certaines réflexions pour y parvenir ont été mentionnées dans l'article « *Current Opinion in Plant Biology* » figurant en annexe. En complément, nous développerons dans les chapitres suivants certaines pistes d'amélioration possible concernant notamment les points (ii) et (iii).

Récemment, à un niveau plus ambitieux, nos résultats ont appuyé la rédaction d'un projet européen (H2020) porté au sein de notre équipe, et impliquant un large consortium. Le projet OSCAR (Optimizing C Source-sink relations for Cereals' Adaptation to future agRo-climatic challenges) a pour vocation d'explorer les voies (physiologiques, moléculaires, mais aussi culturelles) d'amélioration potentielle de la performance agro-écologique (production et services écosystémiques, notamment enracinement et séquestration de C dans le sol) dans un contexte de changement climatique des céréales C₃ (riz, blé) et C₄ (maïs, sorgho), au travers de l'optimisation des relations sources- puits en C à différentes échelles biologiques (cellule, tissu, organe, plante et champ). Pour cela, le projet utilisera des environnements contrôlés et contrastés en CO₂ (phytotrons, système FACE), des plateformes de phénotypage des plantes (aérien et racinaire), et fera appel aux approches de métabolomique, transcriptomique, bioinformatique et de modélisation. Le projet n'a pas été accepté à sa première soumission, mais la réflexion menée pour son montage sera sans aucun doute recyclée dans un autre projet qui hébergera la suite de mes travaux de recherche.

4.3.2. Incorporer une rétroaction de l'équilibre source-puits en C dans les modèles

Bien que de nombreux efforts ont été faits pour explorer et améliorer la prise en compte des relations sources-puits en modélisation des plantes, les modèles peinent toujours à représenter d'un point de vue mécaniste ces processus (Wu *et al.*, 2016), et présentent de faibles capacités de prédiction de l'acclimatation de la photosynthèse dans des situations de eCO₂ (Asseng *et al.*, 2013; Fatichi *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2020).

Bon nombre de modèles de cultures ont une représentation 'carbone centrée', plaçant la ressource C en haut de la hiérarchie des contrôles de croissance de la plante, et utilisent une dérivation du modèle biochimique et mécaniste de photosynthèse de Farquhar (Farquhar *et al.*, 1980) simulant l'activité des sources. Très souvent, seules les limitations majeures classiquement manipulées comme V_{cmax} et J_{max} sont prises en compte, et rarement implémentées de la limitation par TPU (Rogers Alistair *et al.*, 2016; Lombardozzi *et al.*, 2018; Busch *et al.*, 2018).

Un de nos résultats majeurs a été de montrer que TPU pouvait exercer un rôle directement limitant sur la photosynthèse dans des conditions de déséquilibre source-puits, et surtout reflétait les variations de photosynthèse nette dans ce cadre. Cela justifie pleinement d'incorporer ce paramètre dans les modèles mécanistes de fonctionnement des plantes pour qu'ils puissent mieux prédire la capacité photosynthétique et ajuster les valeurs simulées de la photosynthèse nette, en fonction de l'équilibre source-puits de la plante. De plus, moyennant une modification préalable de l'équation générale décrivant TPU, cela donnera *de facto* une dimension moins carbone centré aux modèles, mais où la force de puits orienterait fortement la croissance. Dans cette optique, (Fatichi *et al.*, 2014) avait déjà appelé à utiliser et repenser les modèles terrestres de végétation pour qu'ils puissent mieux prendre en compte la limitation par les puits.

Dans ce cadre, il me semble donc essentiel de privilégier l'utilisation des modèles de croissance de plante dans lesquels l'équilibre source-puits constitue un régulateur du fonctionnement, de façon à ce qu'il soit possible de faire rétroagir cet équilibre (et la variable d'état le représentant) non seulement sur l'activité des puits (incluant le stockage de C), mais aussi des sources (régulation de la photosynthèse, remobilisation des réserves). Comme nous l'avons vu, les organes sources et puits de la plante interagissent étroitement avec de nombreux facteurs environnementaux, conduisant à une représentation non linéaire des réponses lorsqu'une des composantes est manipulée. Une approche de modélisation mécaniste de la croissance et du développement formalisé à l'échelle de l'organe serait sans doute un moyen de mieux prendre en compte ces interactions, incluant des modules spécifiques connectant le fonctionnement des sources, des puits et stockage transitoire, mais aussi intégrant la dynamique nutritionnelle contribuant à l'acclimatation comme l'azote (Yin *et al.*, 2019), ou des formalismes reliant photosynthèse et croissance en réponse à la sécheresse (Muller and Martre, 2019). Ce concept

de modélisation est ambitieux et constitue un enjeu, non seulement en termes de connaissances biologiques à différents niveaux d'organisation, mais aussi en termes d'acquisition de données requises pour sa paramétrisation (phénotypage) et formalismes informatiques. Il exige une part importante d'interdisciplinarité et s'envisage sur un effort de long terme et de façon itérative, mais commence à être plébiscité par la communauté scientifique (Zhu *et al.*, 2016a; Chang and Zhu, 2017).

Dans le cadre proche des travaux de modélisation menés au sein de notre équipe, il est prévu de faire évoluer le modèle *Ecomeristem* en y intégrant certains formalismes au niveau de la régulation photosynthétique. Ce modèle écophysio-écologique, simulant la régulation de la croissance et du développement de la plante en peuplement à l'échelle de l'organe sous l'effet de l'état carboné (et hydrique) journalier de la plante (rapport offre/demande en C : IC), est en effet particulièrement bien adapté pour s'adresser aux considérations faites à l'issue de mon travail de thèse. Celui-ci a par ailleurs l'avantage d'avoir été développé pour le riz (Luquet *et al.*, 2006, 2008, 2012) initialement pour s'intéresser à la phase végétative. L'adaptation récente du modèle au cycle entier a impliqué des modifications majeures de la gestion du C en interne à la plante, dans sa version adaptée au sorgho (Larue *et al.*, 2019). En effet, dès l'entrée en phase reproductive, les talles deviennent des entités plus autonomes (priorité d'allocation de la source en C issue de la talle aux organes de cette talle, et entre talles, selon une priorité aux talles fertiles hiérarchisées selon leur âge).

Le modèle vise à simuler la variabilité phénotypique au sein d'une espèce donnée en fonction du contrôle génotypique (G) et environnemental (E) des relations sources-puits en carbone. La morphogénèse de la plante est modélisée à l'échelle de l'organe élémentaire (feuille, entrenœud, panicule, grain) par une représentation simplifiée du fonctionnement du méristème apical et axillaire, sites de production et dimensionnement des phytomères et organes.

Ce modèle dit « puits centré » (Dingkuhn *et al.*, 2007), décrit donc la croissance des plantes au niveau des organes, permettant d'estimer précisément les composantes du ratio source-puits local en C que nous avons défini. Il est basé sur le calcul de la demande des puits de carbone, qui contrôlent donc le potentiel de croissance journalier ; l'offre en carbone de la plante est actuellement calculée par l'activité des sources estimée en fonction de l'équation de Beer-Lambert et Monteith au niveau du couvert végétal pour calculer le taux d'interception de la lumière et le taux de carbone assimilé.

Une prochaine étape sera donc d'apporter une amélioration par l'implémentation d'un calcul mécaniste de l'offre en carbone en intégrant le modèle de Farquhar, mais aussi en y apportant une modification au niveau de l'équation de la limitation par TPU.

Ce modèle intègre les trois processus principaux se produisant simultanément dans les feuilles : la photosynthèse, la photorespiration et la respiration mitochondriale. Le taux de photosynthèse nette (A) y est décrit par le minimum des trois limitations biochimiques (voir chapitre 1.4.2 en complément) en fonction de la teneur en CO_2 :

- . Limitation par la Rubisco (A_c)
- . Limitation par la régénération du RuBP provenant du flux linéaire d'électron (A_j)
- . Limitation par la régénération du RuBP relatif à l'utilisation des trioses-phosphates (A_p)

$$A = \min(A_c, A_j, A_p) - R_d$$

Avec :

$$A_c = \frac{(C_c - \Gamma_*)}{C_c + K_c \left(1 + \frac{O}{K_o}\right)} V_{cmax} - R_d$$

et

$$A_j = \frac{(C_c - \Gamma_*)J}{4C_c + 8\Gamma_*} - R_d$$

La limitation par TPU dans sa version la plus courante (Von Caemmerer, 2013) est représentée par :

$$A_p = 3 TPU - R_d$$

Où :

R_d est le taux de respiration mitochondriale diurne

Γ_* est le point de compensation au CO_2 en l'absence de respiration mitochondriale

C_c représente la pression partielle de CO_2 au niveau du site de carboxylation de la Rubisco

K_c et K_o sont les constantes de Michaelis-Menten de l'activité de la Rubisco pour le CO_2 et l' O_2 respectivement

Une alternative plus récente à cette équation (Busch and Sage, 2017) considère un paramètre (α) représentant la fraction des produits de la photorespiration (glycolate) qui retourne dans le chloroplaste ($0 < \alpha < 1$)

$$A_p = \frac{(C_c - \Gamma_*) 3TPU}{C_c - (1 + 3\alpha)\Gamma_*} - R_d$$

Dans tous les cas, étant donné que TPU et Γ_* sont des paramètres fixés pour les simulations, le niveau de photosynthèse calculée pour cette phase (A_p) lors de pressions partielles (C_c) élevées en CO₂ reste inchangé quelque soit le niveau de l'équilibre source-puits.

Une option serait d'introduire dans l'équation une fonction bi-linéaire du ratio source-puits (β) et de la concentration en CO₂, de la forme :

$$f(\beta, [CO_2]) = 1 + (a\beta + b) \left(\frac{[CO_2]}{400} - 1 \right)$$

La nouvelle équation serait ainsi :

$$A_p = \frac{(C_c - \Gamma_*) 3 f(\beta, [CO_2]) TPU}{C_c - (1 + 3\alpha)\Gamma_*} - R_d$$

La fonction $f(\beta, [CO_2])$ serait neutre pour une valeur constante de $[CO_2] = 400$, avec $f(\beta, [CO_2]) = 1$, ce qui ne modifierait donc pas l'équation A_p , sauf pour des valeurs de CO₂ plus élevées où l'équation A_p deviendrait aussi une fonction linéaire du ratio source-puit β estimé par le modèle *Ecomeristem*.

Cela permettrait d'infléchir sur le niveau de photosynthèse A_p lors des hautes concentrations en CO₂ en prenant en compte l'équilibre source-puits.

Nous avons estimé les paramètres de la fonction f à partir des données publiées dans (Fabre *et al.*, 2020), Table 1 (relatif aux résultats présentés dans le chapitre 3). Nous obtenons ainsi :

$$f(\beta) = 1 + (-2.06 \beta + 0.54) \left(\frac{[CO_2]}{400} - 1 \right) \text{ en prenant une valeur fixée de TPU} = 10.$$

Par un jeu d'analyses de sensibilités, il serait intéressant de voir comment l'incorporation de ce paramètre affecte les valeurs de sorties du modèle.

Dans un deuxième temps, il sera important de relier d'une manière encore à définir la variable d'état calculée par *Ecomeristem* comme indicateur d'état carboné de la plante (IC : rapport journalier entre offre et demande en C) au calcul du TPU de façon à simuler la rétroaction de l'état carboné de la plante sur la photosynthèse. Sur ce plan deux problèmes sont à appréhender : le facteur temporalité (l'IC étant calculé sur une base journalière alors que TPU, comme on l'a vu au chapitre 2 est régulé à des échelles horaires) et la spatialisation de l'information (plante entière ou talle pour le calcul de l'IC, niveau organe pour TPU) : on peut imaginer une rétroaction plus locale du rapport source-puits en C à un instant t sur TPU, par exemple sur une talle portant ou non une panicule. De fait les améliorations récentes du modèle ayant consisté à localiser (par talle) le calcul et les effets de l'IC sera un avantage. Il pourrait être intégré en

complément la notion de distance dans la gestion des sources-puits, pour aller progressivement vers une approche architecturale du modèle (ou 3D), qui considérerait un niveau local de cet équilibre sur la photosynthèse, qui comme nous l'avons vu à travers nos expérimentations semblait plus pertinent que l'utilisation d'un niveau global calculé à l'échelle plante entière. Le problème du changement d'échelle de temps (IC journalier vs. TPU régulé à pas de temps horaire) sera à considérer en premier lieu afin d'évaluer si le calcul d'un IC horaire est nécessaire ou non.

Plus généralement pour la modélisation, il est à mon avis important d'incorporer dès maintenant ces nouvelles relations et connaissances, et observer comment leurs inclusions modifient les valeurs de sorties des modèles au regard des conditions climatiques futures (eCO₂). Les résultats de ces expériences seront enrichissants dans la démarche de conception d'idéotypes variétaux, mais aussi pour évaluer les modèles eux-mêmes, en circonscrivant les domaines de validité et en identifiant les domaines qui méritent une attention particulière.

4.4. Perspective d'amélioration pour le phénotypage des plantes sous eCO₂

4.4.1. Quantifier rapidement les limitations biochimiques de la photosynthèse

Lors de nos expérimentations, en particulier celles décrites au chapitre 2, nous avons effectué de nombreuses courbes de réponse au CO₂ (A/C_i) (120 au total). Ces courbes de réponse sont considérées comme l'outil de référence par les physiologistes pour étudier les facteurs biochimiques limitant la photosynthèse (V_{cmax} , J_{max} et TPU). Elles sont d'une importance critique pour connaître l'adaptation des plantes aux changements climatiques vis-à-vis du CO₂ et de la température, ou paramétrer les modèles de photosynthèse (Kromdijk and Long, 2016). Chacune de nos courbes a intégré un nombre important de paliers de CO₂ afin d'obtenir le maximum de précision possible lors de l'estimation des paramètres par la méthode de « fitting » employée, et éviter ainsi tout risque de sur-paramétrisation. De ce fait, le temps de mesures de chaque plante était d'environ 2 heures pour laisser le temps d'une parfaite stabilisation du niveau de photosynthèse, et ainsi obtenir des données qualitatives.

Cependant, nous sommes maintenant à l'ère du haut débit, de la phénotypique, où de nouvelles approches de phénotypage rapide qui fournissent des données de qualité sur l'état physiologique des plantes sont une priorité. Les approches d'évaluation à « haut débit » de l'efficacité du système photosynthétique sont donc un élément essentiel pour assurer le succès et accroître l'efficacité des recherches en physiologie des plantes afin que les chercheurs ou sélectionneurs puissent réaliser des avancées rapides.

Comme mentionné dans la partie précédente, une approche intégrative me semble nécessaire pour améliorer les connaissances sur les relations sources-puits. La réalité est que cette approche nécessairement interdisciplinaire présente des disparités en termes de temps d'analyses des plantes : la biochimie ou la biologie moléculaire possèdent des méthodes d'analyses haut débit, contrairement à la physiologie fine constituant encore un goulot d'étranglement. Cela nécessite donc de nouvelles méthodes plus rapides, notamment pour l'évaluation des processus des limitations biochimiques de la photosynthèse.

À ce degré de précision, peu de moyens sont disponibles. Des méthodes indirectes basées sur la spectroscopie ont été évaluées (Serbin *et al.*, 2015; Barnes *et al.*, 2017; Silva-Perez *et al.*, 2018; Burnett *et al.*, 2019), mais se limitent principalement à l'estimation de la limitation $V_{c,max}$, sans pour atteindre un degré équivalent aux mesures classiques.

Récemment, une nouvelle génération d'appareil de mesures de photosynthèse (LI-COR 6800) a permis une analyse directe des limitations biochimiques de la feuille *via* l'établissement rapide de courbes de réponses au CO_2 (RACiR), en moins de 20 minutes seulement (**Image 4-2**). Cette méthode est basée sur l'injection continue et constante de CO_2 au niveau de la feuille permettant une fréquence de mesure conjointe élevée produisant un grand nombre de points. Après un traitement de corrections *post* analyse, les estimations dérivées semblent très proches des limitations estimées par les méthodes classiques de références (Stinziano *et al.*, 2017, 2019; Lawrence *et al.*, 2019).

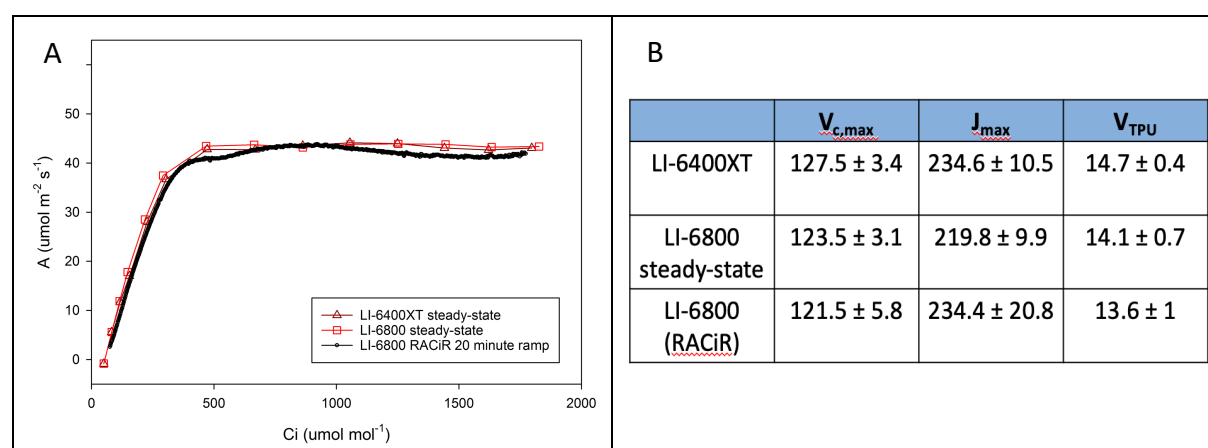


Image 4-2: Exemple d'une courbe de type RACiR

Panel A : Exemple d'une courbe de type RACiR (en noir) obtenue sur du tournesol (*Helianthus spp*) en comparaison aux méthodes classiques (en rouge)

Panel B : Les paramètres estimés des limitations biochimiques par la méthode RACiR (sur $n=5$ feuilles) sont comparés dans le tableau aux méthodes classiques (LI-6400XT et LI-6800 Steady State).

Poster LI-COR : Lynch D and Gordon E. (Ecological Society of America, 2017)

Notre laboratoire vient d'acquérir deux de ces nouveaux appareils. Pour la suite des études que nous allons mener, et en considérant certains biais possibles par l'utilisation de cette méthode

(Taylor and Long, 2019), je pense qu'il est important de considérer cette nouvelle voie d'analyse pour accéder aux caractéristiques biochimiques de la photosynthèse sous eCO₂.

La priorité de cette méthode n'est pas d'acquérir des valeurs très précises de ces paramètres, comme cela était nécessaire dans notre étude, mais de projeter l'analyse de la photosynthèse pour des évaluations de grands nombres. Cela servirait nos objectifs mentionnés au chapitre 4.3.1, pour vérifier sur un large panel de riz si une corrélation marquée peut-être généralisée entre des caractéristiques physiologiques foliaires (TPU, A_{\max} , A_{net} ...), et des caractéristiques morphologiques (ratio source-puits local en C), voire avec des données de rendement final. Ces données, confrontées aux données biochimiques ou moléculaires acquises conjointement fourniraient de l'information aux sélectionneurs pour appuyer le processus de définition d'idéotypes physiologiques et génétiques pour des situations adaptées à l'augmentation des teneurs en CO₂.

4.4.2. Utiliser la signature spectrale des feuilles pour estimer la capacité photosynthétique

Le chapitre 3 a montré qu'il était possible d'augmenter le rendement potentiel en grain chez le riz avec une augmentation du niveau de photosynthèse nette mais surtout de sa capacité photosynthétique (A_{\max}). Ce dernier paramètre semble un indicateur particulièrement pertinent à évaluer, car semble refléter la capacité du riz à produire davantage dans des conditions de eCO₂. Plusieurs études vont dans ce sens chez le riz et pour d'autres espèces cultivées dans les conditions ambiantes de CO₂ (Chen *et al.*, 2007; Driever *et al.*, 2014; Yamori *et al.*, 2016; Simkin *et al.*, 2019).

Estimer des variations de la capacité photosynthétique se fait traditionnellement *in vivo* comme nous l'avons fait par l'utilisation d'appareil de mesure de la photosynthèse. Cela rend la tâche laborieuse et coûteuse par le prix de l'appareillage, même si de nouvelles techniques méritent d'être désormais exploitées (RACiR) comme décrit au chapitre précédent, qui doivent être privilégiées pour l'analyse rapide des limitations biochimiques en serre ou milieu contrôlé.

Développer des méthodes indirectes qui permettraient d'évaluer des variations relatives du paramètre A_{\max} est naturellement d'un grand intérêt pour améliorer la sélection future, surtout en condition de plein champ. De nouvelles méthodes non destructives ont été récemment publiées, basées sur la réflectance de la feuille : **l'imagerie hyperspectrale, (Image 4-3)**, allant du visible dans le proche infrarouge à l'infrarouge intermédiaire (environ 350 à 2500 nm) peut donner des informations sur les teneurs en sucres foliaires chez les céréales (Yendrek *et al.*, 2017; Lowe *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2018; Meacham-Hensold *et al.*, 2019, 2020). Cet aspect est intéressant, car les sucres, notamment la teneur en saccharose foliaire chez le riz comme nous l'avons montré, est un élément de régulation de la capacité de TPU, qui détermine donc la capacité photosynthétique foliaire.

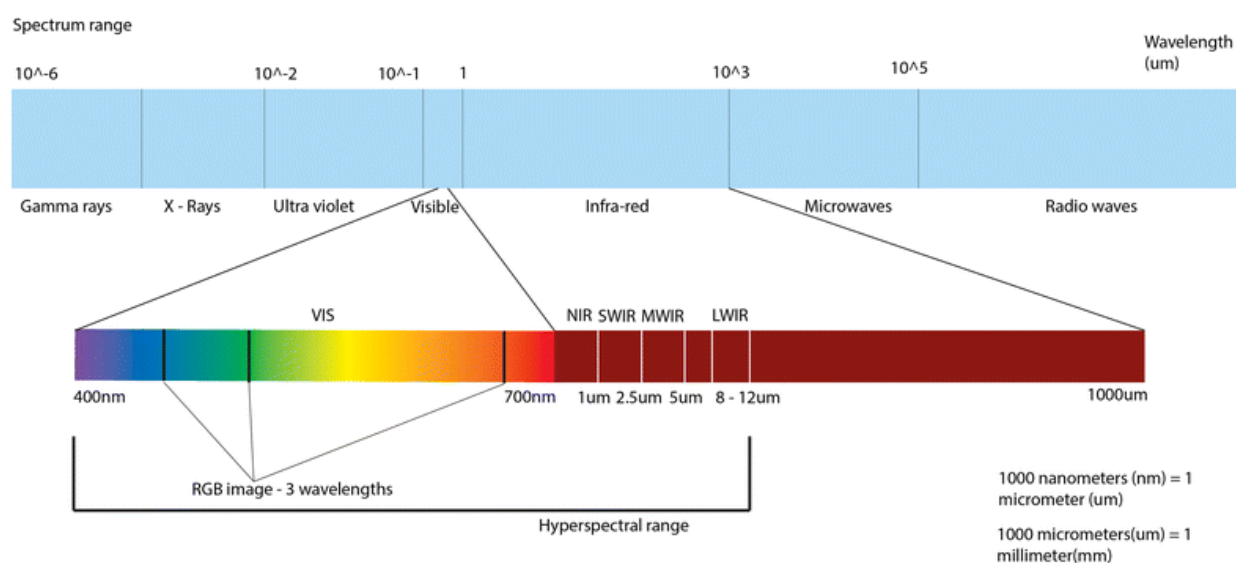


Image 4-3 : Description du spectre électromagnétique et ses longueurs d'onde. La barre inférieure affiche le domaine de l'hyperspectral.

La relation entre les spectres de réflectance obtenus et la composition chimique des feuilles se fait classiquement par l'utilisation de régression linéaire multiple (SMLR) ou par régressions partielles des moindres carrés (PLSR), qui sont des modèles possédant à la fois de puissantes capacités d'extractions et d'inférences de données. Pour faire face à l'hétérogénéité de performance de ces modèles, de nouvelles méthodes de prédictions (Golhani *et al.*, 2018) basées sur l'intelligence artificielle et les réseaux de neurones (ANN), permettent souvent d'acquérir de meilleure estimation, notamment au niveau des teneurs en sucres foliaires (Das *et al.*, 2018), mais aussi peut servir à la prédiction de la capacité photosynthétique (Heckmann *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2019, 2020).

La technologie de mesure hyperspectrale devient de plus en plus populaire en raison de la baisse des coûts de production de ces équipements, et a permis aux chercheurs d'avoir un meilleur accès à cette technologie et à des appareils de plus en plus portables (ex. ASD FieldSpec4). Une autre innovation pour ces spectromètres et qu'il est désormais possible d'y adjoindre des accessoires tels que les clips foliaires contenant une source de lumière interne fixe d'angle constant, réduisant les interférences de l'atmosphère.

Ces nouvelles méthodes innovantes en spectroscopie laissent présager de la contribution de la réflectance spectrale des feuilles à la panoplie des méthodes de phénotypage des plantes qui demeurent toujours un challenge et une barrière méthodologique. Avec une formation appropriée des modèles de prédiction pour l'apprentissage de corrélations entre traits biochimiques (sucres) et photosynthétiques (A_{max}), l'imagerie hyperspectrale foliaire pourrait fournir des informations liées à des variations de paramètres photosynthétiques. Cette voie de recherche émergente mérite de s'y intéresser fortement, car elle participerait aux efforts de sélection des plantes de demain, par un phénotypage rapide des plantes sous eCO_2 .

Conclusion :

Dans le champ thématique des recherches liées à la compréhension de la régulation de la photosynthèse par l'équilibre source-puits de la plante, ce travail de thèse a permis d'identifier et privilégier certaines explications, et d'autres ont été écartées. Nous avons pu mettre en évidence des preuves tangibles sur la possibilité d'augmenter le niveau de photosynthèse et du rendement du riz (et potentiellement des céréales de type C₃), en améliorant la capacité de puits de carbone. Contrairement à un récent article (Kumarathunge *et al.*, 2019), je pense que certains aspects liés notamment à la limitation de la photosynthèse par TPU sont à revisiter et doivent être justement considérés. Les nouvelles connaissances présentées ici alimentent le débat, et ouvrent de nouveaux défis et de nouvelles voies de recherches à plusieurs niveaux :

Au regard des processus photosynthétiques, le paramètre TPU s'avère jouer un rôle intégrateur pour expliquer les variations observées en fonction de l'équilibre source-puits de la plante. La modélisation des plantes doit se saisir de cette opportunité et intégrer ce résultat en incorporant ce paramètre dans les modèles de fonctionnement des plantes pour mieux prendre en compte l'impact du CO₂ et mieux considérer l'équilibre source-puits. Il existe donc un besoin pressant d'une nouvelle description mathématique et mécaniste de cette limitation dans les modèles de photosynthèse afin de concevoir de nouveaux idéotypes.

Imaginer les idéotypes de demain devra aussi tenir compte de la manière dont l'augmentation du CO₂ interagira avec des contraintes de sécheresse et d'augmentation de température, nécessitant par ailleurs des modèles prédictifs appropriés.

D'un point de vue agronomique, nos travaux ouvrent indirectement de nouvelles perspectives de sélection et proposent de nouveaux outils, avec notamment la mise en évidence d'un proxy, le ratio source-puits local en C, qui pourrait une fois validé à large échelle, permettre une sélection plus efficace de variétés de riz pour les climats futurs en eCO₂.

Enfin, la comparaison entre mon travail et les travaux les plus récents dans ce champ de recherche, questionnent également le rôle de la plasticité phénotypique dans la réponse de la productivité des cultures (notamment céréalières) au travers d'une meilleure capacité de puits, dans un contexte de changement climatique. Cela questionne sur l'effet de la domestication et de la pression de sélection, qui ont en partie limité au cours du temps la faculté de certaines variétés modernes à s'adapter à ces conditions changeantes et fluctuantes. Autant de questions qui restent à adresser à la suite de ce travail.

Bibliographie

- Abadie C, Bathellier C, Tcherkez G.** 2018. Carbon allocation to major metabolites in illuminated leaves is not just proportional to photosynthesis when gaseous conditions (CO₂ and O₂) vary. *New Phytologist* **218**, 94–106.
- Acreche MM, Slafer GA.** 2009. Grain weight, radiation interception and use efficiency as affected by sink-strength in Mediterranean wheats released from 1940 to 2005. *Field Crops Research* **110**, 98–105.
- Adachi M, Hasegawa T, Fukayama H, Tokida T, Sakai H, Matsunami T, Nakamura H, Sameshima R, Okada M.** 2014. Soil and Water Warming Accelerates Phenology and Down-Regulation of Leaf Photosynthesis of Rice Plants Grown Under Free-Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant and Cell Physiology* **55**, 370–380.
- Ainsworth EA.** 2008. Rice production in a changing climate: a meta-analysis of responses to elevated carbon dioxide and elevated ozone concentration. *Global Change Biology* **14**, 1642–1650.
- Ainsworth EA, Bush DR.** 2011. Carbohydrate Export from the Leaf: A Highly Regulated Process and Target to Enhance Photosynthesis and Productivity. *Plant Physiology* **155**, 64–69.
- Ainsworth EA, Long SP.** 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* **165**, 351–372.
- Ainsworth EA, Rogers A.** 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising CO₂: mechanisms and environmental interactions: Photosynthesis and stomatal conductance responses to rising CO₂. *Plant, Cell & Environment* **30**, 258–270.
- Allen LH, Kimball BA, Bunce JA, Yoshimoto M, Harazono Y, Baker JT, Boote KJ, White JW.** 2020. Fluctuations of CO₂ in Free-Air CO₂ Enrichment (FACE) depress plant photosynthesis, growth, and yield. *Agricultural and Forest Meteorology* **284**, 107899.
- Arnold A, Nikoloski Z.** 2011. A quantitative comparison of Calvin–Benson cycle models. *Trends in Plant Science* **16**, 676–683.
- Arp WJ.** 1991. Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant, Cell & Environment* **14**, 869–875.
- Asseng S, Ewert F, Rosenzweig C, et al.** 2013. Uncertainty in simulating wheat yields under climate change. *Nature Climate Change* **3**, 827–832.
- Asseng S, Kassie BT, Labra MH, Amador C, Calderini DF.** 2017. Simulating the impact of source-sink manipulations in wheat. *Field Crops Research* **202**, 47–56.
- Atwell BJ, Kriedemann PE, Turnbull CGN.** 1999. *Plants in Action: Adaptation in Nature, Performance in Cultivation*. Macmillan Education AU.

- Bäiram E, leMorvan C, Delaire M, Buck-Sorlin G.** 2019. Fruit and Leaf Response to Different Source–Sink Ratios in Apple, at the Scale of the Fruit-Bearing Branch. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Baker JT, Jr LHA.** 1993. Effects of CO₂ and Temperature on Rice. *Journal of agricultural meteorology* **48**, 575–582.
- Ball JT, Woodrow IE, Berry JA.** 1987. A Model Predicting Stomatal Conductance and its Contribution to the Control of Photosynthesis under Different Environmental Conditions. *Progress in Photosynthesis Research*. Springer, Dordrecht, 221–224.
- Balmford A, Green RhysE, Scharlemann JPW.** 2005. Sparing land for nature: exploring the potential impact of changes in agricultural yield on the area needed for crop production. *Global Change Biology* **11**, 1594–1605.
- Barnes ML, Breshears DD, Law DJ, Leeuwen WJD van, Monson RK, Fojtik AC, Barron-Gafford GA, Moore DJP.** 2017. Beyond greenness: Detecting temporal changes in photosynthetic capacity with hyperspectral reflectance data. *PLOS ONE* **12**, e0189539.
- Becklin KM, Walker SM, Way DA, Ward JK.** 2017. CO₂ studies remain key to understanding a future world. *New Phytologist* **214**, 34–40.
- Bernacchi CJ, Bagley JE, Serbin SP, Ruiz-Vera UM, Rosenthal DM, Vanlooche A.** 2013. Modelling C₃ photosynthesis from the chloroplast to the ecosystem. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1641–1657.
- Bernacchi CJ, Kimball BA, Quarles DR, Long SP, Ort DR.** 2007. Decreases in Stomatal Conductance of Soybean under Open-Air Elevation of [CO₂] Are Closely Coupled with Decreases in Ecosystem Evapotranspiration. *Plant Physiology* **143**, 134–144.
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W-R, Stitt M.** 2005. Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 3257–3281.
- Bloom AJ.** 2015. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 10–16.
- Borrás L, Slafer GA, Otegui ME.** 2004. Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research* **86**, 131–146.
- Bouman B a. M, Humphreys E, Tuong TP, Barker R.** 2006. Rice and water. *Adv. Agron.*
- Bouman BAM, Tuong TP.** 2001. Field water management to save water and increase its productivity in irrigated lowland rice. *Agricultural Water Management* **49**, 11–30.
- Burnett AC, Davidson KJ, Serbin SP, Rogers A.** 2019. The ‘one-point method’ for estimating maximum carboxylation capacity of photosynthesis: A cautionary tale. *Plant, Cell & Environment* **42**, 2472–2481.

Burnett AC, Rogers A, Rees M, Osborne CP. 2016. Carbon source-sink limitations differ between two species with contrasting growth strategies: Source-sink limitations vary with growth strategy. *Plant, Cell & Environment* **39**, 2460–2472.

Busch FA, Sage RF. 2017. The sensitivity of photosynthesis to O₂ and CO₂ concentration identifies strong Rubisco control above the thermal optimum. *New Phytologist* **213**, 1036–1051.

Busch FA, Sage TL, Cousins AB, Sage RF. 2013. C₃ plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO₂. *Plant, Cell & Environment* **36**, 200–212.

Busch FA, Sage RF, Farquhar GD. 2018. Plants increase CO₂ uptake by assimilating nitrogen via the photorespiratory pathway. *Nature Plants* **4**, 46–54.

von Caemmerer S. 2000. *Biochemical Models of Leaf Photosynthesis*.

von Caemmerer S, Evans JR. 2015. Temperature responses of mesophyll conductance differ greatly between species: Temperature responses of mesophyll conductance. *Plant, Cell & Environment* **38**, 629–637.

von Caemmerer S, Farquhar GD. 1984. Effects of partial defoliation, changes of irradiance during growth, short-term water stress and growth at enhanced p(CO₂) on the photosynthetic capacity of leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **160**, 320–329.

von Caemmerer S, Quick WP, Furbank RT. 2012. The Development of C₄ Rice: Current Progress and Future Challenges. *Science* **336**, 1671–1672.

Cai C, Yin X, He S, et al. 2016. Responses of wheat and rice to factorial combinations of ambient and elevated CO₂ and temperature in FACE experiments. *Global Change Biology* **22**, 856–874.

Carmo-Silva E, Scales JC, Madgwick PJ, Parry MAJ. 2015. Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency: Probing Rubisco for agricultural efficiency. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1817–1832.

Cen Y-P, Sage RF. 2005. The Regulation of Rubisco Activity in Response to Variation in Temperature and Atmospheric CO₂ Partial Pressure in Sweet Potato. *Plant Physiology* **139**, 979–990.

Chang T-G, Zhu X-G. 2017. Source–sink interaction: a century old concept under the light of modern molecular systems biology (C Raines, Ed.). *Journal of Experimental Botany* **68**, 4417–4431.

Chang T-G, Zhu X-G, Raines C. 2017. Source-sink interaction: a century old concept under the light of modern molecular systems biology. *Journal of Experimental Botany* **68**, 4417–4431.

Chen G-Y. 2005. Photosynthetic Acclimation in Rice Leaves to Free-air CO₂ Enrichment Related to Both Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylation Limitation and Ribulose-1,5-bisphosphate Regeneration Limitation. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1036–1045.

Chen H-J, Wang S-J. 2008. Molecular regulation of sink–source transition in rice leaf sheaths during the heading period. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**, 639–649.

- Chen Y, Yuan L-P, Wang X-H, Zhang D-Y, Chen J, Deng Q-Y, Zhao B-R, Xu D-Q.** 2007. Relationship between grain yield and leaf photosynthetic rate in super hybrid rice. *Journal of plant physiology and molecular biology* **33**, 235–243.
- Chiou TJ, Bush DR.** 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4784–4788.
- Cho D, Jong S, Son S, Park YK.** 1988. Studies on the duration and rate of grain filling in rice (*Oryza sativa* L.). II. Difference between the parts of a panicle. *Kor J Crop Sci*, 5–11.
- Cock JH, Yoshida S.** 1973. Changing sink and source relations in rice (*Oryza sativa* L.) using carbon dioxide enrichment in the field. *Soil Science and Plant Nutrition* **19**, 229–234.
- Collatz GJ, Ribas-Carbo M, Berry JA.** 1992. Coupled Photosynthesis-Stomatal Conductance Model for Leaves of C4 Plants. *Functional Plant Biology* **19**, 519–538.
- Dahal K, Martyn GD, Vanlerberghe GC.** 2015. Improved photosynthetic performance during severe drought in *Nicotiana tabacum* overexpressing a nonenergy conserving respiratory electron sink. *The New Phytologist* **208**, 382–395.
- Dahal K, Wang J, Martyn GD, Rahimy F, Vanlerberghe GC.** 2014a. Mitochondrial alternative oxidase maintains respiration and preserves photosynthetic capacity during moderate drought in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology* **166**, 1560–1574.
- Dahal K, Weraduwege SM, Kane K, et al.** 2014b. Enhancing biomass production and yield by maintaining enhanced capacity for CO₂ uptake in response to elevated CO₂. *Canadian Journal of Plant Science* **94**, 1075–1083.
- DaMatta FM, Cunha RL, Antunes WC, Martins SCV, Araujo WL, Fernie AR, Moraes GABK.** 2008. In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *The New Phytologist* **178**, 348–357.
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L.** 2010. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level: Models of stomatal conductance. *Plant, Cell & Environment* **33**, 1419–1438.
- Das B, Sahoo RN, Pargal S, Krishna G, Verma R, Chinnusamy V, Sehgal VK, Gupta VK, Dash SK, Swain P.** 2018. Quantitative monitoring of sucrose, reducing sugar and total sugar dynamics for phenotyping of water-deficit stress tolerance in rice through spectroscopy and chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **192**, 41–51.
- De Souza AP, Long SP.** 2018. Toward improving photosynthesis in cassava: Characterizing photosynthetic limitations in four current African cultivars. *Food and Energy Security* **7**, e00130.
- Diffenbaugh NS, Swain DL, Touma D.** 2015. Anthropogenic warming has increased drought risk in California. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 3931–3936.

- Dingkuhn M, Jones MP, Johnson DE, Sow A.** 1998. Growth and yield potential of *Oryza sativa* and *O. glaberrima* upland rice cultivars and their interspecific progenies. *Field Crops Research* **57**, 57–69.
- Dingkuhn M, Luquet D, Clément-Vidal A, Tambour L, Kim HK, Song YH.** 2007. Is plant growth driven by sink regulation? Implications for crop models, phenotyping approaches and ideotypes. *Frontis* **21**, 155–168.
- Dingkuhn M, Luquet D, Fabre D, Muller B, Yin X, Paul MJ.** 2020. The case for improving crop carbon sink strength or plasticity for a CO₂-rich future. *Current Opinion in Plant Biology* **56**, 259–272.
- Driever SM, Lawson T, Andralojc PJ, Raines CA, Parry M a. J.** 2014. Natural variation in photosynthetic capacity, growth, and yield in 64 field-grown wheat genotypes. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4959–4973.
- Elliott J, Müller C.** 2014. The AgMIP GRIDded Crop Modeling Initiative (AgGRID) and the Global Gridded Crop Model Intercomparison (GGCMI). ICP Series on Climate Change Impacts, Adaptation, and Mitigation. Handbook of Climate Change and Agroecosystems. IMPERIAL COLLEGE PRESS, 175–189.
- Ellsworth DS, Crous KY, Lambers H, Cooke J.** 2015. Phosphorus recycling in photorespiration maintains high photosynthetic capacity in woody species: Phosphorus recycling in photorespiration. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1142–1156.
- Escobar-Gutiérrez AJ, Gaudillère J-P.** 1997. Carbon partitioning in source leaves of peach, a sorbitol-synthesizing species, is modified by photosynthetic rate. *Physiologia Plantarum* **100**, 353–360.
- Evans JR.** 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* **78**, 9–19.
- Evans JR.** 2013. Improving Photosynthesis. *Plant Physiology* **162**, 1780–1793.
- Evers JB, Vos J, Fournier C, Andrieu B, Chelle M, Struik PC.** 2005. Towards a generic architectural model of tillering in Gramineae, as exemplified by spring wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* **166**, 801–812.
- Fabre D, Dingkuhn M, Yin X, Clément-Vidal A, Roques S, Soutiras A, Luquet D.** 2020. Genotypic variation in source and sink traits affects the response of photosynthesis and growth to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell & Environment* **43**, 579–593.
- Fabre D, Yin X, Dingkuhn M, Clément-Vidal A, Roques S, Rouan L, Soutiras A, Luquet D.** 2019. Is triose phosphate utilization involved in the feedback inhibition of photosynthesis in rice under conditions of sink limitation? *Journal of Experimental Botany* **70**, 5773–5785.
- Farquhar G v, von Caemmerer S von, Berry JA.** 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**, 78–90.
- Fatichi S, Leuzinger S, Körner C.** 2014. Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink-driven vegetation modeling. *New Phytologist* **201**, 1086–1095.

- Fatichi S, Pappas C, Zscheischler J, Leuzinger S.** 2019. Modelling carbon sources and sinks in terrestrial vegetation. *New Phytologist* **221**, 652–668.
- Figueiredo N, Carranca C, Trindade H, Pereira J, Goufo P, Coutinho J, Marques P, Maricato R, Varennes A de.** 2015. Elevated carbon dioxide and temperature effects on rice yield, leaf greenness, and phenological stages duration. *Paddy and Water Environment* **13**, 313–324.
- Fitzgerald GJ, Tausz M, O’Leary G, et al.** 2016. Elevated atmospheric [CO₂] can dramatically increase wheat yields in semi-arid environments and buffer against heat waves. *Global Change Biology* **22**, 2269–2284.
- Flexas J, Carriquí M, Coopman RE, Gago J, Galmés J, Martorell S, Morales F, Diaz-Espejo A.** 2014. Stomatal and mesophyll conductances to CO₂ in different plant groups: Underrated factors for predicting leaf photosynthesis responses to climate change? *Plant Science* **226**, 41–48.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H.** 2008. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell & Environment* **31**, 602–621.
- Flexas J, Scoffoni C, Gago J, Sack L.** 2013. Leaf mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance: an introduction to their measurement and coordination. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3965–3981.
- Flood PJ, Harbinson J, Aarts MGM.** 2011. Natural genetic variation in plant photosynthesis. *Trends in Plant Science* **16**, 327–335.
- Foley MM, Martone RG, Fox MD, Kappel CV, Mease LA, Erickson AL, Halpern BS, Selkoe KA, Taylor P, Scarborough C.** 2015. Using Ecological Thresholds to Inform Resource Management: Current Options and Future Possibilities. *Frontiers in Marine Science* **2**.
- Foyer CH, Ruban AV, Nixon PJ.** 2017. Photosynthesis solutions to enhance productivity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**, 20160374.
- Franck N, Vaast P, Génard M, Dautzat J.** 2006. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology* **26**, 517–525.
- Franks SJ, Weber JJ, Aitken SN.** 2014. Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications* **7**, 123–139.
- Fu P, Meacham-Hensold K, Guan K, Bernacchi CJ.** 2019. Hyperspectral Leaf Reflectance as Proxy for Photosynthetic Capacities: An Ensemble Approach Based on Multiple Machine Learning Algorithms. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Fu P, Meacham-Hensold K, Guan K, Wu J, Bernacchi C.** 2020. Estimating photosynthetic traits from reflectance spectra: A synthesis of spectral indices, numerical inversion, and partial least square regression. *Plant, Cell & Environment* **43**, 1241–1258.
- Furbank R, Parry MAJ.** 2013. Increasing photosynthetic capacity and efficiency of wheat. In: Reynolds M., In: Braun H, eds. *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT) Mexico*, 1–3.

- Gent MPN, Seginer I.** 2012. A carbohydrate supply and demand model of vegetative growth: response to temperature and light. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1274–1286.
- Gerardeaux E, Jordan-Meille L, Constantin J, Pellerin S, Dingkuhn M.** 2010. Changes in plant morphology and dry matter partitioning caused by potassium deficiency in *Gossypium hirsutum* (L.). *Environmental and Experimental Botany* **67**, 451–459.
- Gibon Y, Pyl E-T, Sulpice R, Lunn JE, Höhne M, Günther M, Stitt M.** 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell & Environment* **32**, 859–874.
- Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R, Stitt M.** 2006. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biology* **7**, R76.
- Gibson K, Park J-S, Nagai Y, et al.** 2011. Exploiting leaf starch synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields. *Plant Science* **181**, 275–281.
- Goldschmidt EE, Huber SC.** 1992. Regulation of Photosynthesis by End-Product Accumulation in Leaves of Plants Storing Starch, Sucrose, and Hexose Sugars. *Plant Physiology* **99**, 1443–1448.
- Golhani K, Balasundram SK, Vadamalai G, Pradhan B.** 2018. A review of neural networks in plant disease detection using hyperspectral data. *Information Processing in Agriculture* **5**, 354–371.
- Griffiths CA, Paul MJ, Foyer CH.** 2016a. Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1857**, 1715–1725.
- Griffiths CA, Sagar R, Geng Y, et al.** 2016b. Chemical intervention in plant sugar signalling increases yield and resilience. *Nature* **540**, 574–578.
- Gu J, Yin X, Stomph T-J, Wang H, Struik PC.** 2012. Physiological basis of genetic variation in leaf photosynthesis among rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines under drought and well-watered conditions. *Journal of experimental botany* **63**, 5137–5153.
- Gunderson CA, O'hara KH, Campion CM, Walker AV, Edwards NT.** 2010. Thermal plasticity of photosynthesis: the role of acclimation in forest responses to a warming climate. *Global Change Biology* **16**, 2272–2286.
- Harley PC, Loreto F, Di Marco G, Sharkey TD.** 1992. Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiology* **98**, 1429–1436.
- Harley PC, Sharkey TD.** 1991. An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: Reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research* **27**, 169–178.

Hasegawa T, Li T, Yin X, et al. 2017. Causes of variation among rice models in yield response to CO₂ examined with Free-Air CO₂ Enrichment and growth chamber experiments. *Scientific Reports* **7**, np.

Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, et al. 2013. Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂ enrichment (FACE) sites in Japan. *Functional Plant Biology* **40**, 148.

Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, et al. 2019. A High-Yielding Rice Cultivar “Takanari” Shows No N Constraints on CO₂ Fertilization. *Frontiers in Plant Science* **10**.

Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, Usui Y, Yoshimoto M, Fukuoka M, Nakamura H, Shimono H, Okada M. 2016a. Rice Free-Air Carbon Dioxide Enrichment Studies to Improve Assessment of Climate Change Effects on Rice Agriculture. *Advances in Agricultural Systems Modeling. Improving Modeling Tools to Assess Climate Change Effects on Crop Response*. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Inc., 45–68.

Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, Usui Y, Yoshimoto M, Fukuoka M, Nakamura H, Shimono H, Okada M. 2016b. Rice Free-Air Carbon Dioxide Enrichment Studies to Improve Assessment of Climate Change Effects on Rice Agriculture. *Improving Modeling Tools to Assess Climate Change Effects on Crop Response* **advancesinagric**, 45–68.

Heckmann D, Schlüter U, Weber APM. 2017. Machine Learning Techniques for Predicting Crop Photosynthetic Capacity from Leaf Reflectance Spectra. *Molecular Plant* **10**, 878–890.

Hermida-Carrera C, Kapralov MV, Galmés J. 2016. Rubisco Catalytic Properties and Temperature Response in Crops1. *Plant Physiology* **171**, 2549–2561.

Herold A. 1980. Regulation of Photosynthesis by Sink Activity—the Missing Link. *New Phytologist* **86**, 131–144.

Huber SC, Huber JL. 1992. Role of Sucrose-Phosphate Synthase in Sucrose Metabolism in Leaves. *Plant Physiology* **99**, 1275–1278.

Huber JL, Huber SC, Nielsen TH. 1989. Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **270**, 681–690.

Iglesias DJ, Lliso I, Tadeo FR, Talon M. 2002. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* **116**, 563–572.

IRRI - Rice Almanac, 4th edition. IRRI.

Ishihara K, Saitoh K. 1987. Diurnal Courses of Photosynthesis, Transpiration, and Diffusive Conductance in the Single-leaf of the Rice Plants Grown in the Paddy Field under Submerged Condition. *Japanese Journal of Crop Science* **56**, 8–17.

van Ittersum MK, Cassman KG, Grassini P, Wolf J, Titttonell P, Hochman Z. 2013. Yield gap analysis with local to global relevance—A review. *Field Crops Research* **143**, 4–17.

- Jagadish SVK, Bahuguna RN, Djanaguiraman M, Gamuyao R, Prasad PVV, Craufurd PQ.** 2016. Implications of High Temperature and Elevated CO₂ on Flowering Time in Plants. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Jin SH, Huang JQ, Li XQ, Zheng BS, Wu JS, Wang ZJ, Liu GH, Chen M.** 2011. Effects of potassium supply on limitations of photosynthesis by mesophyll diffusion conductance in *Carya cathayensis*. *Tree Physiology* **31**, 1142–1151.
- Jing L, Wu Y, Zhuang S, Wang Y, Zhu J, Wang Y, Yang L.** 2016. Effects of CO₂ enrichment and spikelet removal on rice quality under open-air field conditions. *Journal of Integrative Agriculture* **15**, 2012–2022.
- Jitla DS, Rogers GS, Seneweera SP, Basra AS, Oldfield RJ, Conroy JP.** 1997. Accelerated Early Growth of Rice at Elevated CO₂ (Is It Related to Developmental Changes in the Shoot Apex?). *Plant Physiology* **115**, 15.
- Jones JW, Antle JM, Basso B, et al.** 2017. Brief history of agricultural systems modeling. *Agricultural Systems* **155**, 240–254.
- June T.** 2005. The light gradients inside soybean leaves and their effect on the curvature factor of the light response curves of photosynthesis. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*.
- Kant S, Seneweera S, Rodin J, Materne M, Burch D, Rothstein SJ, Spangenberg G.** 2012. Improving yield potential in crops under elevated CO₂: Integrating the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies. *Frontiers in Plant Science* **3**, 162.
- Kasai M.** 2008. Regulation of leaf photosynthetic rate correlating with leaf carbohydrate status and activation state of Rubisco under a variety of photosynthetic source/sink balances. *Physiologia Plantarum* **134**, 216–226.
- Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar PA, Hungria M, Giller KE.** 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 1233–1244.
- Katul G, Manzoni S, Palmroth S, Oren R.** 2010. A stomatal optimization theory to describe the effects of atmospheric CO₂ on leaf photosynthesis and transpiration. *Annals of Botany* **105**, 431–442.
- Kiirats O, Cruz JA, Edwards GE, Kramer DM.** 2009. Feedback limitation of photosynthesis at high CO₂ acts by modulating the activity of the chloroplast ATP synthase. *Functional Plant Biology* **36**, 893–901.
- Kikuchi S, Bheemanahalli R, Jagadish KSV, Kumagai E, Masuya Y, Kuroda E, Raghavan C, Dingkuhn M, Abe A, Shimono H.** 2017. Genome-wide association mapping for phenotypic plasticity in rice. *Plant, Cell & Environment* **40**, 1565–1575.
- King RW, Wardlaw IF, Evans LT.** 1967. Effect of assimilate utilization on photosynthetic rate in wheat. *Planta* **77**, 261–276.

- Kirschbaum MUF, Lambie SM.** 2015. Re-analysis of plant CO₂ responses during the exponential growth phase: interactions with light, temperature, nutrients and water availability. *Functional Plant Biology* **42**, 989–1000.
- Ko J, Kim H-Y, Jeong S, An J-B, Choi G, Kang S, Tenhunen J.** 2014. Potential impacts on climate change on paddy rice yield in mountainous highland terrains. *Journal of Crop Science and Biotechnology* **17**, 117–126.
- Kobayashi K, Okada M, Kim HY, Lieffering M, Miura S, Hasegawa T.** 2006. Paddy Rice Responses to Free-Air [CO₂] Enrichment. In: Nösberger PDJ,, In: Long PDSP,, In: Norby PDRJ,, In: Stitt PDM,, In: Hendrey PDGR,, In: Blum DH, eds. *Ecological Studies. Managed Ecosystems and CO₂*. Springer Berlin Heidelberg, 87–104.
- Kölling K, Thalmann M, Müller A, Jenny C, Zeeman SC.** 2015. Carbon partitioning in *Arabidopsis thaliana* is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1965–1979.
- Körner C.** 2015. Paradigm shift in plant growth control. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 107–114.
- Korres NE, Norsworthy JK, Tehranchian P, et al.** 2016. Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **36**.
- Koyama K, Takemoto S.** 2014. Morning reduction of photosynthetic capacity before midday depression. *Scientific Reports* **4**.
- Kromdijk J, Long SP.** 2016. One crop breeding cycle from starvation? How engineering crop photosynthesis for rising CO₂ and temperature could be one important route to alleviation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**, 20152578.
- Kumagai E, Homma K, Kuroda E, Shimono H.** 2016. Finlay–Wilkinson’s regression coefficient as a pre-screening criterion for yield responsiveness to elevated atmospheric CO₂ concentration in crops. *Physiologia Plantarum* **158**, 312–317.
- Kumar U, Laza MaR, Soulié J-C, Pasco R, Mendez KVS, Dingkuhn M.** 2016. Compensatory phenotypic plasticity in irrigated rice: Sequential formation of yield components and simulation with SAMARA model. *Field Crops Research* **193**, 164–177.
- Kumar U, Laza MaR, Soulié J-C, Pasco R, Mendez KVS, Dingkuhn M.** 2017a. Analysis and simulation of phenotypic plasticity for traits contributing to yield potential in twelve rice genotypes. *Field Crops Research* **202**, 94–107.
- Kumar U, Quick WP, Barrios M, Sta Cruz PC, Dingkuhn M.** 2017b. Atmospheric CO₂ concentration effects on rice water use and biomass production. *PLoS ONE* **12**.
- Kumarathunge DP, Medlyn BE, Drake JE, Rogers A, Tjoelker MG.** 2019. No evidence for triose phosphate limitation of light-saturated leaf photosynthesis under current atmospheric CO₂ concentration. *Plant, Cell & Environment* **42**, 3241–3252.
- Kumari M, Asthir B.** 2016. Transformation of Sucrose to Starch and Protein in Rice Leaves and Grains under Two Establishment Methods. *Rice Science* **23**, 255–265.

- Larue F, Fumey D, Rouan L, Soulié J-C, Roques S, Beurier G, Luquet D.** 2019. Modelling tiller growth and mortality as a sink-driven process using Ecomeristem: implications for biomass sorghum ideotyping. *Annals of Botany* **124**, 675–690.
- Lawlor DW, Paul MJ.** 2014. Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Frontiers in Plant Science* **5**, 418.
- Lawrence EH, Stinziano JR, Hanson DT.** 2019. Using the rapid A-Ci response (RACiR) in the Li-Cor 6400 to measure developmental gradients of photosynthetic capacity in poplar. *Plant, Cell & Environment* **42**, 740–750.
- Lawson T, Kramer DM, Raines CA.** 2012. Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 215–220.
- Leakey ADB.** 2009. Rising atmospheric carbon dioxide concentration and the future of C4 crops for food and fuel. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**, 2333–2343.
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR.** 2009. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2859–2876.
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Zhu X, Long SP, Ort DR.** 2012. Photosynthesis in a CO₂-Rich Atmosphere. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Photosynthesis. Springer, Dordrecht, 733–768.
- Leegood RC, Edwards GE.** 1996. Carbon Metabolism and Photorespiration: Temperature Dependence in Relation to Other Environmental Factors. In: Baker NR, ed. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Photosynthesis and the Environment. Dordrecht: Springer Netherlands, 191–221.
- Leegood RC, Furbank RT.** 1986. Stimulation of photosynthesis by 2% oxygen at low temperatures is restored by phosphate. *Planta* **168**, 84–93.
- Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, et al.** 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**, 272.
- Li T, Hasegawa T, Yin X, et al.** 2015a. Uncertainties in predicting rice yield by current crop models under a wide range of climatic conditions. *Global Change Biology* **21**, 1328–1341.
- Li T, Heuvelink E, Marcelis LFM.** 2015b. Quantifying the source sink balance and carbohydrate content in three tomato cultivars. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- LI C, WEISS D, GOLDSCHMIDT EE.** 2003. Girdling Affects Carbohydrate-related Gene Expression in Leaves, Bark and Roots of Alternate-bearing Citrus Trees. *Annals of Botany* **92**, 137–143.
- Liancourt P, Boldgiv B, Song DS, Spence LA, Helliker BR, Petraitis PS, Casper BB.** 2015. Leaf-trait plasticity and species vulnerability to climate change in a Mongolian steppe. *Global Change Biology* **21**, 3489–3498.

- Liu H, Yang L, Wang Y, Huang J, Zhu J, Yunxia W, Dong G, Liu G.** 2008. Yield formation of CO₂-enriched hybrid rice cultivar Shanyou 63 under fully open-air field conditions. *Field Crops Research* **108**, 93–100.
- Lombardozi D, Smith NG, Cheng SJ, Bonan GB, Dukes JS, Fisher R, Sharkey TD, Rogers A.** 2017. The impact of including export limitation in photosynthetic models from leaf to global scales. *AGU Fall Meeting Abstracts* **21**.
- Lombardozi DL, Smith NG, Cheng SJ, Dukes JS, Sharkey TD, Alistair Rogers, Fisher R, Bonan GB.** 2018. Triose phosphate limitation in photosynthesis models reduces leaf photosynthesis and global terrestrial carbon storage. *Environmental Research Letters* **13**, 074025.
- Long SP, Ainsworth EA, Leakey AD, Nösberger J, Ort DR.** 2006. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science* **312**, 1918–1921.
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR.** 2004. RISING ATMOSPHERIC CARBON DIOXIDE: Plants FACE the Future. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 591–628.
- Long SP, Bernacchi CJ.** 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2393–2401.
- Long SP, Marshall-Colon A, Zhu X-G.** 2015. Meeting the Global Food Demand of the Future by Engineering Crop Photosynthesis and Yield Potential. *Cell* **161**, 56–66.
- Lowe A, Harrison N, French AP.** 2017. Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress. *Plant Methods* **13**, 80.
- Ludewig F, Sonnewald U.** 2016. Demand for food as driver for plant sink development. *Journal of Plant Physiology* **203**, 110–115.
- Luo W, Mayumi Y, Dai J, Zhu J, Han Y, Liu G.** 2002. [Effects of free-air CO₂ enrichment on rice canopy microclimate]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology* **13**, 1235–1239.
- Luquet D, Clément-Vidal A, Fabre D, This D, Sonderegger N, Dingkuhn M.** 2008. Orchestration of transpiration, growth and carbohydrate dynamics in rice during a dry-down cycle. *Functional Plant Biology* **35**, 689–704.
- Luquet D, Dingkuhn M, Kim HK, Tambour L, Clément-Vidal A.** 2006. EcoMeristem, a model of morphogenesis and competition among sinks in rice: 1. concept, validation and sensitivity analysis. *Functional Plant Biology* **33**, 309–323.
- Luquet D, Soulié JC, Rebolledo MC, Rouan L, Clément-Vidal A, Dingkuhn M.** 2012. Developmental Dynamics and Early Growth Vigour in Rice 2. Modelling Genetic Diversity Using Ecomeristem. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**, 385–398.
- Lv C, Huang Y, Sun W, Yu L, Zhu J.** 2020. Response of rice yield and yield components to elevated [CO₂]: A synthesis of updated data from FACE experiments. *European Journal of Agronomy* **112**, 125961.

- Mackill DJ, Ismail AM, Pamplona AM, Sanchez DL, Carandang JJ, Septiningsih EM.** 2010. Stress tolerant rice varieties for adaptation to a changing climate. *Crop, Environment and Bioinformatics* **7**, 250–259.
- MacNeill GJ, Mehrpouyan S, Minow MAA, Patterson JA, Tetlow IJ, Emes MJ.** 2017. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of Experimental Botany* **68**, 4433–4453.
- Makino A.** 2003. Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and plant growth. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**, 319–327.
- Makino A.** 2011. Photosynthesis, Grain Yield, and Nitrogen Utilization in Rice and Wheat. *Plant Physiology* **155**, 125–129.
- Makino A, Harada M, Sato T, Nakano H, Mae T.** 1997. Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiology* **115**, 199–203.
- Makino A, Mae T.** 1999. Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant and Cell Physiology* **40**, 999–1006.
- Makino A, Nakano H, Mae T, Shimada T, Yamamoto N.** 2000. Photosynthesis, plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased Rubisco under CO₂ enrichment. *Journal of Experimental Botany* **51**, 383–389.
- Maphosa L, Fitzgerald GJ, Panozzo J, Partington D, Walker C, Kant S.** 2019. Genotypic response of wheat under semi-arid conditions showed no specific responsive traits when grown under elevated CO₂. *Plant Production Science* **22**, 333–344.
- Marshall-Colon A, Long SP, Allen DK, et al.** 2017. Crops In Silico: Generating Virtual Crops Using an Integrative and Multi-scale Modeling Platform. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Matthews RB, Rivington M, Muhammed S, Newton AC, Hallett PD.** 2013. Adapting crops and cropping systems to future climates to ensure food security: The role of crop modelling. *Global Food Security* **2**, 24–28.
- McClain AM, Sharkey TD.** 2019. Triose phosphate utilization and beyond: from photosynthesis to end product synthesis. *Journal of Experimental Botany* **70**, 1755–1766.
- McCormick AJ, Cramer MD, Watt DA.** 2008. Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1817–1829.
- McCormick AJ, Watt DA, Cramer MD.** 2009. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* **60**, 357–364.
- McKinley BA, Casto AL, Rooney WL, Mullet JE.** 2018. Developmental dynamics of stem starch accumulation in *Sorghum bicolor*. *Plant Direct* **2**, e00074.
- McLeod AR, Long SP.** 1999. Free-air Carbon Dioxide Enrichment (FACE) in Global Change Research: A Review. *Advances in Ecological Research* **28**, 1–56.

- Meacham-Hensold K, Fu P, Wu J, et al.** 2020. Plot-level rapid screening for photosynthetic parameters using proximal hyperspectral imaging. *Journal of Experimental Botany* **71**, 2312–2328.
- Meacham-Hensold K, Montes CM, Wu J, et al.** 2019. High-throughput field phenotyping using hyperspectral reflectance and partial least squares regression (PLSR) reveals genetic modifications to photosynthetic capacity. *Remote Sensing of Environment* **231**, 111176.
- Medlyn BE, Zaehle S, De Kauwe MG, et al.** 2015. Using ecosystem experiments to improve vegetation models. *Nature Climate Change* **5**, 528–534.
- Mengin V, Pyl E-T, Alexandre Moraes T, Sulpice R, Krohn N, Encke B, Stitt M.** 2017. Photosynthate partitioning to starch in *Arabidopsis thaliana* is insensitive to light intensity but sensitive to photoperiod due to a restriction on growth in the light in short photoperiods. *Plant, Cell & Environment* **40**, 2608–2627.
- Mohanty S, Wassmann R, Nelson A, Moya P, Jagadish SVK.** 2013. Rice and climate change: significance for food security and vulnerability. International Rice Research Institute.
- Moore BD, Cheng S-H, Rice J, Seemann JR.** 1998. Sucrose cycling, Rubisco expression, and prediction of photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell & Environment* **21**, 905–915.
- Moore BD, Cheng S-H, Sims D, Seemann JR.** 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell & Environment* **22**, 567–582.
- Moradi F, Ismail AM.** 2007. Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. *Annals of Botany* **99**, 1161–1173.
- Morey SR, Hirose T, Hashida Y, Miyao A, Hirochika H, Ohsugi R, Yamagishi J, Aoki N.** 2018. Genetic Evidence for the Role of a Rice Vacuolar Invertase as a Molecular Sink Strength Determinant. *Rice* **11**, 6.
- Morita R, Inoue K, Ikeda K, Hatanaka T, Misoo S, Fukayama H.** 2016. Starch Content in Leaf Sheath Controlled by CO₂-Responsive CCT Protein is a Potential Determinant of Photosynthetic Capacity in Rice. *Plant and Cell Physiology* **57**, 2334–2341.
- Mott KA, Jensen RG, O’Leary JW, Berry JA.** 1984. Photosynthesis and Ribulose 1,5-Bisphosphate Concentrations in Intact Leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* **76**, 968–971.
- Motta S, Pappalardo F.** 2013. Mathematical modeling of biological systems. *Briefings in Bioinformatics* **14**, 411–422.
- Muller B, Martre P.** 2019. Plant and crop simulation models: powerful tools to link physiology, genetics, and phenomics. *Journal of Experimental Botany* **70**, 2339–2344.
- Murchie EH, Pinto M, Horton P.** 2009. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytologist* **181**, 532–552.

- Myers SS, Zanobetti A, Kloog I, et al.** 2014. Increasing CO₂ threatens human nutrition. *Nature* **510**, 139–142.
- Nakano H, Makino A, Mae T.** 1995. Effects of panicle removal on the photosynthetic characteristics of the flag leaf of rice plants during the ripening stage. *Plant and cell physiology* **36**, 653–659.
- Nakano H, Makino A, Mae T.** 1997. The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant physiology* **115**, 191–198.
- Nakano H, Yoshinaga S, Takai T, et al.** 2017. Quantitative trait loci for large sink capacity enhance rice grain yield under free-air CO₂ enrichment conditions. *Scientific Reports* **7**, 1827.
- Nebauer SG, Renau-Morata B, Guardiola JL, Molina R-V.** 2011. Photosynthesis down-regulation precedes carbohydrate accumulation under sink limitation in Citrus. *Tree Physiology* **31**, 169–177.
- Nelson GCR.** 2009. Climate change: Impact on agriculture and costs of adaptation.
- Norby RJ, Warren JM, Iversen CM, Medlyn BE, McMurtrie RE.** 2010. CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 19368–19373.
- Nuccio ML, Potter L, Stieglmeyer SM, et al.** 2017. Strategies and tools to improve crop productivity by targeting photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**.
- Nuccio ML, Wu J, Mowers R, et al.** 2015. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. *Nature Biotechnology* **33**, 862–869.
- Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ.** 2013. Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**, 89–98.
- Ort DR, Merchant SS, Alric J, et al.** 2015. Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 8529–8536.
- Osorio S, Ruan Y-L, Fernie AR.** 2014. An update on source-to-sink carbon partitioning in tomato. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Oszvald M, Primavesi LF, Griffiths CA, Cohn J, Basu SS, Nuccio ML, Paul MJ.** 2018. Trehalose 6-Phosphate Regulates Photosynthesis and Assimilate Partitioning in Reproductive Tissue. *Plant Physiology* **176**, 2623–2638.
- Palenchar PM, Kouranov A, Lejay LV, Coruzzi GM.** 2004. Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biology* **5**, R91.

- Pammenter NW, Loreto F, Sharkey TD.** 1993. End product feedback effects on photosynthetic electron transport. *Photosynthesis Research* **35**, 5–14.
- Pandey S, Bhandari H, Hardy B.** 2007. *Economic costs of drought and rice farmers' coping mechanisms*. Makati City: International rice research institute (IRRI).
- Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M.** 2017. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias A, Fischer G.** 2001. Millions at risk: Defining critical climate change threats and targets. *Global Environmental Change* **11**, 181–183.
- Parvin S, Uddin S, Tausz-Posch S, Armstrong R, Tausz M.** 2020. Carbon sink strength of nodules but not other organs modulates photosynthesis of faba bean (*Vicia faba*) grown under elevated [CO₂] and different water supply. *New Phytologist* **227**, 132–145.
- Patrick JW, Colyvas K.** 2014. Crop yield components – photoassimilate supply- or utilisation limited-organ development? *Functional Plant Biology* **41**, 893–913.
- Paul MJ, Foyer CH.** 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1383–1400.
- Paul MJ, Pellny TK.** 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**, 539–547.
- Paul MJ, Watson A, Griffiths CA.** 2020. Linking fundamental science to crop improvement through understanding source and sink traits and their integration for yield enhancement (T Lawson, Ed.). *Journal of Experimental Botany* **71**, 2270–2280.
- Pérez-Harguindeguy N, Díaz S, Garnier E, et al.** 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **61**, 167.
- Peterhansel C, Offermann S.** 2012. Re-engineering of carbon fixation in plants – challenges for plant biotechnology to improve yields in a high-CO₂ world. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 204–208.
- Piepho HP, Buchse A, Emrich K.** 2003. A Hitchhiker's Guide to Mixed Models for Randomized Experiments. *Journal of Agronomy and Crop Science* **189**, 310–322.
- Pokhilko A, Ebenhoh O.** 2015. Mathematical modelling of diurnal regulation of carbohydrate allocation by osmo-related processes in plants. *Journal of The Royal Society Interface* **12**, 20141357–20141357.
- Pomeranz Y, Meloan CE.** 1994. Enzymatic Methods. In: Pomeranz Y,, In: Meloan CE, eds. *Food Analysis: Theory and Practice*. Boston, MA: Springer US, 506–531.
- Pons TL, Flexas J, von Caemmerer S, Evans JR, Genty B, Ribas-Carbo M, Brugnoli E.** 2009. Estimating mesophyll conductance to CO₂: methodology, potential errors, and recommendations. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2217–2234.

- Poorter H, Anten NPR, Marcelis LFM.** 2013. Physiological mechanisms in plant growth models: do we need a supra-cellular systems biology approach?: Physiological mechanisms in plant growth models. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1673–1690.
- Poorter H, Bühler J, van Dusschoten D, Climent J, Postma JA.** 2012. Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Functional Plant Biology* **39**, 839.
- Porter J, Xie L, Challinor AJ, Cochrane K, Howden S, Iqbal M, Lobell D, Travasso M.** 2014. *Food security and food production systems*.
- Preece C, Clamp NF, Warham G, Charles M, Rees M, Jones G, Osborne CP.** 2018. Cereal progenitors differ in stand harvest characteristics from related wild grasses. *Journal of Ecology* **106**, 1286–1297.
- van der Putten PEL, Yin X, Struik PC.** 2018. Calibration matters: On the procedure of using the chlorophyll fluorescence method to estimate mesophyll conductance. *Journal of Plant Physiology* **220**, 167–172.
- Rahman MS, Tareq TM, Sarker PK, Rashid ESMH, Yasmeeen R, Ali MA, Seraj ZI, Shimono H.** 2019. Genetic variation of phenotypic plasticity in Bangladesh rice germplasm. *Field Crops Research* **243**, 107618.
- Raines CA.** 2011. Increasing Photosynthetic Carbon Assimilation in C3 Plants to Improve Crop Yield: Current and Future Strategies. *Plant Physiology* **155**, 36–42.
- Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA.** 2013. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLOS ONE* **8**, e66428.
- Rebolledo MC, Peña AL, Duitama J, Cruz DF, Dingkuhn M, Grenier C, Tohme J.** 2016. Combining Image Analysis, Genome Wide Association Studies and Different Field Trials to Reveal Stable Genetic Regions Related to Panicle Architecture and the Number of Spikelets per Panicle in Rice. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1384.
- Regmi KC, Zhang S, Gaxiola RA.** 2016. Apoplasmic loading in the rice phloem supported by the presence of sucrose synthase and plasma membrane-localized proton pyrophosphatase. *Annals of Botany* **117**, 257–268.
- Reich PB, Hobbie SE, Lee T, Ellsworth DS, West JB, Tilman D, Knops JMH, Naeem S, Trost J.** 2006. Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature* **440**, 922–925.
- Reynolds MP, Delgado B. MI, Gutiérrez Rodríguez M, Larque Saavedra A.** 2000. Photosynthesis of wheat in a warm, irrigated environment I: Genetic diversity and crop productivity. *Field Crops Research* **66**, 37–50.
- Reynolds MP, Pask AJD, Hoppitt WJE, et al.** 2017. Strategic crossing of biomass and harvest index—source and sink—achieves genetic gains in wheat. *Euphytica* **213**, 257.
- Roche D.** 2015. Stomatal Conductance Is Essential for Higher Yield Potential of C3 Crops. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 429–453.

- Rogers Alistair, Medlyn Belinda E., Dukes Jeffrey S., et al.** 2016. A roadmap for improving the representation of photosynthesis in Earth system models. *New Phytologist* **213**, 22–42.
- Rosenzweig C, Elliott J, Deryng D, et al.** 2014. Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 3268–3273.
- Roy KS, Bhattacharyya P, Neogi S, Rao KS, Adhya TK.** 2012. Combined effect of elevated CO₂ and temperature on dry matter production, net assimilation rate, C and N allocations in tropical rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research* **139**, 71–79.
- Ruiz-Vera UM, De Souza AP, Long SP, Ort DR.** 2017. The Role of Sink Strength and Nitrogen Availability in the Down-Regulation of Photosynthetic Capacity in Field-Grown *Nicotiana tabacum* L. at Elevated CO₂ Concentration. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Ruiz-Vera UM, Siebers MH, Drag DW, Ort DR, Bernacchi CJ.** 2015. Canopy warming caused photosynthetic acclimation and reduced seed yield in maize grown at ambient and elevated [CO₂]. *Global Change Biology* **21**, 4237–4249.
- Sage RF.** 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynthesis Research* **39**, 351–368.
- Sage RF, Kubien DS.** 2007. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1086–1106.
- Sage RF, Sharkey TD.** 1987. The Effect of Temperature on the Occurrence of O₂ and CO₂ Insensitive Photosynthesis in Field Grown Plants. *Plant Physiology* **84**, 658–664.
- Sage RF, Sharkey TD, Seemann JR.** 1989. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C₃ species. *Plant Physiology* **89**, 590–596.
- Sakai H, Hasegawa T, Kobayashi K.** 2006. Enhancement of rice canopy carbon gain by elevated CO₂ is sensitive to growth stage and leaf nitrogen concentration. *New Phytologist* **170**, 321–332.
- Sakai H, Tokida T, Usui Y, Nakamura H, Hasegawa T.** 2019. Yield responses to elevated CO₂ concentration among Japanese rice cultivars released since 1882. *Plant Production Science* **22**, 352–366.
- Seneweera SP, Conroy JP, Ishimaru K, Ghannoum O, Okada M, Lieffering M, Kim HY, Kobayashi K.** 2002. Changes in source-sink relations during development influence photosynthetic acclimation of rice to free air CO₂ enrichment (FACE). *Functional plant biology* **29**, 945–953.
- Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y.** 2011. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environmental and Experimental Botany* **71**, 128–136.
- Seneweera S, Makino A, Mae T, Basra AS.** 2005. Response of Rice CO₂ Enrichment: The Relationship Between Photosynthesis and Nitrogen Metabolism. *Journal of Crop Improvement* **13**, 31–53.

- Serbin SP, Singh A, Desai AR, Dubois SG, Jablonski AD, Kingdon CC, Kruger EL, Townsend PA.** 2015. Remotely estimating photosynthetic capacity, and its response to temperature, in vegetation canopies using imaging spectroscopy. *Remote Sensing of Environment* **167**, 78–87.
- Sharkey TD.** 1985. Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: Physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* **51**, 53–105.
- Sharkey TD.** 2012. Mesophyll conductance: constraint on carbon acquisition by C3 plants. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1881–1883.
- Sharkey TD.** 2015. Understanding carbon partitioning and its role in determining plant growth: Understanding carbon partitioning. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1963–1964.
- Sharkey TD.** 2016. What gas exchange data can tell us about photosynthesis: Gas exchange data and photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **39**, 1161–1163.
- Sharkey TD.** 2017. A dichotomy resolved: Plant growth can control the rate of starch accumulation. *Plant, Cell & Environment* **40**, 2606–2607.
- Sharkey TD.** 2019. Is triose phosphate utilization important for understanding photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* **70**, 5521–5525.
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL.** 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1035–1040.
- Sharkey TD, Berry JA, Sage RF.** 1988. Regulation of photosynthetic electron-transport in *Phaseolus vulgaris* L., as determined by room-temperature chlorophyll a fluorescence. *Planta* **176**, 415–424.
- Sharkey TD, Stitt M, Heineke D, Gerhardt R, Raschke K, Heldt HW.** 1986*a*. Limitation of Photosynthesis by Carbon Metabolism : II. *Plant Physiology* **81**, 1123–1129.
- Sharkey TD, Stitt M, Heineke D, Gerhardt R, Raschke K, Heldt HW.** 1986*b*. Limitation of Photosynthesis by Carbon Metabolism 1. *Plant Physiology* **81**, 1123–1129.
- Sharkey TD, Vanderveer PJ.** 1989. Stromal phosphate concentration is low during feedback limited photosynthesis. *Plant Physiology* **91**, 679–684.
- Shimoda S.** 2012. Contribution of leaf nitrogen to photosynthetic gas exchange in contrasting rice (*Oryza sativa* L.) cultivars during the grain-filling period. *Photosynthetica* **50**, 387–394.
- Shimoda S, Maruyama A.** 2014. Rice varietal differences in responses of stomatal gas exchange to supplemental nitrogen application. *Photosynthetica* **52**, 397–403.
- Shimono H, Farquhar G, Brookhouse M, Busch FA, O’Grady A, Tausz M, Pinkard EA.** 2019. Prescreening in large populations as a tool for identifying elevated CO₂-responsive genotypes in plants. *Functional Plant Biology* **46**, 1–14.
- Shimono H, Okada M, Yamakawa Y, Nakamura H, Kobayashi K, Hasegawa T.** 2008. Rice yield enhancement by elevated CO₂ is reduced in cool weather. *Global Change Biology* **14**, 276–284.

- Shimono H, Okada M, Yamakawa Y, Nakamura H, Kobayashi K, Hasegawa T.** 2009. Genotypic variation in rice yield enhancement by elevated CO₂ relates to growth before heading, and not to maturity group. *Journal of Experimental Botany* **60**, 523–532.
- Shimono H, Suzuki K, Aoki K, Hasegawa T, Okada M.** 2010. Effect of panicle removal on photosynthetic acclimation under elevated CO₂ in rice. *Photosynthetica* **48**, 530–536.
- Shinano T, Osawa M, Soejima H, Osaki M.** 2006. Effect of panicle removal on cytokinin level in the xylem and nitrogen uptake activity of rice. *Soil Science & Plant Nutrition* **52**, 331–340.
- Silva-Perez V, Molero G, Serbin SP, Condon AG, Reynolds MP, Furbank RT, Evans JR.** 2018. Hyperspectral reflectance as a tool to measure biochemical and physiological traits in wheat. *Journal of Experimental Botany* **69**, 483–496.
- Simkin AJ, López-Calcagno PE, Raines CA.** 2019. Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *Journal of Experimental Botany* **70**, 1119–1140.
- Simkin AJ, McAusland L, Headland LR, Lawson T, Raines CA.** 2015. Multigene manipulation of photosynthetic carbon assimilation increases CO₂ fixation and biomass yield in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4075–4090.
- Singh R, Singh Y, Xalaxo S, et al.** 2016. From QTL to variety-harnessing the benefits of QTLs for drought, flood and salt tolerance in mega rice varieties of India through a multi-institutional network. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **242**, 278–287.
- Singsaas EL, Ort DR, Delucia EH.** 2004. Elevated CO₂ effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment* **27**, 41–50.
- Smith MR, Rao IM, Merchant A.** 2018. Source-Sink Relationships in Crop Plants and Their Influence on Yield Development and Nutritional Quality. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Smith AM, Stitt M.** 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1126–1149.
- Sonnewald U, Fernie AR.** 2018. Next-generation strategies for understanding and influencing source-sink relations in crop plants. *Current opinion in plant biology* **43**, 63–70.
- Soussana JF, Graux AI, Tubiello FN.** 2010. Improving the use of modelling for projections of climate change impacts on crops and pastures. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2217–2228.
- Stinziano JR, McDermitt DK, Lynch DJ, Saathoff AJ, Morgan PB, Hanson DT.** 2019. The rapid A/Ci response: a guide to best practices. *New Phytologist* **221**, 625–627.
- Stinziano JR, Morgan PB, Lynch DJ, Saathoff AJ, McDermitt DK, Hanson DT.** 2017. The rapid A–Ci response: photosynthesis in the phenomic era. *Plant, Cell & Environment*, n/a-n/a.
- Stitt M, Zeeman SC.** 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 282–292.

- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG.** 1999. Two SNF1-Related Protein Kinases from Spinach Leaf Phosphorylate and Inactivate 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase, Nitrate Reductase, and Sucrose Phosphate Synthase in Vitro. *Plant Physiology* **120**, 257–274.
- Sulpice R, Flis A, Ivakov AA, Apelt F, Krohn N, Encke B, Abel C, Feil R, Lunn JE, Stitt M.** 2014. Arabidopsis Coordinates the Diurnal Regulation of Carbon Allocation and Growth across a Wide Range of Photoperiods. *Molecular Plant* **7**, 137–155.
- Sun Y, Gu L, Dickinson RE, et al.** 2014. Asymmetrical effects of mesophyll conductance on fundamental photosynthetic parameters and their relationships estimated from leaf gas exchange measurements: Asymmetrical mesophyll conductance effects. *Plant, Cell & Environment* **37**, 978–994.
- Sweetlove LJ, Nielsen J, Fernie AR.** 2017. Engineering central metabolism - a grand challenge for plant biologists. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **90**, 749–763.
- Tang L, Gao H, Yoshihiro H, Koki H, Tetsuya N, Liu T, Tatsuhiko S, Xu Z.** 2017. Erect panicle super rice varieties enhance yield by harvest index advantages in high nitrogen and density conditions. *Journal of Integrative Agriculture* **16**, 1467–1473.
- Tao F, Palosuo T, Rötter RP, et al.** 2020. Why do crop models diverge substantially in climate impact projections? A comprehensive analysis based on eight barley crop models. *Agricultural and Forest Meteorology* **281**, 107851.
- Taub DR, Wang X.** 2008. Why are nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO₂? A critical examination of the hypotheses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1365–1374.
- Taylor SH, Long SP.** 2019. Phenotyping photosynthesis on the limit – a critical examination of RACiR. *New Phytologist* **221**, 621–624.
- Tazoe Y, von Caemmerer S, Badger MR, Evans JR.** 2009. Light and CO₂ do not affect the mesophyll conductance to CO₂ diffusion in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2291–2301.
- The State of Food Insecurity in the World 2015.** Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Thompson M, Gamage D, Hirotsu N, Martin A, Seneweera S.** 2017. Effects of Elevated Carbon Dioxide on Photosynthesis and Carbon Partitioning: A Perspective on Root Sugar Sensing and Hormonal Crosstalk. *Frontiers in Physiology* **8**.
- Turgeon R.** 1989. The Sink-Source Transition in Leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 119–138.
- Urban L.** 2004. Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2075–2085.
- Vanuytrecht E, Raes D, Willems P.** 2011. Considering sink strength to model crop production under elevated atmospheric CO₂. *Agricultural and Forest Meteorology* **151**, 1753–1762.

- Velez-Ramirez AI, Ieperen W van, Vreugdenhil D, Poppel PMJA van, Heuvelink E, Millenaar FF.** 2014. A single locus confers tolerance to continuous light and allows substantial yield increase in tomato. *Nature Communications* **5**, 4549.
- Von Caemmerer S.** 2013. Steady-state models of photosynthesis: Steady-state models of photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1617–1630.
- Wallach D, Mearns LO, Rivington M, Antle JM, Ruane AC.** 2014. Uncertainty in Agricultural Impact Assessment. ICP Series on Climate Change Impacts, Adaptation, and Mitigation. Handbook of Climate Change and Agroecosystems. IMPERIAL COLLEGE PRESS, 223–259.
- Wang Q, Chun JA, Fleisher D, Reddy V, Timlin D, Resop J.** 2017. Parameter Estimation of the Farquhar—von Caemmerer—Berry Biochemical Model from Photosynthetic Carbon Dioxide Response Curves. *Sustainability* **9**, 1288.
- Wang Q, Fleisher DH, Timlin D, Reddy VR, Chun JA.** 2012. Quantifying the measurement errors in a portable open gas-exchange system and their effects on the parameterization of Farquhar et al. model for C3 leaves. *Photosynthetica* **50**, 223–238.
- Wang J, Wang C, Chen N, Xiong Z, Wolfe D, Zou J.** 2015. Response of rice production to elevated [CO₂] and its interaction with rising temperature or nitrogen supply: a meta-analysis. *Climatic Change* **130**, 529–543.
- Wang DR, Wolfrum EJ, Virk P, Ismail A, Greenberg AJ, McCouch SR.** 2016. Robust phenotyping strategies for evaluation of stem non-structural carbohydrates (NSC) in rice. *Journal of Experimental Botany* **67**, 6125–6138.
- Wang J, Zhao T, Yang B, Zhang S.** 2018. Sucrose Metabolism and Regulation in Sugarcane. *Journal of Plant Physiology & Pathology* **2017**.
- Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S.** 2013. The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 7370–7390.
- Warren JM, Jensen AM, Medlyn BE, Norby RJ, Tissue DT.** 2014. Carbon dioxide stimulation of photosynthesis in *Liquidambar styraciflua* is not sustained during a 12-year field experiment. *AoB PLANTS* **7**.
- Weber APM, Bar-Even A.** 2019. Update: Improving the Efficiency of Photosynthetic Carbon Reactions. *Plant Physiology* **179**, 803–812.
- Wei H, Meng T, Li X, Dai Q, Zhang H, Yin X.** 2018. Sink-source relationship during rice grain filling is associated with grain nitrogen concentration. *Field Crops Research* **215**, 23–38.
- Weiner H, McMichael RW, Huber SC.** 1992. Identification of Factors Regulating the Phosphorylation Status of Sucrose-Phosphate Synthase in Vivo. *Plant Physiology* **99**, 1435–1442.
- Welch JR, Vincent JR, Auffhammer M, Moya PF, Dobermann A, Dawe D.** 2010. Rice yields in tropical/subtropical Asia exhibit large but opposing sensitivities to minimum and maximum temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 14562–14567.

- Weng J-H, Chen C-Y.** 1991. Effect of Accumulated Nonstructural Carbohydrates on Photosynthesis of Rice Leaves. *Japanese Journal of Crop Science* **60**, 320–321.
- Weng X-Y, Zheng C-J, Xu H-X, Sun J-Y.** 2007. Characteristics of photosynthesis and functions of the water–water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiologia Plantarum* **131**, 614–621.
- White J, Hoogenboom G, Kimball B, Wall G.** 2011. Methodologies for simulating impacts of climate change on crop production. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty.
- White AC, Rogers A, Rees M, Osborne CP.** 2016. How can we make plants grow faster? A source–sink perspective on growth rate. *Journal of Experimental Botany* **67**, 31–45.
- Winder TL, Sun J, Okita TW, Edwards GE.** 1998. Evidence for the occurrence of feedback inhibition of photosynthesis in rice. *Plant and cell physiology* **39**, 813–820.
- Wise RR, Olson AJ, Schrader SM, Sharkey TD.** 2004. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, Cell & Environment* **27**, 717–724.
- Wopereis MCS, Johnson DE, Ahmadi N, Tollens E, Jalloh A (Eds.).** 2013. *Realizing Africa's rice promise*. Wallingford: CABI.
- Wu A, Song Y, Oosterom V, J E, Hammer GL.** 2016. Connecting Biochemical Photosynthesis Models with Crop Models to Support Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1518.
- Wullschlegel SD.** 1993. Biochemical Limitations to Carbon Assimilation in C3 Plants—A Retrospective Analysis of the A/Ci Curves from 109 Species. *Journal of Experimental Botany* **44**, 907–920.
- Wullschlegel SD, Tschaplinski TJ, Norby RJ.** 2002. Plant water relations at elevated CO₂ - - implications for water-limited environments. *Plant, Cell & Environment* **25**, 319–331.
- Xiong D, Yu T, Liu X, Li Y, Peng S, Huang J.** 2015. Heterogeneity of photosynthesis within leaves is associated with alteration of leaf structural features and leaf N content per leaf area in rice. *Functional Plant Biology* **42**, 687–696.
- Xu M, Duan W, Fan PG, Wu BH, Wang LJ, Ma L, Archbold DD, Li SH.** 2014. Low sink-induced stomatal closure alters photosynthetic rates of source leaves in beans as dependent on H₂O₂ and ABA accumulation in guard cells. *Russian Journal of Plant Physiology* **61**, 397–408.
- Yamori W, Kondo E, Sugiura D, Terashima I, Suzuki Y, Makino A.** 2016. Enhanced leaf photosynthesis as a target to increase grain yield: insights from transgenic rice lines with variable Rieske FeS protein content in the cytochrome b6/f complex. *Plant, Cell & Environment* **39**, 80–87.
- Yang F, Liang Z, Wang Z, Chen Y.** 2008. Relationship Between Diurnal Changes of Net Photosynthetic Rate and Influencing Factors in Rice under Saline Sodic Stress. *Rice Science* **15**, 119–124.

- Yang JT, Preiser AL, Li Z, Weise SE, Sharkey TD.** 2016. Triose phosphate use limitation of photosynthesis: short-term and long-term effects. *Planta* **243**, 687–698.
- Yang J, Zhang J.** 2006. Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* **169**, 223–236.
- Yang J, Zhang J.** 2010. Crop management techniques to enhance harvest index in rice. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3177–3189.
- Yendrek CR, Tomaz T, Montes CM, Cao Y, Morse AM, Brown PJ, McIntyre LM, Leakey ADB, Ainsworth EA.** 2017. High-Throughput Phenotyping of Maize Leaf Physiological and Biochemical Traits Using Hyperspectral Reflectance. *Plant Physiology* **173**, 614–626.
- Yin X, van Laar H h.** 2005. *Crop Systems Dynamics*. Wageningen Academic Publishers.
- Yin X, Schapendonk AHCM, Struik PC.** 2019. Exploring the optimum nitrogen partitioning to predict the acclimation of C3 leaf photosynthesis to varying growth conditions. *Journal of Experimental Botany* **70**, 2435–2447.
- Yin X, Struik PC.** 2017. Can increased leaf photosynthesis be converted into higher crop mass production? A simulation study for rice using the crop model GECROS. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2345–2360.
- Yin X, Sun Z, Struik PC, Gu J.** 2011. Evaluating a new method to estimate the rate of leaf respiration in the light by analysis of combined gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3489–3499.
- Yoshida H, Horie T.** 2009. A process model for explaining genotypic and environmental variation in growth and yield of rice based on measured plant N accumulation. *Field Crops Research* **113**, 227–237.
- Yoshida H, Horie T, Shiraiwa T.** 2008. A model for explaining genotypic and environmental variation in vegetative biomass growth in rice based on observed LAI and leaf nitrogen content. *Field Crops Research* **108**, 222–230.
- Yoshimoto M, Oue H, Kobayashi K.** 2005. Energy balance and water use efficiency of rice canopies under free-air CO₂ enrichment. *Agricultural and Forest Meteorology* **133**, 226–246.
- Zhang S, He X, Zhao J, et al.** 2017. Identification and validation of a novel major QTL for harvest index in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice (New York, N.Y.)* **10**, 44.
- Zhang C, Turgeon R.** 2009. Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in *Verbascum phoeniceum* does not inhibit phloem loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 18849–18854.
- Zhou Y, Zhang Y, Wang X, Cui J, Xia X, Shi K, Yu J.** 2011. Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **12**, 126–134.
- Zhu X-G, Long SP, Ort DR.** 2010. Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 235–261.

Zhu X-G, Lynch JP, LeBauer DS, Millar AJ, Stitt M, Long SP. 2016a. Plants in silico : why, why now and what? an integrative platform for plant systems biology research. *Plant, Cell & Environment* **39**, 1049–1057.

Zhu X-G, Portis AR, Long SP. 2004. Would transformation of C3 crop plants with foreign Rubisco increase productivity? A computational analysis extrapolating from kinetic properties to canopy photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **27**, 155–165.

Zhu C, Xu X, Wang D, Zhu J, Liu G, Seneweera S. 2016b. Elevated atmospheric [CO₂] stimulates sugar accumulation and cellulose degradation rates of rice straw. *GCB Bioenergy* **8**, 579–587.

Zhu C, Zhu J, Cao J, Jiang Q, Liu G, Ziska LH. 2014. Biochemical and molecular characteristics of leaf photosynthesis and relative seed yield of two contrasting rice cultivars in response to elevated [CO₂]. *Journal of Experimental Botany* **65**, 6049–6056.

Ziska LH, Morris CF, Goins EW. 2004. Quantitative and qualitative evaluation of selected wheat varieties released since 1903 to increasing atmospheric carbon dioxide: can yield sensitivity to carbon dioxide be a factor in wheat performance? *Global Change Biology* **10**, 1810–1819.

Ziska LH, Tomecek MB, Gealy DR. 2014. Assessment of cultivated and wild, weedy rice lines to concurrent changes in CO₂ concentration and air temperature: determining traits for enhanced seed yield with increasing atmospheric CO₂. *Functional Plant Biology* **41**, 236–243.

Annexes

Annexe 1 : Poster conçu pour le congrès international de photosynthèse, Nouvelle-Zélande

OPTIMIZING C SOURCE-SINK BALANCE CAN IMPROVE RICE PHOTOSYNTHESIS AND YIELD IN A CO₂ ELEVATION CONTEXT



Denis Fabre^{1*}, Xinyou Yin², Michael Dingkuhn¹, Anne Clément-Vidal¹, Sandrine Roques¹, Armelle Soutiras¹ and Delphine Luquet¹

¹ CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

² Centre for Crop Systems Analysis, Department of Plant Sciences Wageningen University & Research, Wageningen, Netherlands

denis.fabre@cirad.fr



OBJECTIVES

Increased atmospheric CO₂ concentration (e-CO₂) will enhance photosynthesis in C3 crops, but the impact on crop productivity should also depend on C sink capacity and thus the optimization of C source-sink relationships. This study aims at disentangling the relationship between C source-sink balance, photosynthesis, biomass and grain yields in rice.

Two experiments were conducted to tackle more specific questions:

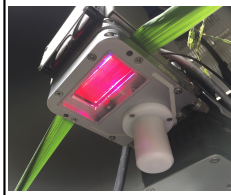
- Growth Chamber :
Is Triose-Phosphate Utilization (TPU) involved in response to source-sink imbalance ?
- Greenhouse :
Does genotypic variation in source-sink ratio affect photosynthesis response to e-CO₂ ?

METHODS

Growth Chamber



- 1 rice variety
- 400 vs 800 ppm
- Control vs Panicle pruning

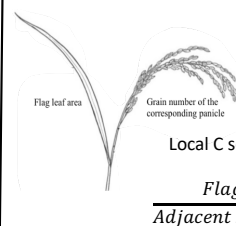


- A/Ci curves
- Sugar content (leaf, internode)
- Morning
- Midday
- Afternoon
- Evening

Greenhouse



- 5 rice varieties constitutively contrasting in local C source-sink ratio
- 400 vs 800 ppm

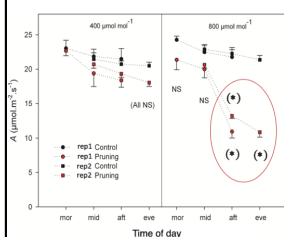


$$\text{Local C source-sink ratio} = \frac{\text{Flag leaf area}}{\text{Adjacent Spikelet number}}$$

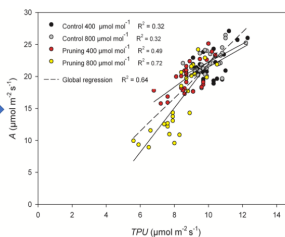
RESULTS

Growth chamber

Panicle pruned plants show greater decrease in photosynthesis in the afternoon under e-CO₂



This could be related to the decrease in Triose-P Utilization (TPU)

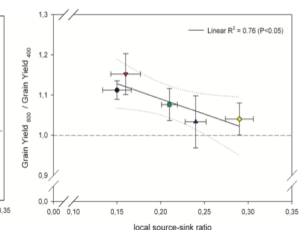
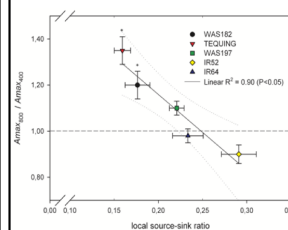


- Among photosynthetic parameters, TPU was the most indicative of changes in the photosynthesis variation in response to the C source-sink imbalance generated by panicle pruning X e-CO₂

- Sink limitation ⇒ Low TPU ⇒ increased [leaf sucrose] (not shown)

Greenhouse

Local C source-sink ratio is a key driver of the the genotypic response to e-CO₂ of Photosynthetic capacity & ... Grain yield



- Genotypic response to e-CO₂ could be related to the phenotypic plasticity and the capacity of C sink organs (panicle size and number)

CONCLUSIONS

⇒ Morphological traits affecting plant C source-sink ratio are key drivers of genotypic responses to e-CO₂ in terms of leaf photosynthesis and plant productivity

⇒ Local C source-sink ratio, as a potential proxy for e-CO₂ response, is easy to measure and might become a useful selection tool in crop breeding.

⇒ Crop models have to consider C source-sink feedbacks and related photosynthetic parameters (TPU) to better predict crop productivity in a e-CO₂ context

REFERENCES

- Fabre D., Yin X., Dingkuhn M et al. (2019) Is triose phosphate utilization involved in the feedback inhibition of photosynthesis in rice under conditions of sink limitation? *Journal of Experimental Botany* **70**, 5773–5785
- Fabre D., Dingkuhn M., Yin X., et al. (2020) Genotypic variation in source and sink traits affects the response of photosynthesis and growth to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell & Environment* **43**, 579–593

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in
Plant Biology

The case for improving crop carbon sink strength or plasticity for a CO₂-rich future

Michael Dingkuhn¹, Delphine Luquet¹, Denis Fabre¹,
Bertrand Muller², Xinyou Yin³ and Matthew J Paul⁴

Atmospheric CO₂ concentration [CO₂] has increased from 260 to 280 μmol mol⁻¹ (level during crop domestication up to the industrial revolution) to currently 400 and will reach 550 μmol mol⁻¹ by 2050. C3 crops are expected to benefit from elevated [CO₂] (e-CO₂) thanks to photosynthesis responsiveness to [CO₂] but this may require greater sink capacity. We review recent literature on crop e-CO₂ responses, related source-sink interactions, how abiotic stresses potentially interact, and prospects to improve e-CO₂ response via breeding or genetic engineering. Several lines of evidence suggest that e-CO₂ responsiveness is related either to sink intrinsic capacity or adaptive plasticity, for example, involving enhanced branching. Wild relatives and old cultivars mostly showed lower photosynthetic rates, less downward acclimation of photosynthesis to e-CO₂ and responded strongly to e-CO₂ due to greater phenotypic plasticity. While reverting to such archaic traits would be an inappropriate strategy for breeding, we argue that substantial enhancement of vegetative sink vigor, inflorescence size and/or number and root sinks will be necessary to fully benefit from e-CO₂. Potential ideotype features based on enhanced sinks are discussed. The generic 'feast-famine' sugar signaling pathway may be suited to engineer sink strength tissue-specifically and stage-specifically and help validate ideotype concepts. Finally, we argue that models better accounting for acclimation to e-CO₂ are needed to predict which trait combinations should be targeted by breeders for a CO₂-rich world.

Addresses

¹ CIRAD, UMR 108 AGAP, F-34398 Montpellier, France

² INRAE, UMR 759 LEPSE, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, F-34060 Montpellier, France

³ Centre for Crop Systems Analysis, Dept. Plant Sciences, Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands

⁴ Plant Science, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, United Kingdom

Corresponding author: Dingkuhn, Michael (michael.dingkuhn@cirad.fr)

Current Opinion in Plant Biology 2020, XX:xx-yy

This review comes from a themed issue on **AGRI**

Edited by **David Edwards**

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.05.012>

1369-5266/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Anthropogenic climate change since the beginning of the industrial revolution has adversely affected global yields of annual crops [1], whereby CO₂ fertilization benefits were more than offset by yield-reducing climatic factors [2]. As global warming accelerates in the future, the effects of yield-reducing stresses will dominate and increasingly impact production [3]. Potential global arable land area is projected to increase as higher northern latitudes warm [4], but current agricultural prime land is shrinking due to degradation and competition with other economic activities [5]. Meanwhile, global demand for food is projected to increase by 69% from 2010 to 2050 [6]. Thus, there is an objective need to increase crop yields, whereas the changing climate tends to decrease them. Past achievements in yield increase essentially relied on increased harvest index and light interception through architectural changes. Further increasing harvest index of high-yielding cultivars would incur excessive lodging risks [7], and gains must now be achieved through increased biomass resulting from greater radiation use efficiency and photosynthesis [8].

Potential breakthroughs were recently reported on the engineering of C₃-type plants having increased photosynthetic potential, namely by reducing the photorespiratory loss (tobacco: [9]; rice: [10]) [The reported 40% biomass increase observed in tobacco, however, was questioned by Fischer [11] on methodology grounds]. An alternative or complementary approach to enhancing the assimilate source system directly is to stimulate it indirectly by strengthening sinks [12,13]. Under current atmospheric CO₂ concentrations, which are about 50% higher than the pre-industrial levels (400 μmol mol⁻¹ versus 260–280 μmol mol⁻¹ [14]), C₃ crop growth and yield may frequently be sink limited [15–17]. Therefore, C₃ crops may not be able to efficiently use the higher CO₂ concentration expected to be present in the atmosphere in the coming decades if sink capacity is not increased to maintain balanced source-sink relationships [18]. This is the rationale for our present review.

Several reviews [17,19–21] and opinion papers [22*,18] have discussed the potential of increasing crop productivity by enhancing sink strength. In these reviews, the targeted sinks are most often reproductive and thus directly grain-yield related. However, all growth depends on sinks, including that related to tillering and root

growth. Stimulating them could not only release breaks due to downregulation of photosynthesis but also provide additional gains in terms of drought avoidance [23,24] or soil carbon sequestration via roots [25]. Recent studies showed that sink enhancement by molecular engineering, for example, using the T6P (Triose-6-Phosphate) feast-famine system, increased both the productivity of the targeted sink organ and crop photosynthesis [26**], thereby boosting overall crop biomass production [27*]. The stimulation of specific sinks does more than simply re-direct (partition) assimilates within the plant. There is growing evidence that the whole-plant level source-sink relationships are affected, stimulating leaf photosynthesis (source) through the rapid removal of photosynthate from their sites of production [28*]. This may involve long distance signaling between sources and sinks through sucrose gradients that then translate locally into T6P signals [29*]. Understanding source-sink signaling and interactions has important implications for future crop breeding and engineering, particularly to draw maximal benefits for crops and agro-ecosystems from the globally rising atmospheric CO₂ concentration.

Before the industrial revolution, atmospheric CO₂ concentrations were relatively stable for about 10 000 years at around 260–280 μmol mol⁻¹ (Figure 1). The domestication and gradual improvement through selection of our main old-world cereal crops occurred during this period. This was followed during the last 150 years or so by an

anthropogenic, exponential increase of [CO₂] which stands today at over 400 μmol mol⁻¹ and is expected to reach 550 μmol mol⁻¹ by 2050 [30–32]. Our crops are thus exposed to a carbon resource that will soon be twice as abundant as it was when these species were domesticated as crops. FACE experiments (Free-Air CO₂ Enrichment: [33,34*,35,36*]) have demonstrated the large potential for yield stimulation in C₃-species under e-CO₂ in a large diversity of situations. However, there is large genotypic and experiment-to-experiment variation and meta analyses may carry a positive bias [37]. On the other hand, a negative bias may be caused by the effect of [CO₂] fluctuations in FACE setups which are much larger than natural fluctuations, suggesting that real-world stimulation by e-CO₂ on growth and photosynthesis is larger than observed in FACE trials [38]. Are our current C₃-crops able to fully exploit the potential provided by the increasing atmospheric [CO₂]?

In line with this question, there is growing evidence that large genotypic variation in e-CO₂ response exists, suggesting that there is scope for improvement through breeding. Moreover, this variation seems to be associated with source-sink relationships (e.g. [13,36*,39,40**]) prompting the need to better understand how sink strength feeds backward on photosynthesis. Such results also call for revisiting crop models which typically assume leaf photosynthesis to be driven only by genotype, external resources (light, CO₂, water), leaf nutritional status and stress factors, but not the plant capacity to remove assimilates from the source and use them in sink organs [41].

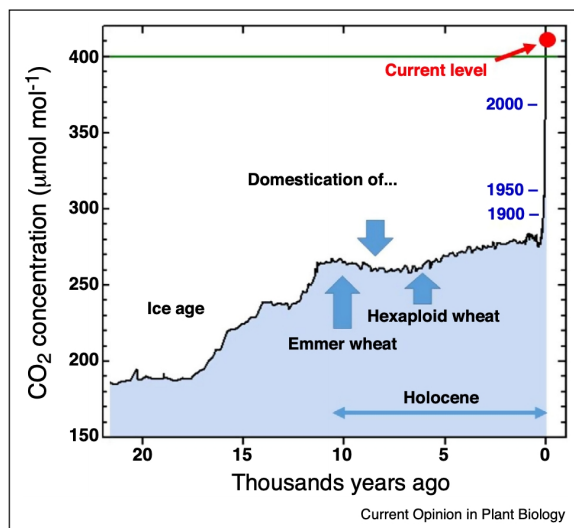
Our purpose is therefore to review the evidence of acclimation of photosynthesis response of C₃ crops to e-CO₂ concentration, to examine the causes of ‘downward acclimation’ [42], the interactions with some abiotic stresses, the main causes of cultivar differences in e-CO₂ response and how they may be related to domestication and breeding history, the design of crop ideotypes with the help of improved crop models, and the possibilities to engineer them experimentally. We will terminate with perspectives for improved breeding approaches.

High sink potential and sink plasticity improve e-CO₂ response in C₃-crops

Sink limitation of photosynthesis

It is well known that C₃ photosynthesis in the absence of physiological stresses is limited by the atmospheric CO₂ concentration, both at the pre-industrial level (ca. 260–280 μmol mol⁻¹; Figure 1) and current level (ca. 400 μmol mol⁻¹), and even at projected levels for 2050 (>550 μmol mol⁻¹) as the saturating intercellular CO₂ level is above 600 μmol mol⁻¹ [43]. If leaf photosynthetic rates were only determined by the constitutive properties of the photosynthetic apparatus and the environment it operates in (assuming the absence of stresses), the light-saturated and CO₂-saturated rate (A_{max}) would be a

Figure 1



Dynamics of atmospheric CO₂ concentration during the past 20 000 years. The current warm period (Holocene) had 260–280 μmol mol⁻¹ CO₂ (pre-industrial levels) and was conducive to development of civilization and domestication of crops. The recent increase in [CO₂] to >400 μmol mol⁻¹ is anthropogenic. (Adapted from www.co2.earth).

constant system property. However, Amax changes with plant acclimation after plants are exposed to e-CO₂ for several weeks [44], and it also declines during the day, the degree of this decline depending on source-sink relationships [28*]. Sink limitation feeds back on the photosynthetic rate as assimilates are not exported to sink organs at the rate at which they are produced. Consequently, e-CO₂ driven stimulation of the source (photosynthesis), or conversely sink pruning, reduces Amax and causes the diurnal decline of leaf photosynthesis, which in turn limits crop growth [28*].

Downward acclimation of photosynthesis to e-CO₂ is a commonly reported in C₃ species (e.g. [42]). A strong acclimation was observed in garlic, resulting in the absence of yield any gains from e-CO₂ [45]. In some cases, acclimation effects are absent like in radish [46], probably because the tuber has virtually unlimited carbon storage capacity. In addition to changes in photosynthetic parameters, acclimation can cause structural changes in the leaf [47].

A decline of photosynthesis under sink limitation, as observed for rice under sink pruning [28*] has been attributed to end-product accumulation in photosynthetic tissues [48]. Excess assimilates can negatively feedback on photosynthetic rate [49–52], possibly via leaf Triose phosphate utilization (TPU) capacity [19,28*]. To avoid physiological damage, photosynthetic processes need to be downregulated to avoid outright TPU limitation, probably involving co-adjustment of V_{cmax} (maximum carboxylation rate of Rubisco) and TPU parameters [28*,44,53,54*,55].

Kirschbaum [56] concluded in a review of crop responses to e-CO₂ that acclimation in most cases wipes out much of the potential gains in growth, largely due to the plants' inability to use additional assimilates. Fatichi *et al.* [57] went as far as calling for vegetation models to be sink and not source driven.

Greater sink potential enhances the yield response of crops to e-CO₂

Although it is not clear if TPU ever becomes rate-limiting for C₃ photosynthesis in a natural range of environments, inhibitory feedbacks clearly occur when sink activity does not match photosynthetic potential [55]. Conversely, engineered enhancement of grain sinks can stimulate photosynthetic rate (and eventually increase grain yield), as demonstrated by Oszvald *et al.* [26**] using the T6P regulatory system, even in the case of the C₄-crop maize (see section on T6P below).

Fabre *et al.* [58*] demonstrated that constitutive morphological differences in rice affecting source and sink capacity, namely flag leaf area and panicle size, are aligned with genotypic differences in photosynthetic responses to e-

CO₂. Genotypes having large flag leaves and small panicles (and thus high local source/sink ratio) showed no increase in Amax after a 15-d exposure to e-CO₂. Amax increased substantially, however, when genotypes having low local source-sink ratio (small flag leaves, large panicle) were exposed to e-CO₂. The positive response of Amax to e-CO₂ after acclimation in high-sink cultivars translated into greater yield gain (although the use of potted plants in growth chambers warrants caution here). Consistent with this, it was suggested that increasing Amax of the flag leaf is important to improve rice yield potential particularly for e-CO₂ environments [59]. A strong sink capacity may thus be necessary for increased Amax to be expressed.

One would expect from these findings that genotypic differences in sink capacity might translate into crop yield response to atmospheric CO₂ concentration. This has been demonstrated by Hasegawa *et al.* [40**] for rice in FACE experiments in Japan: Genotypic yield response to e-CO₂ (200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ above ambient) ranging between +3% and +36% among 8 cvs. was observed in a single-site experiment and between +4% and 25% among 4 cvs. in a multi-site experiment. Effects were correlated with the spikelet number per unit ground area observed in the ambient (low) CO₂ concentration treatment. All genotypes were high-yielding types and the yield gain was mainly due to the number of fertile tillers. In FACE experiments in China, Lv *et al.* [36*] observed large genetic-group effects on the yield response to e-CO₂ (600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Japonica inbred cvs. responded the least (+13.5%), indica inbred cvs. intermediate (+22.6%) and F₁ hybrids the most (+32.8%), based on a large sample of 120 genotypes. The authors concluded that these genotype differences reflect different magnitudes of photosynthetic acclimation, with hybrids showing the least acclimation. The low e-CO₂ response (or strong acclimation, as presumed by the authors) of japonica types was mainly explained by their smaller capacity to adjust spikelet number per panicle (a sink trait) to the greater carbon source. A FACE treatment applying e-CO₂ only at post-heading stages benefitted yield of indica rice (+24%) more than japonica rice (+13%), indicating that the latter were probably more sink limited. The large body of experimental data from rice FACE trials in Japan and China combined indicate strong differences in e-CO₂ response among modern, high-yielding cultivars. The FACE trials show that sink traits strongly affect genotypic e-CO₂ response, further supported by phytotron studies [28*,58*].

Greater sink plasticity enhances the response of crops to e-CO₂

A cereal crop's sink capacity, in terms of the product of spikelet number per ground area and potential kernel weight, is a complex and plastic trait. Its components (tillering, tiller mortality, tiller fertility, inflorescence size and potential kernel weight) respond to external resources and show strong compensatory plasticity in rice, a cereal having small plasticity for kernel weight but large

plasticity for tiller number and spikelet number per panicle [60*,61]. Modern maize cvs., by contrast do not tiller but ‘prolific’ genotypes can compensate for wide spacing by increasing ear number per plant [62]. Modern wheat cvs. tiller less than traditional ones, but highly plastic ear size and kernel weight provide adaptability to resource levels [63]. One could therefore expect that a genotype’s adaptive or compensatory sink plasticity contributes to e-CO₂ response, in addition to the effects of constitutive differences in sink capacity.

Kikuchi *et al.* [64] investigated this hypothesis for two rice diversity panels, using the response of tillering and spikelet number per panicle to plant population density as a measure of the phenotypic plasticity of sinks. Genome-wide association studies (GWAS) then provided quantitative trait loci (QTLs) for the plasticity traits, and a subset of genotypes carrying positive-effect or negative-effect alleles was subjected to e-CO₂ in a FACE experiment. The authors report greater growth and yield responses to e-CO₂ in the more plastic genotypes, thus validating the original hypothesis. Similarly, Kumagai *et al.* [65**] demonstrated that soybean genotypes exhibiting greater biomass and yield response to e-CO₂ also exhibited greater compensatory plasticity when subjected to differential planting densities. Genotypic differences in both e-CO₂ response and planting density response were very large, and both responses were positively correlated across genotypes. Consistent with this, Zhu *et al.* [66] compared two rice cultivars differing in physiological and yield e-CO₂ responses. The poorly responding cultivar showed strong down regulation of photosynthesis (acclimation) whereas the more e-CO₂ responsive cultivar avoided acclimation through adaptive plasticity of sink capacity.

The combined results of Kumagai *et al.* [65**] and Kikuchi *et al.* [64] make a strong case for a crop’s gap-filling capacity to be an enabling factor for biomass and yield gains under e-CO₂ conditions, for two annual crop species (rice and soybean) that are quite distant from each other biologically and phylogenetically. The gap-filling capacity, or ability to aggressively colonize resources through plasticity, can thereby be interpreted as the potential to opportunistically enhance existing sinks, or to generate new sinks through branching (e.g. tillering). The adaptive sink plasticity of the e-CO₂ responsive rice cultivar described by Zhu *et al.* [66] resulted in a greater ratio of spikelet number versus flag leaf area (local sink-source ratio), driven by branching within the panicle.

Effects of other resource factors and stresses on crop e-CO₂ response

Water and temperature interactions

The crop water status seems to be an important factor interacting with the growth/yield response to e-CO₂. Indeed, under water deficit conditions, growth is

more affected than photosynthesis, leading to carbohydrate accumulation in various plant parts [67*] and this may impact photosynthesis response. Consistent with this, Fitzgerald *et al.* [34*] observed a +37% gain in wheat yield under e-CO₂ for an irrigated crop, but only +13% under water-limited conditions. Similarly, Tausz-Posch *et al.* [68] found no superior e-CO₂ response in high-tillering versus low-tillering wheat genotypes and suggested this to be due to the water-limited conditions in the FACE experiment.

A major effect of e-CO₂ is the partial stomatal closure which in turn may affect water status, and favor droughted plants. In principle, this effect should be dominating in C₄ species where e-CO₂ is not expected to directly affect photosynthesis. Consistent with this, e-CO₂ stimulated photosynthesis and growth of maize under drought conditions, but not under well-watered conditions [127]. Drought can thus have opposing effects on e-CO₂ response, an indirect stimulation through stomatal regulation and a negative effect due to carbohydrate accumulation. According to Tausz-Posch *et al.* [69], wheat genotypes having greater transpiration efficiency (TE) maintain this trait under e-CO₂, whereby e-CO₂ increased TE for all genotypes as expected.

The reduction of transpiration rate under e-CO₂ is large for irrigated rice [70]. Stomatal response to e-CO₂ thereby reduces transpirational cooling and thus can cause significant warming of the canopy [71]. In fact, as an alternative to selecting genotypes that use e-CO₂ conditions for greater yield potential, breeders might consider selecting for lower water use while forfeiting potential increases in yield. Low stomatal density in rice was shown to conserve soil water [72*]. Interestingly, lower stomatal conductance as a trait in rice was reported to be associated with increased density of root aerenchyma, needed in anaerobic rice to supply the root with O₂ [73].

These observations demonstrate the numerous tradeoffs associated with changes in stomatal conductance, as a constitutive trait or induced by e-CO₂, or both: yield potential, drought avoidance, canopy temperature, and specifically for rice, the O₂ supply to roots. Fitzgerald *et al.* [34*] also reported a synergy between heat and e-CO₂ effects on wheat yield, observed at FACE trials located at thermally different sites. Elevated temperatures and [CO₂] synergistically affect photosynthesis within temperature ranges the plants are adapted to ([74]; for tomato: [75]; wheat: [76] (review)). However, increased canopy temperature can severely reduce cereal biomass and yield. Cai *et al.* [77*,78] used factorial combinations of two temperature and two CO₂ levels in FACE experiments to study tradeoffs between the two factors for rice and wheat. In both crops, large yield reductions caused by a 1.5–2.0°C temperature increase could not be fully offset by the yield gain caused by 500 μmol mol⁻¹ CO₂.

Nitrogen interactions

Growth stimulation by e-CO₂ causes significant dilution of mineral nutrients in the plant in the absence of concomitant increase of nutrient uptake. The resulting N deficiency can cause reallocation of N from Rubisco, which is the largest nitrogen pool in the plant [79,80,81]. A wheat crop grown in a CO₂ FACE experiment produced 30% higher grain yield under e-CO₂ but had 10% lower N concentration in grain [82]. The decrease in N concentration, however, was not different between strong and weak responders to e-CO₂.

Myers *et al.* [83] warned that nutrient limitation in crops under the influence of e-CO₂ will not only limit productivity but also the quality of human nutrition. Bloom *et al.* [84] called for crop management and improvement strategies to enhance nutrient uptake commensurate with the increased yield potential. There may in fact be a substantial margin to genetically improve nutrient uptake along with the growth stimulation by e-CO₂. Hasegawa *et al.* [85*] investigated a rice variety (*Takanari*) that substantially increased N uptake and maintained grain quality as its yield was increased by 18% under e-CO₂ in a FACE experiment (3-year and 3 N-level average), whereas a common check variety showed grain quality degradation and no yield gains. These results demonstrate that yield gains under e-CO₂ are not only a matter of source-sink relationships but also depend on the adaptive plasticity of nutrient uptake. Consistent with this idea, Sakai *et al.* [86*] reported that strong genotypic differences in the yield response to e-CO₂ among rice cultivars released over the past century in Japan were correlated with their ability to take up additional N. Root growth stimulation upon e-CO₂ as shown in many cases (e.g. wheat: [87*]) may contribute, in a feedforward loop, to additional soil N and water acquisition needed under e-CO₂.

Soil-volume interactions

Arp [88] and Bourgault *et al.* [89] cautioned against extrapolating genotypic differences in e-CO₂ response from pot to field experiments. They demonstrated that the available soil volume per plant interacted with the growth response to [CO₂] and changed genotypic response patterns. Soil volume effects on crop growth are not necessarily caused by resource limitations such as nutrients or water. Poorter *et al.* [90] demonstrated in a meta-analysis that plants adjust growth to the accessible soil volume, apparently through an unknown sensing mechanism. These findings underline the importance of FACE experiments in this area of research. Controlled environments are suited to investigate biological processes but are rarely predictive of crop behavior in the field [91].

Have domestication and selection history limited crop responsiveness to e-CO₂?

Domestication of the major old-world cereals and subsequent selection/breeding processes, from ca. 10 millennia

ago until the early 19th century, happened under low atmospheric CO₂ concentrations compared to today's (260–280 μmol mol⁻¹; Figure 1). Only during modern breeding were crops exposed to the current, rapidly rising CO₂ levels. Although human crop selection never involved exposure to increased CO₂ levels, it is likely that selection affected crop e-CO₂ response in some way because it necessarily affected source-sink relationships and the phenotypic plasticity of sinks.

Donald's ideotype and the aptitude of wild species for domestication

Domestication shifts selection criteria from an individual's survival and reproduction (maximized fitness frequently at the expense of neighbors; [92]) to the productivity of a population of genetically similar individuals. Crop plants thus tend to share resources more equitably with neighbors, requiring some restraint on competitiveness ('Tragedy of the Commons'; [93]). Competitiveness would cause redundant vegetative growth and stand heterogeneity. This concept is supported by Preece *et al.* [94*] who compared the phenotypic plasticity among grass species, some being wild progenitors to modern cereals and others that did not give rise to domestication. Plasticity was tested by growing plants in isolation or in a stand. The crop progenitors were less plastic and more similar in biomass and tillering between treatments, as compared to closely related species that did not domesticate.

The less aggressive gap-filling behavior of the crop progenitors, in terms of benefiting from open spaces [*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* (barley), *Triticum monococcum* ssp. *aegilopoides* (einkorn wheat), *Triticum dicoccum* ssp. *Dicoccoides* (emmer wheat) and *Secale vavilovii* (progenitor of rye)] appears to be a step in the direction of Donald's [95] ideotype. This behavior necessarily involves a smaller capacity to develop more or larger organs in response to the availability to additional spaces (resources). This behavior is thus rooted in sink plasticity, particularly of vegetative organs, and is a developmental phenomenon.

Sink limitations in modern crops

A frequently reported but somewhat controversial view is that cereal crops are sink limited during vegetative growth and source limited during grain filling. Definitions of sink limitation and proxies used to evaluate it vary widely (Review: [96*]) probably contributing to conflicting conclusions. Accumulation of non-structural carbohydrate (NSC) in leaves (and probably, in all tissues not specialized on storage) is a reliable indicator for sink limitation [97]. Examples for the genericity of this proxy are found in several studies on a variety of species such as rice [28*,58*], tomato [51], soybean [97] and oil palm [98,99].

Burnett *et al.* [100*] compared an annual cultivated barley with a perennial wild barley subjected to continuous 180,

400 and 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO_2 treatments in growth chambers over 61 days. The wild plants had lower photosynthetic rates than the cultivated ones under ambient $[\text{CO}_2]$ but showed a greater positive response of photosynthesis, tillering, root-shoot weight ratio and biomass to increased $[\text{CO}_2]$. The cultivated species accumulated more NSC in vegetative organs than the wild barley in root and shoot at ambient $[\text{CO}_2]$. The authors conclude that the cultivated species was sink limited and the wild species source limited during vegetative development.

For wheat, the comparison of old and recent cultivars (released in 1903, 1921, 1965 and 1996) in growth chambers at 293, 385 and 715 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ $[\text{CO}_2]$ showed a clear trend towards smaller yield responses to e- CO_2 in modern cultivars [16]. Larger responses (and probably, smaller acclimation effects) in old cultivars were attributed to their greater tillering plasticity, enabling a better sink adjustment to the carbon resource. Of course, responses may be different in field-grown canopies involving intraspecific plant competition.

Too little information is available to judge if C3-type cereal cultivars are generally more sink limited than their ancestors. Borrás *et al.* [15] found modern wheat to be sink-limited during grain filling in most situations. By contrast, Acreche and Slafer [63] compared Mediterranean wheat varieties released between 1940 and 2005 and found that the older ones were strongly sink limited. Recent cultivars had more balanced sink-source relationships as breeding had increased grain number. Sakai *et al.* [86*] studied the yield response of old and recent rice varieties to e- CO_2 in FACE experiments. They observed the strongest e- CO_2 response in older varieties but data were insufficient to establish a historical trend. Genotypic differences in e- CO_2 response were correlated with the genotypic ability to take up additional N to support the CO_2 -stimulated growth. Similarly, a FACE study on *Lolium perenne* [101] demonstrated a strong sink-limitation and accumulation of NSC in response to e- CO_2 when N resources were limiting. These source-sink imbalances largely disappeared in a high-N treatment, indicating the important role of N resources in e- CO_2 response.

We conclude that although there is insufficient evidence to support that modern varieties generally lack sink capacity under e- CO_2 conditions during yield formation, evidence is accumulating that their restrained sink plasticity during vegetative development, probably necessary to be good crops in Donald's sense, limits their overall growth response to e- CO_2 . This may explain the positive association between gap filling capacity (largely by tillering) in widely spaced crops and yield response to e- CO_2 for cultivated rice [64], and the observation that early variation in rice tillering is positively correlated with the e- CO_2 response of yield [102*]. Sink limitation during vegetative development in modern cultivars under high

ambient $[\text{CO}_2]$ therefore merits more attention in crop improvement because it limits the potential biomass gain.

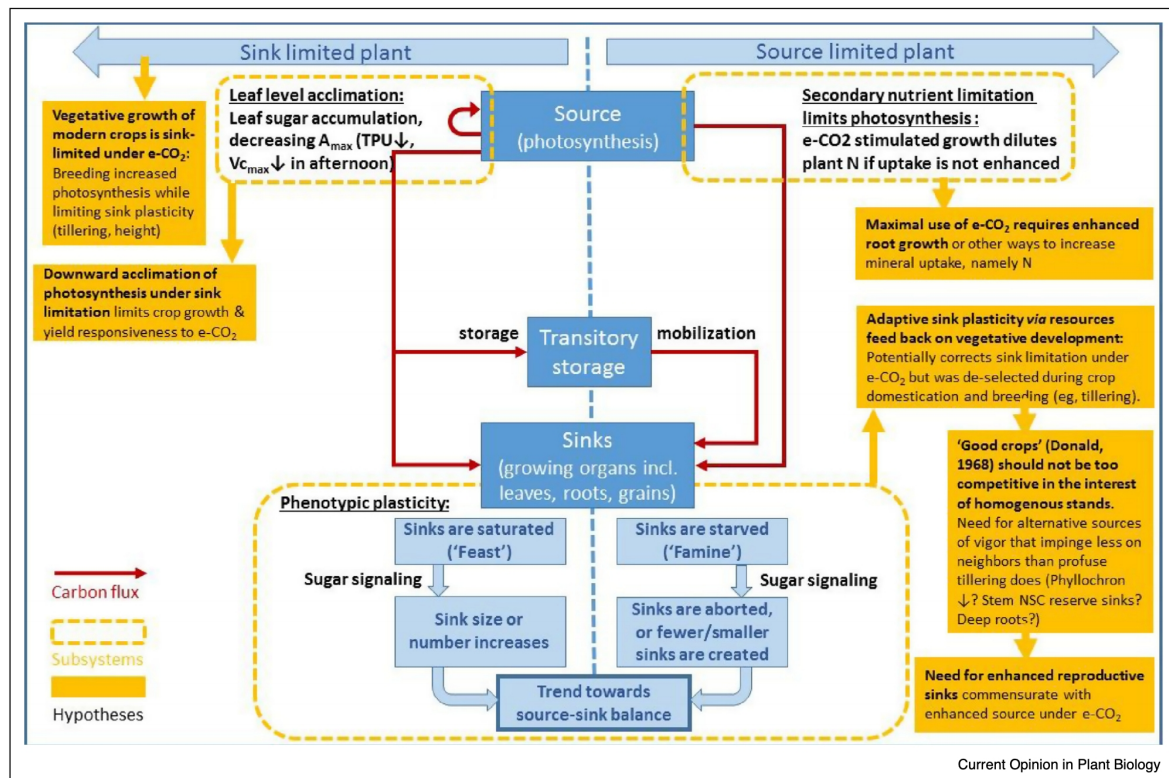
Consequences for crop ideotypes better using e- CO_2

Crop ideotypes making better use of e- CO_2 need to minimize downward acclimation of photosynthesis while maintaining the high potential photosynthetic rates of modern cultivars. They should also satisfy Donald's [95] paradigm of restrained intraspecific competitiveness enabling homogenous crop stands and avoiding redundant vegetative growth. It is thus not useful to revert to archaic plasticity traits that breeders have de-selected even if they effectively reduce downward e- CO_2 acclimation of photosynthesis. However, the principle of enhancing sinks to enable photosynthetic rates unimpeded by acclimation under e- CO_2 conditions remains valid. The magnitude of the required sink adjustments is substantial as $[\text{CO}_2]$ in 2050 will be more than twice the $[\text{CO}_2]$ experienced during domestication and selection in pre-industrial times (260–280 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), and 70% higher than levels during the green revolution (ca. 320 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). It is unclear to what extent recent breeding has unwittingly achieved adaptation to current CO_2 levels (e.g. by increasing grain number), as there is an astonishing diversity in e- CO_2 response among modern crop varieties that is not fully understood.

Sink limitation during vegetative development might be corrected through increased, sink-driven early vigor. Profuse tillering, although sometimes predictive of e- CO_2 response [64,102*] may not be the only way to achieve it. We hypothesize that increased leaf number [103], larger leaves and leaf sheaths, increased NSC reserve pools in the stem functioning as active sinks [104], and enhanced root sinks may jointly enhance demand for assimilate while avoiding the invasive weedy behavior associated with profuse tillering, which is usually followed by high tiller mortality. Erect leaves, small tiller angle and small seminal root angle (favoring deep roots; [105]) may control unwanted competitiveness. More vigorous root systems might also enable the increased mineral uptake to support enhanced biomass. Combined with enhanced reproductive sinks, such traits may increase biomass production under e- CO_2 while maintaining the high harvest index already achieved in modern cultivars. More research is thus needed to test if these traits, are as effective as tillering in controlling e- CO_2 acclimation. Our hypotheses are summarized schematically in Figure 2, projected onto the theoretical framework of sink-source relationships and acclimation of photosynthesis to e- CO_2 .

If the hypotheses are valid, it will be useful to understand the gene networks and physiological pathways controlling the number and size of sinks, both for the vegetative and reproductive architecture of the plant. To predict improved ideotypes on this basis, appropriate crop models are also needed.

Figure 2



Schematic diagram of source-sink interactions, downward acclimation of photosynthesis to e-CO₂ and adaptive plasticity of sinks. Key hypotheses of this paper are inserted in yellow boxes.

Challenges in quantitative modelling to design ideotypes

Donald's [95] ideotype concept facilitated the use of quantitative physiological understanding in crop breeding, that is, design trait combinations that would enable high and stable yield in target ranges of environments. An example of using a crop model was the rice plant type with reduced panicle height combined with erect long uppermost-leaves [106]. Dingkuhn *et al.* [107] predicted a rice ideotype for high, direct-seeded stand densities on the basis of modified tillering and partitioning patterns. Both ideotypes influenced the successful development of Super Hybrid Rice in China [108]. Ideotyping may be extended to incorporate effects of major QTLs which can then be pyramided by marker-assisted selection [109,110]. Potentially, ideotypes can also be molecularly engineered as we will discuss further down. Whatever the genetic pathways used to build e-CO₂ efficient ideotypes, improved models are needed to orientate strategies towards relevant targets. They should be able to predict observed genotypic differences for yield under variable [CO₂] conditions but also to cross-evaluate hypotheses.

They should also integrate source-sink relationships across several biological and temporal scales.

At the leaf level and a time scale of minutes, sink limitation is characterised by TPU [53,54^{*}]. At the whole-plant level and a time scale of hours, sink limitation is often indicated by sugar accumulation and the diurnal decline of A_{max} [28^{*}]. Over days to weeks, sink limitation may build up and contribute to photosynthetic downward acclimation under e-CO₂ (e.g. [44]; [111]). Over the whole crop cycle, competition for resources, compensatory growth responses and turnover of source and sink organs modify source-sink [112]. Nitrogen and other mineral resources are key at this scale.

Presently, the general acclimation of both leaf and canopy photosynthesis to e-CO₂ can be modelled to some extent as an emergent property via a whole-plant feedforward mechanism, that is, e-CO₂ increases carbon accumulation that dilutes plant nitrogen and causes more leaf senescence [113]. Such a simple mechanism can avoid the overestimation by many crop models of the fertilisation

effect of e-CO₂ on crop yield that was observed by Ainsworth *et al.* [91].

In addition to e-CO₂ acclimation, the photosynthetic acclimation to other abiotic factors may involve mechanisms other than plant carbon/nitrogen status [114]. For example, drought decouples growth from photosynthesis [67] and this uncoupling is diversely accounted for by models. Indeed some can be categorized as source-driven with drought induced leaf area adjustments being the consequence of reduction of photosynthesis whereas others are based on independent formalisms of photosynthesis and growth response to drought [115,116].

Another example of uncoupling of responses is provided by Matsui *et al.* [117] who showed that at air temperatures above 30°C, filled spikelet fraction of rice was reduced under e-CO₂, a trend that is opposite to the interaction between CO₂ and temperature on photosynthesis. Reduced spikelet fertility was explained by reduced transpirational cooling [118] under e-CO₂, the higher panicle temperature increasing pollen sterility. Modeling of crop response to e-CO₂ thus should also consider the heat balance and crop-generated microclimate.

Increased photosynthesis usually increases yield as seen in FACE trials, but genotypic variation in photosynthesis *per se* often does not correlate with yield [109,119]. Are feedbacks from non-photosynthetic processes behind genotypic crop responses to e-CO₂? As discussed earlier, this may largely be the case, and acclimation of photosynthesis ultimately is an emergent response to complex carbon source-sink, developmental and nutrient dynamics at the crop level, involving adaptive phenotypic plasticity at several scales. To predict it and translate it into yield variation, a crop model would thus require skills to connect leaf level photosynthetic processes with the plasticity of developmental and morphological dynamics of the crop (sources, sinks and transitory storage), as well as nutritional dynamics (e.g. nitrogen) and to some extent the crop-generated microclimate. Parameterization of such a model will be a major challenge, both in terms of data requirements (phenotyping) and estimation of parameters that cannot be measured directly (e.g. reaction norms of developmental processes). A recent study showed that differences in phenology (phyllochron) during development and as a function of environmental (temperature, light) variation could be fully accounted for by intercepted radiation thereby offering a very simple mean to incorporate this behavior in a modeling algorithm [120].

Building such a model should be a step-wise, iterative endeavor involving experimental research. Once proven valid for a reasonable range of conditions and genetic diversity, the model could be used to design ideotypes for future climatic conditions but also to inform biological engineering targets.

T6P signaling, a lever to modify source-sink relations and engineer e-CO₂ responsive ideotypes?

We are today technically equipped and sufficiently knowledgeable to genetically modify crop plants to express specific sink enhancements as warranted by an improved adaptation to e-CO₂ or by future crop production objectives in general. This approach, even if it may not necessarily provide societally acceptable cultivars for production, will increasingly be central to proving causative hypotheses and to develop and validate ideotypes for new or improved crops. We will focus here on the T6P feast-famine signaling system because of its omnipresence in higher plants, its regulatory involvement in all sinks, and the demonstrated feasibility of modifying it.

Mechanics of the T6P system

Trehalose-6-Phosphate (T6P) is a signal of sucrose concentration in plant tissues communicating the availability of C for growth and development. Plants have an absolute requirement for T6P signals to regulate sucrose utilization in physiological processes [121]. T6P inhibits SnRK1 [122], a kinase related to the SNF1/AMPK protein kinases which are activated under starvation by AMP (adenosine monophosphate) to conserve ATP and C resources.

Inhibition of SnRK1 by T6P promotes the opposite of the starvation response, a so-called feast response. T6P-inhibited SnRK1 de-represses anabolism and represses catabolism enabling growth, development and biosynthetic processes to proceed. In plants and crops both feast and famine responses are necessary in different cells at different times and environmental conditions for growth and adaptation. The balance between survival and productivity has been shifted in crops towards the allocation of more C towards seed production with an increase in numbers and size of grain at the expense of stems. Both stems and seeds are sinks for C, but it is not known how increased harvest index has affected the overall plant source-sink dynamic. Seed sinks may be more easily perturbed by environmental stress than allocation of C to stem reserves, hence modern crops may become sink limited more readily, particularly under e-CO₂ and where stresses inhibit seed numbers and size. It may be expected that domestication and breeding of crops has exerted selection pressure on the T6P synthases (TPS) and phosphatases (TPP) of the T6P pathway. Accordingly, Hufford *et al.* [123] listed both TPSs and TPPs as domestication improvement genes in maize.

Current and prospective use of T6P system for sink enhancement and ideotype engineering

As the T6P pathway regulates both feast and famine responses it can be a target to enhance productivity (feast) and the anabolic processes associated with it that support organ numbers and size; and at the same time to improve

resilience (famine) processes to conserve grain numbers during stresses such as drought.

Oszvald *et al.* [26**] showed that through overexpression of a TPP gene in maize, primarily in phloem of florets, conservation of grain numbers was promoted during drought. Probably, the reduction of T6P promoted sucrose transport into developing grain as a famine response, preventing abortion due to lack of sucrose. Seven SWEET genes were upregulated in the transformed plants. Nuccio *et al.* [27*] reported for the same plant materials a significant increase in grain yield and biomass in the field due to TPP overexpression, for well-watered plants and more strongly under drought. Interestingly, enhanced grain number through expression of the TPP gene was associated with increased photosynthetic longevity of source leaves [26**] suggesting that T6P through the stimulation of sink may also regulate the source as part of a source-sink homeostatic mechanism. This offers clues as to how to increase photosynthesis to support stronger sinks through better source-sink relations.

Griffiths *et al.* [124] experimentally enhanced T6P through chemical intervention in *A. thaliana* and wheat plants, 10 days after anthesis, by spraying a plant-permeable T6P 'signalling-precursor' causing sunlight-triggered release of T6P *in planta*. The treatment increased grain size through promotion of feast processes.

For rising atmospheric [CO₂], the stimulation of both grain number and size via the T6P pathway may enable the sink enhancements necessary to maximize photosynthesis under e-CO₂ and sustain sink activity under abiotic stresses in C3 crops. Both examples [27*] and [26**,124] show that there is room to optimize the T6P pathway for grain numbers and size and hence this may be a promising target for breeding if natural, functional polymorphisms for the respective genes can be identified.

In terms of enabling the tailored engineering of crop ideotypes expressing sink modifications in specific organs and developmental stages, further research should adapt T6P gene transformation to various crop species and develop constructs (genome editing approaches) targeting the size and number of specific organs, developmental stages and environmental triggers for gene expression. This would constitute genetic engineering toolbox for the experimental creation of different source-sink and assimilate partitioning ideotypes.

Ways forward in crop breeding

Effective breeding for improved e-CO₂ response at a high quantity and quality level of yield in C3 crops will require (1) appropriate ideotype concepts and adaptive physiological traits to guide selection; (2) improved models better accounting for e-CO₂ acclimation, capable of predicting the yield benefits of the targeted traits in variable

environments; and (3) scalable phenotyping and selection tools. None of those are currently available. However, avenues can be envisaged.

For most high-yielding crops, the general approach would be to increase biomass production while maintaining the high harvest index and increasing nutrient uptake commensurate with the stimulated growth [125]. Tausz *et al.* [42] called for traits that would help avoiding 'downward acclimation' of photosynthesis by adjusting the source-sink balance not only during grain filling (seed number and size) but throughout crop development (tillering or branching, NSC storage in vegetative organs). Moving towards this direction clearly requires proxies that can be used to characterize the plant material preferably at early stages and at high throughput. For instance, Ziska *et al.* [102*] reported that the tillering response to e-CO₂ in juvenile rice (a plasticity trait) was predictive of e-CO₂ response of yield across different thermal regimes and for both modern and wild rice lines, and may thus be used as a proxy. Other studies on rice [64] and soybean [65**] support this idea. The local source-sink ratio in rice (flag leaf versus panicle size; [58*]) may be another morphological proxy for e-CO₂ response potentially scalable in breeding. Such morphological and developmental proxy traits should be validated for large populations in FACE trials before any practical application in breeding. As discussed earlier, there may be other sink traits increasing vegetative growth vigor and may thus relate to e-CO₂ response, as an alternative to tillering where it is not wanted. The search for scalable proxy traits in breeding for e-CO₂ responsiveness has barely begun.

Several authors called for increased root/shoot ratio to improve adaptation to climate change (review: [126]). This may not only improve crop drought avoidance and enhance C sequestration in the soil [25] but may also be essential to meet the increased nutrient demand [42] and maintain grain quality [85*] under e-CO₂. Increased root/shoot ratio should translate into a greater soil volume accessed by roots to result in greater nutrient uptake [90] – thus requiring sufficient soil depth and appropriate cultural practices. As for the other sink traits, the challenge is to express these root traits in a plastic (e-CO₂-responsive) fashion, requiring proxy traits that are easily used in selection. Where reliable proxy traits cannot be found, molecular selection or engineering may be eventually more promising because FACE experiments will probably always be too costly to host conventional breeding setups.

Conclusion

We found strong evidence for the potential to substantially increase crop photosynthesis, biomass and yield by enhancing carbon sink capacity that would, in turn, stimulate carbon assimilation. This would be particularly effective in annual C3 crops whose photosynthesis is sensitive to the recent and anticipated rise of atmospheric

[CO₂]. Much of the evidence provided concerns rice and wheat but is likely extendable to other major C3-crops.

More research is needed to better understand what lies behind the strong cultivar differences consistently observed in field e-CO₂ response. We raise the hypothesis that major processes accounting for differences in acclimation are sink and N limitation. We have illustrated that some equally high yielding cultivars are able or unable to adjust (increase) sink potential and N uptake. Similarly, compensatory plasticity of tillering and inflorescence size as observed in plant spacing experiments seem to contribute to the ability to minimize e-CO₂ acclimation.

Wild crop relatives and very old cultivars tend to respond better than most modern crops to e-CO₂ due to aggressive gap filling behavior and competitiveness, but on the basis of lower photosynthetic rates. Adopting such archaic traits in breeding would sacrifice essential features of a good crop. Instead, a more constitutively expressed and targeted sink enhancement may be a better strategy. This calls for quantitative modeling to design ideotypes and methodologies to validate them. The appropriate predictive models should consider how acclimation to e-CO₂ will interact with stresses such as drought and heat.

It may be possible to genetically engineer experimental ideotypes that express desirable patterns of sink enhancement, by using organ-specific, T6P-based, 'feast-famine', sugar signaling. This approach can in principle be applied to any C3 crop, and the engineered ideotypes can be validated in FACE e-CO₂ field environments. There are also opportunities to breed in more conventional ways for improved crop response to e-CO₂ but this will hinge on the availability of valid and easily measurable proxy traits.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

Rothamsted Research receives strategic funding from the Biotechnological Sciences Research Council of the UK. MJP acknowledges the Designing Future Wheat Strategic Programme (BB/P016855/1). CIRAD received funding from the CGIAR Research Program Rice (CRP-RICE) of the Consultative Group for International Agricultural Research (CGIAR).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Ray DK, West PC, Clak M, Gerber JS, Prishchepov AV, Chatterjee S: **Climate change has likely already affected global food production.** *PLoS One* 2019 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0217148>. 18 pages.
 2. Iizumi T, Shiogama H, Imada Y, Hanasaki N, Takikawa H, Nishimori M: **Crop production losses associated with anthropogenic climate change for 1981–2010 compared with preindustrial levels.** *Int J Climatol* 2018, **38**:5405–5417.
 3. Zhao C, Liu B, Piao S, Wang X, Lobell DB, Huang Y, Huang M, Yao Y, Bassu S, Ciais P *et al.*: **Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates.** *PNAS* 2017, **114** <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1701762114>.
 4. Zabel F, Putzenlechner B, Mauser W: **Global agricultural land resources – a high resolution suitability evaluation and its perspectives until 2100 under climate change conditions.** *PLoS One* 2014, **9** e107522.
 5. Döös B: **Population growth and loss of arable land.** *Global Environ Change* 2002, **12**:303–311.
 6. Pardey PG, Beddow JM, Hurley TM, Beatty TKM, Eidman VR: **A bounds analysis of world food futures: global agriculture through to 2050.** *Aust J Agric Res Econ* 2014:571–589 <http://dx.doi.org/10.1111/1467-8489.12072>.
 7. Shah L, Yahya M, Mehar S, Shah A, Nadeem M, Ali A, Ali A, Wang J, Riaz JW, Rehman S *et al.*: **Improving lodging resistance: using wheat and rice as classical examples.** *Review. Int J Mol Sci* 2019, **20**:4211 <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20174211>.
 8. Fischer RA, Edmaedes GO: **Breeding and cereal yield progress.** *Crop Sci* 2010, **50**:S-85–S-98 <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2009.10.0564>.
 9. South PF, Cavanagh AP, Liu HW, Ort DR: **Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field.** *Science* 2019, **363** <http://dx.doi.org/10.1126/science.aat9077> eaat9077.
 10. Shen B-R, Wang L-M, Lin XL, Yao Z, Xu H-W, Zhu C-H, Teng H-Y, Cui L-L, Liu E-E, Zhang J-J *et al.*: **Engineering a new chloroplastic photorespiratory bypass to increase photosynthetic efficiency and productivity in rice.** *Mol Plant* 2019, **12**:199–214.
 11. Fischer RA: **40% increased growth with genetic engineering.** *Science* 2019, **363** (e-letter).
 12. Ainsworth EA, Bush DR: **Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity.** *Plant Physiol* 2011, **155**:64–69.
 13. Ruiz-Vera UM, De Souza AP, Long SP, Ort DR: **The role of sink strength and nitrogen availability in the down-regulation of photosynthetic capacity in field-grown *Nicotiana tabacum* L. at elevated CO₂ concentration.** *Front Plant Sci* 2017, **8**.
 14. Rubino M, Etheridge DM, Thornton DP, Howden R, Allison CE, Francey RJ, Langenfelds RL, Steele LP, Trudinger CM, Spencer DA *et al.*: **Revised records of atmospheric trace gases CO₂, CH₄, N₂O, and δ₁₃C-CO₂ over the last 2000 years from Law Dome, Antarctica.** *Earth Syst Sci Data* 2019, **11**:473–492.
 15. Borrás L, Slafer GA, Otegui ME: **Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal.** *Field Crops Res* 2004, **86**:131–146.
 16. Ziska L, Morris CF, Goins EW: **Quantitative and qualitative evaluation of selected wheat varieties released since 1903 to increasing atmospheric carbon dioxide: can yield sensitivity to carbon dioxide be a factor in wheat performance?** *Global Change Biol* 2004, **10**:1810–1819 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00840.x>.
 17. Ludewig F, Sonnewald U: **Demand for food as driver for plant sink development.** *J Plant Physiol* 2016, **203**:110–115.
 18. Sonnewald U, Fernie AR: **Next-generation strategies for understanding and influencing source–sink relations in crop plants.** *Curr Opin Plant Biol* 2018, **43**:63–70.
 19. Paul MJ, Foyer CH: **Sink regulation of photosynthesis.** *J Exp Bot* 2001, **52**:1383–1400.
 20. Lawlor DW, Paul MJ: **Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat.** *Review. Front Plant Sci* 2014 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00418>. 14 pages.
 21. Paul MJ, Watson A, Griffiths CA: **Linking fundamental science to crop improvement through understanding source and sink traits and their integration for yield enhancement.** *J Exp Bot* 2020, **71**:2270–2280 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erz480>.

22. Paul MJ, Oszvald M, Jesus C, Rajulu C, Griffiths CA: **Increasing crop yield and resilience with trehalose 6-phosphate: targeting a feast-famine mechanism in cereals for better source-sink optimization.** *J Exp Bot* 2017, **68**:4455-4462 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erx083>.
The authors demonstrate the broad applicability of T6P based sink boosting (maize, wheat, rice) and propose a vision for using it in the future.
23. Griffiths CA, Paul MJ: **Targeting carbon for crop yield and drought resilience.** *Plant Science*. Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK: Rothamsted Research; 2017 <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8501>.
24. Fromm H: **Root plasticity in the pursuit of water. Review.** *Plants* 2019, **8**:236 <http://dx.doi.org/10.3390/plants8070236>.
25. Suseela V, Tharayil N, Pendall E, Rao AM: **Warming and elevated CO₂ alter the suberin chemistry in roots of photosynthetically divergent grass species.** *AoB Plants* 2017, **9** <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/plx041> plx041.
26. Oszvald M, Primavesi LF, Griffiths CA, Cohn C, Basu SS, Nuccio ML, Paul MJ: **Trehalose 6-phosphate in maize reproductive tissue regulates assimilate partitioning and photosynthesis.** *Plant Physiol* 2018, **176**:2623-2638 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.17.01673>.
This paper establishes that boosting sinks via T6P modification stimulates photosynthesis by feedback. The regulatory processes and gene networks involved are elucidated.
27. Nuccio ML, Wu J, Mowers R, Zhou H-P, Meghji M, Primavesi LF, Paul MJ, Chen X, Gao Y, Haque E *et al.*: **Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions.** *Nat Biotechnol* 2015, **33**:862-869.
Sink boosting via T6P modification increases yield even more under drought than well-watered conditions in the field.
28. Fabre D, Yin X, Dingkuhn M, Clément-Vidal A, Roques S, Rouan L, Soutiras A, Luquet D: **Is triose phosphate utilization involved in the feedback inhibition of photosynthesis in rice under conditions of sink limitation?** *J Exp Bot* 2019, **70**:5773-5785.
The authors show that photosynthesis downregulation under sink limitation mostly impacts in the afternoon. This finding may change the way acclimation to e-CO₂ is modeled. Note also Sharkey's [55] follow-up paper to this study.
29. Griffiths CA, Paul MJ, Foyer CH: **Metabolite transport and associated sugar signalling systems. Review.** *Biochim Biophys Acta* 2016, **1857**:1715-1725.
A review integrating metabolite transport and signaling at different scales, highlighting interesting paths to improving yield and drought tolerance.
30. IPCC: In *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team]*. Edited by Pachauri RK, Meyer LA. Geneva, Switzerland: IPCC; 2014. 151 pp.
31. IPCC *et al.*: In *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: AR5 WG2 A, Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II (WG2) to the Fifth Assessment Report (AR5) of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Edited by Field CB. Cambridge University Press; 2016. Archived from the original on 28 April 2016.
32. Smith MR, Myers SS: **Impact of anthropogenic CO₂ emissions on global human nutrition.** *Nat Clim Change* 2018, **8**:834-839 <http://dx.doi.org/10.1038/s41558-018-0253-3>.
33. Ainsworth EA, Long SP: **What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy.** *New Phytol* 2005, **165**:351-371 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01224.x>.
34. Fitzgerald GJ, Tausz M, O'Leary G, Mollah MR, Tausz-Posch S, Seneweera S, Mock I, Löw M, Partington DL, McNeill D, Norton RM: **Elevated atmospheric [CO₂] can dramatically increase wheat yields in semi-arid environments and buffer against heat waves.** *Global Change Biol* 2016, **22**:2269-2284 <http://dx.doi.org/10.1111/gcb.13263>.
A remarkable FACE multi-E (sites, years, sowing dates, water regime) data resource for wheat informing on e-CO₂ interactions with heat and water limitation.
35. Hasegawa T, Li T, Yin X, Zhu Y, Boote K, Baker J, Bregaglio S, Buis S, Confalonieri R, Fugice J *et al.*: **Causes of variation among rice models in yield response to CO₂ examined with free-air CO₂ enrichment and growth chamber experiments.** *Nat Sci Rep* 2017, **7** <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13582-y> 14858.
36. Lv C, Huang Y, Sun W, Yu L, Zhu J: **Response of rice yield and yield components to elevated [CO₂]: a synthesis of updated data from FACE experiments.** *Eur J Agron* 2020, **112** 125961.
On the basis of a formidable data resource from FACE trials in China, the authors describe rice subspecies differences in e-CO₂ response. They are in part explained by sink trait plasticity.
37. Haworth M, Hoshika Y, Killi D: **Has the impact of rising CO₂ on plants been exaggerated by meta-analysis of free air CO₂ enrichment studies?** *Front Plant Sci* 2016 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01153>.
38. Allen LH, Kimball BA, Bunce JA, Yoshimoto M, Harazono Y, Baker JT, Boote KJ, White JW: **Fluctuations of CO₂ in free-air CO₂ enrichment (FACE) depress plant photosynthesis, growth, and yield.** *Agric For Meteorol* 2020, **284**:107899.
39. Ainsworth EA, Rogers A, Nelson R, Long SP: **Testing the source-sink hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitutions in Glycine max.** *Agric For Meteorol* 2004, **122**:85-94 <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.09.002>.
40. Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, Nakamura H, Zhu C, Usui Y, Yoshimoto M, Fukuoka M, Wakatsuki H, Katayanagi N *et al.*: **Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂ enrichment (FACE) sites in Japan.** *Funct Plant Biol* 2013, **40**:148-159.
A surprising diversity of cultivar yield responses to e-CO₂, explained in part by sink traits, shows that breeding for e-CO₂ response will not need archaic or weedy traits. Look also at the other papers of Hasegawa's group.
41. Chang T-G, Zhu X-G: **Source-sink interaction: a century old concept under the light of modern molecular systems biology.** *J Exp Bot* 2017, **68**:4417-4431 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erx002>.
42. Tausz M, Posch S, Norton RM, Fitzgerald GJ, Nicolas ME, Seneweera S: **Understanding crop physiology to select breeding targets and improve crop management under increasing atmospheric CO₂ concentrations.** *Environ Exp Bot* 2013, **88**:71-80 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envenxpbot.2011.12.005>.
43. Von Caemmerer S, Farquhar GD: **Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves.** *Planta* 1981, **153**:376-387.
44. Sage RF, Sharkey TD, Seemann JR: **Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C3 species.** *Plant Physiol* 1989, **89**:590-596.
45. Nackley LL, Jeong JH, Oki LR, Kim S-H: **Photosynthetic acclimation, biomass allocation, and water use efficiency of garlic in response to carbon dioxide enrichment and nitrogen fertilization.** *J Am Soc Hort Sci* 2016, **141**:373-380.
46. Usuda H, Shimogawara K: **The effects of increased atmospheric carbon dioxide on growth, carbohydrates, and photosynthesis in radish, Raphanus sativus.** *Plant Cell Physiol* 1998, **39**:1-7.
47. Zheng Y, Li F, Hao L, Yu J, Guo L, Zhou H, Ma C, Zhang X, Xu M: **Elevated CO₂ concentration induces photosynthetic down-regulation with changes in leaf structure, non-structural carbohydrates and nitrogen content of soybean.** *BMC Plant Biol* 2019, **19**:255 <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-019-1788-9>.
48. Paul MJ, Pellny TK: **Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development.** *J Exp Bot* 2003, **54**:539-547.
49. Huber SC, Huber JL: **Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves.** *Plant Physiol* 1992, **99**:1275-1278.
50. Iglesias DJ, Lliso I, Tadeo FR, Talon M: **Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves.** *Physiol Plant* 2002, **116**:563-572.

51. Li T, Hasegawa T, Yin X, Zhu Y, Boote K, Adam M, Bregaglio S, Buis S, Confalonieri R, Fumoto T *et al.*: **Uncertainties in predicting rice yield by current crop models under a wide range of climatic conditions.** *Global Change Biol* 2015, **21**:1328-1341.
52. Yang JT, Preiser AL, Li Z, Weise SE, Sharkey TD: **Triose phosphate use limitation of photosynthesis: short-term and long-term effects.** *Planta* 2016, **243**:687-698.
53. Sharkey TD, Berry JA, Sage RF: **Regulation of photosynthetic electron-transport in *Phaseolus vulgaris* L., as determined by room-temperature chlorophyll a fluorescence.** *Planta* 1988, **176**:415-424.
54. McClain AM, Sharkey TD: **Triose phosphate utilization and beyond: from photosynthesis to end product synthesis.** *J Exp Bot* 2019, **70**:1755-1766.
- This paper elucidates regulatory processes that help avoid damage to the photosynthetic system under sink limitation.
55. Sharkey TD: **Is triose phosphate utilization important for understanding photosynthesis?** *J Exp Bot* 2019, **70**:5521-5525.
56. Kirschbaum MUF: **Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies.** *Plant Physiol* 2011, **155**:117-124.
57. Fatichi S, Leuzinger S, Körner C: **Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink-driven vegetation modeling.** *New Phytol* 2013, **201**:1086-1095.
58. Fabre D, Dingkuhn M, Yin X, Clément-Vidal A, Roques S, Soutiras A, Luquet D: **Genotypic variation in morphological source and sink traits affects the response of rice photosynthesis and growth to elevated atmospheric CO₂.** *Plant Cell Environ* 2020, **43**:579-593 <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13693>.
- The authors describe a promising proxy trait for selecting for greater e-CO₂ response. Requires field validation.
59. Chen Y, Yuan L-P, Wang X-H, Zhang D-Y, Chen J, Deng Q-Y, Zhao B-R, Xu D-Q: **Relationship between grain yield and leaf photosynthetic rate in super hybrid rice.** *J Plant Physiol Mol Biol* 2007, **33**:235-243.
60. Kumar U, Laza MR, Soulie J-C, Pasco R, Mendez KVS, Dingkuhn M: **Phenotypic plasticity of irrigated rice: sequential path analysis of yield components and simulation with the SAMARA crop model.** *Field Crops Res* 2016, **193**:164-177.
- Hierarchical developmental plasticity of sequentially formed yield components is modelled here at crop scale. Approach potentially applicable to e-CO₂ response and underlying traits.
61. Kumar U, Laza MR, Soulie J-C, Pasco R, Mendez KVS, Dingkuhn M: **Analysis and simulation of phenotypic plasticity for traits contributing to yield potential in twelve rice genotypes.** *Field Crops Res* 2017, **202**:94-107.
62. Tang L, Ma W, Noor MA, Li L, Hou H, Zhang X, Zhao M: **Density resistance evaluation of maize varieties through new "Density-Yield Model" and quantification of varietal response to gradual planting density pressure.** *Nat Sci Rep* 2018, **8**:17281 <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-35275-w>.
63. Acreche MM, Slafer GA: **Grain weight response to increases in number of grains in wheat in a Mediterranean area.** *Field Crops Res* 2009, **98**:52-59.
64. Kikuchi S, Bheemanahalli R, Jagadish KSV, Kumagai E, Masuya Y, Kuroda E, Raghavan C, Dingkuhn M, Shimono AA, Shimono H: **Genome-wide association mapping for phenotypic plasticity in rice.** *Plant Cell Environ* 2017, **40**:1565-1575 <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12955>.
65. Kumagai E, Aoki N, Masuya Y, Shimono H: **Phenotypic plasticity conditions the response of soybean seed yield to elevated atmospheric CO₂ concentration.** *Plant Physiol* 2015, **169**:2021-2029.
- This is probably the strongest published evidence so far that compensatory growth plasticity under differential crop spacing is predictive of e-CO₂ response. Similar: Kikuchi *et al.* [64].
66. Zhu C, Zhu J, Cao J, Jiang Q, Liu G, Ziska LH: **Biochemical and molecular characteristics of leaf photosynthesis and relative seed yield of two contrasting rice cultivars in response to elevated [CO₂].** *J Exp Bot* 2014, **65**:6049-6056.
67. Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y: **Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs.** *J Exp Bot* 2011, **62**:1715-1729.
- The uncoupling of growth from photosynthesis under drought described here may in part explain a poor e-CO₂ response under drought (Fitzgerald *et al.* [34•]) and the strong impact under drought of T6P sink boosting (Nuccio *et al.* [24•]).
68. Tausz-Posch S, Dempsey RW, Seneweera S, Norton RM, Fitzgerald G, Tausz M: **Does a freely tillering wheat cultivar benefit more from elevated CO₂ than a restricted tillering cultivar in a water-limited environment?** *Eur J Agron* 2015, **64**:21-28.
69. Tausz-Posch S, Norton RM, Seneweera S, Fitzgerald GJ, Tausz M: **Will intra-specific differences in transpiration efficiency in wheat be maintained in a high CO₂ world? A FACE study.** *Physiol Plant* 2012, **148**:232-245.
70. Shimono H, Okada M, Inoue M, Nakamura H: **Diurnal and seasonal variations in stomatal conductance of rice at elevated atmospheric CO₂ under open-air conditions.** *Plant Cell Environ* 2019, **33**:322-331.
71. Yoshimoto M, Fukuoka M, Hasegawa T, Utsumi M, Ishigooka Y, Kuwagata T: **Integrated micrometeorology model for panicle and canopy temperature (IM2PACT) for rice heat stress studies under climate change.** *J Agric Meteorol* 2011, **67**:233-247.
72. Caine RS, Yin X, Sloan J, Harrison EL, Mohammed U, Fulton T, Biswal AK, Dionora J, Chater CC, Coe RA *et al.*: **Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions.** *New Phytol* 2019, **221**:371-384 <http://dx.doi.org/10.1111/nph.15344>.
- The authors show that water saving via lower stomatal density has negligible tradeoffs with photosynthetic rate under e-CO₂ while helping to avoid drought. This may be an alternative strategy to make crops benefit from rising [CO₂].
73. Mohammed U, Caine RS, Atkinson JA, Harrison EL, Wells D, Chater CC, Gray JE, Swarup R, Murchie EH: **Rice plants overexpressing *OsEPF1* show reduced stomatal density and increased root cortical aerenchyma formation.** *Nat Sci Rep* 2019, **9**:5584.
74. Caizhe P, Ahammed GJ, Li X, Shi K: **Elevated CO₂ improves photosynthesis under high temperature by attenuating the functional limitations to energy fluxes, electron transport and redox homeostasis in tomato leaves.** *Front Plant Sci* 2018 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01739>.
75. Pan C, Ahammed GJ, Li X, Shi K: **Elevated CO₂ improves photosynthesis under high temperature by attenuating the functional limitations to energy fluxes, electron transport and redox homeostasis in tomato leaves.** *Front Plant Sci* 2018, **9**:1739 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01739>.
76. Posch BC, Kariyawasam BC, Bramley H, Coast O, Richards RA, Reynolds MP, Trethowan R, Atkin OK: **Exploring high temperature responses of photosynthesis and respiration to improve heat tolerance in wheat. Review.** *J Exp Bot* 2019, **70**:5051-5069 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erz257>.
77. Cai C, Yin X, He S, Jiang WSC, Struik PC, Luo W, Li G, Xie Y, Xiong Y, Pan X: **Responses of wheat and rice to factorial combinations of ambient and elevated CO₂ and temperature in FACE experiments.** *Global Change Biol* 2016, **22**:856-874.
- This is the most rigorous field study on e-CO₂ x temperature interactions to our knowledge. It confirms a modest e-CO₂ alleviation of heat stress but highlights the strong impact of heat.
78. Cai C, Li G, Di L, Ding Y, Fu L, Guo X, Struik PC, Pan G, Chen W, Luo W, Yin X: **The acclimation of leaf photosynthesis of wheat and rice to seasonal temperature changes in T-FACE environments.** *Global Change Biol* 2019, **26**:539-556 <http://dx.doi.org/10.1111/gcb.14830>.
79. Makino A: **Rubisco and nitrogen relationships in rice: leaf photosynthesis and plant growth.** *Soil Sci Plant Nutr* 2003, **49**:319-327.

80. Kant S, Seneweera S, Rodin J, Materne M, Burch D, Rothstein SJ, Spangenberg G: **Improving yield potential in crops under elevated CO₂: integrating the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies.** *Front Plant Sci* 2012, **3**.
81. Weber APM, Bar-Even A: **Update: improving the efficiency of photosynthetic carbon reactions.** *Plant Physiol* 2019, **179**:803-812.
82. Maphosa L, Fitzgerald GJ, Panozzo J, Partington D, Walker C, Kant S: **Genotypic response of wheat under semi-arid conditions showed no specific responsive traits when grown under elevated CO₂.** *Plant Prod Sci* 2019, **22**.
83. Myers SS, Zanobetti A, Kloog I, Huybers P, Leakey ADB, Bloom AJ, Carlisle E, Dieterich LH, Fitzgerald G, Hasegawa T *et al.*: **Increasing CO₂ threatens human nutrition.** *Nature* 2014, **510**:139-142 <http://dx.doi.org/10.1038/nature13179>.
84. Bloom AJ: **The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources.** *Curr Opin Plant Biol* 2015, **25**:10-16 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.03.002>.
85. Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, Usui Y, Nakamura I, Wakatsuki H, Chen CP, Ikawa H, Zhang G, Nakano H *et al.*: **A high-yielding rice cultivar "Takanari" shows no N constraints on CO₂ fertilization.** *Front Plant Sci* 2019 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00361>. 15 pages.
The authors present a high-yielding variety that overcomes both sink-limitation and N-limitation under e-CO₂ through trait plasticity. This benefits both yield and grain quality.
86. Sakai H, Tokida T, Usui Y, Nakamura H, Hasegawa T: **Yield responses to elevated CO₂ concentration among Japanese rice cultivars released since 1882.** *Plant Prod Sci* 2019, **22** <http://dx.doi.org/10.1080/1343943X.2019.1626255>.
The authors find that not the age of the cultivar but its capacity to adjust its N uptake may determine yield response to e-CO₂.
87. Uddin S, Löw M, Parvin S, Fitzgerald GJ, Tausz-Posch S, Armstrong R, O'Leary G, Tausz M: **Elevated [CO₂] mitigates the effect of surface drought by stimulating root growth to access sub-soil water.** *PLoS One* 2018, **22**:38-51 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0198928>.
The role of root sinks and root growth in e-CO₂ response is understudied. This paper reports root growth stimulation contributing to drought avoidance.
88. Arp WJ: **Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂.** *Plant Cell Environ* 1991, **14**:869-875.
89. Bourgault M, James AT, Dreccer MF: **Pot size matters revisited: does container size affect the response to elevated CO₂ and our ability to detect genotypic variability in this response in wheat?** *Funct Plant Biol* 2016, **44**:52-61 <http://dx.doi.org/10.1071/FP16047>.
90. Poorter H, Böhler J, Van Dusschoten D, Climent J, Postma JA: **Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth.** *Funct Plant Biol* 2012, **39**:839-850.
91. Ainsworth EA, Leakey ADB, Ort DR, Long SP: **FACE-ing the facts: inconsistencies and interdependence among field, chamber and modelling [CO₂] impacts on crop yield and food supply.** *New Phytol* 2008, **179**:5-9.
92. Weiner J: **Looking in the wrong direction for higher-yield crop genotypes.** *Trends Plant Sci* 2019, **24**:927-933.
93. Anten NPR, Vermeulen PJ: **Tragedies and crops: understanding natural selection to improve cropping systems.** *Trends Ecol Evol* 2016, **31**:429-439 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.010>.
94. Preece C, Clamp NF, Warham G, Charles M, Rees M, Jones G, Osborne CP: **Cereal progenitors differ in stand harvest characteristics from related wild grasses.** *J Ecol* 2018, **106**:1286-1297 <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2745.12905>.
Results suggest (implicitly) that the initial choice of species for domestication already followed Donald's [95] crop ideotype principle of restrained plasticity. Consider this data in conjunction with Burnett *et al.* [100] and Zhang *et al.* [128].
95. Donald CM: **The breeding of crop ideotypes.** *Euphytica* 1968, **17**:385-403.
96. White A, Rogers A, Rees M, Osborne CP: **How can we make plants grow faster? A source-sink perspective on growth rate.** *Review. J Exp Bot* 2016, **67**:31-45 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv447>.
This review is significant as it calls for the integration of N in the C-centric debate on source-sink optimization.
97. Rogers A, Ainsworth EA: **The response of foliar carbohydrates to elevated [CO₂].** In *Managed Ecosystems and CO₂: Case Studies, Processes, and Perspectives*. Edited by Nösberger J, Long S, Norby R, Stitt M, Blum H. 2006:293-308 <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-31237-4>.
98. Legros S, Mialet-Serra I, Clement-Vidal A, Caliman JP, Siregar F, Fabre D, Dingkuhn M: **Phenology, growth and physiological adjustments of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) to sink limitation induced by fruit pruning.** *Ann Bot* 2009, **104**:1183-1194.
99. Legros S, Mialet-Serra I, Clement-Vidal A, Caliman JP, Siregar F, Fabre D, Dingkuhn M: **Role of transitory carbon reserves during adjustment to climate variability and sink-source imbalances in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.).** *Tree Physiol* 2009, **29**:1199-1211.
100. Burnett AC, Rogers A, Rees M, Osborne CP: **Carbon source-sink limitations differ between two species with contrasting growth strategies.** *Plant Cell Environ* 2016, **39**:2460-2472.
An interesting comparison of a cultivated (sink limited) versus wild (source limited) barley at 180, 400 and 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ [CO₂]. The wild acclimatizes less because it has more plastic sinks.
101. Isopp H, Frehner M, Long SP, Nösberger J: **Sucrose-phosphate synthase responds differently to source-sink relations and to photosynthetic rates: *Lolium perenne* L. growing at elevated pCO₂ in the field.** *Plant Cell Environ* 2000, **23**:597-607.
102. Ziska LH, Tomecek MB, Gealy DR: **Assessment of cultivated and wild, weedy rice lines to concurrent changes in CO₂ concentration and air temperature: determining traits for enhanced seed yield with increasing atmospheric CO₂.** *Funct Plant Biol* 2013, **41**:236-243 <http://dx.doi.org/10.1071/FP13155>.
Evidence that early tillering response to e-CO₂ is predictive of yield response, indicating that vegetative-stage sink plasticity contributes to it.
103. Clerget B, Dingkuhn M, Goze E, Rattunde HFW, Ney B: **Variability of phyllochron, plastochron and rate of increase in height in photoperiod-sensitive sorghum varieties.** *Ann Bot* 2008, **101**:579-594.
104. Slewinski TL: **Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production.** *J Exp Bot* 2012, **63**:4647-4670 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers124>.
105. Huang G, Liang W, Sturrock CJ, Pandey BK, Giri J, Mairhofer S, Wang D, Muller L, Tan H, York LM *et al.*: **Rice actin binding protein RMD controls crown root angle in response to external phosphate.** *Nat Commun* 2018, **9**:2346.
106. Setter TL, Conocono EA, Egdane JA, Kropff MJ: **Possibility of increasing yield potential of rice by reducing panicle height in the canopy. I. Effects of panicles on light interception and canopy photosynthesis.** *Aust J Plant Physiol* 1995, **22**:441-451.
107. Dingkuhn M, Penning de Vries FWT, De Datta SK, van Laar HH: **Concepts for a new plant type for direct seeded flooded tropical rice.** *Direct Seeded Flooded Rice in the Tropics*. P.O. Box 933, Manila, Philippines, 17-38: International Rice Research Institute; 1991.
108. Yuan LP: **Progress in super-hybrid rice breeding.** *Crop J* 2017, **5**:100-102.
109. Gu J, Yin X, Zhang C, Wang H, Struik PC: **Linking ecophysiological modelling with quantitative genetics to support marker-assisted crop design for improved yields of rice (*Oryza sativa*) under drought stress.** *Ann Bot* 2014, **114**:499-511.
110. Kadam NN, Jagadish KSV, Struik PC, van der Linden GC, Yin X: **Incorporating genome-wide association into eco-physiological simulation to identify markers for improving rice yields.** *J Exp Bot* 2019, **70**:2575-2586.

111. Sakai H, Hasegawa T, Kobayashi K: **Enhancement of rice canopy carbon gain by elevated CO₂ is sensitive to growth stage and leaf nitrogen concentration.** *New Phytol* 2006, **170**:321-332.
112. Kim HY, Lieffering M, Kobayashi K, Okada M, Miura S: **Seasonal changes in the effects of elevated CO₂ on rice at three levels of nitrogen supply: a free air CO₂ enrichment (FACE) experiment.** *Global Change Biol* 2003, **9**:826-837.
113. Yin X: **Improving ecophysiological simulation models to predict the impact of elevated atmospheric CO₂ concentration on crop productivity.** *Ann Bot* 2013, **112**:465-475.
114. Yin X, Schapendonk AHCM, Struik PC: **Exploring the optimum nitrogen partitioning to predict the acclimation of C₃ leaf photosynthesis to varying growth conditions.** *J Exp Bot* 2019, **70**:2435-2447.
115. Parent B, Tardieu F: **Can current crop models be used in the phenotyping era for predicting the genetic variability of yield of plants subjected to drought or high temperature?** *J Exp Bot* 2014, **65**:6179-6189.
116. Muller B, Martre P: **Plant and crop simulation models: powerful tools to link physiology, genetics, and phenomics.** *J Exp Bot* 2019, **70**:2339-2344.
117. Matsui T, Namuco OS, Ziska LH, Horie T: **Effects of high temperature and CO₂ concentration on spikelet sterility in indica rice.** *Field Crops Res* 1997:213-219.
118. Julia C, Dingkuhn M: **Predicting temperature induced sterility of rice spikelets requires simulation of crop-generated microclimate.** *Eur J Agron* 2013, **49**:50-60.
119. Driever SM, Lawson T, Andralojc PJ, Raines CA, Parry MAJ: **Natural variation in photosynthetic capacity, growth, and yield in 64 field-grown wheat genotypes.** *J Exp Bot* 2014, **65**:4959-4973.
120. Baumont M, Parent B, Manceau L, Brown H, Driever SM, Muller B, Martre P: **Experimental and modeling evidence of carbon limitation of leaf appearance rate for spring and winter wheat.** *J Exp Bot* 2019, **70**:2449-2462.
121. Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul MJ: **Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilisation and growth in *Arabidopsis thaliana*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:6849-6854.
122. Zhang Y, Primavesi LF, Jhureea D, Mitchell R, Powers S, Schluepmann H, Delatte T, Winkler A, Paul MJ: **Inhibition of Snf1-related protein kinase (SnRK1) activity and regulation of metabolic pathways by trehalose 6-phosphate.** *Plant Physiol* 2009, **149**:1860-1871.
123. Hufford MB, Xu X, van Heerwaarden J, Pyhajarvi T, Chia J-M, Cartwright RA, Elshire RJ, Glaubitz JC, Guill KE, Kaeppeler SM *et al.*: **Comparative population genomics of maize domestication and improvement.** *Nat Genet* 2012, **44**:808-811 <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2309>.
124. Griffiths CA, Sagar R, Geng Y, Primavesi LF, Patel MK, Passarelli MK, Gilmore IS, Stevens RT, Buncj J, Paul MJ, Davis BG: **Chemical intervention in plant sugar signalling increases yield and resilience.** *Nature* 2016, **540**:574-578 <http://dx.doi.org/10.1038/nature20591>.
125. Ainsworth EA, Rogers A, Leakey ADB: **Targets for crop biotechnology in a future high-CO₂ and high-O₃ world.** *Plant Physiol* 2008, **147**:13-19.
126. Korres NE, Norsworthy JK, Tehranchian P, Gitsopoulos TK, Loka DA, Oosterhuis DM, Gealy DR, Moss SR, Burgos NR, Miller MR, Palhano MP: **Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: a review.** *Agron Sustain Dev* 2016, **36**:12. HAL Id: hal-01532407 <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01532407>.
127. Leakey ADB, Uribealarea M, Ainsworth EA, Naidu SL, Rogers A, Ort DR, Long SP: **Photosynthesis, productivity, and yield of maize are not affected by open-air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought.** *Plant Physiol* 2006, **140**:779-790.
128. Zhang D-Y, Sun G-J, Jiang X-H: **Donald's ideotype and growth redundancy: a game theoretical analysis.** *Field Crops Res* 1999, **61**:179-187.

Résumé :

L'augmentation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone (eCO₂) associée au changement climatique pourrait affecter les processus physiologiques fondamentaux des plantes et par là, les rendements agricoles. Les céréales de type C₃ comme le riz présentent une réponse génotypique variable du niveau de photosynthèse ainsi que de la production en biomasse et en grain au eCO₂. Cela suggère une variabilité génétique à la fois dans la réponse des organes sources (feuilles) et puits (en croissance ou de réserve) en carbone (C). Concevoir des génotypes optimisant les relations sources-puits en C pourrait donc contribuer à augmenter la production des cultures dans des climats futurs. Cependant, l'étude de ces relations et des rétroactions en jeu reste complexe, car impliquent de nombreux processus physiologiques et biochimiques agissant au niveau des organes source ou puits en C impactant le fonctionnement de la plante entière. Comprendre le lien entre ces processus et ces échelles biologiques est de fait un enjeu majeur à relever.

Cette thèse a pour objectif d'explorer, par une approche intégrative de la biochimie de l'organe (métabolisme carboné) à la croissance de la plante entière, l'impact des relations sources-puits en C sur la régulation de la photosynthèse. Elle s'intéresse en particulier à la limitation par TPU (Trioses-Phosphates Utilization), un paramètre peu étudié de la photosynthèse qui pourrait intervenir à cette interface.

Une expérimentation a été menée sur un génotype de riz (IR64) pour étudier la dynamique des paramètres photosynthétiques au long de la journée, dans des situations contrastées d'équilibre source-puits en C en phase de remplissage des grains. Pour cela, des plants contrôlés ont été comparés à des plants pour lesquels la panicule du brin maître a été supprimée (limitation de puits) sous deux conditions de CO₂ : 400ppm et 800ppm pendant 14 jours à partir d'épiaison (augmentation de la source). Les paramètres photosynthétiques ont été mesurés sur la feuille drapeau du brin maître, puis cette feuille et l'entrenoeud adjacent ont simultanément été prélevés pour le dosage des teneurs en sucres non structuraux. Une diminution de la photosynthèse en fin de journée a pu être observée ; celle-ci était proportionnelle à la limitation de l'utilisation du C par les puits, en particulier en situation d'ablation de panicule et à 800ppm de [CO₂]. TPU s'est avéré le paramètre photosynthétique le plus explicatif de cette variation journalière de photosynthèse. Une corrélation négative a été mise en évidence entre TPU et deux indicateurs d'une limitation de la capacité de puits de la plante : la concentration en saccharose de la feuille drapeau (source), et le rapport entre la surface foliaire de la feuille drapeau du brin maître (source) avec le nombre d'épillets de la panicule adjacente (puits), appelé ratio source-puits local en C.

Une seconde expérimentation a été conduite pour évaluer la variabilité génétique de ces résultats. Pour cela, cinq variétés de riz de type *indica* contrastant pour le ratio source-puits local en C ont été comparées sous CO₂ ambiant (400ppm) et élevé (800ppm à partir d'épiaison, mais aussi sur le cycle complet. Une relation négative entre ce ratio et la réponse i) de la capacité photosynthétique à l'augmentation du CO₂ (représentative de TPU), ii) de la production de biomasse aérienne et de grain, a pu être observée. Ce résultat suggère le rôle clef de la capacité et de la plasticité phénotypique des puits en C dans la réponse au eCO₂ chez le riz et plus largement pour les espèces C₃.

Ces résultats soulignent le rôle pivot et intégrateur que peut jouer le paramètre TPU pour expliquer les variations de photosynthèse en lien avec l'équilibre sources-puits en C de la plante. Il est discuté pourquoi et comment ce paramètre devrait être davantage pris en compte dans les modèles de croissance des plantes et peuplements en vue de mieux prédire les rendements sous les climats futurs. Ces résultats sont également discutés en termes de pistes de recherche et d'applications à venir dans un contexte d'évaluation et amélioration variétale.

Mots clefs : Changement climatique, augmentation du CO₂, photosynthèse, plasticité phénotypique, riz, ratio sources-puits, saccharose, trioses-phosphates utilisation (TPU).

Abstract :

The increase in atmospheric carbon dioxide (eCO₂) concentration associated with climate change could affect plant physiological processes and thereby crop productivity. C₃-type cereals such as rice exhibit variable genotypic response to eCO₂ in terms of photosynthesis, biomass and grain production. This suggests that genetic variability exists in the response to CO₂ of both carbon (C) source (leaves) and sink (growing, storing) organs. Designing genotypes optimizing C source-sink relationships could therefore contribute to increasing crop productivity in future climates. However, studying these relationships and related feedbacks remains complex, as they involve numerous physiological and biochemical processes acting at the level of both C source or sink organs together affecting the whole plant functioning and growth. Understanding the links between these processes and biological scales is therefore a challenge to be tackled.

The aim of this thesis is to explore, based on an integrative approach from organ biochemistry (C metabolism) to the whole plant growth, the impact of C source-sink relationships on the regulation of photosynthesis. A particular focus will be done on TPU limitation (Trioses-Phosphates Utilization), an understudied photosynthesis parameter that could act at this interface.

An experiment was carried out on a single rice genotype (IR64) to study the diurnal dynamics of photosynthetic parameters under contrasted situations of plant C source-sink balance during grain filling. Control plants were compared to plants with the panicle pruned on the main stem (sink limitation) under two CO₂ conditions: 400ppm and 800ppm (source increase) for 14 days from heading. Photosynthetic parameters were measured on the flag leaf of the main stem. This leaf and adjacent internode were simultaneously sampled in order to analyze nonstructural sugar contents. Photosynthesis exhibited a decrease at the end of the day; this decrease was proportional to the C sink limitation and was thus the most pronounced for panicle pruned plants at 800ppm of [CO₂]. TPU appeared as the most explicative parameter of photosynthesis regulation by C sink limitation. In addition, a negative correlation was found between TPU and two indicators of a limitation of plant C sink capacity: flag (source) leaf sucrose concentration, and the ratio between the flag leaf area of the main stem (source) and grain number on the adjacent panicle (sink), called the local C source-sink ratio.

A second experiment was carried out to assess the genetic variability of these results. Five *indica*-type rice cultivars, contrasting in above-mentioned local C source-sink ratio, were compared under ambient (400ppm) and eCO₂ (800ppm from heading, but also over the whole cycle). A negative relationship between this ratio and the response to eCO₂ of i) photosynthetic capacity (representative of TPU), ii) above-ground biomass and grain production, was observed. These results suggested the key role of C sink capacity and phenotypic plasticity in enhancing rice productivity and more broadly C₃ species under eCO₂.

This work highlights the key role played by TPU in explaining photosynthetic variations in response to plant C source-sink balance. It is discussed why and how this parameter should be further considered in plant and crop growth models in order to better predict yields in future climates. Results are also discussed with respect to future research and application avenues in the context of plant evaluation and breeding.

Keywords: Climate change, CO₂ enrichment, photosynthesis, rice, sink feedback, source-sink, sucrose, triose phosphate utilization (TPU).