



HAL
open science

Characterization and modeling of residual transpiration in the tolerance mechanisms of trees to extreme hydric and thermal stress

Lise-Marie Billon Mallaret

► **To cite this version:**

Lise-Marie Billon Mallaret. Characterization and modeling of residual transpiration in the tolerance mechanisms of trees to extreme hydric and thermal stress. *Vegetal Biology*. Université Clermont Auvergne, 2022. English. NNT : 2022UCFAC128 . tel-04649068

HAL Id: tel-04649068

<https://theses.hal.science/tel-04649068>

Submitted on 16 Jul 2024

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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement

Université Clermont-Auvergne

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité *Biologie végétale*

Lise-Marie Billon Mallaret

Caractérisation et modélisation de la transpiration résiduelle dans les mécanismes de tolérance des arbres aux stress hydriques et thermiques extrêmes

Soutenue publiquement le 08 décembre 2022

Présidente du jury

Valérie LEGUÉ, Professeure des Universités, Université Clermont Auvergne

Rapporteurs

Claire DAMESIN, Professeure des Universités, Université Paris Saclay

Jérôme JOUBÈS, Professeur des Universités, Université de Bordeaux

Directeur de thèse

Hervé COCHARD, Directeur de Recherche, INRAE Clermont Ferrand

Invités

Adnane HITMI, (Co-directeur de thèse), MCU-HDR, Université Clermont Auvergne

José Manuel TORRES-RUIZ, Chargé de Recherche, INRAE Clermont Ferrand

Résumé

Le réchauffement climatique et ses impacts sur notre Planète sont de nos jours de plus en plus documentés et pris en compte, en grande partie grâce aux travaux du GIEC. Entre autres effets, notre climat tempéré va subir des modifications induisant des événements de sécheresse de plus en plus intenses et longs, souvent couplés à des vagues de chaleur. C'est sur l'impact de ces événements sur la mortalité des arbres que s'est inscrit ce projet. Lors d'événements de sécheresse, la mortalité des arbres est majoritairement due à une défaillance hydraulique causée par la cavitation au sein des vaisseaux du xylème. La résistance à la cavitation des espèces (P_{50}) ainsi que la conductance stomatique (g_s) sont des traits hydrauliques très étudiés, cependant, même après fermeture stomatique, la plante continue de perdre de l'eau de façon résiduelle (g_{res}) provoquant une défaillance hydraulique en cas de sécheresse prolongée. Dans les cas de sécheresse à températures élevées, la conductance résiduelle augmente jusqu'à une certaine température (T_p) à partir de laquelle la barrière hydrique n'est plus efficace, la plante se dessèche plus rapidement.

Des modèles de prédiction, tels que le modèle *SurEau*, permettent de simuler le temps de défaillance hydraulique des plantes en réponses à des événements de sécheresse et/ou vague de chaleur. Ce modèle a pu être validé par une expérimentation sur des plantes en pot placées sur une plateforme de phénotypage. Cette expérimentation a par ailleurs permis de mettre en avant les principaux traits hydrauliques impliqués dans le temps de défaillance hydraulique (g_{res} , T_p , Q_{10} , P_{50} et g_{s88}). Outre P_{50} et g_{s88} , les traits g_{res} , T_p et Q_{10} sont calculable à partir d'une seule courbe, la courbe de déshydratation de branches, réalisable de façon autonome et aisée grâce à un outil développé spécialement pour : la DroughtBox.

Les facteurs induisant des différences au niveau du g_{res} ou du T_p entre espèces sont encore peu connues, encore moins pour les espèces des climats tempérés. Des études de chimie et de physique au niveau des cires cuticulaires foliaires ont permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs composés chimiques dans ces deux traits hydrauliques. Cependant, il est difficile d'attribuer des rôles spécifiques à chaque famille de composés chimiques, l'arbre, avec toutes les interactions qu'il peut présenter à différents niveaux (des racines jusqu'aux cires cuticulaires foliaires), devant être prise en compte dans son ensemble.

Mots clés : Réchauffement climatique, sécheresse, vague de chaleur, mortalité, temps de défaillance hydraulique, transpiration résiduelle, T_p , modélisation, *SurEau*, cires cuticulaires.

Abstract

Global warming and its impacts on our Planet are nowadays more and more documented and taken into account, largely thanks to the work of the IPCC. Among other effects, our temperate climate will undergo changes leading to increasingly intense and long drought events, often coupled with heat waves. This project focuses on the impact of these events on tree mortality. During drought events, tree mortality is mainly due to hydraulic failure caused by cavitation within the xylem vessels. Species cavitation resistance (P50) and stomatal conductance (g_s) are well-studied hydraulic traits, however, even after stomatal closure, the plant continues to lose water residually (g_{res}) causing hydraulic failure during prolonged drought. In high temperature drought events, residual conductance increases up to a certain temperature (T_p) after which the water barrier is no longer effective and the plant dries out more rapidly.

Predictive models, such as the *SurEau* model, can simulate the hydraulic failure time of plants in response to drought and/or heat wave events. This model has been validated through experimentation on potted plants placed on a phenotyping platform. This experimentation furthermore highlighted the main hydraulic traits involved in time to hydraulic failure (g_{res} , T_p , Q_{10} , P50, and g_{s88}). Besides P50 and g_{s88} , the g_{res} , T_p and Q_{10} traits can be calculated from a single curve, the branch dehydration curve, which can be carried out autonomously and easily thanks to a tool specially developed for this purpose: the DroughtBox.

The factors inducing differences in g_{res} or T_p between species are still not well known, even less for species from temperate climates. Chemical and physical studies of leaf cuticular waxes have revealed the role of several chemical compounds in these two hydraulic traits. However, it is difficult to assign specific roles to each family of chemical compounds, as the tree, with all the interactions it may present at different levels (from the roots to the leaf cuticle waxes), must be taken into account as a whole.

Keywords: Global warming, drought, heat wave, mortality, time to hydraulic failure, residual transpiration, T_p , modelling, *SurEau*, cuticular waxes.

Remerciements

Enfin !

Tout d'abord, merci aux membres de mon jury de thèse, Valérie Legué, Claire Damesin, Jérôme Joubès, d'avoir accepté de faire partie de ce jury, de lire et évaluer mes travaux et d'avoir fait preuve de compréhension et de patience par rapport aux perturbations rencontrées ces derniers temps.

Merci aussi énormément à mes chefs. Hervé pour tes conseils, ton partage de savoir, ta gentillesse et tes espadrilles, Adnane pour ta joie de vivre, ta disponibilité, ton soutien et tes innombrables corrections, et Torres pour ton écoute, tes conseils, ton aide et nos interminables réunions. Vraiment merci d'avoir fait partie de cette thèse, à chacun vous m'avez apporté quelque chose, et ça n'aurait certainement pas été pareil sans l'un de vous.

Merci à l'équipe *SurEau*, pour votre grande aide. Stéphane H. pour ta bienveillance et pour ton aide dans ma formation scientifique tout au long de mon cursus, Têtè pour la formation chambre à pression, Julien pour ton aide sur tout ce que j'ai pu faire et ta disponibilité, Stéphane A. pour ton aide précieuse en chimie. Philippe aussi, c'est grâce à toi qu'on a pu entreprendre les extractions de cires ! Et tous ceux qui ont été de passage : Chris, Paulo et Fernanda, Danielle et les autres.

Merci à tous les membres du PIAF (INRAE, UCA), encore présents ou déjà partis : (allez on prend une grande inspiration) Bruno, Norbert (à appâter avec des biscuits), Nicolas (ma bestie), Pierre, Romain S., Eric, Marc S. Brigitte SJ., Aline, Jérôme N., Aline, Guillaume, Patrice, Dominique, Sylvie, Pascal, Felix, Nicole, André, Stéphane P., Brigitte G., ... J'en oublie mais vous avez tous participé à ma thèse d'une façon ou d'une autre et je vous en remercie.

Merci également aux membres du laboratoire SIGMA de Clermont qui ont grandement participé à toute la partie chimie de ma thèse : Mohamad Sleiman, Samar et Adéline.

Merci à Nicolas Martin-StPaul, Huguette Sallanon et Mohamad Sleiman pour leurs précieux conseils, leur bienveillance et leur aide lors de mes comités de thèse.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans la présence de mes collègues de bureau... Benjamin et Romain, merci et bravo pour nous avoir supportées pendant tout ce temps avec Marine.

« Dites, est-ce que vous vous envoyez des élastiques quand on n'est pas là ? » $\frac{\text{"OUI"}}{\text{"NON"}}$. Du coup merci pour les boîtes d'élastiques Benjamin ☺

Merci à mes collègues précaires. Ludo, ton rire s'entend dans tout le bâtiment. Cédric, tu as renversé ton café dans tout le bâtiment. Erwan, tu as probablement fait des siestes dans tout le bâtiment.

Un immense merci à mes zouz, mes zoulettes, mes meufs sûres, Marines (encore toi), (Smecta)Lia, Cleubie, Marychou et Lulu. Merci pour ces pauses, ces fous rires, ces moments de perdition totale, ces confidences/histoires de vie, ces coups de main, ces regards de détresse, ces instants créatifs, ces pauses Chatoune ou Michèèèèle Boudiiiiin, ces discussions quasiment toujours orientées sur la bouffe, ce fameux Nesquik le p'tit dej des bilingues, ces grands moments de bitchage, mon entrée dans le club des Châtelains, ces repas composés de quiche/frites/louche de sauce au bleu/Cantal/semoule au chocolat. Merci d'être encore là dans ma vie d'ailleurs. Il est un fait avéré que vous m'avez rendue heureuse. Et Joyeux Grounounoupette.

Un merci à toute ma famille Billon et ma belle-famille Mallaret qui m'ont énormément soutenue. Je dédie cette thèse à mes parents, ce fut long mais on y est enfin arrivé ! J'espère que ce manuscrit arrivera à côté de celui de Papy mais qu'il sera un peu plus compréhensible.

Enfin, last but certainly not least, merci à mon merveilleux mari. Tu m'as écoutée, aidée, pas lâchée, motivée, tout ce qui rime en -é. J'ai une chance incroyable de t'avoir dans ma vie, et même que c'est vrai. Alors arrête. Je n'oublie pas ma Baboune (Jabba, Catherine la Macrotte, Flamme Doudoune, ma Beauté des Îles, Poupoum, Bibounette, Dragon de Grododo et tout autre nom ridicule) parce qu'elle m'a beaucoup écoutée aussi, même si elle m'a jamais répondu.

Liste des abréviations

ACL : Average Chain Length

g_{bark} : conductance de l'écorce

g_{leaf} : conductance de la feuille

g_{min} : conductance minimale

g_{res} : conductance résiduelle

g_{s} : conductance stomatique

LMA : Leaf Mass Area

P12 : Pression dans le xylème induisant 12% de perte de conductance hydraulique
Point de fermeture stomatique

P50 : Pression dans le xylème induisant 50% de perte de conductance hydraulique
Point de défaillance hydraulique pour les conifères

P88 : Pression dans le xylème induisant 88% de perte de conductance hydraulique
Point de défaillance hydraulique pour les feuillus

$P_{g_{\text{s}88}}$: Pression dans le xylème induisant 88% de fermeture stomatique

PLC : Percentage Loss of Conductance

Q_{10a} et Q_{10b} : Pentes de réponse de g_{res} à la température avant et après T_p

SLA : Surface Leaf Area

T_{α} : Temperature of waxes softening

THF : Time to Hydraulic Failure

T_p : Température de transition de phase

Liste des figures

Synthèse Bibliographique

- Figure 1:** Prédiction de l'augmentation de la température globale terrestre en fonction des différents scénarii d'émissions de GES (Roberts et al., 2022). 21
- Figure 2 :** Référencement de la mortalité des arbres en fonction de l'année à partir de la base de données. L'étendue des forêts à la surface du globe ont été représentées par un gradient de hauteurs d'arbres. Les inserts a, b et c montrent la forte densité de mortalité au Canada, en Amérique centrale et au sud-ouest de l'Australie (Hammond et al., 2022). 22
- Figure 3 :** L'origine des forces de tension se trouve dans les feuilles. 26
- Figure 4:** Représentation schématique de l'ouverture/fermeture d'un stomate (Nobel 2020 modifiée). 28
- Figure 5 :** Redirection du flux d'eau (sève brute) dans les vaisseaux fonctionnels grâce aux punctuations, évitant les vaisseaux embolisés V1 et V2 (Cruiziat et al., 2001). 30
- Figure 6 :** Exemple de courbes de vulnérabilité représentant le pourcentage de perte de conductance hydraulique (PLC) en fonction de la pression à l'intérieur des vaisseaux du xylème pour 4 espèces différentes de *Cistus* (Torres-Ruiz et al., 2017). 31
- Figure 7 :** Variations du P50 en fonction des espèces. Les espèces ayant un P50 élevé (proche de 0) sont considérées comme hygrophiles ou vivant dans des milieux humides, à l'inverse, celles ayant un P50 faible sont considérées comme xérophiles donc vivant dans des milieux secs (adapté de la base de données de Lens et al.) 32
- Figure 8 :** Les différents effets d'un stress thermique à différentes échelles de l'arbre. Les flèches indiquent un effet positif ↗ ou négatif ↘ de la chaleur sur le processus associé. La présence de deux flèches indique une variation inter ou intra espèce de l'effet chaleur (Teskey et al., 2015). 34
- Figure 9 :** Cinétique de mortalité des arbres dans des conditions de sécheresse référençant les différents événements amenant à la défaillance hydraulique et à la mortalité de la plante. La double flèche bleue représente la marge de sécurité. 36
- Figure 10 :** Cinétique de perte de masse d'une branche de *Pseudotsuga menziesii* laissée à déshydrater dans un environnement stable à 30°C et 40% d'humidité relative en 3 phases. A : temps de fermeture stomatique d'environ 10 heures, B : perte de masse due à la transpiration résiduelle de 10 à 166 heures et C : teneur en eau minimale de la branche dans les conditions imposées (données personnelles). 37
- Figure 11 :** Cinétiques de déshydratation en pourcentage de contenu en eau relatif pour deux

espèces conifères (*Picea abies* A et *Pseudotsuga menziesii* B) ayant des P50 très proches (données personnelles). 38

Figure 12 : Diagramme schématique mettant en évidence les principales caractéristiques structurales de la cuticule et de la couche cellulaire épidermique sous-jacente. En insert, différents types de surfaces cuticulaires telles que l'absence de cristaux de cires (A), une croûte cireuse (B), des plaquettes à bord réguliers (C) ou un ensemble de cheminées autour des stomates et de fils cireux (D). Modifiée de (Koch and Ensikat, 2008; Yeats and Rose, 2013).

..... 40

Figure 13 : Courbe d'Arrhenius montrant l'évolution de la conductance cuticulaire de *Citrullus colocynthis* en fonction de la température (en K^{-1}). Modifiée de (Bueno et al., 2019a)..... 42

Figure 14 : Simulations du temps de défaillance hydraulique en fonction du temps en conditions de sécheresse démarrant au T0. Le taux de transpiration (en rose) ainsi que le pourcentage de perte de conductance (en noir) ont été simulés pour une plante seulement exposée au stress hydrique. La simulation montre le temps de défaillance hydraulique pour une plante exposée à une vague de chaleur (3 jours à $+15^{\circ}C$) entre 0 et 6 jours (rouge), entre 7 et 12 jours (vert) et 13 jours et plus (bleu) après arrêt d'irrigation (Cochard, 2019). 44

Chapitre 1:

Figure 15 : Schematic of the DroughtBox. Branches in the lower compartment are attached to strain gauges in the upper compartment, which are linked to an acquisition board PhidgetBridge and to a Raspberry Pi computer. Following hydration overnight, branches are allowed to dehydrate inside the insulated box in which temperature is controlled via heating resistors and relative humidity is controlled via the injection of either dry or humidified air. Each environmental parameter is controlled by a microcontroller, Arduino, which responds to experimenter commands. Small (4 cm diameter) fans circulates the air at a constant rate. 51

Figure 16 : Time courses of environmental conditions inside the DroughtBox. A: stable conditions, B: ramps in temperature with stable relative humidity and C: ramps in temperature with stable water vapor concentration..... 57

Figure 17 : Plots showing temperature dependence of g_{res} and the corresponding Arrhenius plot for *Abies alba* (a, b), *Cedrus atlantica* (c, d), *Pseudotsuga menziesii* (e, f), *Picea abies* (g, h) and *Quercus ilex* (i, j) from 30 to $55^{\circ}C$ with stable water vapor concentration at $10.6 g.kg^{-1}$. 59

Figure 18 : a) The relationship between leaf and air temperature with increasing set temperature inside the Drought-Box across the four conifer (yellow = *Abies alba*; blue = *Cedrus atlantica*; green = *Picea abies*; red = *Pseudotsuga menziesii*) and one angiosperm (light blue = *Quercus*

ilex) species. The slope of the leaf-air temperature relationship across set points are included for each species. b) The relationship between leaf and air temperature (solid lines) and dry leaf and air temperature (dashed lines) with increasing set temperature inside the Drought-Box for the conifer *Cedrus atlantica* (blue) and the angiosperm *Quercus ilex* (light blue). The slope of the leaf-air temperature relationships across set points are included for each species. 60

Figure 19 : Plots showing changes in relative water content (plots a-b) and percentage loss conductance (expressed as relative conductivity, plots c-d) for branches of two conifer species (*Cedrus atlantica*, plots a, c; and *Picea abies*, plots b, d) dehydrated under contrasting climate conditions inside the Drought-Box. Blue lines and symbols represent branches dehydrated under constant temperature (30°C) and relative humidity (40%); red lines and symbols represent branches dehydrated under constant temperature (30°C) and relative humidity (RH, 40%), but punctuated by a 10 hr heatwave (grey shaded area) with temperature and RH set to 46°C and 17%, respectively. 61

Figure 20 : Transverse Micro tomography images of *Cedrus atlantica* (panels a and c) and *Picea abies* (panels b and d) obtained from control branches (panels a and b) and from branches that were exposed to heatwave (panels c and d). Conduits in grey and black represent those functional or cavitated tracheids, respectively. PLC indicates the theoretical loss of hydraulic conductivity for each image. Scale bars = 500 µm. 62

Figure 21 : The relationship between relative conductivity of stem xylem (PLC) and relative water content (RWC) of branches of *Cedrus atlantica* (a) and *Picea abies* (b) dehydrated inside the Drought-Box under constant temperature and relative humidity (blue lines and symbols) and under the same conditions but punctuated by a heatwave event (red lines and symbols). Dashed vertical lines represent the RWC at 50% loss in conductivity. Note that for both species, PLC is decoupled from RWC under heatwave conditions. 63

Chapitre 2:

Figure 22 : Scanning Electron Microscopy of the 6 species leaves adaxial and abaxial surfaces. 83

Figure 23 : Residual conductance or gres (A) and P50 (B) measures for the six species. Significant differences between species are indicated by letters (P<0.05). Error bars represent standard deviation of mean (n=4). 85

Figure 24 : Concentrations of the different components contained in the cuticular waxes extracted from leaves of the six species. Significant differences between species are indicated by letters (P<0.05). Error bars represent standard deviation of mean (n=4). 86

Figure 25 : Proportions of the different components contained in the cuticular waxes extracted from leaves of the six species. Significant differences between species are indicated by letters ($P < 0.05$). Error bars represent standard deviation of mean ($n=4$). 87

Figure 26 : Average chain length (ACL) in number of Carbons of the three components families Alkanes, Alcohols and Fatty Acids for each of the six species. Each letter is used to compare the ACL across each chemical family, alkanes, alcohols and fatty acids separately. 88

Figure 27 : PCA graph showing the profile of response of gres and Tp of all species with the concentrations of chemical components. The correlation table summarize the correlation across gres, Tp and the concentrations of chemical components and their p-values associated. 91

Figure 28 : PCA graph showing the profile of response of gres and Tp of all species with the proportions of chemical components. The correlation table summarize the correlation across gres, Tp and the proportions of chemical components and their p-values associated. 92

Chapitre 3:

Figure 29 : Climate variables recorded on-site during the dry-down experiment. Plot (a) shows minimum (blue) and maximum (red) daily temperature and mean daily relative humidity (brown). Plot (b) shows mean daily photosynthetic active radiation (yellow) and wind speed (green). Numbered dashed lines indicate the start date of each species dry-down treatment: *Pinus halepensis* (1), *Populus nigra* (2), *Quercus ilex* (3), and *Cedrus atlantica* (4) 107

Figure 30 : Plots showing strong correspondence between observed and modelled water potential dynamics during drought in each of the four study species: (a) *Pinus halepensis*; (b) *Populus nigra*; (c) *Quercus ilex*; (d) *Cedrus atlantica*. In each plot, the colouring and symbol type indicate observed (circles) and modelled (lines) predawn and midday water potentials for water stressed (WS; blue and red lines, respectively) and control (WW; black and grey lines, respectively) plants. 95% confidence intervals for the modelled data are shown as grey shading. In each plot, the horizontal lines indicate the water potential at stomatal closure (P_{gs88} ; dotted line) and 50% loss of hydraulic conductivity (P_{50} ; dashed line) 114

Figure 31 : Modelled dynamics of percentage loss of conductance (PLC) due to embolism during a simulated drought in the four study species (yellow = *Pinus halepensis*; light green = *Populus nigra*; dark green = *Quercus ilex*; red = *Cedrus atlantica*). In the model, plants of each species were standardised by leaf area and pot size and dried down under the same climatic conditions 115

Figure 32 : Global sensitivity analysis, focusing on the traits that contribute the most to higher values for the time to stomatal closure (T_{close}), the subsequent time to hydraulic failure (T_{cav}),

and the overall time from full hydration to hydraulic failure (THF). Colours represent the four species in the study: Pin_hale = Pinus halepensis (orange); Pop_nigr = Populus nigra (light green); Que_ilex = Quercus ilex (dark green); Ced_atla = Cedrus atlantica (red). See Table 1 for trait abbreviations..... 117

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Liste non exhaustive des T_p mesurés sur différentes espèces dans la bibliographie. 43

Chapitre 1

Table 1: g_{res} ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) \pm standard errors for four conifers species (*Abies alba*, *Cedrus atlantica*, *Pseudotsuga menziesii* and *Picea abies*) and one angiosperm specie (*Quercus ilex*) at the different temperature levels and T_p value ($^{\circ}\text{C}$) for each specie. 58

Chapitre 2

Table 1: Phenological variation of leaf functional traits within deciduous and evergreen species. Significant differences between species are indicated by letters ($P < 0.05$). 82

Table 2: Temperature of Phase transition (T_p) obtained with branches and transition temperature in dynamic mechanical properties (T_{α}) and crystallinity rate (χ) of isolated wax cuticles of leaf plants in deciduous and evergreen species. 84

Table 3: Correlation matrix summarizing the correlation across g_{res} , T_p and leaf traits, hydraulic trait and cuticle physical characteristics and their p-values associate. 90

Chapitre 3

Table 1 : Plant allometric, gas exchange and hydraulic trait means used to parameterise the model *SurEau* for predicting the dynamics of plant desiccation during drought for the four study species. Also included are the response variables Ψ_{min} , and PLC, recorded for each species at the end of the experimental drought. Note that allometric values represent species means, yet model simulations were run using individual-level data..... 111

Table des Matières

Résumé	2
Abstract.....	4
Remerciements.....	6
Liste des abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux.....	15
Synthèse bibliographique	20
1. Le réchauffement climatique et son effet sur la fréquence des événements climatiques extrêmes.....	20
1.1. Evolution du climat aux niveaux global et local	20
1.2. Les effets du réchauffement climatique sur la mortalité des arbres	21
1.3. Mourir de soif ou mourir de faim ?.....	22
2. L'eau dans la plante.....	23
2.1. La circulation de l'eau dans l'arbre	23
2.1.1. Le continuum sol – plante – atmosphère.....	24
2.1.2. La théorie de la tension – cohésion.....	26
2.1.3. La transpiration stomatique	27
2.1.4. La capacitance.....	29
2.1.1. La vulnérabilité à la cavitation.....	29
2.1.2. Les P12, P50 et P88.....	31
2.2. Les stress hydrique et thermique	32
2.2.1. Définition d'un stress environnemental	32
2.2.2. Le stress hydrique	32
2.2.3. Le stress thermique.....	33
2.3. Impact des stress hydrique et thermique sur l'état hydrique des plantes.....	34
3. La transpiration résiduelle et les éléments intervenants post fermeture stomatique	38
3.1. Les composés de g_{res}	39
3.1.1. Les méthodes de mesure de la conductance résiduelle	39
3.1.2. La cuticule	39
3.2. Dépendance de la transpiration résiduelle à la température.....	41
4. L'utilisation de la modélisation dans les prédictions du temps de défaillance hydraulique	43
4.1. Pourquoi en a-t-on besoin ?.....	43
4.2. Le modèle <i>SurEau</i>	43
5. Objectifs et hypothèses	44
La DroughtBox, un nouvel outil de mesure du g_{res}	46

1. Résumé.....	46
2. The DroughtBox: a new tool for phenotyping residual branch conductance and its temperature dependence during drought.....	48
2.1. Abstract	48
2.2. Introduction	49
2.3. Material and method	51
2.4. Results	56
2.5. Discussion	63
2.6. Acknowledgments	66
2.7. Author contribution.....	66
Effets des cires cuticulaires foliaires sur la transpiration résiduelle d'espèces tempérées...	70
1. Résumé.....	70
2. Effects of the chemical and physical characteristics of foliar cuticular waxes on the residual transpiration of temperate tree species	72
2.1. Abstract	73
2.2. Introduction	74
2.3. Materials and methods	76
2.4. Results	81
2.5. Discussion	92
2.6. Conclusion.....	96
2.7. Acknowledgements.....	97
2.8. Supplemental figures.....	98
Détermination des traits hydrauliques clés dans le contrôle du temps de défaillance hydraulique lors d'une sécheresse.....	99
1. Résumé.....	99
2. Key hydraulic traits control the dynamics of plant desiccation in four contrasting tree species during drought.....	102
2.1. Abstract	102
2.2. Introduction	103
2.3. Materials and methods	106
2.4. Results	113
2.5. Discussion	117
2.6. Conclusion.....	121
2.7. Acknowledgments	121
2.8. Authors' contributions	122
Conclusion et perspectives	123
Bibliographie	129
Annexes	145

Synthèse bibliographique

1. Le réchauffement climatique et son effet sur la fréquence des événements climatiques extrêmes

1.1. Evolution du climat aux niveaux global et local

Depuis la dernière glaciation (-115 000 à -11 700 ans) le réchauffement climatique naturel a permis la mise en place d'écosystèmes en équilibre avec leur environnement présentant une très forte biodiversité. Depuis le début de l'Anthropocène, le réchauffement climatique que nous connaissons s'effectue de façon beaucoup plus rapide causant une perte de biodiversité globale et perturbant l'équilibre des écosystèmes (Verma, 2021). Le réchauffement climatique résulte de l'émission de plus en plus importante de gaz à effet de serre (GES) tels que le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4) et l'oxyde nitreux (N_2O) due aux activités anthropiques humaines, notamment la valorisation des énergies fossiles (charbon, gaz, pétrole) pour les transports, l'urbanisation des milieux, l'agriculture et certaines activités industrielles. Une fraction de ces émissions s'accumule dans l'atmosphère faisant alors augmenter les concentrations de ces gaz : environ 1.7 ppm/an pour le CO_2 (évalué entre 1980 et 2011), un gain d'environ 250 ppb pour le CH_4 et une augmentation variant entre 0.25 et 1.0 ppb/an pour le N_2O sur la même période. Actuellement, la concentration atmosphérique de CO_2 culmine à 416.34 ppm (moyenne globale pour mars 2021), celle de CH_4 à 1888.9 ppb et celle de N_2O à 334 ppb (moyennes globales pour février 2021) (Dlugokencky and Trans, 2021; Dogniaux, 2021). Ces GES, piégés dans la troposphère, absorbent et bloquent les émissions de radiations infrarouge de la surface terrestre vers l'espace. Ces émissions IR sont donc réémises vers la surface terrestre ce qui induit une augmentation de la température de surface (Mathez and Smerdon, 2009). Cette modification anthropique de l'abondance des GES dans l'atmosphère par rapport aux niveaux pré-industriels perturbe l'équilibre radiatif de notre planète, on appelle cela forçage radiatif. En 2019, il a été évalué globalement à 2.75 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ par rapport à 1750 (Dufresne, 2021).

Le réchauffement climatique à l'échelle de la terre induit une augmentation globale des températures des surfaces terrestres et maritimes ainsi que de l'atmosphère, la température moyenne de la surface de la Terre a augmenté de 1,09°C entre 2011 et 2020 par rapport à la période 1850-1900 (Roberts et al., 2022). Cela se traduit par des phénomènes quotidiens tels

que la diminution du nombre de jours et nuits froides et à l'inverse l'augmentation de jours et nuits chaudes ainsi qu'à l'augmentation de la fréquence d'événements extrêmes de vagues de chaleur. Les effets du réchauffement climatique sur les événements de sécheresse n'ont pas été observés avec un indice de confiance suffisamment élevé dû au manque de données climatiques (Jentsch et al., 2007; Allen et al., 2015)).

Cependant, des prévisions du climat futur peuvent être réalisées grâce à des SSP qui sont des scénarii d'émissions de substances à effet radiatifs comme les gaz à effet de serre ou aérosols fondées sur un ensemble cohérent et intrinsèquement homogène d'hypothèses concernant les forces motrices (évolution démographique et socio-économique, progrès technologique, énergie, utilisation des terres, etc.) et leurs interactions principales. Ces SSP, au nombre de 5, modélisent l'évolution du climat futur en prenant en compte 5 possibles évolution des concentrations de GES, du scénario le plus optimiste au plus pessimiste quant aux émissions de GES (Roberts et al., 2022).

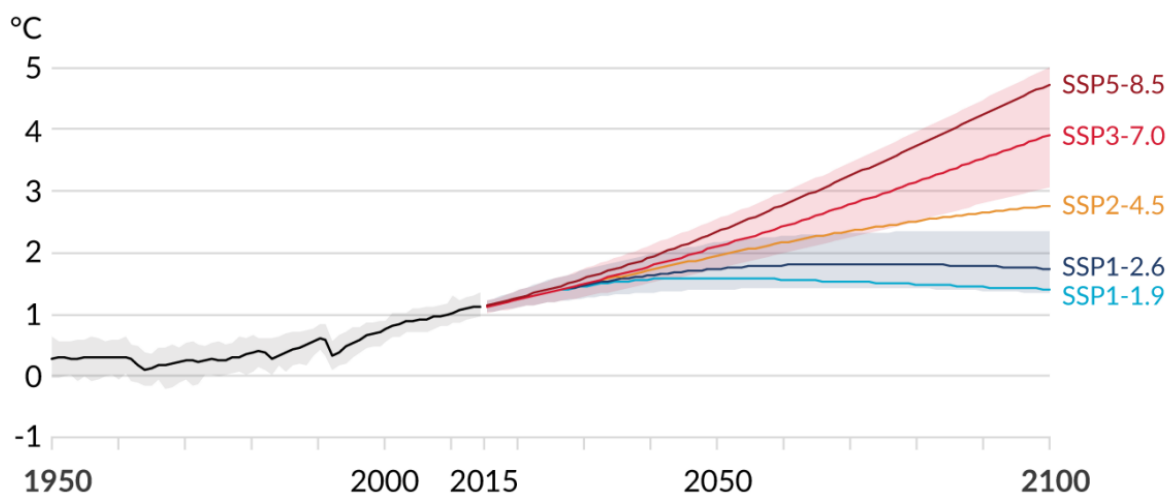


Figure 1: Prédictions de l'augmentation de la température globale terrestre en fonction des différents scénarii d'émissions de GES (Roberts et al., 2022).

1.2. Les effets du réchauffement climatique sur la mortalité des arbres

La Terre étant entrée dans une nouvelle époque appelée Anthropocène, elle subit l'influence des activités humaines (feux de forêts, déforestation, pollution des écosystèmes...). Les effets du changement climatique sont donc exacerbés par l'action de l'Homme aux dépens des biomes présents sur Terre. Un des effets du changement climatique est l'augmentation de la fréquence et l'intensité des « sécheresses chaudes », couplées à des vagues de chaleur. Ces sécheresses chaudes sont particulièrement létales pour des espèces végétales pourtant installées dans leur

biome depuis des centaines/milliers d'années, de nombreuses forêts vont se trouver en péril et dépérir au profit d'espèces plus adaptées aux nouvelles conditions climatiques. Ce processus est appelé transition écologique (McDowell and Allen, 2015; Hammond et al., 2022). Comme montré dans la Figure 2, la mortalité des arbres n'est pas un événement isolée et concerne tous les écosystèmes, de la forêt tropicale à continentale.

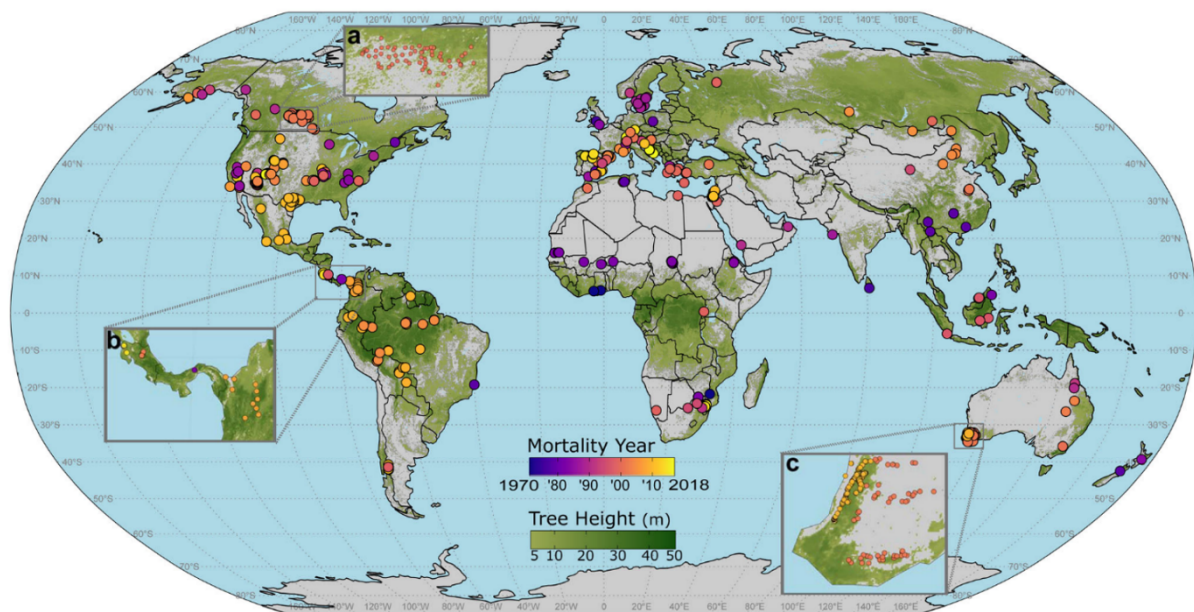


Figure 2 : Référencement de la mortalité des arbres en fonction de l'année à partir de la base de données. L'étendue des forêts à la surface du globe ont été représentées par un gradient de hauteurs d'arbres. Les inserts a, b et c montrent la forte densité de mortalité au Canada, en Amérique centrale et au sud-ouest de l'Australie (Hammond et al., 2022).

1.3. Mourir de soif ou mourir de faim ?

Dans des conditions de sécheresse caniculaire, les plantes deviennent vulnérables par plusieurs mécanismes. En fonction des stratégies de tolérance ou d'évitement développées par les plantes pour faire face au risque de mortalité, la plante peut mourir de faim par inhibition des échanges gazeux ou mourir de soif par une perte trop importante en eau.

Lors de canicules, certaines plantes maintiennent leurs stomates ouverts jusqu'à un certain niveau de potentiel hydrique afin de garder une activité des échanges gazeux permettant une activité photosynthétique suffisante pour leur croissance, leur développement et la régulation de leur température foliaire.

Ce faisant, et sachant que pour 1 molécule de CO₂ absorbée par la feuille, il faut 1 molécule d'eau, et que 6 molécules de chaque sont nécessaires seulement pour la formation de

carbohydrates (photosynthèse), la plante risque une défaillance hydraulique. La défaillance hydraulique est plus probable de se dérouler lors de sécheresses intenses car en parallèle de la plus grande quantité de CO₂ et donc d'eau qui va être utilisée afin de former les carbohydrates nécessaires, la demande évaporative de l'atmosphère sera bien supérieure à l'apport hydrique du sol dans le continuum sol-plante-atmosphère.

Une autre stratégie des plantes consiste à fermer rapidement les stomates lorsque la disponibilité en eau du sol est limitée et que la demande évaporative est forte. Ces mécanismes permettent d'économiser les réserves en eau. Dans ces conditions, les stomates fermés afin de réduire le processus de transpiration, entraînent une baisse de l'absorption de CO₂ par les feuilles, le taux de photosynthèse devient minimale et les besoins en carbohydrates pour maintenir une croissance ne peuvent plus être comblés : la plante est en manque de carbone. Ce processus est plus important lorsque les températures sont élevées et augmentent les demandes évaporatives permettant de réduire la température de surface des feuilles. Le manque de carbohydrates est plus probable de se dérouler lors de sécheresses prolongées mais peu intenses lorsque les stocks de carbones s'épuisent mais que la demande évaporative n'est pas suffisante pour causer la défaillance hydraulique (Mcdowell et al., 2008; McDowell et al., 2022).

Au cours de ce projet, nous nous sommes concentrés sur la mortalité des arbres due à la défaillance hydraulique dans des conditions de stress hydrique couplé à un stress thermique afin de caractériser les réponses des plantes aux fortes canicules car lors d'événements de sécheresse, la cause de mortalité a été démontrée comme étant due à la défaillance hydraulique seule ou couplée à un manque de carbone (Adams et al., 2017).

2. L'eau dans la plante

2.1. La circulation de l'eau dans l'arbre

L'eau est indispensable à la survie de la plante, elle est à la fois l'élément le plus présent mais aussi le plus limitant pour leur croissance. C'est principalement la présence ou absence d'eau qui va induire la présence ou absence d'espèces dans un environnement donné.

L'électronégativité liée à l'atome d'oxygène de la molécule d'eau est supérieure à celle des atomes d'hydrogène, la molécule d'eau est alors considérée comme polaire. Cette polarité permet à chaque molécule d'eau d'être attirée et de se lier aux autres molécules d'eau grâce à des liaisons faibles, les liaisons hydrogène, c'est le phénomène de cohésion. Ces liaisons faibles permettent aussi aux molécules d'eau de se lier à d'autres molécules contenant des atomes d'oxygène ou d'azote ce qui en fait un excellent solvant. Les liaisons hydrogène apportent aussi

des propriétés thermiques spécifiques aux molécules d'eau. En effet, pour passer de l'eau liquide à vapeur sans augmentation de température, principe de l'évapotranspiration, il est nécessaire d'apporter une énergie suffisante pour casser les liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau, cette énergie est la chaleur latente de vaporisation ou enthalpie de vaporisation. Cette enthalpie de vaporisation importante permet à la plante de diminuer la température de ses organes foliaires lors de l'évapotranspiration.

Les liaisons hydrogène sont aussi responsables d'autres propriétés de l'eau liquide. La tension de surface, étant définie comme l'énergie requise pour augmenter l'aire de surface d'une interface gaz-liquide, résulte de la plus grande attractivité des molécules d'eau entre elles qu'avec la phase gazeuse en contact. Plus l'aire de surface de l'interface gaz-liquide sera faible, plus le système sera stable.

Les molécules d'eau ont aussi la propriété d'être attirées par une phase solide, comme une paroi cellulaire ou les particules du sol, c'est le phénomène d'adhésion. En fonction de la nature de la phase solide, les molécules d'eau seront plus ou moins attirées définissant un angle de contact entre l'eau et la phase solide, plus l'angle de contact sera faible, plus la phase solide sera considérée comme hydrophile.

Ces 3 propriétés hydriques, cohésion, tension de surface et adhésion, donnent lieu au phénomène de capillarité : dans un tube, l'adhésion des molécules d'eau à une surface hydrophile va créer un ménisque avec un angle de contact très faible. La tension de surface due à ce ménisque va orienter la force nette vers le haut et l'eau va monter dans le tube grâce à la cohésion des molécules entre elles. Cette forte cohésion des molécules d'eau entre elles va aussi permettre à la colonne d'eau de ne pas rompre, elle va lui conférer une résistance à la traction (Taiz & Zeiger 2006).

2.1.1. Le continuum sol – plante – atmosphère

L'eau circule dans l'arbre du sol jusqu'aux feuilles. Au niveau du sol, l'eau est captée par les racines de l'arbre, plus précisément au niveau des parties jeunes de la racine. Pour traverser le cortex racinaire et accéder jusqu'à l'endoderme de la racine, elle peut passer par trois voies :

La *voie apoplasmique* : l'eau circule au niveau des parois cellulaires, espaces intercellulaires et lumen des cellules « mortes » comme les vaisseaux du xylème.

La *voie symplasmique* : l'eau circule à l'intérieur des cellules vivantes via les cytoplasmes et passe de cellule en cellule à travers les plasmodesmes qui sont des extensions tubulaires de la membrane plasmique reliant les cytoplasmes des cellules adjacentes.

La *voie transmembranaire* : cette voie ressemble à la voie symplasmique à la différence que

l'eau ne passe pas de cellule en cellule via les plasmodesmes mais en traversant directement les membranes cellulaires. Ce trajet induit que la force motrice est un gradient de potentiels hydriques car l'eau doit traverser des membranes semi-perméables. A l'inverse, les voies apoplasmique et symplasmique utilisent un gradient de forces hydrostatiques pour faire avancer l'eau (Taiz & Zeiger 2006).

Une fois au niveau de l'endoderme, les bandes de Caspary composées de subérine bloquent le passage apoplasmique de l'eau, la voie symplasmique est alors privilégiée pour accéder à la stèle et aux vaisseaux du xylème.

Les vaisseaux du xylème sont composés de trachéides présentes chez les angiospermes et gymnospermes et de vaisseaux présents uniquement chez les angiospermes (Tyree and Zimmermann, 2002). Les vaisseaux et trachéides du xylème sont des cellules mortes formées à partir de la création de parois cellulaires secondaires, elles sont vidées de leurs organites et lignifiées. Les éléments du xylème sont isolés de toute entrée d'air possible, leurs parois sont parsemées de pores exempt de paroi secondaire appelés ponctuations permettant le passage de l'eau entre les différents vaisseaux et trachéides. Les ponctuations entre 2 éléments du xylème sont séparées par une lamelle poreuse appelée « membrane » de ponctuation. La porosité de ces membranes de ponctuation est si fine qu'elles ont la capacité de bloquer les bulles d'air présentes dans les éléments du xylème tout en laissant passer l'eau, évitant ainsi la propagation de ces bulles d'air (phénomène d'embolie).

Les trachéides sont longues et fines à l'inverse des éléments de vaisseaux plus courts et larges. De par leur structure, les trachéides sont moins efficaces dans le transport de l'eau que les vaisseaux, cependant, les différences de conductances chez les angiospermes et les conifères sont tamponnées par la présence de « membranes » de ponctuation spécifiques appelées « torus » qui permettent une meilleure conductance par de larges pores tout en les préservant des événements de cavitation en scellant le pore par aspiration (Sperry et al., 2006).

Les vaisseaux sont composés d'éléments de vaisseaux séparés les uns des autres à leurs extrémités par des plaques perforées, et formant ainsi de longs vaisseaux dont la taille peut aller de quelques centimètres à plusieurs mètres.

Arrivée au niveau des feuilles, l'eau est transportée au niveau des cellules du mésophylle grâce à une différence de potentiel hydrique puis au niveau des chambres sous-stomatique où elle va se transformer en vapeur d'eau et être évaporée au niveau des stomates (van den Honert, 1948) grâce à l'énergie solaire suffisante pour atteindre la chaleur latente d'évaporation (Tyree and Zimmermann, 2002).

2.1.2. La théorie de la tension – cohésion

Dans l'arbre, l'eau circule du sol jusqu'aux racines selon la théorie de tension – cohésion mise en place en 1895, cette théorie explique que l'eau dans l'arbre circule sous forme de « colonnes » contenues dans des éléments conducteurs du xylème grâce aux forces de tension générées au niveau des sites d'évaporation des feuilles aux interfaces air-liquide présentant des ménisques et selon des différences de pression de gaz (Dixon and Joly, 1895; Tyree and Zimmermann, 2002).

Au niveau de son site de vaporisation, dans les chambres sous-stomatiques, l'eau va former un film contre les cellules du mésophylle. Plus la transpiration est importante, plus les molécules d'eau forment des ménisques avec un angle de contact faible induisant une diminution de la pression hydrostatique (Figure 3).

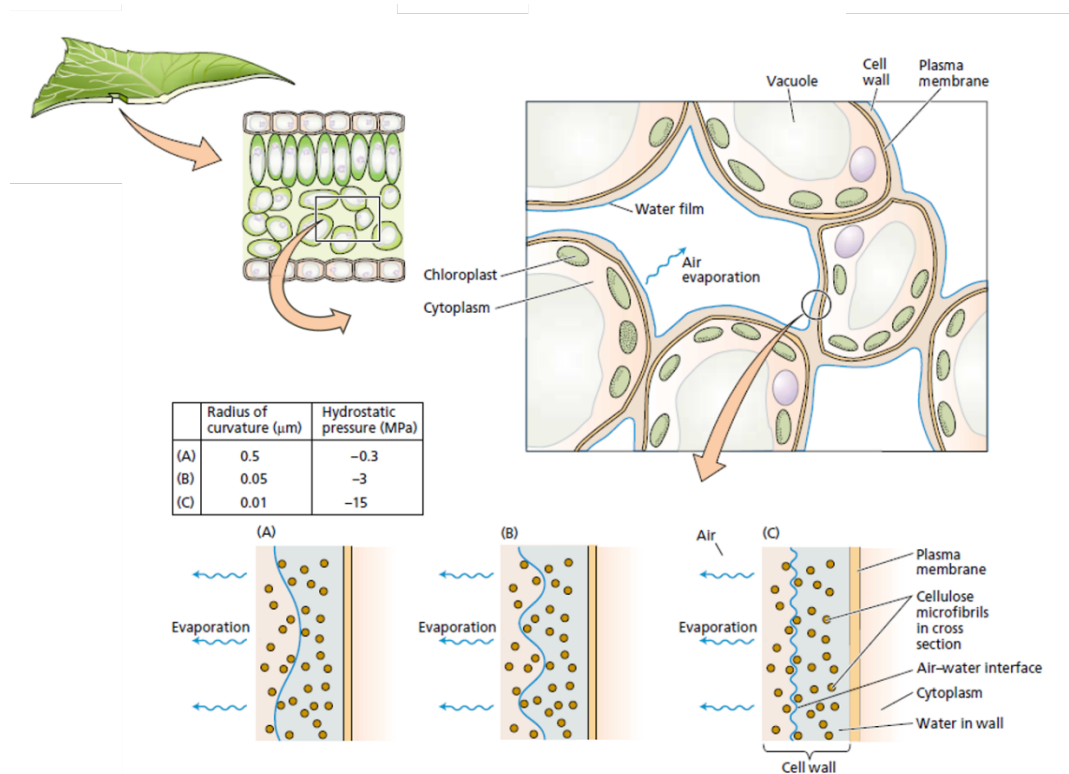


Figure 3 : L'origine des forces de tension se trouve dans les feuilles.

Comme l'eau s'évapore du film qui recouvre la surface des parois cellulaires du mésophylle, l'eau se retire plus profondément dans les interstices de la paroi cellulaire et la tension de surface induit une pression négative sur la phase liquide. Le rayon de courbure des ménisques diminuant, la pression devient plus négative (Taiz & Zeiger 2010, modifiée).

Les forces de tension créées au niveau des feuilles lors de l'évaporation de l'eau sont donc les moteurs de la montée de l'eau à partir des racines. En effet, en raison de la grande cohésion des

molécules d'eau entre elles (liaisons hydrogène), les forces de tension vont tirer les molécules d'eau sous forme de colonnes au sein des éléments conducteurs du xylème. Le flux d'eau peut alors être calculé suivant la loi d'Ohm :

$$Flux = \frac{\Delta\Psi}{R}$$

Avec $\Delta\Psi$ la différence de tension entre deux points et R la résistance des éléments conducteurs au transfert de l'eau entre ces du continuum sol-plante-atmosphère (Cruiziat et al., 2001). La résistance R est l'inverse de la conductance K. La conductance correspond à l'efficacité du transport de l'eau à travers un organe donné (Sack and Holbrook, 2006), elle est calculée en $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$. Chaque organe a sa propre résistance, les résistances peuvent être additives si elles sont en série et vont déterminer les flux d'eau à travers la plante.

2.1.3. La transpiration stomatique

Les stomates sont des ouvertures situées principalement sur la face inférieure des feuilles hypostomatiques de dicotylédones. Ils sont composés d'une ouverture appelée ostiole entourée de deux cellules réniformes, les cellules de garde. La partie de la paroi de ces cellules de garde entourant l'ostiole sont lignifiées ce qui permet l'ouverture et la fermeture du stomate par osmose. En présence de lumière, un apport de K^+ s'effectue dans les cellules de garde ce qui tend à augmenter la pression osmotique à l'intérieur de ces cellules et diminuant leur potentiel hydrique. Cela a pour effet un influx d'eau par osmose. Les cellules de garde gonflent dû à l'augmentation de la pression hydrostatique à l'intérieur et permettent l'ouverture du stomate (Figure 4) (Nobel 2020).

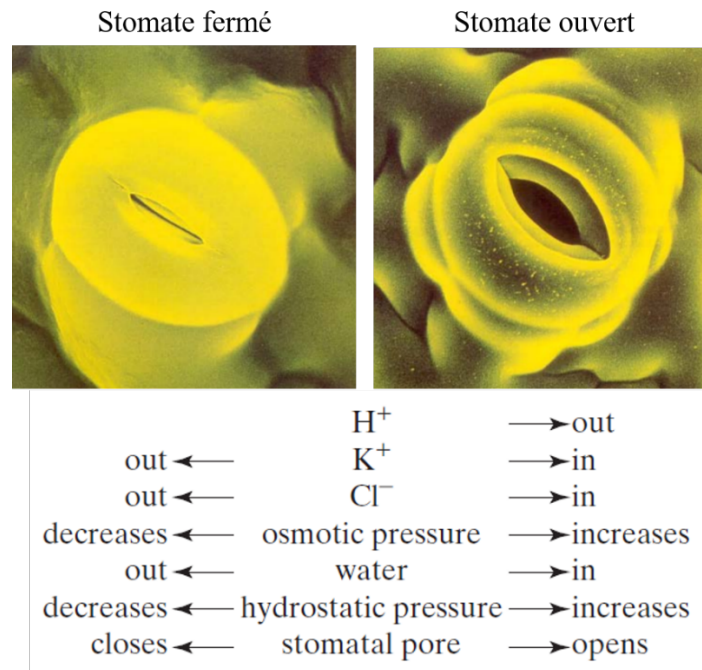


Figure 4: Représentation schématique de l'ouverture/fermeture d'un stomate (Nobel 2020 modifiée).

Le fonctionnement stomatique est étudié depuis plus de 100 ans, notamment les principes d'ouverture et fermeture à la lumière et en présence d'air plus ou moins sec ou encore durant la nuit (Darwin, 1898). Ils fonctionnent sous le principe d'ouverture/fermeture en fonction des moments de la journée et de l'état hydrique du sol et sont à la base du phénomène de photosynthèse. En règle générale, une concentration en CO_2 faible à l'intérieur des cellules de garde ainsi que la lumière sont responsables de l'ouverture des stomates à l'aube. Ce faisant, la photosynthèse permettant l'absorption de CO_2 par l'action de photons émis par le soleil et le relargage d' H_2O et d' O_2 se met en place pour la journée. Une fois la nuit tombée, la concentration en CO_2 importante dans les cellules de garde due à la photosynthèse ainsi que l'absence de lumière permettent la fermeture des stomates induisant la mise en place de la phase biochimique de la photosynthèse, permettant la fixation et l'assimilation du CO_2 et les réactions de formation des sucres dans le stroma (Hopkins and Hüner, 2009).

La photosynthèse a une grande importance écologique car elle est responsable de la fixation d'environ 106 milliards de tonnes de carbone chaque année par les organismes photosynthétiques (Nobel 2020).

La transpiration est définie comme « la perte en eau par une plante sous forme de vapeur d'eau » (Hopkins 2008). La transpiration stomatique représente 90 à 95% des pertes en eau totales par la feuille lorsque les conditions environnantes des plantes sont optimales. Lors de la

transpiration stomatique, l'eau est donc évaporée au niveau des stomates, refroidissant la surface foliaire d'environ 6 – 7°C par rapport à une feuille ne transpirant pas (Duca, 2015). De plus, elle permet la création de forces de tension permettant de transporter l'eau des racines jusqu'aux feuilles. L'ouverture/fermeture des stomates est également dirigée par l'état hydrique de la plante. Dans des conditions optimales, l'état des stomates dépend de la concentration de CO₂ et de la luminosité, cependant dans les conditions de stress hydrique, les stomates se ferment afin de réduire les pertes en eau dues à la transpiration, ceci induit une réduction de l'absorption de CO₂ et donc une réduction du taux de photosynthèse.

2.1.4. La capacitance

Pour tamponner les différences de demande évaporative au fil de la journée ou lors d'un événement quelconque de type sécheresse passagère, la plante dispose de réservoirs d'eau situés au niveau des racines, tronc, branches et feuilles. La capacitance est liée aux propriétés biophysiques intrinsèques des tissus de stockage des plantes et à leur capacité à libérer de l'eau en réponse aux variations du statut hydrique (Scholz et al., 2011). La capacitance (C) est donc définie comme le ratio entre la variation du volume d'eau du tissu et la variation de son potentiel hydrique ramené sur le volume du tissu ($\text{kg.m}^{-3}.\text{MPa}^{-1}$).

Dans des conditions de stress hydrique, l'eau est premièrement relâchée des espaces intercellulaires, aussi appelés stockage capillaire, puis des vaisseaux cavités et des cellules vivantes de l'écorce (Tyree and Yang, 1990).

Cette eau stockée peut supporter de 10 à 50% de la transpiration quotidienne et permet à la plante d'éviter de trop importantes différences entre la demande et l'apport en eau, et donc une forte diminution du potentiel hydrique pouvant déclencher la formation d'embolie dans le xylème (Meinzer et al., 2009).

2.1.1. La vulnérabilité à la cavitation

Les colonnes d'eau à l'intérieur du xylème sont dans un état métastable. Autrement dit, l'eau sous tension se trouve dans un état liquide à des valeurs de tension pour lesquelles elle se trouverait dans un état de vapeur. Le risque d'une sécheresse est la vaporisation de l'eau dans les vaisseaux du xylème rendant l'état de l'eau stable. Cette vaporisation de l'eau, due à la formation d'une bulle d'air, la cavitation, dans le xylème rend les vaisseaux non fonctionnels, ils deviennent embolisés (Tyree and Sperry, 1989; Cruiziat et al., 2001).

La structure des vaisseaux du xylème est importante pour déterminer la continuité des événements de cavitation. Pour rappel, les éléments du xylème sont tapissés de ponctuations,

ces pores permettant le passage de l'eau d'un vaisseau ou d'une trachéide à un ou une autre et fluidifiant le trajet de l'eau jusqu'aux feuilles. Lorsqu'un vaisseau est embolisé, les ponctuations servent à rediriger l'eau du vaisseau précédent aux vaisseaux latéraux (Figure 5).

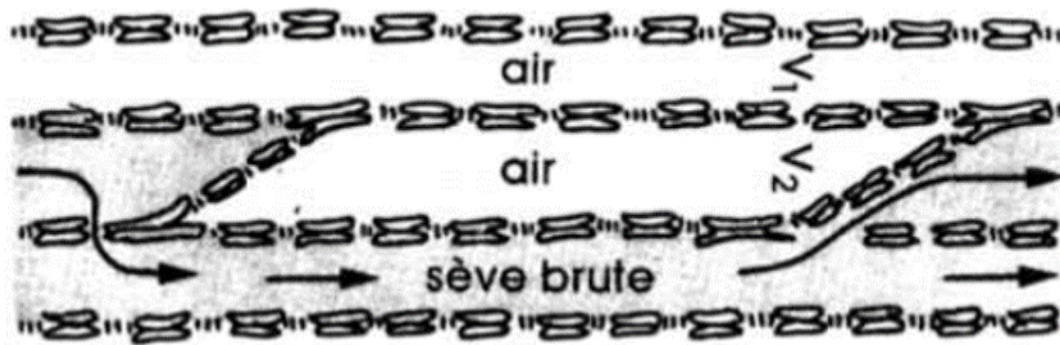


Figure 5 : Redirection du flux d'eau (sève brute) dans les vaisseaux fonctionnels grâce aux ponctuations, évitant les vaisseaux embolisés V1 et V2 (Cruiziat et al., 2001).

Cependant, les ponctuations peuvent aussi être responsables de la diffusion de la cavitation à travers les vaisseaux. La théorie la plus retenue pour expliquer ce phénomène est la théorie du « germe d'air ».

Lorsqu'un vaisseau devient embolisé, il sort de son état métastable pour entrer dans un état stable, la pression à l'intérieur n'est plus négative mais est en équilibre avec l'atmosphère. Un vaisseau embolisé en parallèle d'un vaisseau fonctionnel va montrer une grande différence de pression, il va donc se former des ménisques au niveau des ponctuations. Plus la plante va transpirer, plus la tension dans les vaisseaux fonctionnels va augmenter, plus la différence de pression entre les deux vaisseaux sera grande. Cette différence de pression va se faire ressentir au niveau des ménisques. La tension de surface de l'interface air/eau va augmenter et creuser le ménisque. Lorsque le ménisque aura atteint sa limite de résistance qui est égale au rayon du pore le plus large, une microbulle se forme et envahit le vaisseau fonctionnel.

Il n'est alors pas encore rempli d'air mais de vapeur d'eau, élément de transition nécessaire afin de revenir à un état stable, l'eau sous de telles tensions devrait se trouver sous forme de vapeur d'eau et non sous forme liquide, la forme vapeur étant donc la forme stable dans ces conditions. La pression à l'intérieur de ce vaisseau devient donc celle de la vapeur saturante de l'eau à température de l'élément soit 0.0025 MPa. L'air présent dans le premier vaisseau embolisé va entrer dans le vaisseau saturé en vapeur d'eau et la pression de ce dernier va elle aussi s'équilibrer avec l'atmosphère (Cruiziat et al., 2001).

La vulnérabilité à la cavitation se traduit par la relation entre le potentiel hydrique et le pourcentage de perte de conductance hydraulique et se présente sous la forme d'une courbe de vulnérabilité (Figure 6). Les différentes espèces diffèrent par leur vulnérabilité à la cavitation de par l'efficacité de leur xylème, non pas à cause de la largeur de leurs conduits ou de leur nature (vaisseaux/trachéïdes) mais plutôt à cause des différences de passage de bulles d'air au niveau des pores entre conduits (Tyree and Sperry, 1989; Li et al., 2016).

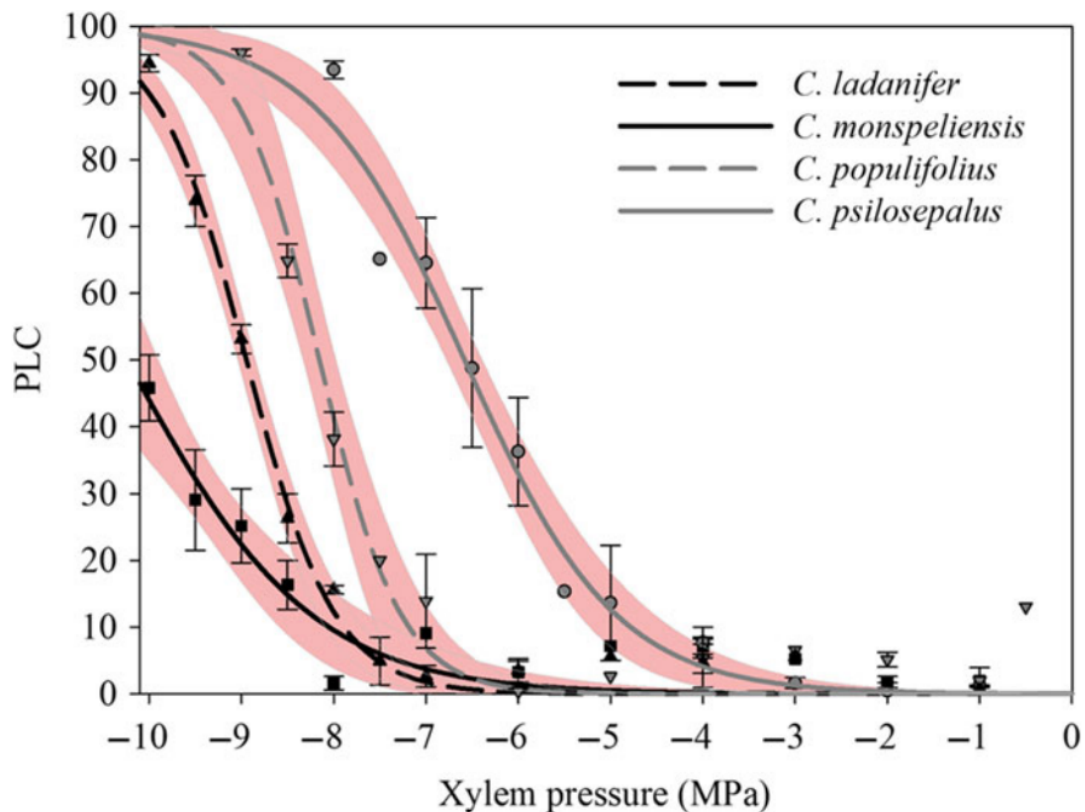


Figure 6 : Exemple de courbes de vulnérabilité représentant le pourcentage de perte de conductance hydraulique (PLC) en fonction de la pression à l'intérieur des vaisseaux du xylème pour 4 espèces différentes de *Cistus* (Torres-Ruiz et al., 2017).

2.1.2. Les P12, P50 et P88

C'est à partir de ces courbes de vulnérabilité que l'on peut extraire les P12, P50 et P88 qui sont définis comme la pression à l'intérieur des vaisseaux du xylème induisant respectivement 12, 50 et 88% de perte de conductance hydraulique.

Le P12 correspond au point d'entrée d'air, autrement dit à la pression à laquelle débute la cavitation dans les vaisseaux. Le P88 correspond au point de mortalité, ou la pression à laquelle la défaillance hydraulique est totale chez les angiospermes. Ce point de mortalité chez les

gymnospermes se situe au P50. Enfin, le P50 est le point le plus utilisé. Il correspond à la pression à l'intérieur des vaisseaux induisant 50% de perte de conductance hydraulique, c'est un index permettant de classer les espèces selon leur vulnérabilité à la cavitation (Figure 7) (Fichot et al., 2015). Plus une espèce aura un P50 négatif, moins son xylème sera vulnérable à la sécheresse, ces espèces vivent principalement dans des milieux secs.

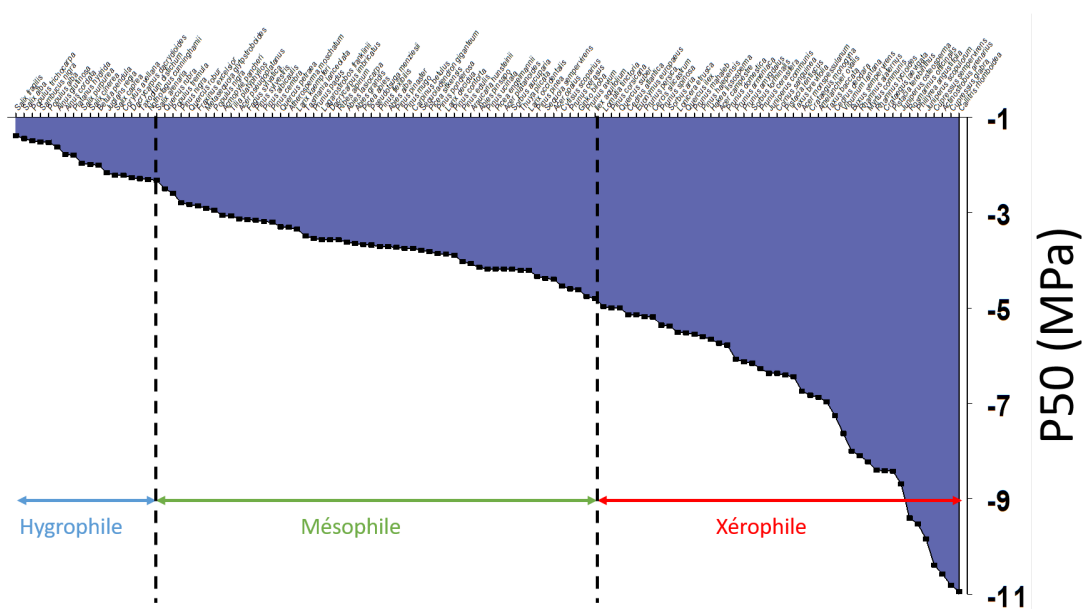


Figure 7 : Variations du P50 en fonction des espèces. Les espèces ayant un P50 élevé (proche de 0) sont considérées comme hygrophiles ou vivant dans des milieux humides, à l'inverse, celles ayant un P50 faible sont considérées comme xérophiles donc vivant dans des milieux secs (adapté de la base de données de Lens et al)

2.2. Les stress hydrique et thermique

2.2.1. Définition d'un stress environnemental

Le stress est défini par Taiz et Zeiger 2008 comme « un facteur externe qui exerce une influence désavantageuse sur la plante. ». Un stress peut être biotique, dû à un élément vivant comme un pathogène, un insecte ou un animal quelconque, ou abiotique c'est-à-dire dû à un élément environnemental comme la température, l'eau, ou la minéralité du sol. Nous nous intéresserons ici aux stress abiotiques.

Les effets des stress peuvent se faire ressentir en différents laps de temps. Par exemple, un stress thermique montre ses effets en quelques heures, comparé au stress hydrique qui se fera ressentir en quelques jours voire semaines en fonction de l'intensité.

2.2.2. Le stress hydrique

Lors d'un stress hydrique, l'eau se fait plus rare dans le sol, les ménisques formés par l'eau entre les différents composants du sol se creusent et augmentent les forces de tension dans le sol induisant une augmentation des forces de tension dans le xylème pour extraire cette eau du sol. Comme le ratio transpiration/apport racinaire devient important, les stomates se ferment afin d'éviter de trop grandes pertes en eau. Cependant, si l'évapotranspiration reste importante, les forces de tension continuent d'augmenter dans les vaisseaux du xylème jusqu'à un point critique induisant de la cavitation. Un stress hydrique moyen induira certes de la cavitation mais pas suffisamment pour atteindre le seuil critique de mortalité de la plante, les vaisseaux embolisés le resteront mais de nouveaux vaisseaux pourront être fabriqués afin de pallier au manque de conductivité. En revanche, si le stress hydrique est trop important, le seuil de mortalité risque d'être atteint induisant la mort de la plante ou de l'arbre (Cochard, 2014).

2.2.3. Le stress thermique

Les stress thermiques regroupent les stress causés par le gel, le froid ou la chaleur, ici nous nous concentrerons sur les stress thermiques causés par la chaleur.

Au niveau foliaire, les températures élevées ont un effet négatif sur la photosynthèse. Le point de compensation de température est la température à laquelle l'absorption de CO₂ utile pour la photosynthèse égale la quantité de CO₂ rejeté par la respiration, si cette température est dépassée, la quantité de CO₂ rejeté sera plus importante que celle absorbée, mettant en déclin les réserves de sucres (Taiz et al., 2014). La capacité photosynthétique peut revenir à la normale après un temps plus ou moins long en fonction de la sévérité du stress thermique (Pallardy, 2008).

A l'échelle de l'arbre (Figure 8), une augmentation de la température courte mais intense, importante vague de chaleur, semble avoir un effet plus prononcé sur la croissance de l'arbre et la production de biomasse des racines, tiges et feuilles qu'une augmentation moyenne de la température sur la même période (Teskey et al., 2015).



Process	Heat effect	Acclimatation	Process	Heat effect	Acclimatation
Leaf area development	↘	No	Photosynthesis	↘	Yes
Leaf shedding	↗	?	Dark respiration	↗	Yes
Growth	↘	Yes	Photorespiration	↗	Yes
Mortality	↗	Yes	Stomatal conductance	↗/↘	Yes
Fecundity	↘	Yes	Transpiration	↗/↘	No

Figure 8 : Les différents effets d'un stress thermique à différentes échelles de l'arbre. Les flèches indiquent un effet positif ↗ ou négatif ↘ de la chaleur sur le processus associé. La présence de deux flèches indique une variation inter ou intra espèce de l'effet chaleur (Teskey et al., 2015).

Habituellement les stress thermiques sont couplés aux stress hydriques pour plusieurs raisons :

- Une diminution de l'humidité relative de l'air induisant une augmentation de températures peut être due à une diminution de la couverture nuageuse augmentant les flux de chaleur sensible du sol
- Une augmentation du déficit de pression de vapeur (VPD) due à des températures élevées induisant une augmentation de l'évapotranspiration et donc à un dessèchement plus rapide du sol (Teskey et al., 2015)

Un stress thermique aura des effets plus importants chez une plante en conditions de stress hydrique, en effet, lors d'un stress hydrique, les stomates se ferment afin de limiter les pertes en eau, de ce fait, l'évapotranspiration ne peut plus jouer le rôle de refroidissement des feuilles, amplifiant l'impact du stress thermique.

2.3. Impact des stress hydrique et thermique sur l'état hydrique des plantes

Le classement des espèces selon le concept iso/anisohydrique se base principalement sur le comportement des traits hydrauliques des plantes (potentiel hydrique, conductance stomatique) en réponse à une modification de l'environnement (potentiel hydrique du sol ou VPD) (Ratzmann et al., 2019).

Les espèces isohydriques, du grec iso- : égal, ont la capacité de maintenir un potentiel minimal relativement stable lors des changements de conditions environnementales. A l'inverse, les

espèce dites anisohydriques maintiennent les échanges gazeux au risque de voir leur potentiel hydrique diminuer fortement (Pivovarov et al., 2018).

Ce concept fait donc intervenir le dilemme dans la stratégie de survie des plantes : mourir de faim ou mourir de soif ? Le maintien du potentiel hydrique chez les plantes isohydriques s'effectue grâce à une fermeture précoce des stomates lorsque les conditions environnementales ne sont plus favorables, cette fermeture des stomates permet donc de garder l'eau à l'intérieur de la plante au détriment des échanges gazeux et de l'absorption de CO₂ utile pour la photosynthèse. Les sucres présents dans la plante ne sont plus suffisants pour maintenir le métabolisme, la plante peut finir par mourir de faim par privation de carbone. En gardant leurs stomates ouverts, les plantes anisohydriques peuvent maintenir plus longtemps leur métabolisme carboné mais ont plus de risques de mourir d'une défaillance hydraulique (Mcdowell et al., 2008).

Le concept iso/anisohydrique a été utilisé comme la principale classification des espèces en fonction de leurs réponses au stress hydrique depuis les années 1990. Cependant, il est aujourd'hui largement remis en cause du fait qu'il ne prend pas en compte l'environnement de la plante : une espèce peut passer d'anisohydrique à isohydrique en fonction du potentiel hydrique du sol. C'est pourquoi il est plus pertinent de classer les plantes en fonction de leur potentiel hydrique au point de perte de turgescence, conductance hydraulique maximale et vulnérabilité du xylème à la cavitation pour étudier leurs réponses au stress hydrique (Hochberg et al., 2018)

Une fois les stomates fermés, la conductance stomatique devient nulle. Cependant, lorsque l'apport en eau reste limité dû au stress hydrique, les plantes continuent de se déshydrater. Ceci est dû à la transpiration résiduelle.

Dans les cas où le stress hydrique serait problématique de par son intensité et sa durée, les pertes en eau non contrôlées par la plantes peuvent être responsable de la mise en place d'événements de cavitation.

Les plantes subissent des changements de potentiel hydrique au cours de la journée, arrivant au Ψ_{\min} au midi solaire. La pression à l'intérieur des vaisseaux du xylème, pourtant minimale, n'induit pas de dégâts à la plante qui peut récupérer après une journée sèche. Lors d'événements de sécheresse répétés et plus longs, la pression à l'intérieur des vaisseaux peut atteindre la valeur létale pour les plantes (P50 pour les conifères ou P88 pour les feuillus) avec peu de rétablissement possible. La marge entre le Ψ_{\min} et le $\Psi_{\text{létal}}$ est appelée marge de sécurité, elle a une valeur moyenne de 2MPa. Dans cette marge de sécurité, la plante peut subir des dégâts sans

pour autant atteindre le point de non-retour, une formation de nouveaux vaisseaux conducteurs est possible afin de permettre son rétablissement.

La marge de sécurité est un trait plastique dans une même espèce, des individus ayant un Ψ_{\min} plus faible verront leur marge de sécurité plus étroite (Delzon and Cochard, 2014).

Dans une situation de stress hydrique extrême, si aucun apport d'eau n'est effectué alors que les demandes évaporatives restent élevées, la présence d'air dans certains vaisseaux embolisés risque de s'expandre aux vaisseaux alentours via les ponctuations augmentant ainsi le nombre de vaisseaux embolisés et impactant fortement la circulation de l'eau des racines jusqu'aux feuilles. La conductance de l'eau dans les vaisseaux du xylème devient insuffisante pour alimenter les organes en eau, la plante se dessèche et meurt. C'est ce qu'on appelle la défaillance hydraulique, qui semble être la principale cause de mortalité lors d'événements de sécheresse (McDowell et al., 2008).

Ces événements suivent une cinétique précise telle qu'illustrée en Figure 9 mettant en évidence que malgré les mécanismes d'économies d'eau (fermeture stomates et chute des feuilles) mis en place par la plante, la transpiration résiduelle, bien que faible, est déterminante dans le timing d'apparition de la cavitation et de la mortalité de l'arbre par défaillance hydraulique.

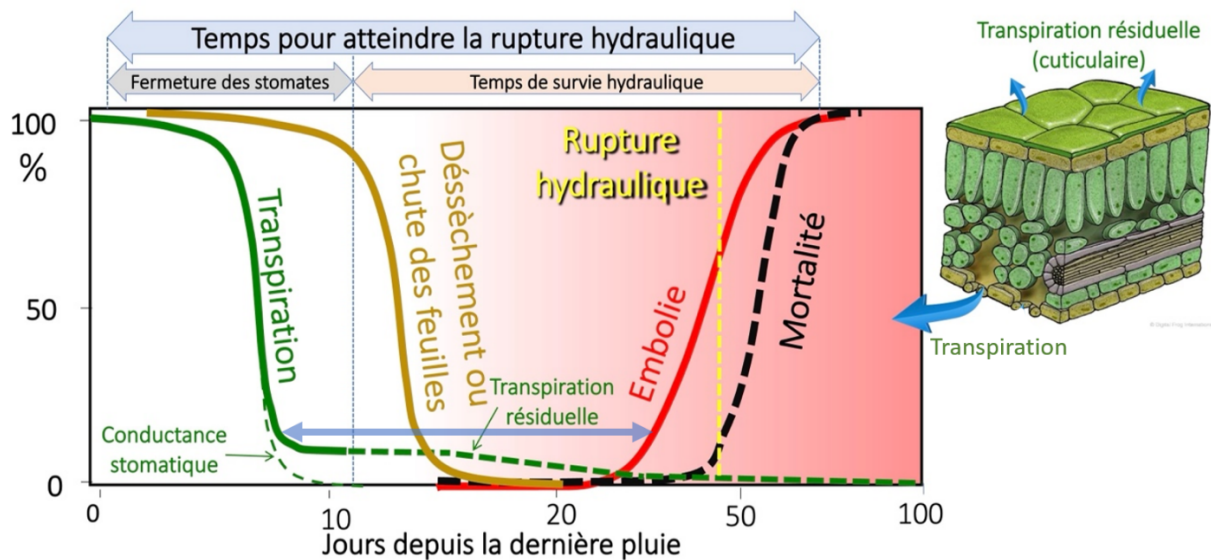


Figure 9: Cinétique de mortalité des arbres dans des conditions de sécheresse référant les différents événements amenant à la défaillance hydraulique et à la mortalité de la plante. La double flèche bleue représente la marge de sécurité.

La cinétique de déshydratation telle que présentée en Figure 10 illustrant la perte de masse hydrique d'une branche mise en déshydratation dans des conditions environnementales stables

de 30°C et 40% d'humidité relative montre 3 phases. La première phase (A) correspond au temps de fermeture stomatique, elle est généralement assez courte (environ 10 heures). Lorsque les conditions ne sont pas optimales pour la plante, les stomates se ferment afin de réduire fortement les pertes en eau (Paragraphe 272.1.3), la perte de masse lors de cette phase est donc relativement importante et illustre le principe de transpiration stomatique. La deuxième phase (B) montre une perte de masse hydrique plus limitée et beaucoup plus longue (environ 150 heures). Cette phase montre l'existence de pertes en eau après la fermeture stomatique. Ces pertes en eau, non contrôlées ou résiduelles sont plus faibles que les pertes par évapotranspiration mais amènent fatalement à la troisième phase (C). Cette dernière phase est considérée comme la phase de défaillance hydraulique. Les pertes en eau deviennent nulles, la branche est complètement déshydratée et a atteint le point de non-retour, ou le P50 (ici, ou P88 pour une espèce angiosperme).

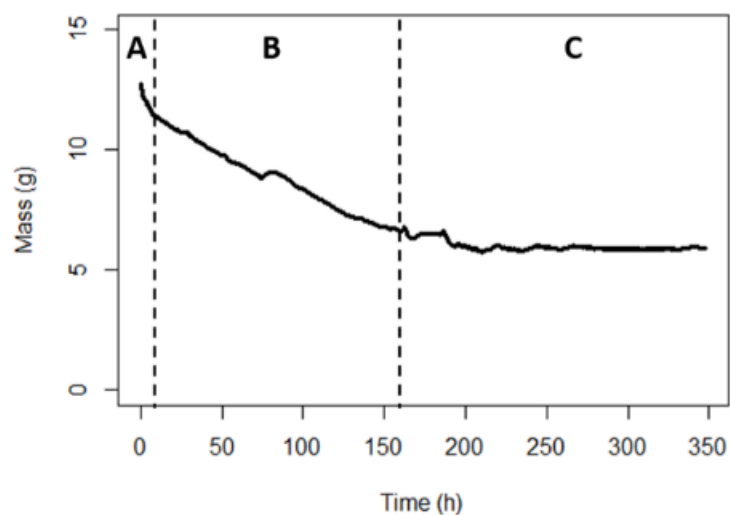


Figure 10 : Cinétique de perte de masse d'une branche de Pseudotsuga menziesii laissée à déshydrater dans un environnement stable à 30°C et 40% d'humidité relative en 3 phases. A : temps de fermeture stomatique d'environ 10 heures, B : perte de masse due à la transpiration résiduelle de 10 à 166 heures et C : teneur en eau minimale de la branche dans les conditions imposées (données personnelles)

Le Time to Hydraulic Failure ou temps de défaillance hydraulique est le temps nécessaire à une plante en conditions de stress hydrique pour atteindre le P88 pour les angiospermes ou le P50 pour les gymnospermes. Il a longtemps été admis que le P50 pouvait être considéré comme le seul trait déterminant la résistance au stress hydrique chez les plantes, et donc était le facteur principal du THF. Or, regardant la Figure 11, les deux espèces conifères ayant des P50 très

proches montrent des cinétiques de déshydratation différentes, *Pseudotsuga menziesii* atteignant la 3^{ème} phase de déshydratation, défaillance hydraulique, en premier. La transpiration résiduelle, bien que très faible, se révèle donc être un facteur prédominant dans la détermination du THF.

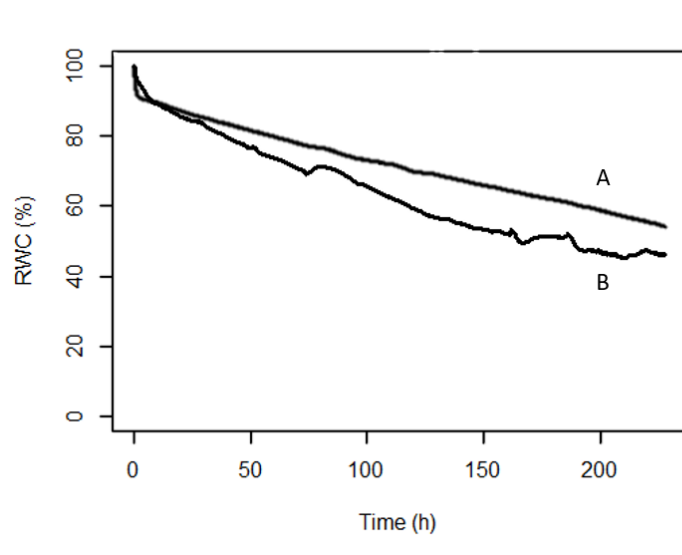


Figure 11: Cinétiques de déshydratation en pourcentage de contenu en eau relatif pour deux espèces conifères (*Picea abies* A et *Pseudotsuga menziesii* B) ayant des P50 très proches (données personnelles).

3. La transpiration résiduelle et les éléments intervenants post fermeture stomatique

Le terme de transpiration résiduelle rassemble toutes les pertes en eau non contrôlées par la plantes, ces pertes proviennent des lenticelles de l'écorce, des stomates dont la fermeture n'est pas totale ainsi que de la cuticule des feuilles et organes primaires aériens (Sánchez et al., 2001; Kerstiens, 2006; Schuster et al., 2017; Duursma et al., 2019).

Selon la littérature, il existe différents termes concernant la transpiration après la fermeture stomatique ne mesurant pas exactement les mêmes phénomènes. La conductance résiduelle en elle-même est mesurée sur feuille détachée, elle comprend donc les pertes résiduelles via les stomates non-complètement fermés et la cuticule, elle est appelée g_{min} . La conductance cuticulaire ne comprend que les pertes résiduelles via la cuticule, sous le nom de g_{cuti} elle est en moyenne 10 fois plus faible que g_{min} . La conductance nocturne, g_{dark} , a pu être utilisée comme un proxy de g_{min} , seulement, la nuit les stomates ne se ferment pas complètement. En moyenne, g_{dark} est 8 fois plus important que g_{min} . Enfin, étant donné que les pertes en eau résiduelles peuvent aussi s'effectuer via les lenticelles de l'écorce, une nouvelle dénomination plus pertinente a été introduite, g_{res} , qui rassemble les pertes résiduelles de la cuticule, des stomates pas complètement fermés et des lenticelles.

3.1. Les composés de g_{res}

Comme expliqué dans le chapitre précédent, le g_{res} est calculé à partir des fuites résiduelles provenant de l'écorce via les lenticelles, des stomates non-complètement fermés et de la cuticule. Contrairement au g_{min} ou au g_{cuti} , le g_{res} est le trait le plus représentatif des pertes d'eau chez les arbres soumis à des stress hydriques et/ou thermiques induisant la fermeture des stomates pour réduire la transpiration stomatique. Au niveau de la feuille, il a été montré que la part stomatique des pertes résiduelles représentait 35% des pertes résiduelles totales, 65% donc pour la part cuticulaire non stomatique (Šantrůček et al., 2004). Des études récentes ont également démontré l'importance de g_{bark} dans les pertes en eau résiduelles (Wolfe, 2020; Loram-Lourenço et al., 2022). C'est pourquoi il a été décidé dans la suite de cette thèse de mesurer les pertes résiduelles sur branche entière et de normaliser par la surface foliaire ainsi que par la surface de la branche afin d'avoir une estimation des pertes totales.

3.1.1. Les méthodes de mesure de la conductance résiduelle

Il existe plusieurs méthodes de mesures de la conductance résiduelle dans la littérature, ces méthodes diffèrent selon le trait mesuré. La perméance cuticulaire est mesurée comme la perte en eau à travers des disques de feuilles ou des cuticules isolées enzymatiquement. Ces disques de feuilles ou cuticules isolées sont placées à la surface de chambres de transpiration remplies d'eau et pesées à intervalles de temps réguliers et la perméance cuticulaire est calculée comme le taux de transpiration cuticulaire (la pente de la droite de régression de la courbe de perte en eau en fonction du temps) divisé par la différence de concentration de l'eau à travers la membrane cuticulaire agissant comme force motrice et exprimée en $m.s^{-1}$ (Burghardt and Riederer, 2003). La conductance minimale (g_{min}) est mesurée sur feuilles détachées avec le site de coupure du pétiole scellé à la paraffine. Les feuilles sont mises à déshydrater soit sur paillasse, soit dans des chambres de culture à température et humidité relative fixes et sont pesées à intervalles de temps réguliers afin de déterminer les pertes en eau en fonction du temps. Le g_{min} est calculé comme le taux de transpiration minimal divisé par la force motrice et est exprimé en $m.s^{-1}$ pour la différence en concentration de vapeur d'eau comme force motrice ou en $mmol.m^{-2}.s^{-1}$ pour la différence en fraction molaire de la vapeur d'eau (Burghardt and Riederer, 2003; Schuster et al., 2017).

3.1.2. La cuticule

C'est la couche la plus externe située sur les organes primaires. Sa formation remonte au milieu

du Paléozoïque, il y a environ 450 millions d'année, quand les plantes sont devenues terrestres. Cette couche externe est utile afin de lutter contre les attaques biotiques et abiotiques comme les rayons UV, la sécheresse, le vent... (Waters, 2003).

Son épaisseur, qui varie de 0.2 à 200 μm , et sa structure chimique ainsi que son organisation sont fonction de l'espèce, de l'organe de la plante et du stade de développement (Jenks and Ashworth, 1999; Jetter and Riederer, 2016). Elle possède plusieurs propriétés : translucide, flexible et auto-réparatrice (Riederer and Schreiber, 2001).

Elle est composée de 2 couches, la couche plus profonde, « cuticular layer » est composée de domaines riches en cutines entremêlés de polysaccharides. La couche la plus externe, « cuticle proper » est plus pauvre en polysaccharides mais très riche en cires intracuticulaires (Yeats and Rose, 2013). A la surface de cette dernière, on trouve des cristaux de cires épicuticulaires pouvant avoir plusieurs formes : en « croûtes », « cheminées », « fils » et autres (Figure 12) et peut donner plusieurs propriétés à la plante comme l'hydrophobicité des feuilles de Lotus ou la glaucescence des feuilles de *Populus tremula* (Koch & Ensikat, 2008).

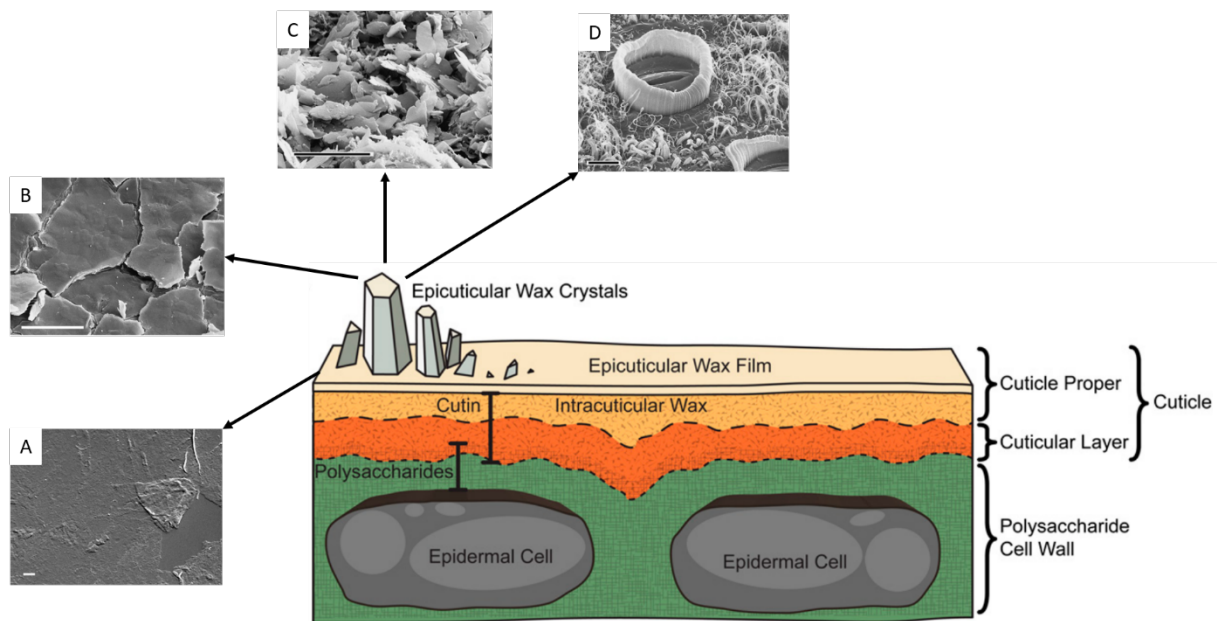


Figure 12: Diagramme schématique mettant en évidence les principales caractéristiques structurelles de la cuticule et de la couche cellulaire épidermique sous-jacente. En insert, différents types de surfaces cuticulaires telles que l'absence de cristaux de cires (A), une croûte cireuse (B), des plaquettes à bord régulier (C) ou un ensemble de cheminées autour des stomates et de fils cireux (D). Modifiée de (Koch and Ensikat, 2008; Yeats and Rose, 2013).

La cuticule agit comme une membrane solution-diffusion, l'eau se dissout ainsi au niveau de l'interface cuticule-paroi cellulaire, se diffuse dans la matrice solide et finalement de désorbe au niveau de la couche la plus externe de la membrane cuticulaire (Kerstiens, 1996), en résumé,

les molécules d'eau se frayent un chemin aléatoire dans la cuticule (Kerstiens, 2006). Sa composition en cires très hétérogène impose une difficulté supplémentaire pour l'eau pour s'évaporer, ces cires pouvant former des domaines cristallins réduisant les pertes en eau (Sánchez et al., 2001). Ainsi, la composition de la cuticule la rend quasi-imperméable à l'eau. Chimiquement parlant, les cires cuticulaires sont composées d'acides gras à très longues chaînes (VLCFA Very Long Chain Fatty Acids) dérivées de la synthèse d'acides gras en C16 ou C18 dans les plastes des cellules épidermales. Ces acides gras peuvent ensuite former des alcools primaires qui peuvent soit se mélanger aux cires soit être estérifiés à un acide gras pour former des esters de cires. Les VLCFA peuvent aussi former des alcanes ou des aldéhydes que l'on retrouve aussi dans le mélange de cires (Yeats and Rose, 2013; Bueno et al., 2019c). Globalement, les cires sont un mélange de composés aliphatiques à très longues chaînes parmi lesquels on retrouve des alcools primaires et secondaires, aldéhydes, alcanes, acides gras et autres métabolites secondaires comme les triterpénoïdes pentacycliques (Jetter et al., 2007; Yeats and Rose, 2013).

A la surface de la cuticule, on retrouve des cristaux de cires épicuticulaires. Ces cristaux ont différentes formes et confèrent à la plante quelques caractéristiques comme sa mouillabilité, sa réflexion de la lumière ou son aspect rugueux

3.2. Dépendance de la transpiration résiduelle à la température

Le g_{res} dans un environnement stable est une donnée relativement fixe (voir pentes des Figure 10 et Figure 11 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Cependant, l'environnement extérieur n'est jamais un facteur stable, la température montre des oscillations au cours de la journée, du mois et de l'année, voire au cours de la décennie, en cause, le réchauffement climatique. Il a été montré par Schönherr *et al.* (Schönherr et al., 1979) que la perméance cuticulaire augmentait avec la température en 2 phases. Sur la Figure 13, on peut observer la courbe d'évolution de la perméance cuticulaire (en logarithme népérien) en fonction de la température (croissante de droite à gauche) présentée sous forme de courbe d'Arrhenius, utilisée afin de déterminer l'effet de la température sur des réactions chimiques. Cette représentation démontre que la perméance cuticulaire réagit à la température sous une première phase stable, de 5 à 35°C puis une deuxième phase stable elle aussi mais à la pente plus abrupte de 50 à 65°C. Entre les 2 phases, on peut observer une inflexion de la courbe avec le point d'intersection des deux droites de tendances à 44°C. Cette température spécifique de l'espèce est appelée T_p , Température de transition de phase, elle correspond à la température à partir de

laquelle l'efficacité de la barrière cuticulaire n'est plus présente (Burghardt and Riederer, 2006). Cette réponse à la température est une réponse de changements dans la structure des cires cuticulaires, non de la matrice cuticulaire. En-dessous de cette température, les changements engendrés sur la structure des cires cuticulaires sont mineurs et réversibles, en revanche, une fois passé le T_p , les changements sont irréversibles et compromettent la barrière cuticulaire.

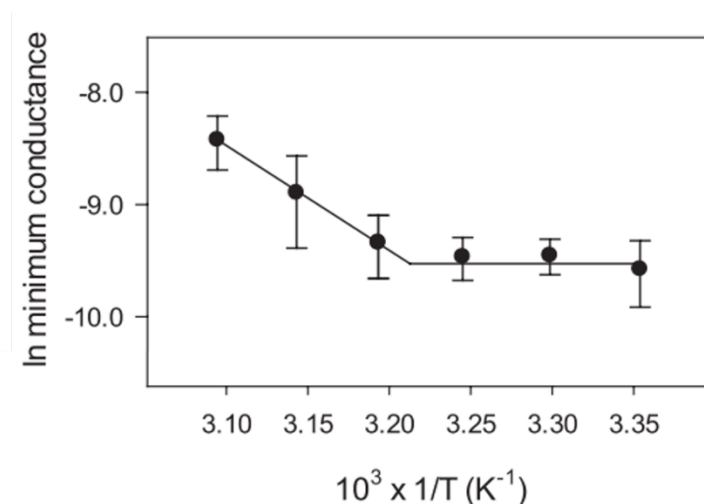


Figure 13: Courbe d'Arrhenius montrant l'évolution de la conductance cuticulaire de *Citrullus colocynthis* en fonction de la température (en K^{-1}). Modifiée de (Bueno et al., 2019a)

Si l'on regarde dans le Tableau 1 les différents T_p déjà mesurés, on peut exprimer une inquiétude quant aux valeurs de T_p comparées aux valeurs de température que nous subissons durant l'été dans nos régions continentales.

Tableau 1 : Liste non exhaustive des T_p mesurés sur différentes espèces dans la bibliographie.

Espèces	T_p (°C)	Matériel	Source
<i>Hedera helix</i>	37	Cuticules isolées	(Burghardt and Riederer, 2006)
<i>Camellia sinensis</i>	36	Cuticules isolées	(Burghardt and Riederer, 2006)
<i>Pyrus communis</i>	32	Cuticules isolées	(Burghardt and Riederer, 2006)
<i>Liriodendron tulipifera</i>	38	Cuticules isolées	(Burghardt and Riederer, 2006)
<i>Juglans regia</i>	35	Feuilles	(Schuster et al., 2016a)
<i>Rhazia stricta</i>	∅	Feuilles	(Schuster et al., 2016a)
<i>Citrullus colocynthis</i>	37.7	Feuilles	(Bueno et al., 2019b)
<i>Phoenix dactylifera</i>	∅	Feuilles	(Bueno et al., 2019b)

On peut aussi remarquer dans ce tableau 2 espèces qui se distinguent par leur absence de T_p ,

Rhazia stricta et *Phoenix dactylifera* qui sont toutes les 2 des espèces désertiques économes en eau, ce qui montre une barrière cuticulaire plus résistante aux changements de températures et donc la présence d'un trait adaptatif à ces plantes pour résister aux climats désertiques (Schuster et al., 2016a; Bueno et al., 2019b).

4. L'utilisation de la modélisation dans les prédictions du temps de défaillance hydraulique

4.1. Pourquoi en a-t-on besoin ?

La modélisation des relations hydriques des plantes n'est pas un sujet émergent, cependant, les modèles mis en place afin de comprendre et prédire les relations hydriques des plantes dans les cas d'événements extrême de sécheresse et de chaleur sont plus rares. Il est pourtant essentiel dans les conditions de changements climatiques et d'augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses couplées aux vagues de chaleur de comprendre et prédire les réponses des plantes. En effet, l'augmentation du dépérissement des forêts et la modification des biomes imposent la mise en place d'outils aidant à la détermination du temps de défaillance hydraulique des différentes espèces (Blackman et al., 2016; Martin-StPaul et al., 2017; Cochard et al., 2021). La modélisation permet, de façon non destructrice, de faire co-varier des traits impliqués dans les réponses à la sécheresse en fonction de l'environnement choisi dans le but de prédire les réponses des arbres.

4.2. Le modèle *SurEau*

Dans sa première publication, le modèle *SurEau* a été décrit comme un modèle mécanistique sol-plante simplifié à temps discret. Simplifié car il ne contenait que deux résistances (la rhizosphère et la plante) ce qui lui conférait une simplicité d'utilisation car il ne nécessitait pas d'hypothèse sur la segmentation (Martin-StPaul et al., 2017). L'idée principale du modèle *SurEau* est que la mortalité des plantes (ou le temps de défaillance hydraulique) dans des conditions de sécheresse sévère est due à une dessiccation, modélisée *via* la cavitation. L'hypothèse de fonctionnement du modèle repose sur le fait que les flux d'eau liquide traversant le système sol-plante sont exactement compensés par les pertes en vapeur d'eau à la surface des feuilles. De ce fait, lorsqu'un déséquilibre est entré dans les paramètres, le modèle est capable de calculer les réponses de la plante.

Depuis, le modèle a évolué en étant plus complet et précis. Les deux résistances ont laissé place à différents compartiments (cellules de calcul) d'organes hydrauliques reliés entre eux par les

flux d'eau. Les cinq principales résistances sont donc les racines, le tronc, les branches, les bourgeons et les feuilles contenant chacun des compartiments symplasmiques et apoplasmiques. Ce modèle est très performant et utile car il est capable de modéliser les événements se déroulant après la fermeture stomatique, à savoir la transpiration résiduelle à travers la cuticule, les événements de cavitation et l'utilisation des réservoirs hydriques, et ce, dans des conditions climatiques actuelles ou futures avec de déterminer le temps de défaillance hydraulique de différentes espèces dans un climat plus chaud et sec (Cochard et al., 2021). Le modèle *SurEau* a notamment permis de démontrer que l'augmentation de la transpiration résiduelle par la température, simulée en vagues de chaleur pendant un événement de sécheresse Figure 14), diminue fortement le temps de défaillance hydraulique de plusieurs jours (Cochard, 2019).

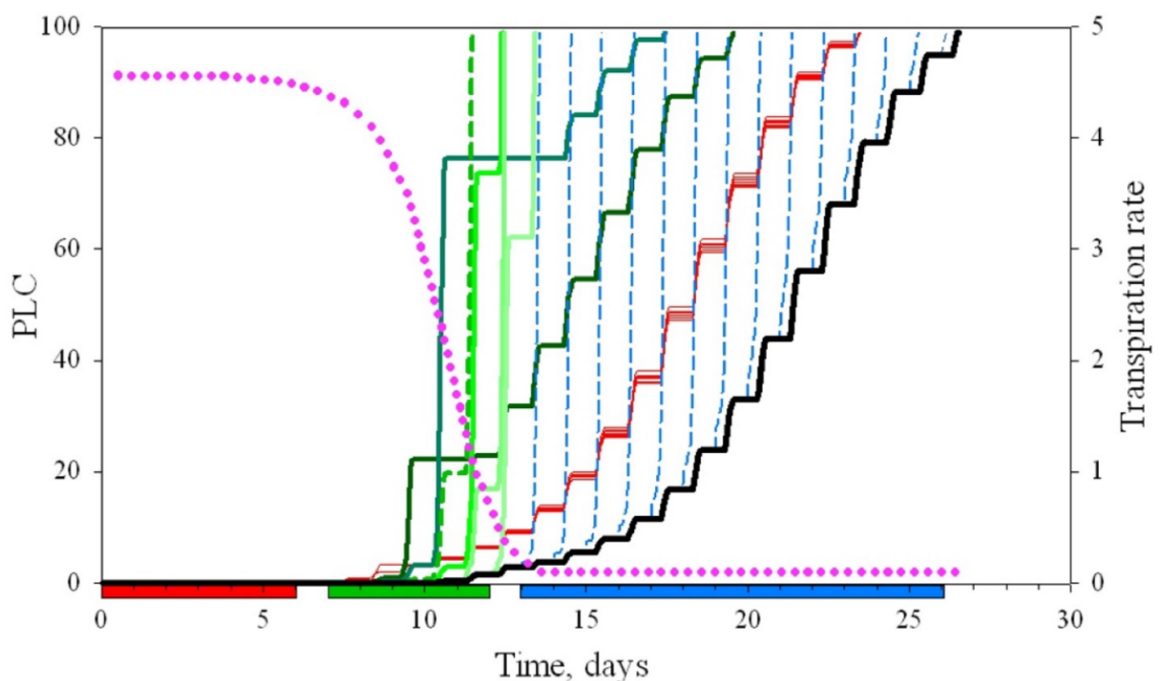


Figure 14: Simulations du temps de défaillance hydraulique en fonction du temps en conditions de sécheresse démarrant au T0. Le taux de transpiration (en rose) ainsi que le pourcentage de perte de conductance (en noir) ont été simulés pour une plante seulement exposée au stress hydrique. La simulation montre le temps de défaillance hydraulique pour une plante exposée à une vague de chaleur (3 jours à +15°C) entre 0 et 6 jours (rouge), entre 7 et 12 jours (vert) et 13 jours et plus (bleu) après arrêt d'irrigation (Cochard, 2019).

5. Objectifs et hypothèses

Les objectifs de cette thèse ont été multiples :

- Mettre en place un outil de mesure du g_{min}/g_{res} répondant au cahier des charges des

obligations de mesures, à savoir un environnement stable, des mesures de poids de précision et temporelles, en enregistrement automatique des données dans le temps, en somme un outil de mesure autonome et peu invasif et vérifier sa fiabilité.

- Déterminer l'importance du T_p dans les mesures de temps de défaillance hydraulique, introduire ce « nouveau » trait dans les index déjà existants comme le P50.
- L'arbre ne pouvant pas être considéré comme une seule cuticule/feuille, déterminer l'importance relative de multiples traits aussi bien physiologiques que chimiques et physiques à différents niveaux de l'arbre dans la tolérance à la sécheresse et aux stress thermiques.
- Démontrer que l'arbre à grande échelle et la feuille à plus petite échelle sont des systèmes très complexes et introduire cette notion dans les futures analyses.
- Vérifier la pertinence des prédictions du modèle *SurEau* via une expérimentation à grande échelle

La DroughtBox, un nouvel outil de mesure du g_{res}

1. Résumé

Dans le contexte climatique actuel, il est plus qu'important de comprendre les mécanismes de réponse des arbres face à la sécheresse ainsi qu'à la chaleur. Les mesures habituelles de g_{leaf} , g_{res} , ou g_{min} consistent en la déshydratation de feuilles ou branches sur la paille avec enregistrement des conditions environnementales telles que la température et l'humidité relative. Les feuilles ou branches sont ensuite pesées à l'aide de balances de précisions afin de déterminer leur perte de masse correspondant aux pertes en eau dues à la transpiration. Ces mesures de perte de masse dans le temps permettent de calculer la transpiration résiduelle de la feuille ou de la branche, autrement dit la quantité d'eau perdue (en mmol) de façon non régulée en fonction de la surface foliaire (en m^2) et du temps (en secondes). Cette mesure de transpiration résiduelle peut également être effectuée en laissant se déshydrater des feuilles ou branches dans une étuve avec une température et une humidité relative régulées ce qui permet un suivi plus précis de la transpiration résiduelle dans un contexte climatique donné. Pour ce faire, les feuilles ou branches doivent être sorties de l'étuve le temps de la pesée induisant un changement dans la température et l'humidité relative à l'intérieure de l'étuve, ces variations environnementales peuvent faire l'objet d'un biais dans la mesure de la transpiration résiduelle. Pour pallier à ces inconvénients, nous avons mis au point une chambre de mesure de transpiration résiduelle permettant de garder un environnement climatique stable et des mesures de masses automatique tout en restant close. Cette chambre, la DroughtBox, est une boîte faite de panneaux de mousse isolante de 4 centimètres d'épaisseur dont la taille peut être personnalisée en fonction des éléments végétaux à analyser (branches ou feuilles). Elle est composée d'un compartiment supérieur contenant des jauges de contraintes reliées à des cartes d'acquisition et d'un compartiment inférieur contenant une résistance chauffante, un système de régulation de l'humidité relative, un capteur de température et d'humidité relative, des lampes LED simulant la lumière du jour ainsi que des crochets reliés aux jauges de contrainte permettant de suspendre les feuilles ou branches à analyser. Le tout est relié à un nano-ordinateur Raspberry Pi et à un micro-contrôleur Arduino permettant de déterminer la ou les températures et pourcentages d'humidité relative, le temps d'acquisition et l'intervalle de temps entre deux mesures. Ces données sont envoyées sur une adresse IP afin de pouvoir les récupérer à distance.

Les mesures réalisées dans la DroughtBox montrent une stabilité de l'environnement très

précise avec des variations de température et d'humidité relative maximales de 0.3°C et 1% respectivement. Cette précision permet une mesure fine de la transpiration résiduelle sur branche (g_{res}) pour différentes espèces, ici *Abies alba*, *Picea abies*, *Cedrus atlantica*, *Pseudotsuga menziesii* et *Quercus ilex*. Cet outil est, entre autre, très utile pour analyser les différences de g_{res} entre interspécifique en environnement fixe. Cet environnement très stable permet aussi de mesurer le Time to Hydraulic Failure (THF) avec précision en laissant des branches de déshydrater dans le temps. Les résultats nous ont montré un THF plus court pour les espèces ayant précédemment subi une vague de chaleur. De plus, la possibilité de moduler l'environnement pendant une mesure de transpiration résiduelle permet de déterminer les changements en temps réel de g_{res} dus à un changement de température et/ou d'humidité relative, autrement dit, à un changement de VPD. Ces analyses permettent de déterminer le T_p (température de transition de phase) pour chaque espèce qui est la température à partir de laquelle le g_{res} augmente de façon significative, cette température correspond au seuil à partir duquel la plante n'est plus capable de résister à ses pertes en eau résiduelles.

Cet outil de mesure a fait l'objet d'un article technique publié dans la revue Plant, Cell and Environment en février 2020.

2. The DroughtBox: a new tool for phenotyping residual branch conductance and its temperature dependence during drought

Billon LM^{1†}, Blackman CJ^{1†}, Cochard H¹, Badel E¹, Hitmi A¹, Cartailleur J¹, Souchal R¹, Torres-Ruiz JM^{1*}

¹Université Clermont-Auvergne, INRAE, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France

[†] Equal contributors

* *Corresponding author*: Torres-Ruiz, José M. (torresruizjm@gmail.com)

Summary statement: We describe the DroughtBox, a new low-cost tool for phenotyping residual conductance (g_{res}) and phase transition temperature (T_p) in plants. An accurate determination of g_{res} and T_p is crucial for predicting plant mortality in conjunction with recently developed mechanistic models.

Keywords: DroughtBox, minimum conductance (g_{min}), residual conductance (g_{res}), leaf cuticle, drought, heatwave, phase transition temperature (T_p).

2.1. Abstract

Xylem hydraulic failure is a major driver of tree death during drought. However, to better understand mortality risk in trees, especially during hot-drought events, more information is required on both rates of residual water-loss from small branches (g_{res}) after stomatal closure, as well as the phase transition temperature (T_p) beyond which g_{res} significantly increases. Here, we describe and test a novel low-cost tool, the DroughtBox, for phenotyping g_{res} and T_p across species. The system consists of a programmable climatically controlled chamber in which branches dehydrate and changes in mass recorded. Test measurements show that the DroughtBox maintains stable temperature and relative humidity across a range of set points, a prerequisite for getting accurate g_{res} and T_p values. Among a study group of four conifer and

one angiosperm species, we observed a range of g_{res} ($0.44 - 1.64 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and T_p ($39.4 - 43.8 \text{ }^\circ\text{C}$) values. Furthermore, measured time to hydraulic failure varied between two conifers species and was shortened in both species following a heatwave event. The DroughtBox is a reliable and customizable tool for phenotyping g_{res} and T_p , as well as for testing models of time to hydraulic failure that will improve our ability to assess climate change impacts on plants.

2.2. Introduction

Global warming is triggering massive tree mortality events worldwide due to an increase in the frequency of heat waves and extreme drought events (Allen et al., 2010; Choat et al., 2012). As soil dries out under drought conditions, increasing tension within the water conducting xylem can exceed a threshold value causing cavitation and the formation of air-embolisms that block water flow, causing catastrophic hydraulic failure and leading to plant death (Tyree and Sperry, 1989). Plants may reduce the risk of hydraulic failure during drought by evolving xylem tissue highly resistant to cavitation and/or by maintaining favourable plant water status through stomatal closure and low residual transpiration (Sperry et al., 1993). Characterizing how different plant species modulate these traits will determine their risk of drought-induced mortality (Choat et al., 2012) and is crucial for predicting how climate change will affect species distribution and vegetation composition worldwide (Jentsch et al., 2007).

Cavitation resistance is one of the most studied traits involved in tree mortality and it is evaluated by determining P_{50} which corresponds to the xylem pressure inducing 50% of loss of conductance ((Tyree and Ewers, 1991). Cavitation resistance is correlated with environmental conditions related to water availability, with more vulnerable trees (i.e., higher P_{50} values) generally growing in high rainfall environments (Brodribb and Hill, 1999; Blackman et al., 2012; Choat et al., 2012). However, P_{50} may not be sufficient alone for assessing species drought-response strategy and explaining differences in their spatial distribution. For example, relatively high P_{50} values of between -1 to -2 MPa have been reported for baobab trees occurring in extremely dry and hot deserts (Chapotin et al., 2006). Therefore, in addition to P_{50} , it is important to evaluate other traits related species drought response strategy, such as hydraulic capacitance (Gleason et al., 2014), stomatal closure (Arve et al., 2011; Blackman et al., 2019a; Creek et al., 2020) and residual conductance (Burghardt and Riederer, 2003; Martin-StPaul et al., 2017).

Stomatal functioning and behaviour have been studied for decades (van den Honert, 1948; Hygen, 1951; Pickard, 1981). In most species under non-limiting water conditions, stomata

open during the day to acquire atmospheric CO₂ for photosynthesis while at the same time lose water due to transpiration. To avoid desiccation during drought, plants close their stomata, which reduces rates of water loss. However, even when stomata are closed, plants continue to lose water through leaf cuticles, leaky stomata and bark (lenticular conductance). These residual water losses influence the kinetics of cavitation as a consequence of their role in determining the time at which point plant water potentials reach threshold values of hydraulic failure (Blackman et al., 2016; Martin-StPaul et al., 2017; Blackman et al., 2019a). Indeed, simulations with a recently developed mechanistic model ('*SurEau*' model, (Martin-StPaul et al., 2017) show how residual conductance is a principal determinant of the onset of hydraulic failure. Following stomatal closure, residual leaf transpiration mainly occurs through the cuticle, but may also occur to a largely unknown extent through leaky stomata. These residual water losses are collectively termed the leaf minimum conductance, or g_{\min} (Schuster et al., 2017), and is determined by its conductance to water vapor and the vapor pressure deficit (VPD) between the leaf and the air. Observations to date suggest g_{\min} varies across species (Schuster et al., 2017; Duursma et al., 2019), although may only be correlated with environmental conditions such as rainfall in some groups of plants (Brodribb et al., 2014). Research also suggests g_{\min} may be sensitive to increasing temperature. For example, Bueno et al (2019) showed how g_{\min} increases significantly when temperatures increase above 37.7°C for *Citrullus colocynthis*. This threshold point where g_{\min} markedly increases has been called the phase-transition temperature (T_p) and corresponds to the temperature above which cuticular permeability increases as a result of changes in the structure of cuticular waxes (Burghardt and Riederer, 2006). The T_p value is important because it gives information on the ability of plants to resist uncontrolled and rapid dehydration leading to run-away embolism during periods of high temperature (Cochard, 2019). To date, the most widely used methodology for determining g_{\min} consists of repeated measurements of detached leaves dehydrating on a bench (Burghardt and Riederer 2003). This method, however, depends on the climatic conditions inside the lab, which if not constant will induce significant differences in water loss rate through time. This approach also makes it difficult to assess the temperature response of g_{\min} and subsequent determination of T_p due to the difficulties of reaching and maintaining relatively high air temperatures. Another way to measure g_{\min} under variable conditions is to place detached leaves in an incubator and control relative humidity with the addition of Silica gel (Schuster et al., 2016b). Although this method can be used to determine both g_{\min} and T_p , it still relies on repeated manual measurements of leaf mass.

Measurements of residual water losses from plants have mainly focused on leaf cuticles (g_{cuticle})

and detached leaves (g_{\min}). Nevertheless, water loss from plant shoots during drought also occurs through the bark (g_{bark}), the contribution of which remains largely unknown. Thus, we define a term for the collective branch residual conductance (that is, $g_{\min} + g_{\text{bark}}$) as g_{res} . Here we introduce and test a new automated tool, the DroughtBox, for phenotyping g_{res} and its possible temperature dependence T_p . The main aims of this study are to i) describe the principle and setup of the DroughtBox; ii) demonstrate its capability to accurately regulate temperature (T) and relative humidity (RH) through time; iii) measure g_{res} and T_p in branches from from a group of four conifer and one angiosperm species; and iv) determine the time required to dehydrate to critical levels of hydraulic failure under constant and constant \times heatwave conditions.

2.3. Material and method

Description of the DroughtBox

The DroughtBox consists of a 70 cm cubic box made of 40 mm thick polystyrene boards with a front door and two compartments (Figure 15).

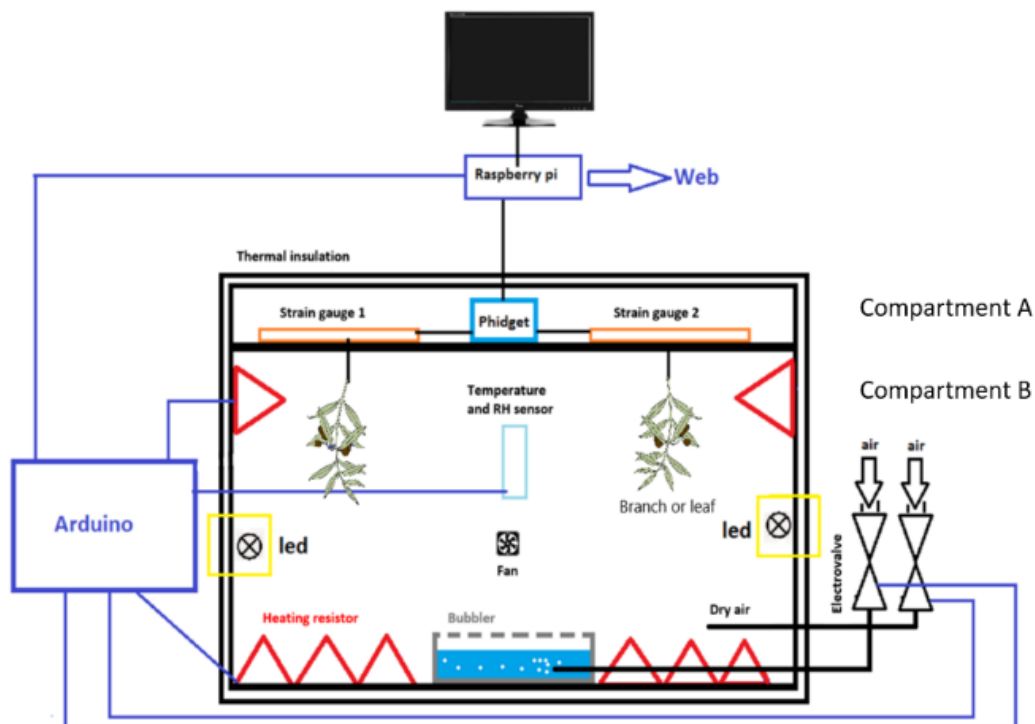


Figure 15: Schematic of the DroughtBox. Branches in the lower compartment are attached to strain gauges in the upper compartment, which are linked to an acquisition board PhidgetBridge and to a Raspberry Pi computer. Following hydration overnight, branches are allowed to dehydrate inside the insulated box in which temperature is controlled via heating resistors and relative humidity is controlled via the injection of either dry or humidified air.

Each environmental parameter is controlled by a microcontroller, Arduino, which responds to experimenter commands. Small (4 cm diameter) fans circulates the air at a constant rate.

In the upper compartment (comp. A), eight 500g strain gauges AS05 (Wimesure, France) are fixed to an aluminium frame and connected to an acquisition board (PhidgetBridge 4-Input 1046, Phidgets inc., Unit 1 – 6115, 4 St SE, Calgary AB T2H 2H9, Canada). Branches for g_{res} measurements are placed in the main lower compartment (comp. B) and attached to the strain gauges through holes in the roof board. An air temperature and relative humidity sensor (HyT271, Innovative Sensor Technology IST AG, Switzerland) is suspended in the branch compartment to monitor changes in these two variables within the compartment. Heating resistors (HK-5,0-12 75W, A. Rak Wärmetechnik GmbH, Germany) and heat dissipators are also placed in this compartment to enable temperature increases up to a maximum of 55°C. Relative humidity in the compartment B is adjusted by differentially injecting water-saturated or dry air with two electronically controlled valves. Both the heating resistors and the three-way valves are piloted by an Arduino MEGA 2560 to control T, RH and, therefore, VPD. Small fans, installed in the compartment B, stir the air in order to reduce spatial heterogeneities in T and RH. To induce stomatal opening in fresh, well-hydrated branches, 4 LED lights XLamp CXA3070 (8646 lm and 4000K, CREE, North Carolina, USA) illuminate inside the box. The DroughtBox is controlled by a nano-computer Raspberry-Pi 3 (Raspberry pi Foundation, United Kingdom) that allows users to program and set up target temperatures and relative humidity conditions in the compartment B. Two programs record both the mass of the branches and the T and RH conditions at specified time steps either under fixed or variable climate conditions.

Plant material and sample installation

Four conifer (*Abies alba* Mill., *Picea abies* L., *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) *Cedrus atlantica* var. *glauca* (Endl.) Carri) and one angiosperm (*Quercus ilex* L.) species were used in the current study. Three of the conifers (*A. alba*, *P. abies* and *P. menziesii*) were collected at the Royat Arboretum (Royat, France, 45°45'22.8"N 3°01'26.1"E), while *C. atlantica* and *Q. ilex* were collected at INRAE of Crouël (Clermont-Ferrand, France, 45°46'30.8"N 3°08'38.2"E). Branches 1-1.5 m in length were collected at 2-3 meters height from the outer part of the crown of 6-8 trees and transported to the lab in large plastic bags. The cut end of each branch was recut and kept in water overnight while the terminal of the branches were enclosed in plastic bags and stored in dark conditions to allow full rehydration. Before their installation in the

DroughtBox, each branch was recut *ca.* 40 cm from the tip, the cut end sealed with paraffine wax (melting point 68°C, Fluka) and the branch fresh weight immediately measured. Branches were then attached to each of eight strain gauge hooks using copper wire, after which the box was closed and the branches allowed to dehydrate progressively.

Performance of the DroughtBox in regulating T and RH.

The capacity of the system for reaching and maintaining constant conditions of T and RH was evaluated. We set a temperature of 30°C and relative humidity of 40% for 90 consecutive hours and monitored T, RH and VPD every 5 seconds. We then evaluated the capacity of the system to increase T from 30 to 50°C over a period of twenty hours with step-wise increases in T of 5°C and RH both held constant at 40% and allowed to decrease so that air water concentration was maintained at 10.6 g.kg⁻¹.

Determination of g_{res}

Eight branches from each of the five species were installed in the Drought-Box to determine g_{res} under fixed conditions, with T and RH set at 30°C and 40%, respectively. These values are typical of summer midday conditions in the area where the samples were collected (Clermont-Ferrand, Supplementary material, Figure S1).

The weight w (g) of each branch was recorded at 5 min intervals. We assumed that changes in w represented water molecules (n_w , mmol) leaving the branches by transpiration which enables the calculation of E (mmol s⁻¹ m⁻²) following equation (1):

$$E = -\frac{\text{slope}(n_w; t)}{LA + BA}$$

With t the time in seconds, LA the two-sided leaf area (m²) derived from the leaf dry mass of each measured branches and empirical relationships between leaf dry mass and fresh leaf area (i.e. SLA), and BA the surface area (m²) of the stem determined from measurements of stem length and basal diameter and assuming the shape of a cone. Finally, the g_{res} is calculated from the linear portion of the water loss curve, i.e. after stomatal closure, following equation (2) :

$$g_{res} = \frac{E}{VPD} \times 101.6$$

With E the transpiration in mmol m⁻² s⁻¹, the air VPD in kPa and 101.6 the atmospheric pressure in the DroughtBox in kPa. For calculating g_{res} , we used the driving force derived, *i.e.* VPD, from leaf temperature measurements recorded for each species (more details below). At the end of the experiment, leaves were removed and oven-dried for 60 hrs for determination of leaf dry

mass.

Testing the temperature dependence of g_{res}

The aim of this experiment was to determine the phase transition temperature (T_p) by measuring g_{res} across a range of temperatures. For each species respectively, branches were exposed to a combination of increasing air temperature set at 30, 35, 40, 45, 50 and 55°C and decreasing RH set at 40, 30, 23, 18, 14 and 11% to maintain water concentration at 10.6 g kg⁻¹, except for *P. menziesii* which has undergone an increase in temperature from 30 to 50°C with 5°C steps and a decrease in RH at 40, 30, 23, 18 and 14%. The duration (hours) of each temperature step varied as follows: 10, 3, 3, 3, 1 and 1 hrs for the conifer species and 6, 1, 1, 1, 0.75 and 0.75 hrs for *Q. ilex*, respectively. These sequences of time ensured that stomata had closed, that g_{res} was stable toward the end of each temperature step, and that branches did not run out of water at higher temperatures. At each temperature step, g_{res} was calculated using the driving force derived from leaf temperature measurements (see below). The temperature dependence of g_{res} was determined using an Arrhenius plot, which is the natural logarithm of g_{res} against the inverse of temperature in Kelvin.

Air vs leaf temperature

We examined possible differences between air and leaf temperature for each of the five species evaluated in this study. Thus, four branches per species were sampled and installed inside the Drought-Box, as described above. A series of four thermocouples connected to a datalogger (CR1000, Campbell Scientific INC, Vincennes, France) was secured to a single leaf/needle of each of the four branches, while an additional two thermocouples were hung in the air. Branches were exposed to the same temperature and relative humidity conditions over the same time-period used to measure T_p , from 30 to 55°C, 40 to 11% RH during 10, 3, 3, 3, 1 and 1 hrs for the conifer species and 6, 1, 1, 1, 0.75 and 0.75 hrs for *Q. ilex*, respectively. Air and leaf temperature were logged every 15 seconds. These experiments were also conducted on oven-dried leaves in two species (*C. atlantica* and *Q. ilex*).

Time to hydraulic failure

We assessed the time to hydraulic failure in a series of experiments using branches of two conifer species (*C. atlantica* and *P. abies*) dehydrated inside the Drought-Box under contrasting conditions. In experiment 1, eight branches of each species were dehydrated under constant and mild temperature (30 °C) and RH (40%). In experiment 2, eight branches of each species were

dehydrated under the same conditions as experiment 1, but were also exposed to a simulated heatwave, with temperature set to 46 °C and RH set to 17%, for a period of 10 hrs, following maximum stomatal closure. During all experiments, the concentration of water in the air remained constant at *ca.* 10.6 g kg⁻¹. Branches were sampled and prepared for installation inside the Drought-Box as described above. Once installed, they were allowed to dehydrate over a period of up to 100 hrs in both experiments, during which time individual branches were removed every 9-12 hrs. Upon removal, each branch was weighed (for fresh mass determination) and then sealed in a plastic bag for 10-15 minutes before being harvested for determination of water potential using a Scholander-type pressure chamber (PMS, PMS Instrument Company, Albany, USA) and percentage loss of conductance (PLC) at the branch level using X-ray microtomography (Micro-CT). All needles from each branch were collected and oven-dried for determination of leaf dry mass, while the dry mass of the stem component of each branch was calculated from strong allometric relationships ($r^2 > 0.85$) between leaf dry mass and stem dry mass measured on 5-8 additional branches per species.

The PLC of each branch was determined by using Micro-CT, a technique that allows the evaluation of embolism formation and spreading by direct observation (Torres-ruiz et al.; Cochard et al., 2015). Thus, each branch was adjusted to 60mm length with a razor blade, immersed in wax to avoid dehydration during scanning and placed in an X-ray microtomograph (Nanotom 180 XS, GE, Wunstorf, Germany) at the PIAF laboratory (INRAE, Clermont-Ferrand, France). For the micro-CT image acquisition and image combination, the field of view was adjusted to 4.0 × 4.0 × 4.0 mm³ and the X-ray source set to 60 kV and 240 μA. For each *ca.* 21min scan, 1000 images were recorded during the 360° rotation of the sample. After 3D reconstruction, the spatial resolution of the image was 2.00 × 2.00 × 2.00 μm³ per voxel. One transverse 2D slice was extracted from the middle of the volume using VGStudio Max© software (Volume Graphics, Heidelberg, Germany). After scanning the sample, a second scan was performed after the sample was cut in the air just below the scanned area, inducing air entry in the remaining functional conduits and therefore 100% of embolised xylem in the area. PLC was then calculated by comparing the area occupied by embolized tracheids measured after the first scan and the total xylem conductivity area (A_e and A_c , respectively) as:

$$PLC = 100 \frac{(A_e)}{(A_c)}$$

For each of Drought-Box experiments, the time to hydraulic failure was defined as the number of hours required for branches to dehydrate from full hydration to levels of water stress associated with 50% loss of theoretical conductivity, as determined from micro-CT

measurements of PLC in branches during the experiments.

Statistical analysis

Significant differences in g_{res} values were determined with ANOVA tests with $\alpha < 0.05$ followed by a Tukey HSD post-hoc or with a Kruskal Wallis test followed by Wilcoxon post hoc test when homoscedasticity of variances was not fulfilled. Spearman rank correlation test was used to test the effect of temperature increase on g_{res} . For the time to hydraulic failure experiments, the time (hrs) at 50% loss of conductivity was determined using the *fitplc* function combined with a ‘loess’ model. The RWC at this time was determined from linear mixed-effects models fit to the branch relative water content vs. time data. The relationship between PLC and RWC over the course of dehydration was described using the *fitplc* function with a ‘weibull’ model.

2.4. Results

Set to a constant temperature of 30°C and a RH of 40%, both air T ($30 \pm 0.2^\circ\text{C}$) and RH ($40 \pm 1\%$) remained very stable during 90 hours of measurements (Figure 16a). When air temperature was increased in 5 °C steps, from 25 to 50 °C, and RH was held constant at 40%, RH maintained the target value ($\pm 0.2\%$) following a brief decline as temperature increased (Figure 16b). At each step, temperature increased $\sim 0.3^\circ\text{C}$ above the target temperature, before stabilizing ($\pm 0.01^\circ\text{C}$) after roughly 20 minutes. When water concentration was set to remain constant (at $10.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) across temperatures, RH took less than 10 minutes to reach the corresponding value (Figure 16c).

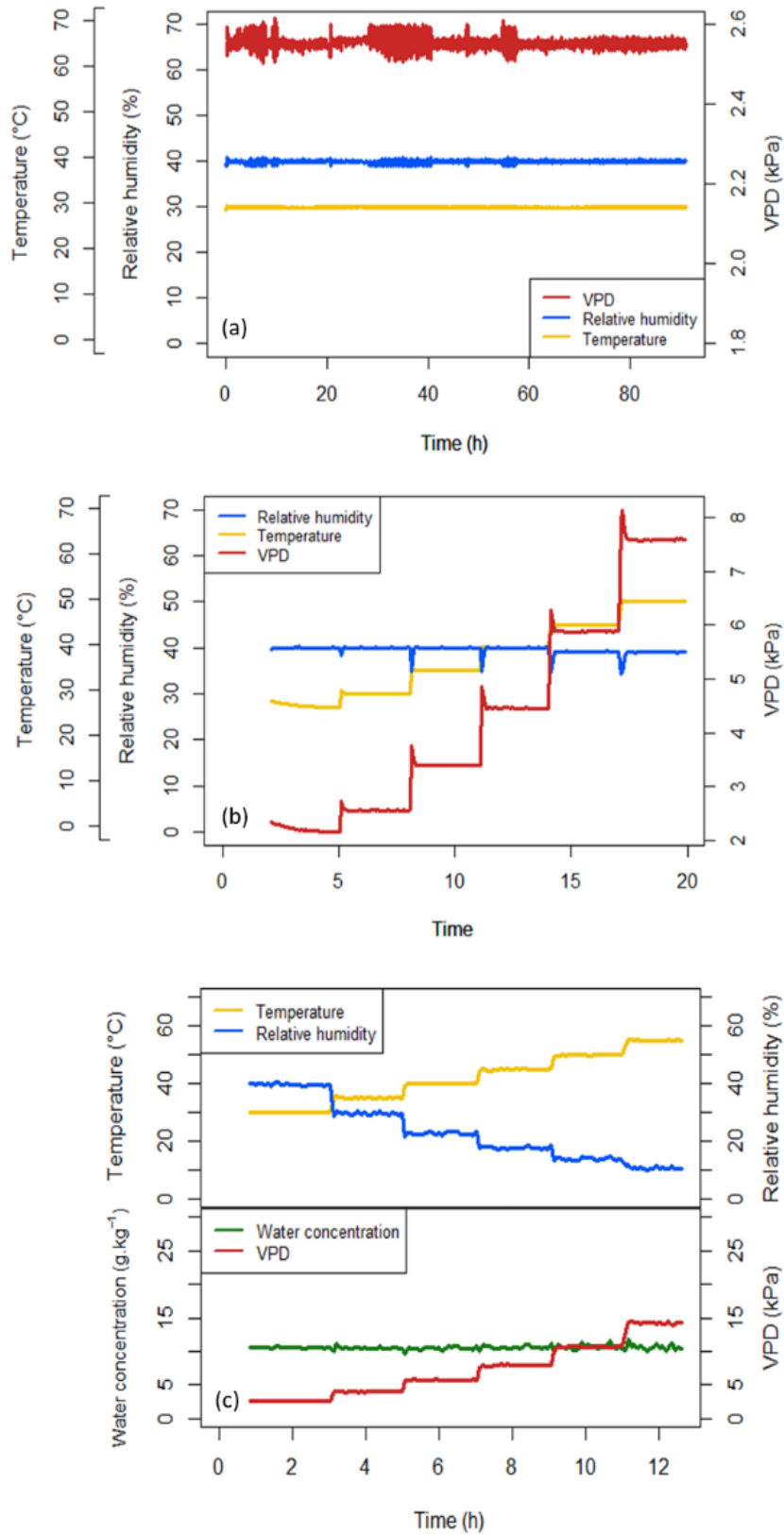


Figure 16: Time courses of environmental conditions inside the DroughtBox. A: stable conditions, B: ramps in temperature with stable relative humidity and C: ramps in temperature with stable water vapor concentration.

For each of the conifer species, the dynamics of plant water loss over time tended to follow three distinct phases represented by: A) a first short phase lasting a few hours with high rates of water loss until maximum stomata closure; B) a second phase characterised by a stable shallow slope, during which time stomata are closed but water loss continues via residual conductance (g_{res}); and C) a third phase characterized by a flattening of the slope as branch water content eventually reaches equilibrium with the ambient relative humidity (Supplementary material Figure S2). Branch residual conductance, measured at 30 °C and at RH 40%, varied among the four conifers, ranging from 0.44 mmol m⁻² s⁻¹ in *P. abies* to 0.9 mmol m⁻² s⁻¹ in *Pseudotsuga menziesii*, while for the angiosperm *Q. ilex*, g_{res} was 1.64 mmol m⁻² s⁻¹ (Table 1). Measured across a range of temperatures, from 30 – 55 °C, all species showed a similar bi-phasic response whereby g_{res} increased significantly with increasing temperature > 39 °C (Figure 17). Among the four conifer species, T_p values were similar, ranging from 39.4 °C in *P. abies* to 42.1 °C in *A. alba*, while the highest T_p value was 43.8 °C recorded for *Q. ilex* (Table 1, Figure 17).

*Table 1: g_{res} (mmol m⁻² s⁻¹) ± standard errors for four conifers species (*Abies alba*, *Cedrus atlantica*, *Pseudotsuga menziesii* and *Picea abies*) and one angiosperm specie (*Quercus ilex*) at the different temperature levels and T_p value (°C) for each specie.*

Species Temperature (°C)	<i>A. alba</i> (mmol.m-2.S-1)	<i>C. atlantica</i> (mmol.m-2.S-1)	<i>P. menziesii</i> (mmol.m-2.S-1)	<i>P. abies</i> (mmol.m-2.S-1)	<i>Q. ilex</i> (mmol.m-2.S-1)
30	0.76 ± 0.02	0.62 ± 0.10	0.90 ± 0.03	0.44 ± 0.03	1.64 ± 0.05
35	0.80 ± 0.03	0.68 ± 0.03	0.90 ± 0.02	0.48 ± 0.04	1.55 ± 0.07
40	0.82 ± 0.01	0.79 ± 0.02	0.97 ± 0.04	0.55 ± 0.03	1.63 ± 0.05
45	0.95 ± 0.02	1.11 ± 0.02	1.36 ± 0.02	0.66 ± 0.03	1.74 ± 0.07
50	1.22 ± 0.02	1.58 ± 0.05	1.90 ± 0.02	0.85 ± 0.02	1.92 ± 0.03
55	1.53 ± 0.02	2.78 ± 0.03	N. A.	1.00 ± 0.02	2.78 ± 0.06
T_p (°C)	42.12	40.55	39.77	39.38	43.81

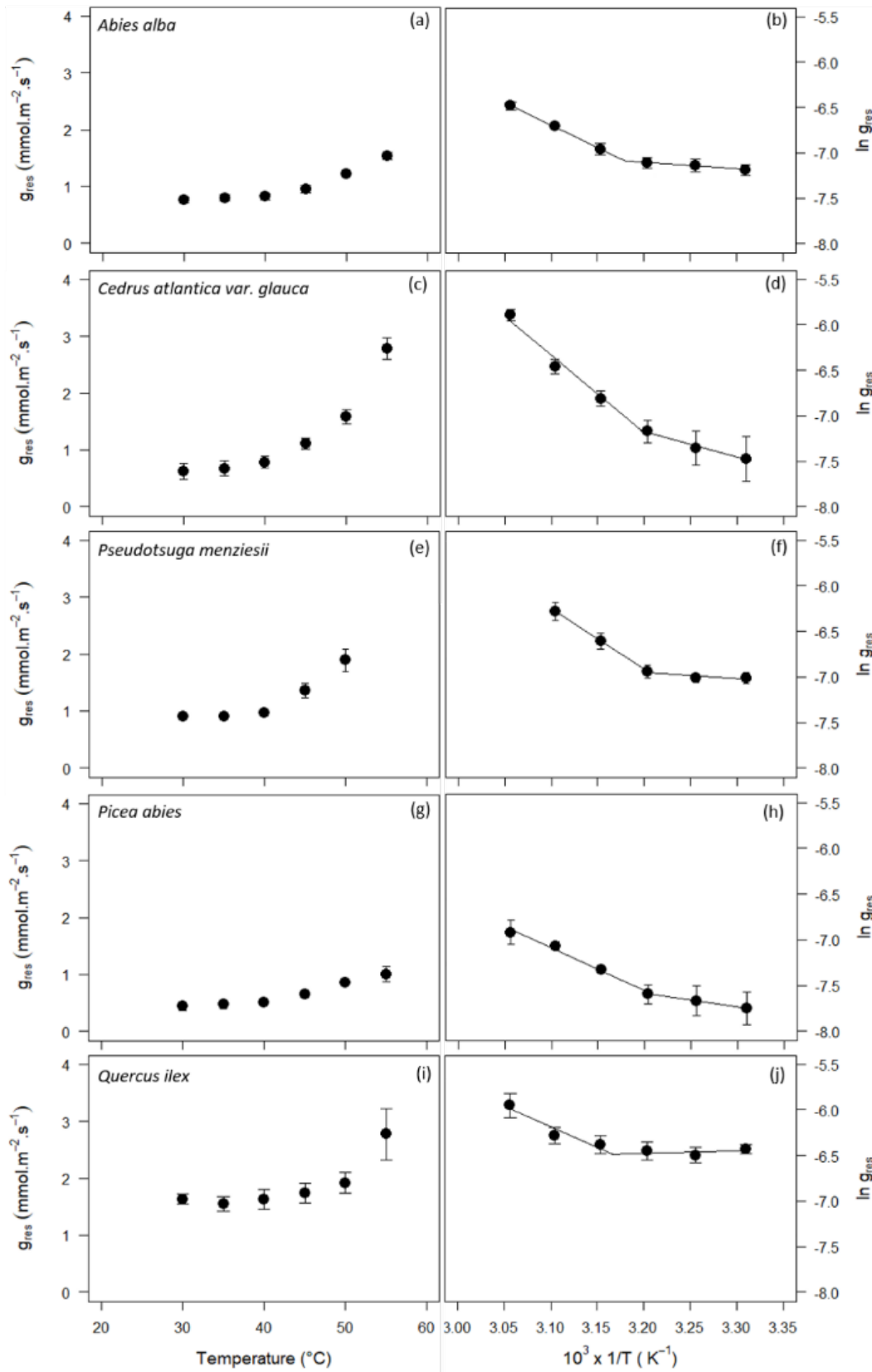


Figure 17: Plots showing temperature dependence of g_{res} and the corresponding Arrhenius plot for *Abies alba* (a, b), *Cedrus atlantica* (c, d), *Pseudotsuga menziesii* (e, f), *Picea abies* (g, h) and *Quercus ilex* (i, j) from 30 to 55°C with stable water vapor concentration at 10.6 g.kg⁻¹.

In all five species, leaf temperature tended to be lower than air temperature during dehydration (following stomatal closure), with air-leaf temperature differences increasing with increasing set temperature (Figure 18). At 30 °C, air-leaf temperature differences were relatively small across species, ranging from 0.02 °C for *Pseudotsuga menziesii* to 0.3 °C for *Q. ilex*, while at 55 °C, air-leaf temperature differences were larger, ranging from 0.76 °C for *P. abies* to 2.51 °C for *C. atlantica* (Figure 18a). In contrast, when using oven-dried leaves of *C. atlantica* and *Q. ilex*, leaf-air temperature differences were smaller across all temperature set points, with a maximum difference of 0.71 °C recorded for *C. atlantica* at 55 °C (Figure 18b). The accumulated difference between leaf and air temperature across the temperature set points was unrelated to g_{\min} recorded either at 30 °C or at 50 °C across species (Supplementary material Figure S3).

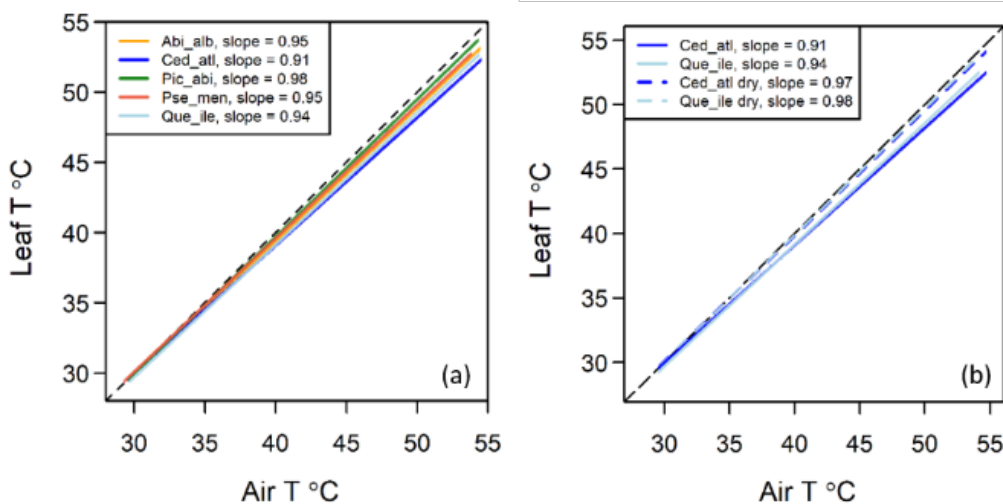


Figure 18: a) The relationship between leaf and air temperature with increasing set temperature inside the Drought-Box across the four conifer (yellow = *Abies alba*; blue = *Cedrus atlantica*; green = *Picea abies*; red = *Pseudotsuga menziesii*) and one angiosperm (light blue = *Quercus ilex*) species. The slope of the leaf-air temperature relationship across set points are included for each species. b) The relationship between leaf and air temperature (solid lines) and dry leaf and air temperature (dashed lines) with increasing set temperature inside the Drought-Box for the conifer *Cedrus atlantica* (blue) and the angiosperm *Quercus ilex* (light blue). The slope of the leaf-air temperature relationships across set points are included for each species.

Under constant temperature and relative humidity, the recorded time to hydraulic failure was

shorter in *P. abies* (62.1 hrs) compared to *C. atlantica* (83.3 hrs). The heatwave treatment increased the occurrence of xylem cavitation (see Figure 20) and resulted in a reduction in the time to hydraulic failure of 9.7 hrs in *P. abies* and 16.5 hrs in *C. atlantica* (Figure 19 c,d). The corresponding RWC at this point in time was 0.51 and 0.69, under constant conditions, and 0.38 and 0.50, under constant \times heatwave conditions for *C. atlantica* and *P. abies*, respectively (Figure 19 a,b). In response to the heatwave event, the relationship between PLC and RWC became decoupled, with 50% loss of conductivity occurring at much lower RWC values in both species when dehydrated under constant \times heatwave conditions compared to constant conditions (Figure 21).

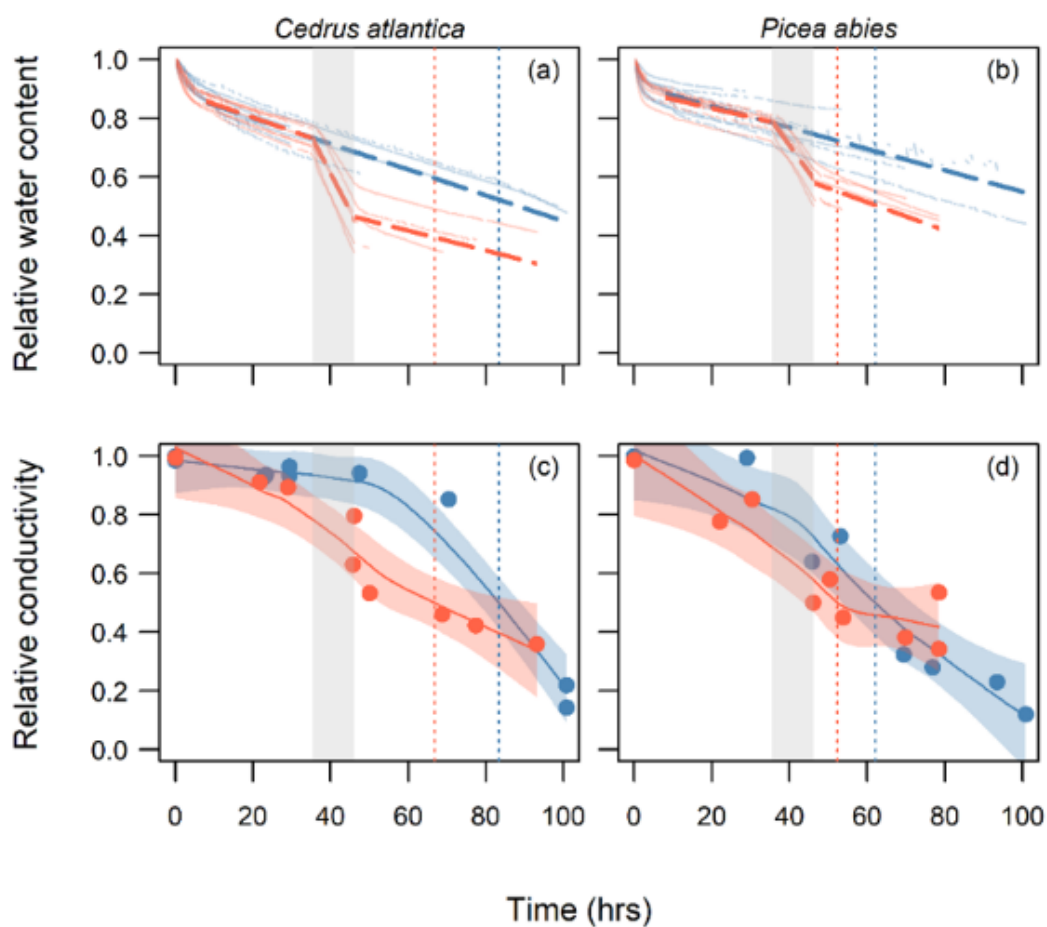


Figure 19: Plots showing changes in relative water content (plots a-b) and percentage loss conductance (expressed as relative conductivity, plots c-d) for branches of two conifer species (*Cedrus atlantica*, plots a, c; and *Picea abies*, plots b, d) dehydrated under contrasting climate conditions inside the Drought-Box. Blue lines and symbols represent branches dehydrated under constant temperature (30°C) and relative humidity (40%); red lines and symbols represent branches dehydrated under constant temperature (30°C) and relative humidity (RH, 40%), but punctuated by a 10 hr heatwave (grey shaded area) with temperature and RH set to

46°C and 17%, respectively.

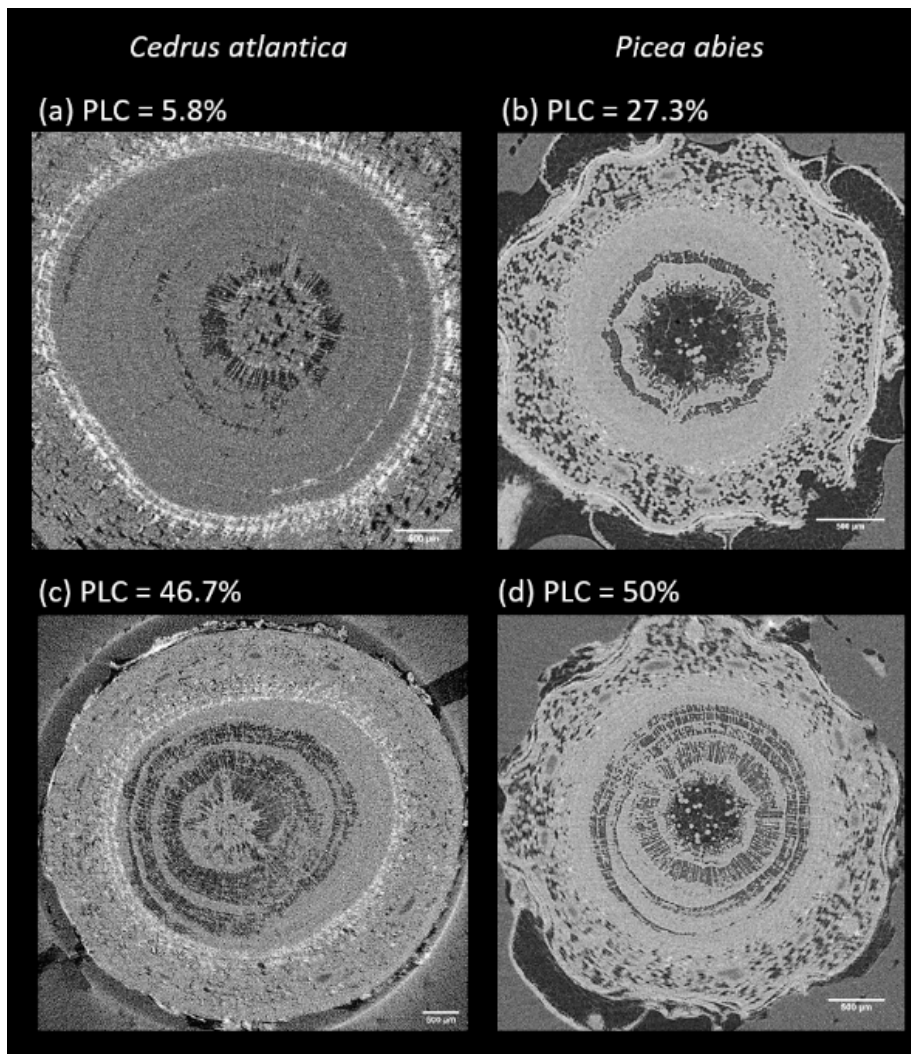


Figure 20: Transverse Micro tomography images of *Cedrus atlantica* (panels a and c) and *Picea abies* (panels b and d) obtained from control branches (panels a and b) and from branches that were exposed to heatwave (panels c and d). Conduits in grey and black represent those functional or cavitated tracheids, respectively. PLC indicates the theoretical loss of hydraulic conductivity for each image. Scale bars = 500 μm .

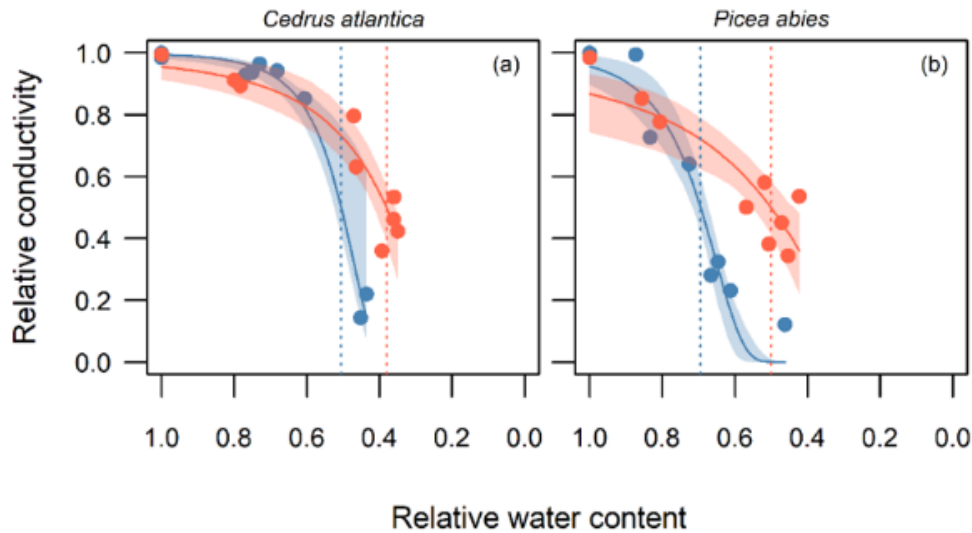


Figure 21: The relationship between relative conductivity of stem xylem (PLC) and relative water content (RWC) of branches of *Cedrus atlantica* (a) and *Picea abies* (b) dehydrated inside the Drought-Box under constant temperature and relative humidity (blue lines and symbols) and under the same conditions but punctuated by a heatwave event (red lines and symbols). Dashed vertical lines represent the RWC at 50% loss in conductivity. Note that for both species, PLC is decoupled from RWC under heatwave conditions.

2.5. Discussion

There is increasing awareness of residual water loss from leaves and stems (g_{res}) as a key determinant of the timing of hydraulic failure and tree mortality during drought (Blackman et al., 2016; Martin-StPaul et al., 2017). Furthermore, knowledge of the response of g_{res} to increasing temperature will further increase our understanding of tree mortality risk during hot-drought events (Cochard, 2019). As a result, an increasing demand for measurements of g_{res} and the transition-phase temperature (T_p) across diverse species can be expected in the near future. However, a reference tool and a standard protocol for determining these parameters has been lacking. The DroughtBox is intended to meet this need by allowing users to measure g_{res} under stable and variable air T and RH conditions, as well as assess species time to hydraulic failure during simulated drought and/or drought by heatwave events.

A fine control of air temperature and relative humidity and keeping both variables stable is essential for evaluating residual water loss from leaves and branches accurately. Until now, this condition has been difficult to attain, especially when using the standard bench dehydration method (Scoffoni and Sack, Minimum epidermal conductance, PrometheusWiki), being

necessary the use of incubators able to control air temperature but not relative humidity automatically (Schuster et al., 2016). Our test measurements show that the DroughtBox is able to maintain very stable conditions of temperature and relative humidity across a range of set points needed for measuring both g_{res} and T_p (Figure 16). With the added element of automated measurements of changes in branch mass, the DroughtBox represents a significant improvement for evaluating these parameters across species.

In the current study, g_{res} (measured at 30 °C and at 40% RH) varied among species, ranging from 0.4 mmol m⁻² s⁻¹ in the conifer *P. abies* to 1.64 mmol m⁻² s⁻¹ in the angiosperm *Q. ilex*. These values are broadly consistent with previous measurements of g_{min} in these species groups (Duursma et al 2019). This suggests that g_{res} , representing the combined residual conductance from leaves and stems (that is, the bark or lenticular conductance), is broadly comparable with previous measurements made solely on leaves. Although we did not measure bark conductance separately we believe that the bark component likely played a small role in our measurements of g_{res} considering that the surface area of the stem was relatively low (<5% across species) compared to that of the leaves. Additionally, while measuring g_{min} in the DroughtBox would be challenging for small conifer needles, we have successfully measured g_{min} in two angiosperm species with larger leaves (data not shown).

A major advantage of the DroughtBox is that it can be programmed to assess the temperature dependence of g_{res} (Burghardt and Riederer, 2006). This is important because temperature is known to have a significant effect on cuticular transpiration (Burghardt and Riederer, 2006), especially beyond the transition phase temperature T_p , which exposes plants to greater risk of mortality (Cochard, 2019). In the current study, we observed T_p values for small branches ranging from 39.4 °C in *P. abies* to 43.8 °C in *Q. ilex*. These values are consistent with the few previous measurements of T_p in temperate and arid-zone species (Burghardt and Riederer, 2006; Schuster et al., 2016c; Bueno et al., 2019b). They also broadly fit with each species climatic niche, with *P. abies* occurring in cool-wet regions of northern Europe and *Q. ilex* occurring in warm-arid regions of the Mediterranean, suggesting that T_p may be under selective pressure as an important driver of plant fitness during drought across climates. This is consistent with previous studies that have highlighted the importance of high T_p in drought resistant desert plants (Schuster et al., 2016c; Bueno et al., 2019b). In fact, evidence to date suggests that, compared to temperate species, hot desert plants may have a different cuticle composition that confer greater thermostability and thus a more stable g_{res} even under high temperatures (Bueno et al., 2019b). However, there is a need to increase the number of T_p values measured across diverse species before the links with climate and ecological strategy and also with cuticle

composition can be tested robustly.

The DroughtBox is also ideal for making measurements of the time for branches to dehydrate to critical levels of hydraulic failure (50% loss of xylem conductivity) under stable and/or variable climatic conditions. In our study, a longer time to hydraulic failure was recorded in *C. atlantica* than in *Picea abies* under fixed 30 °C conditions, even though g_{res} was found to be higher in *C. atlantica* (Table 1). This suggests other traits such as cavitation resistance, which is known to be higher in *C. atlantica* than in *Picea abies* (Choat et al., 2012), should be taken into account when determining time to hydraulic failure. For both species, the simulated heatwave event resulted in a strong reduction in the time to hydraulic failure, confirming that plants are at higher risk of mortality when facing hot-drought events (Cochard 2019). While the 46 °C heatwave exceeded T_p values of both species, a greater reduction in the time to hydraulic failure was recorded in *C. atlantica*. This response may be due to the greater temperature sensitivity of g_{res} recorded in this species (see Figure 17), the mechanism of which is likely related to specific temperature response characteristics of the leaf cuticle (Schuster et al 2016; Bueno et al 2019). Additionally, the heatwave acted to decouple the relationship between PLC and branch relative water content (RWC) during drought, with greater relative water loss at a common level of PLC (50%) in branches exposed to the heatwave. This suggests there may be a significant contribution of water loss from leaves and or branches in response heatwave events and furthermore implies that branch RWC is not a reliable predictor of hydraulic failure in plants exposed to hot-drought conditions.

In conclusion, the DroughtBox is a novel tool that allows for accurate measurements of both g_{res} and T_p under controlled conditions. Residual water loss from plants is increasingly studied due to its strong impact on the time to hydraulic failure during drought and, therefore, its relevance when evaluating the risk of drought-induced tree mortality. An increased knowledge of species T_p will enable researchers to model species responses during heat and drought events associated with a warming climate and also to get better projections of the risk of forest dieback and changes in tree species distribution. The DroughtBox improves upon previous techniques for measuring g_{res} that are either laborious, with repeated measurements of leaf mass on a balance, or lacked climate control of VPD. By being fully programmable, the DroughtBox not only allows physiological traits related with the thermostability of g_{res} , such as T_p , to be phenotyped, but also the dynamics of branch dehydration and time to hydraulic failure under a range of simulated climate conditions.

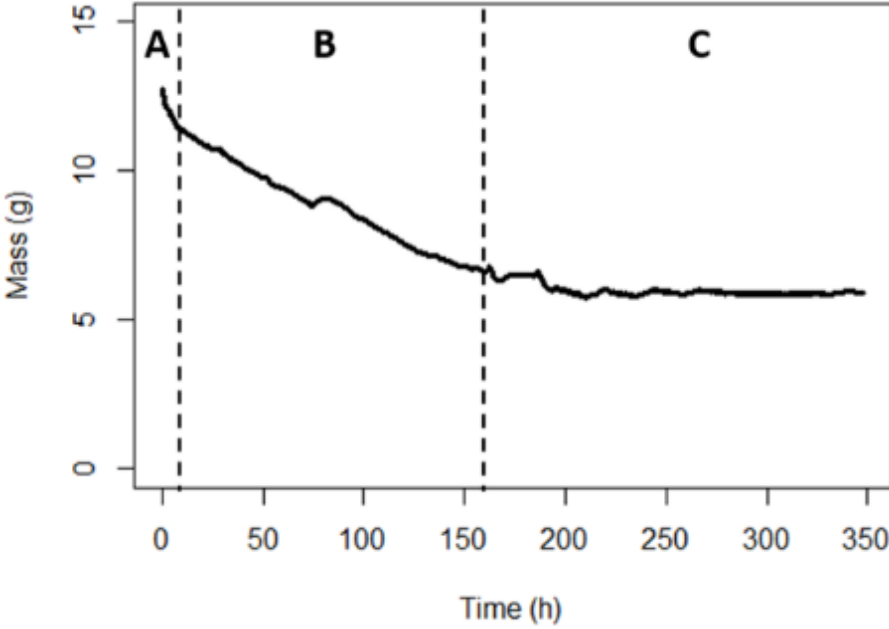
2.6. Acknowledgments

The authors thank Pierre Conchon for his technical assistance with Micro-CT and the Office National des Forêt and the Arboretum of Royat for allowing us to sample branches. This research was funded by the project ANR-18-CE20-0005 *Hydrauleaks*.

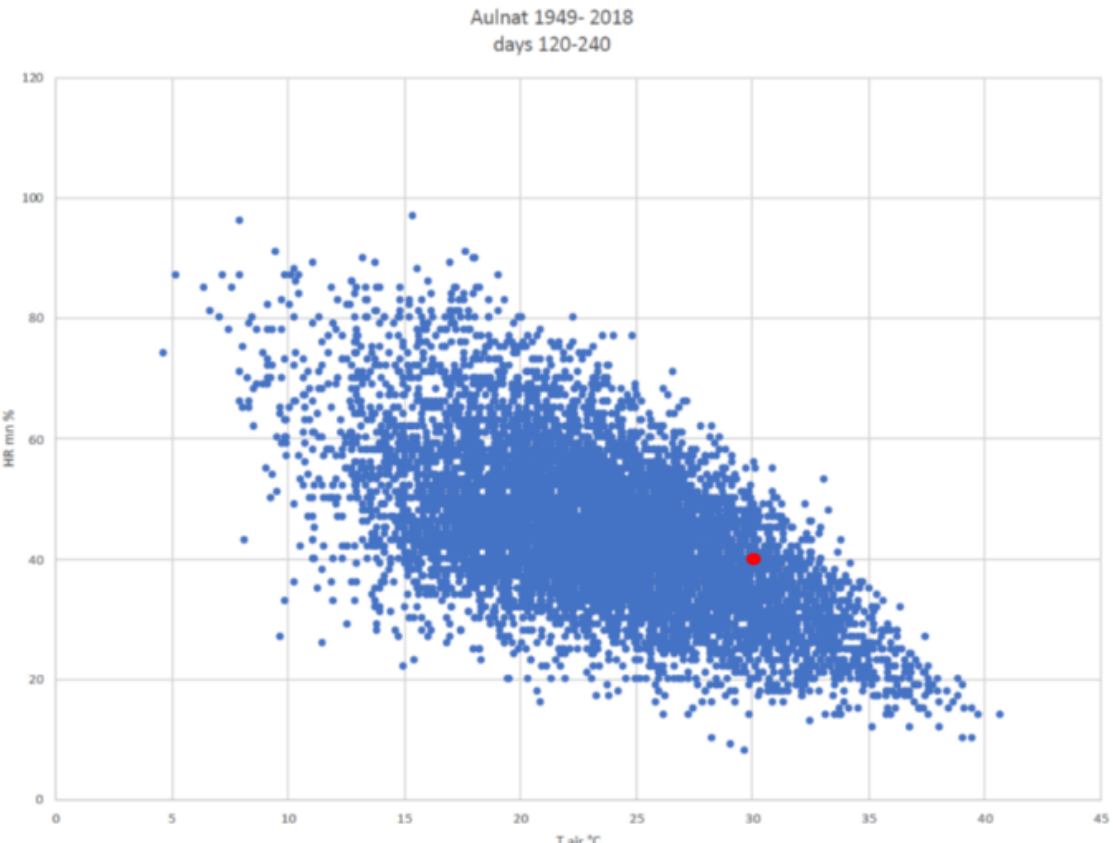
2.7. Author contribution

HC and JMTR: conceived and design of the DroughtBox. JC and RS constructed the first prototype, developed the programs for running it and provided substantial technical support during the measurements. LMB and CJB were responsible of running the measurements and carried out the data analysis. LMB, CJB, HC, and JMTR interpreted the results. LMB and CJB wrote the manuscript with input from HC, JMTR and AH.

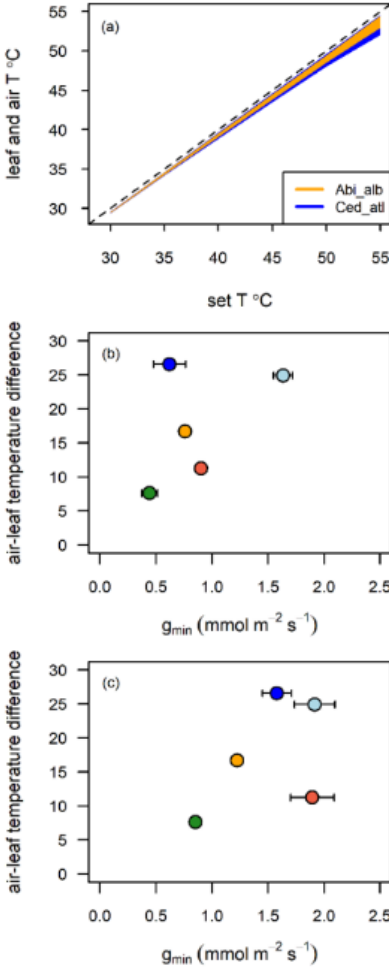
Supplemental figure 1



Supplemental figure 2



Supplemental figure 3



Effets des cires cuticulaires foliaires sur la transpiration résiduelle d'espèces tempérées

1. Résumé

La cuticule est la couche la plus externe des feuilles, fleurs, fruits et organes primaires. Elle est responsable en partie des pertes en eau résiduelles de la plante dans les conditions de stress hydrique avec les fuites stomatiques ainsi que les fuites à travers l'écorce du bois. Avec une augmentation de la température, la transpiration résiduelle, g_{res} , augmente de façon biphasique : une première augmentation jusqu'à une certaine température, T_p ou Température de transition de phase, à partir de laquelle l'augmentation de g_{res} se fait de façon plus importante. La littérature est encore peu développée à ce sujet, et principalement centrée sur la température de transition de phase d'espèces désertiques ainsi que sur les effets de la composition des cires cuticulaires sur la conductance minimale et le T_p . Or, dans un contexte de réchauffement climatique global induisant une augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses à fortes température, il est important de s'intéresser à la conductance résiduelle et au T_p ainsi qu'à l'implication de la composition et de l'organisation des cires cuticulaires dans ces traits hydrauliques pour des espèces de climats tempérés. Les objectifs de cette étude ont été d'incrémenter la liste d'espèces pour lesquelles le g_{res} , T_p , P50 ainsi que la composition et organisation des cires cuticulaires foliaires ont été analysés ; de déterminer si dans un milieu au climat tempéré, pour des plants adultes en pleine terre, les plants les plus résistants à la cavitation étaient également ceux ayant les plus faibles pertes en eau résiduelles ; en comparant avec les données de la littérature sur les effets des composés des cires cuticulaires sur le g_{res} et T_p pour des plantes désertiques, déterminer les effets de ces composés et de leur organisation sur g_{res} et T_p pour des plants de climats tempérés.

Pour cette étude, des branches de chaque espèce ont été échantillonnées et installées dans la DroughtBox dans des conditions de température croissante afin de calculer leur g_{res} et T_p , pour ces mêmes espèces, des tiges ont été prélevées pour mesurer leur P50. Des feuilles de ces espèces ont également été prélevées afin de déterminer leur densité stomatique et la surface occupée par les stomates. Les cires cuticulaires foliaires ont été extraites et leur composition ainsi que leur température de ramollissement ($T\alpha$) en plus des observations de surfaces des cires cuticulaires au MEB ont été analysée grâce à une collaboration avec le laboratoire SIGMA de Clermont Ferrand.

Les résultats n'ont pas montré de lien entre g_{res} et P50, ni entre g_{res} et T_p , en revanche, les espèces plus xérophiles semblent être également plus résistantes à la chaleur en terme de T_p . Pour les espèces étudiées, le g_{res} ne semble pas être lié à la densité stomatique ni à l'aire occupée par les stomates. La structure et la cristallinité des cires cuticulaires, de même que les ACL (Average Chain Length) n'ont pas montré le lien avec g_{res} et T_p . La composition chimique des cires cuticulaires semble à l'inverse avoir un effet sur g_{res} et T_p . Les espèces aux plus faibles g_{res} ont montré une plus grande proportion de triterpénoïdes ainsi qu'une plus grande concentration de triterpénoïdes et d'alcane, à l'inverse, les espèces avec les plus hauts g_{res} semblaient avoir une plus grande proportion d'acides. Les espèces ayant une plus grande résistance à la chaleur ont montré une plus faible proportion en alcools, une plus haute proportion en alcanes ainsi qu'une plus haute concentration en triterpénoïdes pour la plupart d'entre elles.

Les résultats obtenus lors de cette étude, bien que différents de ceux obtenus dans la littérature, montrent l'importance de prendre en compte le fait que la feuille est un système très complexe, les composés des cires cuticulaires peuvent avoir plusieurs rôles et effets sur les réponses au stress hydrique et à la chaleur. Ces résultats montrent aussi qu'un consensus dans les protocoles d'extraction et d'analyse de ces différents traits pourrait être mis en place afin de normaliser les résultats obtenus pour faciliter les comparaisons.

Les résultats de cette étude font actuellement l'objet de la rédaction d'un article scientifique soumis prochainement à la revue *Chemosphere*.

2. Effects of the chemical and physical characteristics of foliar cuticular waxes on the residual transpiration of temperate tree species

Lise-Marie Billon¹, Adéline David², Philippe Vernay¹, Chris J. Blackman³, Paulo E. Menezes-Silva⁴, Mohamad Sleiman², Hervé Cochard¹, José M. Torres-Ruiz¹, Adnane Hitmi^{1*}

¹ Université Clermont-Auvergne, INRAE, PIAF, Clermont-Ferrand, France

² Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ ARC Centre of Excellence for Plant Success in Nature and Agriculture, School of Natural Sciences, University of Tasmania, Hobart 7001, Australia

⁴ Department of Biology, Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology—IF Goiano, Rio Verde, Goiás, Brazil

Corresponding author: Adnane HITMI. Adnane.hitmi@uca.fr

2.1. Abstract

Global warming is causing tree mortality in numerous regions worldwide as a result of increased drought and heat stress leading to hydraulic failure. Resistance to hydraulic failure (i.e. P50) is commonly used to characterize plant drought tolerance, but recent studies have shown that leaf (or shoot) cuticular conductance (i.e. g_{res}) and transition temperature of leaf cuticles (i.e. T_p) are also important in determining the ability of plants to survive extreme drought and/or heatwave conditions. However, a better understanding of the leaf and cuticular traits that modulate g_{res} and T_p is still needed. In this study, we measured a range of leaf morphological and leaf cuticle traits and examined their linkages to variation in g_{res} and T_p , as well as P50, in six temperate tree species. Across species, T_p was positively correlated with increasing drought tolerance (more negative P50) and negatively correlated with g_{res} , while variation in g_{res} was positively correlated with leaf stomatal density. Both g_{res} and T_p were related to different properties of leaf chemistry composition, including triterpenoids, alkanes, alcohols, and fatty acids, depending on whether they were expressed as a concentration of leaf dry weight or as a proportion of all chemical components. This paper highlights that the regulation of g_{res} and T_p is complex and includes many parameters intervening as a balance to respond to environmental changes.

Keywords: Global warming, residual transpiration, wax cuticular chemistry, temperate climate species, functional traits, phase transition temperature.

2.2. Introduction

Water is transported in plants from roots to leaves following the Cohesion-Tension theory which describes how transpiration pulls water from the soil through xylem vessels to the sites of evaporation in the leaves thanks to the cohesion among water molecules (Dixon and Joly, 1895). Under increasing water stress and when evaporative demand exceeds water availability at the root level, the metastable state of the water column under tension within xylem can break creating a gas bubble inside the vessels, which is a cavitation event (Dietrich et al., 2018; Tyree and Zimmermann, 2002). The increment in the number of xylem cavitared conduits reduces the hydraulic conductance capacity of the plant that, ultimately, can lead to hydraulic failure and plant death (Mantova et al., 2022; Tyree and Sperry, 1989). The tension in the xylem vessels (MPa) corresponding to a 50% loss of hydraulic conductivity, the P50, is an indicator of cavitation resistance and is the most used trait to compare the resistance to drought across species (Lens et al., 2016; Tyree and Ewers, 1991). But using P50 alone to study trees responses to dehydration can be misleading as some species develop new strategies to face extreme climate events, this is why is it important to also take into account other drought response strategies such as residual transpiration of the leaf cuticles (Martin-StPaul et al., 2017; Blackman et al., 2019).

At their appearance in the middle of the Paleozoic (about 450 million ago), plants had to deal with a hostile environment to colonize the land. In response, land plants developed protective barriers covering their aerial organs to counteract pathogens and environmental threats related to desiccation, extreme temperatures and increased exposure to UV irradiation (Arya et al., 2021). This barrier, consisting of a thin layer on the uppermost side of the leaves named the cuticle, has become an important focus of research as global climate change heralds forth more extreme heat wave and drought events (Choat et al., 2012).

Cuticle function, composition and biosynthesis have been studied for many years (Jeffree, 2007; Bakan and Marion, 2017). The structure of this biopolymer can be separated into the inner layer, the “cuticular layer” composed of polar (polysaccharids) and apolar (cutin polyesters) compounds, and the outer layer or “cuticle proper” with mostly lipophilic compounds (cutins and waxes). The other major component of the cuticle is the presence of wax throughout its surface manifest as films or crystals (epicuticular wax) or embedded in the cutin matrix (intracuticular wax) (Fernández et al., 2017). Cuticular waxes are located at the outermost

hydrophobic layer and serve as the principal barrier to reduce non-stomatal plant gas exchange (Seufert et al., 2022). There are a complex mixture of hydrophobic lipids with very-long chain fatty acids and their derivatives. These include aliphatic compounds such as alcohols, alkanes, aldehydes, ketones and ester, some alicyclic compounds as triterpenoids and sterols and flavonoids (Bhanot et al., 2021). Cuticular waxes are known to affect cuticular transpiration, however, it remains largely unknown how wax composition is related to its transpirational barrier properties across diverse species (Hasanuzzaman et al., 2017; Bueno et al., 2019c).

Contrary to the response of stomata, which close during the day in order to prevent the plant from losing critical amounts of water leading to hydraulic failure (Tyree and Sperry, 1989), the cuticle constitutes a permanent interface between the plant organs and the atmosphere as a diffusive layer through which water molecules move and evaporate. Transpiration through the cuticle is not actively controlled by the plant and represents a constant minimal conductance named g_{cuticle} at the cuticle level, g_{min} at the leaf level including water losses through leaky stomata even at maximal closure (Schuster et al., 2017), and g_{res} at the shoot or branch level including water losses through the bark (Billon et al., 2020). These traits have been shown to play a critical role in determining the time to hydraulic failure after maximal stomatal closure, with plants showing a lower residual conductance undergoing hydraulic failure later than those with higher residual water losses (Blackman et al., 2016; Martin-StPaul et al., 2017). Minimum conductance can vary across species. Indeed, reviews by Kerstiens (Kerstiens, 1996) and more recently by Schuster et al 2017 and Duursma et al., 2019 have reported a wide range of minimum conductance values in the literature depending on the species, the organ and the method of measurement.

Furthermore, the water diffusive properties of leaf cuticles are temperature dependent, with the residual water conductance of cuticles typically increasing drastically as temperatures rise and increase significantly beyond a species-specific threshold, known as the transition phase, or T_p . Temperature induced defects in the barrier limiting water transport through plant cuticles are most likely create additional diffusion pathways at high polarity wax-cutin interfaces (Bueno et al., 2019a). It can be hypothesized that a thicker cuticle due to a higher amount of wax reduces more effectively the plant water losses, but this theory is challenged (Riederer and Schreiber, 2001). Furthermore, some studies show that it is not the amount of waxes present in the cuticle but the composition of intra- and epicuticular waxes in apolar compounds that plays a role in cuticular water permeability (Chen et al., 2021). Leide *et al* (Leide et al., 2007) observed that

waxes contribute approximately 95% of the cuticle-mediated resistance to water diffusion after the extensive removal of wax from tomato fruit. However, there is still a lack of knowledge regarding the importance of cuticular composition in determining g_{res} and how it varies across species.

In this study we measure a range of leaf structural and functional traits related to drought and heat stress, as well as the composition of leaf cuticular waxes of six contrasting woody angiosperm species. We ask whether differences in shoot residual conductance (g_{res}) and its thermal stability (T_p) are linked to differences in the chemical and structural components of leaf cuticular waxes across temperate six species. We also test for linkages among these traits and variation of foliar phenology and xylem cavitation resistance (P50) as evidence for adaptive trait coordination in response to drought.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Plant material and sample storage

Branches of 6 temperate angiosperm species were harvested from natural populations during the summer of 2018. Branches of 5 species (*Crataegus monogyna* Jacq., *Ilex aquifolium* L., *Corylus avellana* L., *Tilia cordata* Mill. and *Prunus laurocerasus* L) were collected at INRAE (National Research Institute for Agriculture, Food and Environment) of Crouël (Clermont-Ferrand, France, 45°46'30.8"N 3°08'38.2"E) and those of *Acer campestre* L. were collected 20 km from the institute in the commune of Authezat (France, 45°38'50.8"N 3°12'08.3"E). Twenty 1 m long sun exposed branches were collected from mature trees or shrubs of each species and used to carry out all the experiments. Special attention was paid to select branches with green leaves, physiologically mature and without symptoms of disease or chlorosis. According to data measured in 2018 and collected from the nearest Meteo France station (Clermont-Ferrand, France), the climate can be characterized as temperate but with continental influences, with a mean annual rainfall of 505.9 mm. The coldest month is February (lowest mean monthly temperature 1.9°C) and the hottest is July (highest mean monthly temperature 22.1°C). The dry period lasts for 2 months as is can be seen in the ombrothermic diagram of the area (Figure S 1: *Standard ombrothermic diagram of the studied area in 2018 (bars = rainfall, line = temperature)*).

The species of the study belong to 2 groups: deciduous species for *C. monogyna*, *C. avellana*, *T. cordata* and *A. campestre* and evergreen species for *I. aquifolium* and *P. laurocerasus*. All branches were cut at 1.5-2 m high from the outer part of the crown. The cut end of each branch was placed in a beaker containing ultra-pure water and transported to the laboratory in opaque plastic bags before being stored at 4°C.

2.3.2. Leaf anatomy and morphology analysis

Specific Leaf Area (SLA)

For SLA measurements, 10 leaves from 10 different branches per species were harvested. The fresh leaf area (A , cm²) was scanned using a LI-3050A/4 leaf area meter (Li-Cor, Lincoln, NE, U.S.A). Then the leaves were dried in an oven for 72 hours at 60°C and weighed for dry mass (M , g). SLA (cm² g⁻¹) was calculated as A/M .

2.3.3. Stomatal traits

A single mature leaf from each of four branches per species was detached and a thin layer of translucent nail polish applied on each surface. Once the nail polish was dry, it was slowly removed and placed on microscope slides. Stomatal traits were measured from images taken of 3 different zones within the area of each impression with a x20 magnification using a Zeiss Axioskop 40 microscope, coupled with a digital camera and Zen imaging software system (Zeiss, Jena, Germany). Two traits were measured from these images using ImageJ: stomatal density (number of stomata per unit of area) and stomatal index (ratio of stomata to epidermal cells plus stomata, multiplied by 100). The leaves of these species were hypostomatic, total stomatal density has been calculated by dividing the mean amount of stomatas by 2 to refer to the cuticular surface.

2.3.4. Scanning Electron Microscopy

To analyse the surface morphology of adaxial and abaxial leaf surfaces, scanning electron microscopy (SEM) investigations were performed using an Hirox SH-4000M operated at 20 kV accelerating voltage. To get a clean-cut, samples were stored in a freezer (-20°C) then sectioned by scalpel immediately upon their removal. All samples were placed on electrically

insulating double-sided adhesive tape then sputter-coated with gold (ca. 30 nm in thickness) and examined without any additional silver coating.

2.3.5. P50 measurements

P50 measurements were determined from 4 branches per species. Each branch, between 0.7–1.1 cm in diameter and at least 50 cm long, was wrapped in wet paper and placed in sealed plastic bags for transportation. On their arrival at the laboratory, the branches were placed in deionized water and stored at 5 °C until processing. Each stem segment was cut underwater at 43 cm long using a razor blade and installed in a Cavitron (Sorvall RC3C, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The vulnerability to embolism was assessed by plotting embolism vulnerability curves obtained with the Cavitron technique (Cochard et al., 2005). Centrifugal force was used to establish negative pressure in the xylem and provoke water stress-induced embolism. The technique measures the loss of hydraulic conductance under negative pressure using a reference ionic solution of 10 mM KCl and 1 mM CaCl₂ (Cochard et al., 2009). Spin speeds were adjusted and conductance measurements were made with CaviSoft 4.0 software (University of Bordeaux, Bordeaux, France). Vulnerability to embolism curves, corresponding to the percentage loss of conductivity (PLC) as a function of water potential (P), was fitted with the following sigmoidal equation:

$$PLC = \frac{100}{1 + e^{\frac{\text{slope}(P-P50)}{25}}}$$

where P50 is the water potential (-MPa) causing 50% loss of conductance, and slope is the slope of the curve at the inflection point (% MPa⁻¹). One vulnerability curve was fit per sample to determine variation in P50 for each species with the exception for *Crataegus monogyna*. For this species, the P50 value has been taken from the database of Lens et al. 2016 due to the inadequacy of our laboratory cavitron to measure the P50 of this species.

2.3.6. g_{res} measurements

Branches placed in a beaker containing ultra-pure water were enclosed in plastic bags stored in dark conditions overnight to allow full rehydration. g_{res} was measured at 30°C and 40% relative humidity using the DroughtBox, an instrument specifically developed in our laboratory to measure this parameter (Billon et al., 2020). After full rehydration, each branch was recut and sealed with paraffin wax (melting point 68°C, Fluka). Branches were then attached to strain

gauges, the box was closed, and the branches were let to dehydrate at constant environmental conditions. The strain gauges were set to measure branch mass every 5 minutes, with changes in mass assumed to represent water molecules transpired (n_w , mmol), thus allowing transpiration E ($\text{mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) to be calculated following the equation: $E = -\text{slope}(n_w;t)/(LA + BA)$.

With t the time in seconds, LA the two-sided leaf area (m^2) derived from the leaf dry mass of each measured branches and empirical relationships between leaf dry mass and fresh leaf area (*i.e.*, SLA), and BA the surface area (m^2) of the stem determined from measurements of stem length and basal diameter and assuming the shape of a cone. Then g_{res} was calculated on the linear portion of the water loss curve following the equation: $g_{\text{res}} = (E/VPD) \times 101.6$. With E the transpiration in $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, the air VPD (kPa) and 101.6 the atmospheric pressure in the DroughtBox in kPa. At the end of the experiment, leaves were removed and oven-dried for 72 h at 60°C for the determination of leaf area based on SLA, and the stem dry mass.

2.3.7. T_p measurements

For each species, branches were exposed to a combination of increasing air temperature set at 30, 35, 40, 45, 50 and 55°C and decreasing RH set at 40, 30, 23, 18, 14 and 11% to maintain air water concentration at $10.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The duration (hours) of each temperature step varied as follows: 6, 1, 1, 1, 0.75 and 0.75 h. These sequences of time ensured that stomata were closed, that g_{res} was stable toward the end of each temperature/humidity step, and that branches did not run out of water at higher temperatures. At each temperature step, g_{res} was calculated using the driving force derived from leaf temperature measurements. The temperature dependence of g_{res} was determined as a single value for each species using an Arrhenius plot, which is the natural logarithm of g_{res} against the inverse of temperature in Kelvin.

2.3.8. Cuticular waxes extraction and GC-MS analyses

Waxes extraction from leaves and GC-MS analysis were determined as described by Bourdenx et al. (Bourdenx et al., 2011) with slight modification. For each species, 4 mature leaves without disease symptoms were cut from 4 different branches at the same time as those used for g_{res} and T_p measurements. The fresh mass was measured with a precision scale and the double-sided leaf area measured with a planimeter (LI-3050A/4, Li-Cor, Lincoln, NE, U.S.A). Each leaf was immersed at room temperature for 30 s in chloroform containing $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of docosane as an internal standard. Extracts were placed in a water bath heated at 40°C and were dried under

nitrogen flow for chloroform evaporation. After total evaporation, derivatization of polar compounds was achieved by adding 150 µl of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide): trimethylchlorosilane (99:1; Sigma) and heating at 110°C for 30 min. Surplus N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide):trimethylchlorosilane was evaporated under N₂ gas, and samples were dissolved in 300 µl of hexane for analysis. Vial tubes were stored at -20°C.

Quantification of cuticular wax components was performed with a gas chromatograph coupled to mass spectrometry to increase the sensitivity and the analytical selectivity (Jetter and Riederer, 2016). The GC instrument used was an Agilent 6890 coupled to a quadrupole mass spectrometer (Agilent 5973 MSD). The injection volume was 2 µl. The temperature of injection is 300°C. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹. The apolar column was of the Agilent HP-5 MS type, 30 m long, 0.25 mm in diameter and provided with a (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane film of 0.25 µm thickness. The temperature gradient of the column oven was 200°C for 1 min, followed by a ramp of 8°C per min to reach 325°C and maintained at this temperature for 40 mins. The identification of wax compounds was performed by mass spectrometry by determining the mass-to-charge ratio (m/z) of an ion in the gas phase. The ionization of the molecules to be analyzed was ensured by an electronic impact at a temperature of 230°C. The acquisition mode used was a “scan” mode and the ions with m/z ratios between 42 and 700 were identified. Thanks to this mode, the retention time and the main fragments of the parent compound were obtained.

The weighted average of carbon chain length (ACL) of acyclic compounds was calculated based on Huang and Jiang (Huang and Jiang, 2019), from the chain length (L_i) and the molar mass fraction (M_i) of the component (i): $ACL = \sum_i (L_i \times M_i) / \sum_i M_i$

2.3.9. Physical properties

For each species, 10 to 20 g (fresh mass) of leaves were successively immersed in two 600 ml baths of chloroform. After evaporation under nitrogen, the waxes obtained were recovered to characterize the dynamic mechanical properties (DMA) and crystallinity rate (χ (%)) of cuticular wax.

Thermal properties were determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC) experiments carried out on a DSC3 (Metler Toledo) instrument as described by Teixeira et al. (Teixeira et

al., 2010) with slight modifications. The instrument calibration was realized with a high purity indium sample according to standard procedures. The samples of approximately 10 mg were put in sealed aluminum pans and analyzed in the temperature range from -90 to 110 °C at a heating rate of 20 °C.min⁻¹ under nitrogen atmosphere. The calculation of the initial crystallinity rate can be done by comparing the difference in enthalpy (area under the peaks) during melting, which we note ΔH_f , with the enthalpy of fusion ΔH_f° of n-heptacosane assumed to be perfectly crystalline. The crystallinity rates of cuticular waxes are given by the equation:
$$\chi = (\Delta H_f / \Delta H_f^\circ) \times 100$$

The temperature dependency of the dynamic mechanical properties of extracted cuticular waxes was analyzed using dynamic mechanical analysis (DMA) with a Q800 device from TA Instruments. The extracted samples having sizes and thicknesses which varied respectively from 3 to 5 mm and from 1 to 3 mm were put in a steel pocket ($18.18 \times 7.43 \times 0.65$ mm) and the measurements were carried out in single cantilever mode. During temperature ramp test, a constant strain was applied at 1 Hz with an oscillation strain of 0.2 %. Heating rate was 1 °C min⁻¹ between 25 °C and 55 °C. The transition temperature T_α was defined when E' , the elastic storage modulus value started to drop.

2.3.10. Statistical analyses

A statistical analysis was carried out by using GraphPad Prism version 8 and 9.1.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The calculated parameters were subjected to ANOVA tests with a significance level of 0.05 and followed by Tukey HSD posthoc tests to determine difference among species means. PCA tests were carried out by using RStudio (RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>).

2.4. Results

Leaf morphological and stomatal traits varied significantly among the six study species (Table 2). *Prunus laurocerasus* and *Ilex aquifolium* leaves exhibited the lowest SLA values (52.8 and 64.2 cm² G⁻¹, respectively) while *Corylus avellana* leaves had the highest SLA (246.1 cm² G⁻¹). Concerning stomatal density on the whole leaves, *Acer campestre* shows the highest density

with 195 mm⁻², while the lowest density was observed for *Corylus avellana* with 43 mm⁻². The remaining species had stomatal densities from 62 cell.mm⁻² to 99 cell.mm⁻². The stomatal index varied from 1.4% for *Corylus avellana* to 8.7% for *Prunus laurocerasus*. The two evergreen species, *Prunus laurocerasus* and *Ilex aquifolium*, showed the highest stomatal index.

Table 2: Phenological variation of leaf functional traits within deciduous and evergreen species. Significant differences between species are indicated by letters ($P < 0.05$).

Species	SLA (cm ² .g ⁻¹ DW)	Stomatal density (cell.mm ⁻²)	Stomatal index (%)
Deciduous			
<i>Acer campestre</i>	129.4 ± 10.6 ^{a,c}	195 ± 11 ^a	4.8 ± 0.3 ^a
<i>Corylus avellana</i>	246.1 ± 14.1 ^b	43 ± 3 ^b	1.40 ± 0.04 ^b
<i>Crataegus monogyna</i>	99.4 ± 15.3 ^a	62 ± 2 ^c	3.7 ± 0.1 ^c
<i>Tilia cordata</i>	153.3 ± 23.5 ^c	77 ± 4 ^d	2.2 ± 0.1 ^d
Evergreen			
<i>Ilex aquifolium</i>	64.2 ± 5 ^d	99 ± 9 ^e	6.6 ± 0.2 ^e
<i>Prunus laurocerasus</i>	52.8 ± 1.8 ^e	80 ± 5 ^d	8.7 ± 0.3 ^f

Leaf surfaces were examined using SEM, which does not require any preparation, so a whole leaf could be observed as is. The appearance of the cuticular surfaces were found to differ between all tree species whether on the adaxial (upper surface) and abaxial (lower surface) plant leaf surfaces (Figure 22). Waxes crystallinity varied from 1.57% for *Ilex aquifolium* to 97.65% for *Tilia cordata* (Table 3). The lowest crystallinity percentages were found for the two-evergreen species (*Ilex aquifolium* and *Prunus laurocerasus*) showing the smoothest adaxial waxes surfaces and the highest percentage for *Tilia cordata* having the most wrinkled waxes surface.

Shoot residual conductance, varied from 0.45 mmol m⁻² s⁻¹ for *Crataegus monogyna* to 1.61 mmol m⁻² s⁻¹ for *Acer campestre*. *Tilia cordata* and *Acer campestre* show relatively high g_{res} values (1.54 and 1.61 mmol.m⁻².s⁻¹ respectively), which were significantly different from other species (p-value < 0.05) (Figure 23A).

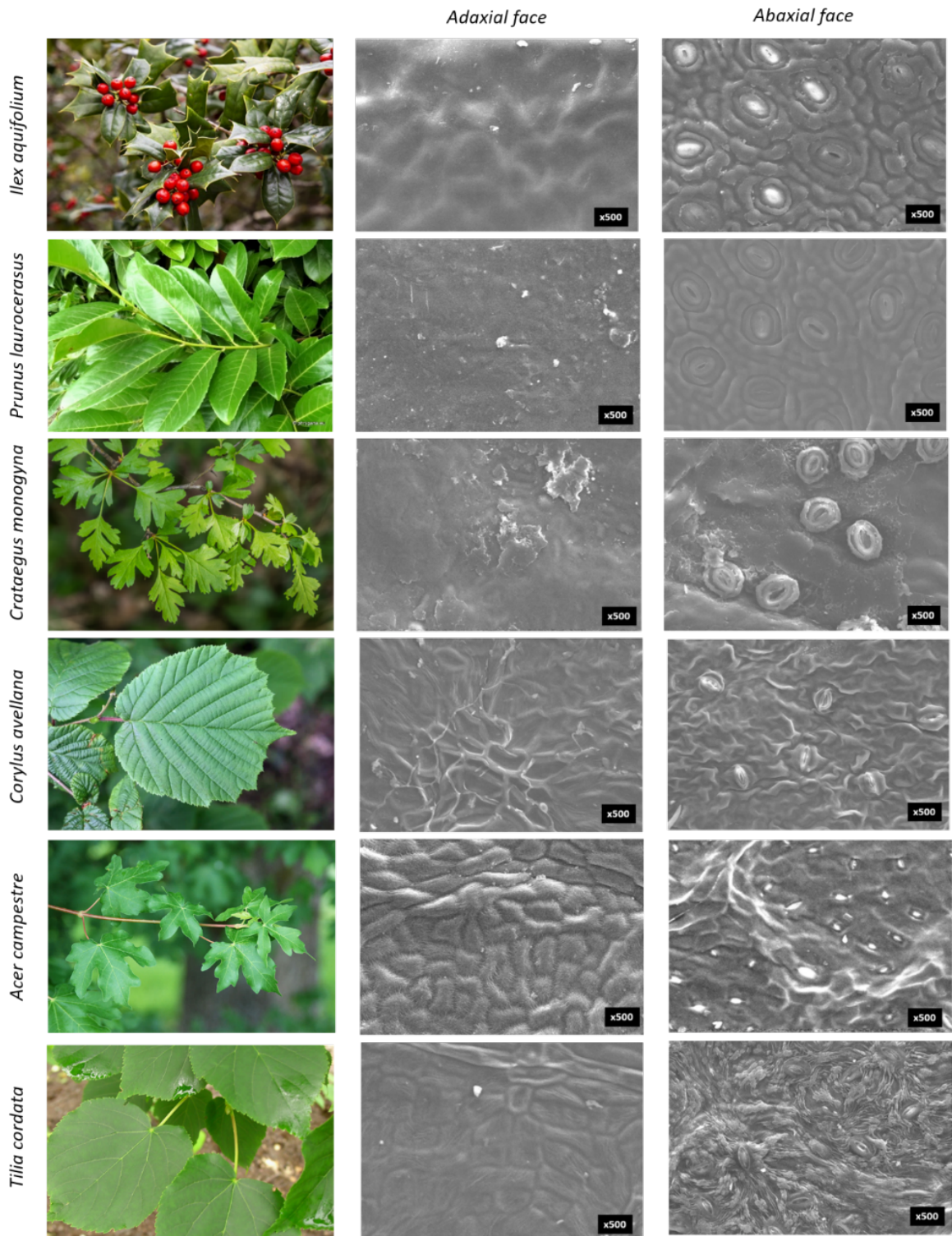


Figure 22: Scanning Electron Microscopy of the 6 species leaves adaxial and abaxial surfaces.

Table 3: Temperature of Phase transition (T_p) obtained with branches and transition temperature in dynamic mechanical properties (T_α) and crystallinity rate (χ) of isolated wax cuticles of leaf plants in deciduous and evergreen species.

Species	T_p (°C)	T_α (°C)	χ (%)
Deciduous			
<i>Acer campestre</i>	45.8	44	37.9
<i>Corylus avellana</i>	43	37 ± 1	45.8
<i>Crataegus monogyna</i>	50	42 ± 1.7	41.0
<i>Tilia cordata</i>	39	39 ± 1	97.1
Evergreen			
<i>Ilex aquifolium</i>	44.3	52 ± 1	1.60
<i>Prunus laurocerasus</i>	42	42	6.8

The vulnerability to xylem embolism differed among the six study species, with P50 values ranging from -2.18 MPa for *Corylus avellana* to -6.83 MPa for *Crataegus monogyna* (Figure 23B). In accordance with the plant species classification developed by Brendel and Cochard (Brendel and Cochard, 2011) on the relationship between values of P50 and drought tolerance capacity of plants, *Crataegus monogyna*, with a P50 of -6.83 MPa, is xerophilous, while all other species, with a P50 variation of -2.18 to -4.57 are mesophilous. No studied species are hygrophilous. The ecological evergreen or deciduous traits does not impact this functional trait.

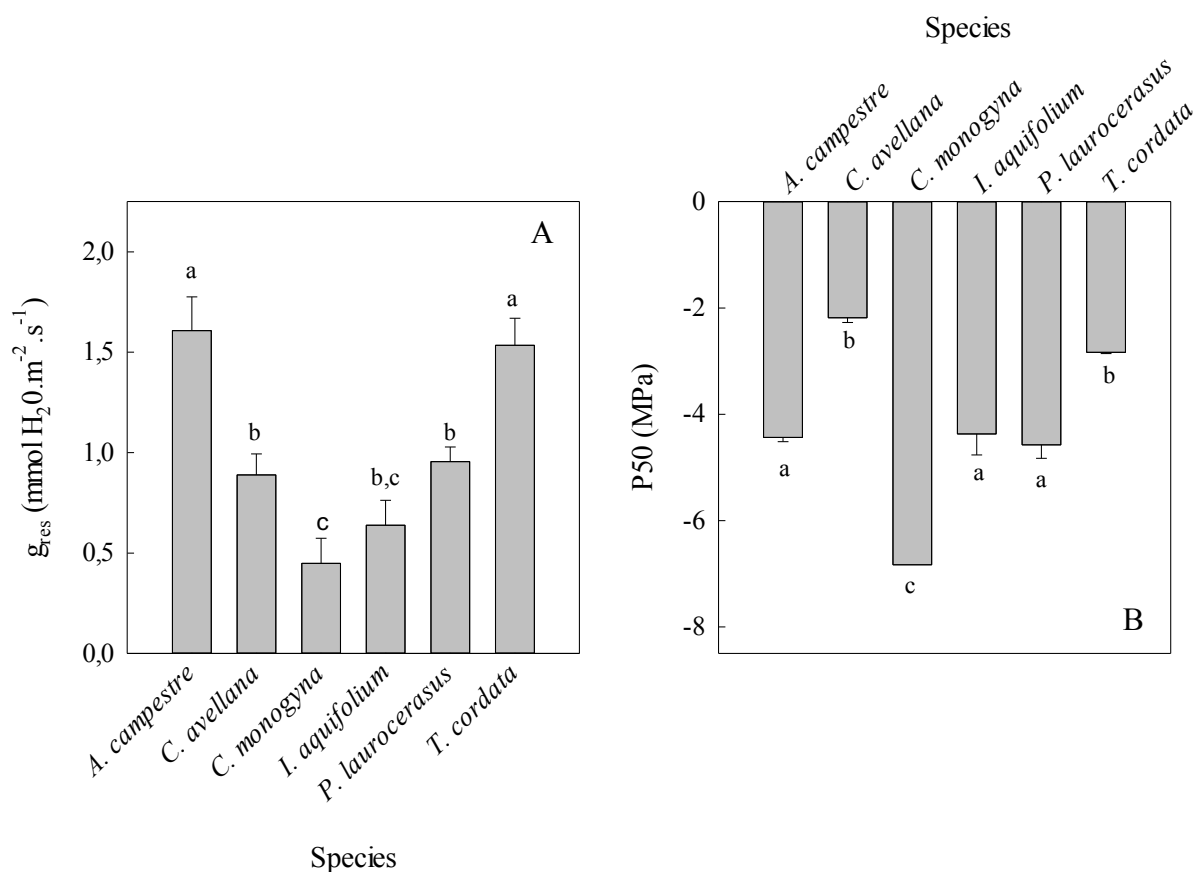


Figure 23: Residual conductance or g_{res} (A) and P50 (B) measures for the six species. Significant differences between species are indicated by letters ($P < 0.05$). Error bars represent standard deviation of mean ($n=4$).

T_p , which is the temperature of phase transition corresponding to the temperature from which g_{res} starts rising sharply, varied between 39°C for *Tilia cordata* and 50°C for *Crataegus monogyna* (Table 3). T_α , which is commonly used in material chemistry to determine the deformation of a polymer with temperature, varied between species, ranging from 37°C for *Corylus avellana* and 52°C for *Ilex aquifolium*. Although the values of T_p and T_α are in the same range, they were not correlated ($r = 0.08$).

The waxes and its associated concentrations and proportions of chemical families: alkanes, acids, alcohols and triterpenoids varied between species (Figure 24 and Figure 25). The concentration and proportion of alkanes varied between $0.10 \pm 0.004 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ for *Ilex aquifolium* and $3.28 \pm 0.24 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ for *Crataegus monogyna*, and between $7.97 \pm 0.27\%$ for *Tilia cordata* and $38.52 \pm 0.06\%$ for *Acer campestre*, respectively. The concentration and proportion of acids varied between $0.18 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ for *Prunus laurocerasus* and $0.62 \pm$

0.04 mg g⁻¹ DW for *Tilia cordata*, and between 4.34 ± 0.52% for *Ilex aquifolium* and 47.06 ± 2.38% for *Tilia cordata*, respectively For alcohols, the concentration and proportion varied between non detected for *Ilex aquifolium* and 0.24 ± 0.01 mg g⁻¹ DW for *Tilia cordata* and between non detected for *Ilex aquifolium* and 18.2 ± 0.62% for *Tilia cordata*, respectively Finally, the concentration and proportion of triterpenoids varied between 0.10 ± 0.004 mg g⁻¹ DW for *Acer campestre* and 6.45 ± 0.49 mg g⁻¹ DW for *Crataegus monogyna* and between 14.62 ± 0.05% for *Acer campestre* and 86.01 ± 1.89% for *Ilex aquifolium*, respectively.

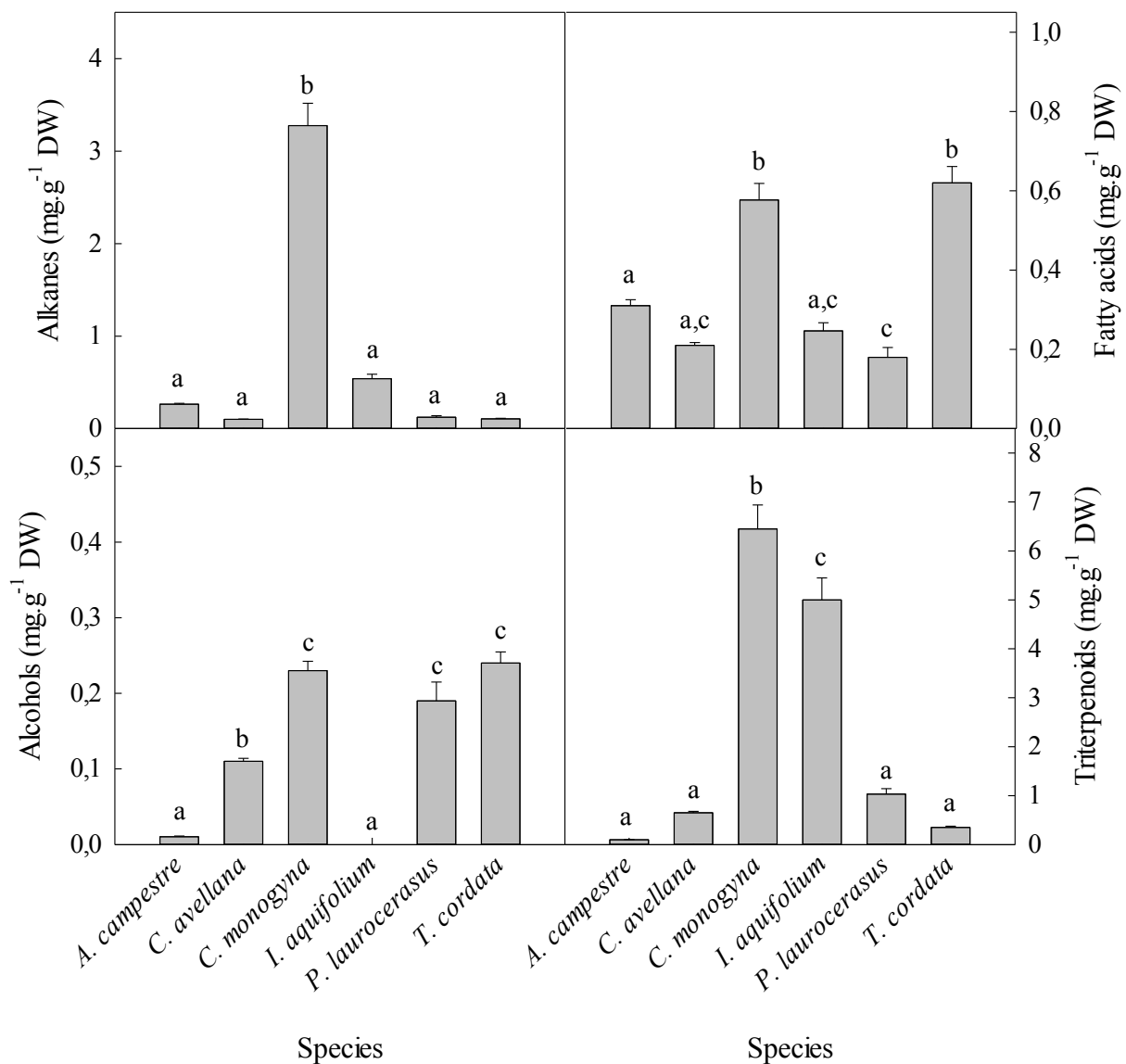


Figure 24: Concentrations of the different components contained in the cuticular waxes extracted from leaves of the six species. Significant differences between species are indicated by letters ($P < 0.05$). Error bars represent standard deviation of mean ($n = 4$).

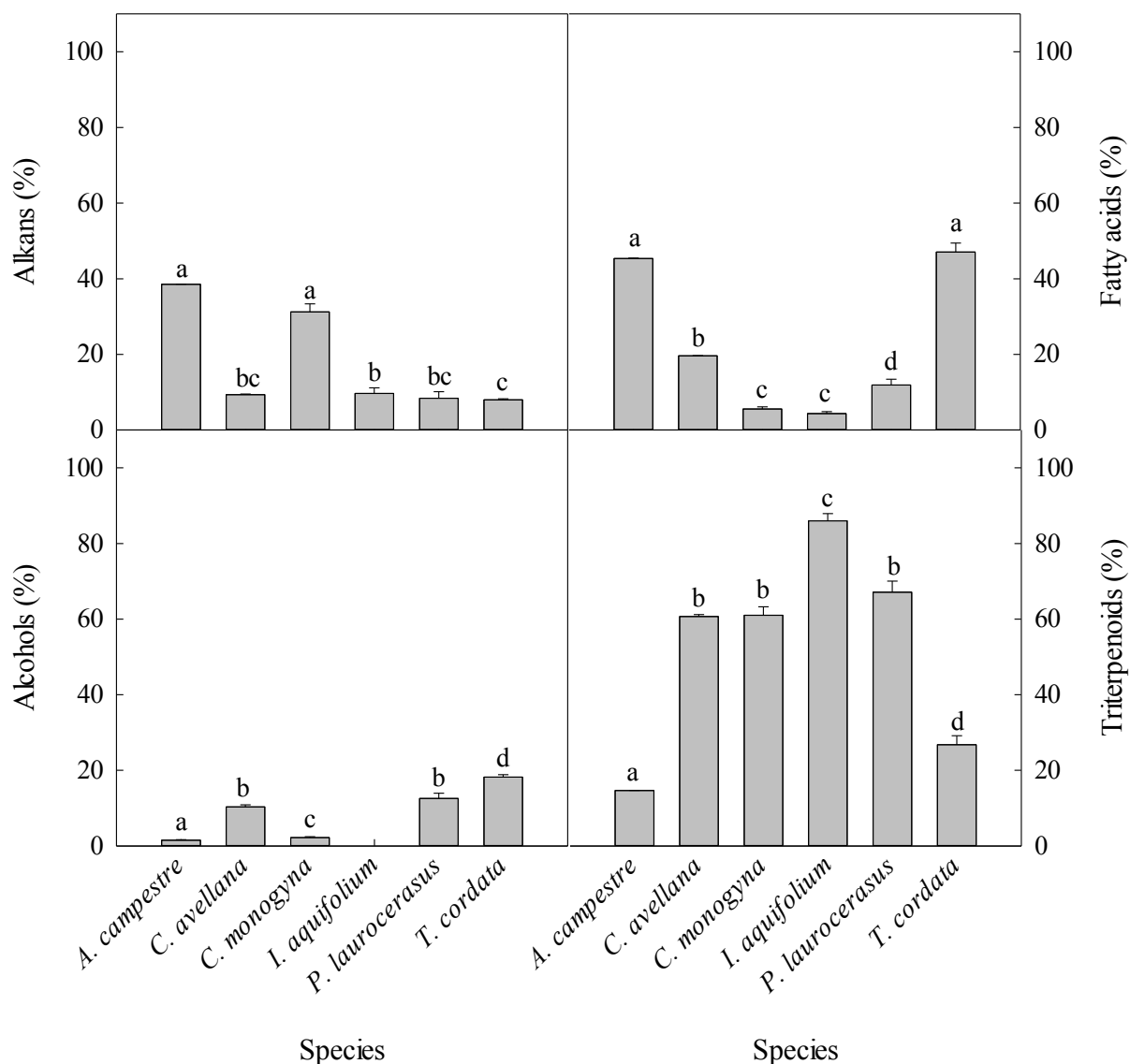


Figure 25: Proportions of the different components contained in the cuticular waxes extracted from leaves of the six species. Significant differences between species are indicated by letters ($P < 0.05$). Error bars represent standard deviation of mean ($n=4$).

The Average Chain Length (ACL) of alkanes, alcohols and acids were also measured with the analyses of waxes extracts (Figure 26). The ACL of alkanes are comprised between 25.9 ± 0.24 C for *Corylus avellana* and 30.1 ± 0.35 for *Prunus laurocerasus*, those of alcohols vary between 25.9 ± 0.24 and ± 0.3 for *Prunus laurocerasus* and *Crataegus monogyna* respectively and 26.9 ± 0.13 for *Acer campestre*. Finally, the ACL of acids vary between 24.3 ± 0.47 for *Crataegus monogyna* and 27.9 ± 0.32 for *Acer campestre*.

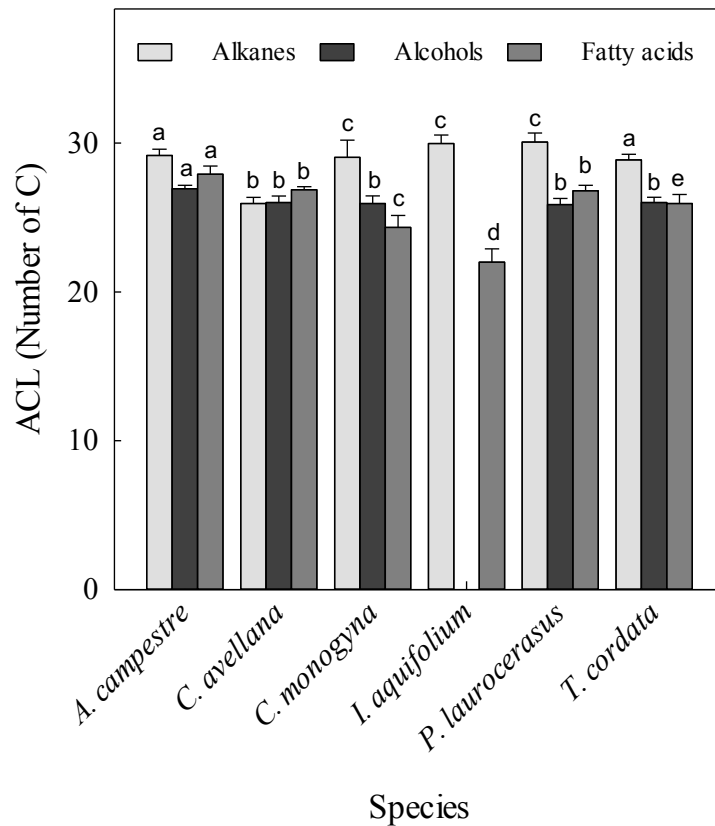


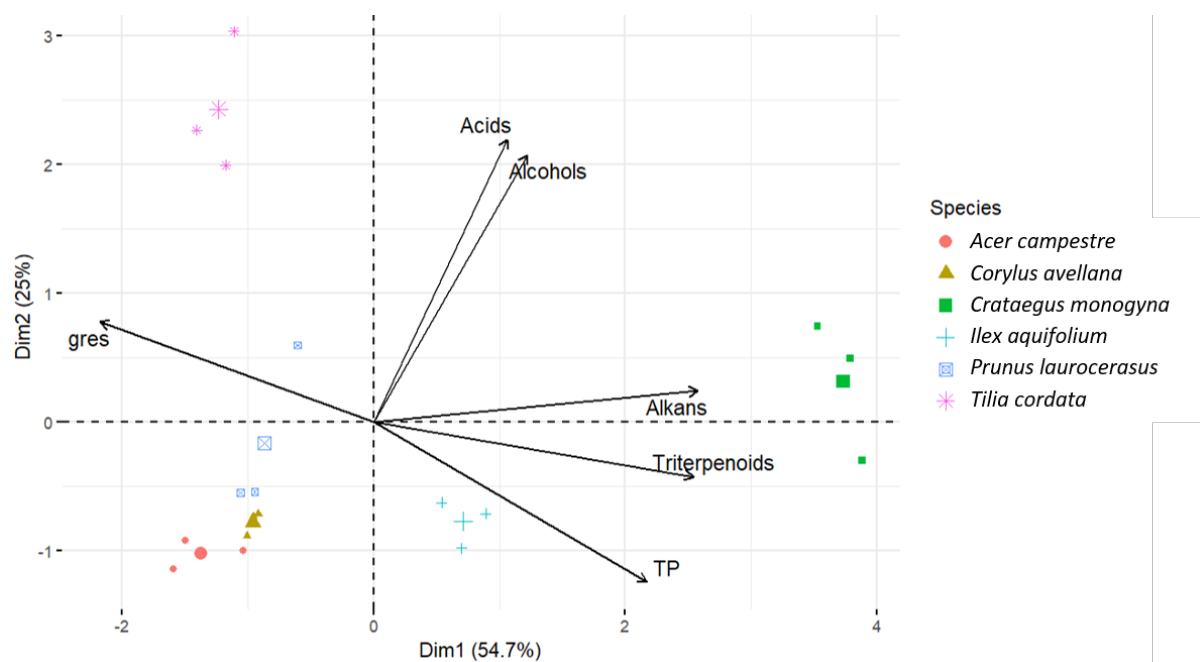
Figure 26: Average chain length (ACL) in number of Carbons of the three components families Alkanes, Alcohols and Fatty Acids for each of the six species. Each letter is used to compare the ACL across each chemical family, alkanes, alcohols and fatty acids separately.

Across the six study species, T_p was positively correlated with increasing drought tolerance (more negative P_{50}) and negatively correlated with g_{res} (Table 4). With regards to variation in leaf chemical composition, the strength of the relationship with both T_p and g_{res} depended on whether levels of triterpenoids, alkanes, alcohols, or fatty acids were expressed as a concentration of leaf dry weight or as a proportion of all chemical components in the sample

(Figure 27 and Figure 28). These correlations were supported by PCA (Figure 27 and Figure 28).

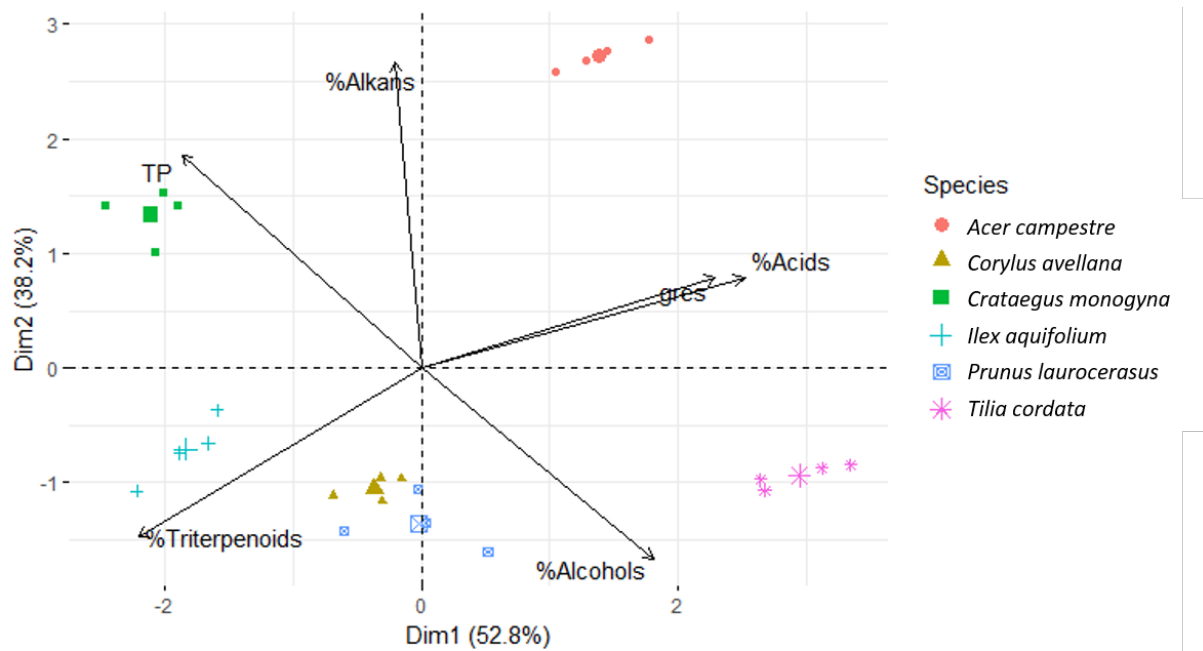
Table 4: Correlation matrix summarizing the correlation across g_{res} , T_p and leaf traits, hydraulic trait and cuticle physical characteristics and their p -values associate.

pvalue r	Stomatal den- sity	Stomatal index	SLA	$T\alpha$	Wax crystalliza- tion	P50	g_{res}	T_p
g_{res}	0.002	0.980	0.706	0.746	0.047	0.397		0.050
	0.591	-0.005	-0.081	-0.069	0.409	0.181		-0.404
T_p	0.481	0.803	0.302	0.195	0.077	4.91E-06	0.050	
	0.151	0.054	-0.220	0.273	-0.367	-0.788	-0.404	



p-value							
		Alcohols	Fatty acids	Triterpenoids	Alkanes	gres	Tp
r							
Alcohols			0.001	0.864	0.106	0.984	0.487
Fatty acids		0.614		0.265	0.017	0.288	0.628
Triterpenoids		0.036	0.236		3.80E-06	0.002	2.04E-04
Alkanes		0.337	0.478	0.793		0.029	1.07E-06
gres		-0.004	0.226	-0.596	-0.444		0.050
Tp		-0.148	0.104	0.687	0.817	-0.404	

Figure 27: PCA graph showing the profile of response of gres and Tp of all species with the concentrations of chemical components. The correlation table summarize the correlation across gres, Tp and the concentrations of chemical components and their p-values associated.



p-value							
	r	Alcohols	Fatty acids	Triterpenoids	Alkanes	g_{res}	Tp
Alcohols			0.045	0.218	0.001	0.153	2.32E-06
Fatty acids	0.411		1.46E-11	0.341	2.32E-06	0.025	
Triterpenoids	-0.260	-0.937		0.014	1.69E-05	0.434	
Alkanes	-0.605	0.202	-0.493		0.369	3.23E-05	
g_{res}	0.300	0.803	-0.759	0.191		0.050	
Tp	-0.803	-0.455	0.167	0.742	-0.404		

Figure 28: PCA graph showing the profile of response of g_{res} and Tp of all species with the proportions of chemical components. The correlation table summarize the correlation across g_{res} , Tp and the proportions of chemical components and their p-values associated.

2.5. Discussion

Among the 6 different angiosperms species studied in this experiment, 2 species are classified as evergreen (*Ilex aquifolium* and *Prunus laurocerasus*) and 4 as deciduous (*Tilia cordata*, *Crataegus monogyna*, *Corylus avellana* and *Acer campestre*). Those species are representative of the species commonly found in European temperate ecosystems. Unlike the species chosen to characterize g_{res} and Tp parameters in a previous study (Bueno et al., 2019b), which focused on desert species, they were chosen to represent fully-grown trees in their natural habitat where

an understanding of how different species will respond to changes in the environment, and particularly to global warming, is needed.

Our data show no correlation between SLA and g_{res} nor T_p for the species chosen (Table 4). However, consistent with previous studies (Machado et al., 2021) stomatal density seems to be the only physiological trait studied that can explain g_{res} ($r = 0.591$, $p\text{-value} = 0.002$) In comparison, the area occupied by stomata as described by the stomal index was not correlated with either g_{res} or T_p . Taking the leaf as a whole system can show that both adaxial and abaxial surfaces play a role in terms of residual transpiration and can give a better idea of the plant response to its environment and adaptation to a rapidly changing climate. Indeed, our results show that g_{res} is positively correlated with the percentage of crystallinity of the cuticular waxes extracted from both sides of the leaves ($p\text{-value} < 0.05$). It is also important to point that T_p was not correlated with cuticular waxes crystallinity (Table 4 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, $p\text{-value} = 0.077$).

The analysis of temperature-dependent residual transpiration of tree branches suggests T_p varies across these species, ranging from 39 °C in the most heat-sensitive species *Tilia cordata* to 50 °C in the most heat resistant species *Crataegus monogyna*. The phase transition temperature and its effect on g_{res} has been attributed to different structural changes to the plant cuticle. The melting of the cuticular waxes is one of the major elements that cause these structural alterations (Merk et al., 1997). Other characteristics may participate in the decrease of the water barrier property of the cuticles of leaves such as micro-defects and cracks in the cuticular wax barrier (Schreiber and Schönherr, 1990) and swelling of the polysaccharide (Riederer, 2006). The higher the T_p , the more resistant to heat the plant is. Although T_p is calculated by assessing the influence of increasing temperature on g_{res} , there was no clear link between T_p and g_{res} across our study species. Indeed, *Acer campestre* showing one of the highest g_{res} value shows high T_p value while *Tilia cordata*, which has the second highest g_{res} value shows the lowest T_p value (Table 3, Figure 23A).

For our six species, P50 was not correlated with g_{res} ($p\text{-value} = 0.397$) but was strongly correlated with T_p ($r = -0.788$, $p\text{-value} = 4.91E-06$) (Table 3). As a measure of heat resistance, species with higher T_p seem to be the most xerophilous. This is consistent with previous studies showing that xerophilous species are more resistant to heat and have a strong adaptability to tolerate various environmental stresses, including heat and soil water deficits (Devitt et al., 2022). These observations suggest that species present in temperate climate ecosystems develop different

strategies to adapt to abiotic stresses related to global warming and heat waves. With a P50 and a T_p of -6.3MPa and 50°C respectively, *Crataegus monogyna* is the most resistant species to hydric and thermal stress. With a significantly lower g_{res} , 0.48 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, this species presents a significant time before reaching the state of critical or lethal hydraulic dysfunction in the trees. *Acer campestre*, *Ilex aquifolium* and *Prunus laurocerasus* have non-significantly different values for T_p (on average 44°C) and P50 (on average -4.1 MPa), nevertheless, *Ilex* has the longest hydraulic failure time of the species. Low g_{res} will provide to *Ilex aquifolium* trees an advantage over trees of *Acer campestre* and *Prunus laurocerasus* since the rate at which the plant water loss rate through the cuticles is the lowest. *Tilia cordata* is the most sensitive species to these abiotic stresses and, in addition, has a high-water conductance through its leaf cuticles.

It is interesting to determine the variability of residual transpiration as a function of the ecological properties of plant species. Previous studies have shown a trend whereby median values for isolated cuticle permeance or minimum isolated leaf conductance are higher in evergreen than in deciduous species (Schuster et al., 2016). Other studies have shown the opposite results (Riederer and Schreiber, 2001). After investigating the results obtained from 39 deciduous and 54 evergreen species, Schuster et al. (Schuster et al., 2017) concluded that there were no statistically significant differences in the water permeability of isolated leaf cuticles between these 2 groups of species. Our results show similar relationships for g_{res} and T_p measured on tree branches. This indicates that these parameters, unlike leaf phenology, are not related to leaf life in temperate-climate trees.

Another set of traits can have a role on g_{res} and T_p fluctuations, the chemical and physical properties of the cuticle. T_α is the commonly used parameter to investigate the viscoelastic behaviour of biopolymers, including fruit and leaf cuticles, and to determine the influence of temperature on this process (Khanal and Knoche, 2017). The temperature-dependent deformation of mature leaves cuticular wax extracts obtained from mature leaves of the species studied was characterized to determine a possible relationship with T_p . The results in Table 2 show that plant species present in the same climatic zone undergoing periods of heat waves see their water retention capacities reduced as well as their mechanical resistance capacities.

The values of T_p and T_α range from 37°C to 52°C. Nevertheless, if for *A. campestre*, *P. laurocerasus* and *T. cordata*, the values of these parameters are similar, they vary by about 20% and are significantly different for the 3 other species (**Erreur! Source du renvoi**

introuvable). It highlights the fact that measuring T_p on isolated cuticles cannot ensure the real role of the wax cuticle as the structure and organization of molecules may be altered by the extraction procedure. Therefore, it is important to take the leaf as a whole system to understand the plant response to its environment.

To our knowledge, this is the first time that an evaluation of the resistance to deformation of extracted cuticular waxes has been performed. Cuticular waxes acts as a filler for the cutin matrix and increases the stiffness of cuticles, thus serving their mechanical functions (Khanal and Knoche, 2017). According to Domínguez et al. (Dominguez et al., 2011), the transition temperatures which induce an increase in water loss through the cuticle and a loss of their mechanical can induce 2 possible of modifications in the physical states: a stiff stage (like a glass) and a liquid-like very viscous stage with less restricted translational movements and rotational and vibrational degrees of freedom. A glass transition temperature is the temperature at which macromolecular chains increase their flexibility and fluidity and above this temperature the cuticular matrix appears more viscous, facilitating the mobility of the compounds. The changes observed in cuticle water permeability to water as a function of temperature could be explained by a second order transition. These results contrast with former studies (Leide et al., 2011; Jetter and Riederer, 2016; Schuster et al., 2016), since they indicate that triterpenoids tend to have a role as a water barrier.

Concerning the thermostability, our results show there is a tendency between a low percentage of alcohols in the cuticular waxes and a higher T_p . Taken together, **Erreur ! Source du renvoi introuvable**. shows negative correlations between g_{res} and the concentrations of triterpenoids and alkanes ($r = -0.6$ and -0.44 respectively, p -values < 0.05) and positive correlations between T_p and the concentrations of triterpenoids and alkanes also ($r = 0.69$ and 0.82 respectively, p -values < 0.05).

Concerning the proportions of each chemical family in the bulk of cuticular waxes, Figure 28 shows a positive correlation between g_{res} and the percentage of acids and a negative correlation with the percentage of triterpenoids ($r = 0.8$ and -0.76 respectively, p -values < 0.05). Figure 28 also shows negative correlations between T_p and the percentage of alcohols and acids, and a positive correlation between T_p and the percentage of alkanes ($r = -0.8$, -0.46 and 0.74 respectively, p -values < 0.05).

These results suggest that concentrations and proportions of chemical families should be

considered when investigating the effects of wax cuticular components on g_{res} and Tp as studied species do not respond in the same way than in the previous studies (Bueno et al., 2019a). Indeed, we observed that the concentration of triterpenoids has a positive effect on Tp, as reported in the literature. Likewise, alkanes have also a same action on Tp. Considering the relative proportions of the different components, the percentage of triterpenoids in the cuticular waxes seems to have no role in variation of Tp, contrary to alcohols, acids and alkanes. Furthermore, triterpenoids have been shown in our species to play a negative role on g_{res} (taken as concentration and proportion) but we can also see a negative effect on the concentration of alkanes and a positive effect on the proportion of acids in the cuticular waxes. The PCA graphs (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** and 7) weight the previous results as the six species seem to respond differently to the chemical composition of their cuticular waxes.

2.6. Conclusion

The lack of relationship between P50 and g_{res} underlines the importance of focusing on residual water losses after stomatal closure to understand plants resistance to drought. The effect of the chemical composition of cuticular waxes on g_{res} and Tp is difficult to describe precisely, regarding their proportion or concentration, the chemical components can have a positive, a negative or no effect on residual conductance and/or its dependence to temperature.

This study, more than bringing new data in the field of understanding water and heat stress on plants, highlights the importance of taking the branch and the leaf as a whole complex system, that involves physiological, chemical and physical traits dealing together as a very precise balance to answer the best to an environmental stress.

2.7. Acknowledgements

This research was supported by the project ANR-18-CR20-0005, Hydrauleaks.

2.8. Supplemental figures

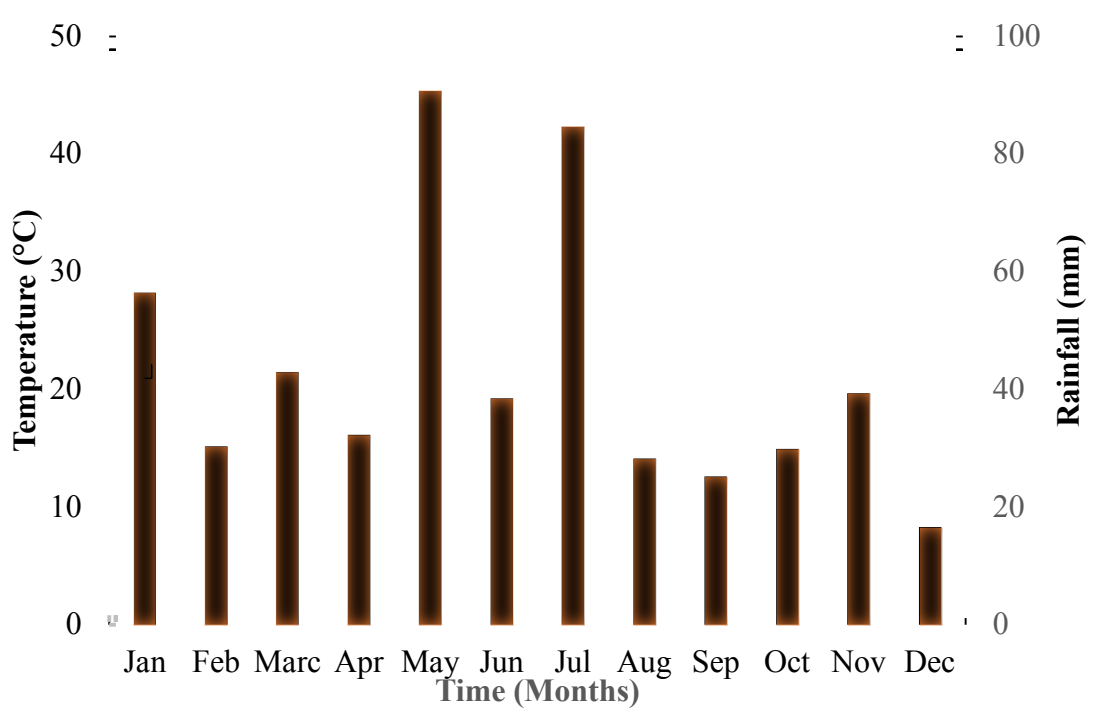


Figure S 1: Standard ombrothermic diagram of the studied area in 2018 (bars = rainfall, line = temperature).

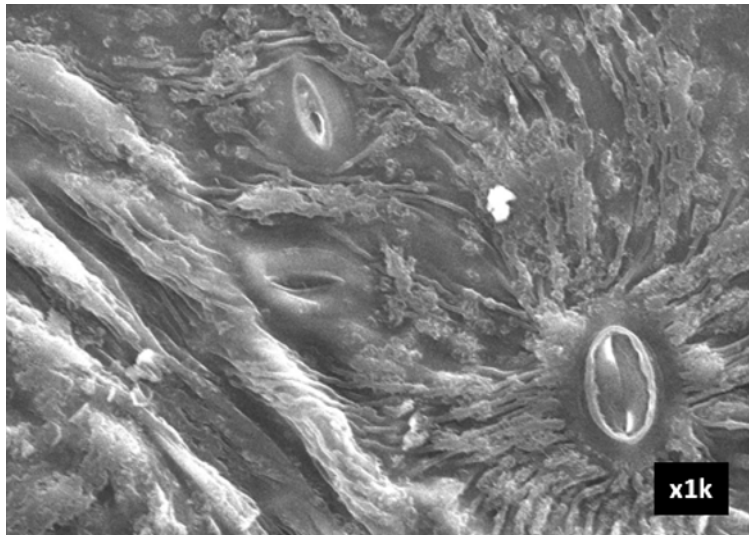


Figure S 2: Scanning Electron microscopy close up x1000 of abaxial surface of *Tilia cordata* leaf showing the relief and wax deposits

Détermination des traits hydrauliques clés dans le contrôle du temps de défaillance hydraulique lors d'une sécheresse

1. Résumé

L'étude des mécanismes de défaillance hydraulique est un sujet émergent après l'étude maintenant bien en place du fonctionnement stomatique en cas de sécheresse. En revanche, la communauté scientifique manque de connaissance concernant l'étude du temps de défaillance hydraulique (THF : Time to Hydraulic Failure). Le THF est fonction de plusieurs traits et processus déterminant les taux de pertes en eau, l'utilisation des stockages en eau et les limites de la tolérance à la sécheresse en termes de résistance à l'embolie du xylème.

Les plantes ont différentes stratégies face à un épisode de sécheresse, il existe un trade-off entre les traits et processus de lutte contre la dessiccation, il est donc important de mettre en place des modèles de prédiction du THF prenant en compte tous ces traits et stratégies. C'est le cas du modèle *SurEau*, un modèle mécanistique de prédiction du THF basé sur les facteurs hydrauliques sol-plante-atmosphère. Le modèle *SurEau* simule la dynamique temporelle du statut hydrique de la plante jusqu'à et après le point de fermeture stomatique.

Le modèle *SurEau* est un modèle expérimental nécessitant une validation du profil de dessiccation d'arbres exposés à une sécheresse contrôlée, c'est le but de cette étude réalisée en 2019 et dont l'article rédigé a été soumis au journal *Tree Physiology*.

Pour ce faire, 4 espèces végétales contrastées ont été utilisées, 2 espèces angiospermes (*Populus nigra* et *Quercus ilex*) et 2 espèces gymnospermes (*Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*). Ces espèces diffèrent de par leur stratégies d'utilisation en eau et de réponse au stress hydrique. 18 plants de chaque espèce ont été mis en pots de 100L et installés sur une plateforme de balances à enregistrement automatique. Du film plastique a été installé sur les pots afin d'éviter un dessèchement du sol, un abri anti pluie automatique se déplaçait en cas de détection de pluie sur les pots afin de maintenir un stress hydrique convenable et une station météo au niveau de

la plateforme de balance permettait un enregistrement horaire de différents paramètres atmosphériques. Pour chaque espèce, les 18 pots ont été séparés en 6 pots appelés WW (Well-Watered, bien hydratés) et 12 pots WS (Water-stressed, stress hydrique). Pour chaque arbre, différents traits ont été mesurés : allométrie, SLA (Specific Leaf Area), g_{res} et T_p , P50, Potentiels hydriques de base et de midi, point de perte de turgescence (TLP, Turgor Loss Point), module d'élasticité, potentiel soluté à pleine turgescence, g_{smax} (conductance stomatique maximale), P_{gs88} (Potentiel hydrique à 88% de fermeture stomatique), niveau de dysfonctionnement hydraulique post stress hydrique par tomographie à rayons X. Les résultats ont montré une forte correspondance entre les prédictions du modèle et les valeurs observées sur plantes sur la dynamique du potentiel hydrique avant la fermeture des stomates pour toutes les espèces et sur la phase tardive amenant à la défaillance hydraulique sur 3 espèces (le peuplier a perdu ses feuilles suite à une vague de chaleur, stratégie d'évitement et d'économie d'eau). Egalement sur la dynamique de contenu en eau du sol donc sur la transpiration des plantes pendant la sécheresse pour les 4 espèces.

Le modèle *SurEau* peut donc être considéré comme un bon modèle pour prédire la dynamique de dessiccation des plantes et le timing des réponses clés pendant une cinétique de sécheresse. Une analyse de sensibilité globale a également été réalisée afin de déterminer la contribution des différents traits sur le temps prédit pour atteindre des niveaux critiques de stress hydrique. Les résultats de cette analyse de sensibilité ont montré que lors de la phase précoce de réponse à la sécheresse, celle précédant la fermeture stomatique, le THF était drivé par les traits impliqués dans l'utilisation en eau : faible transpiration stomatique et haute sensibilité stomatique (P_{gs88}) induisant une diminution de la transpiration et donc une diminution de l'utilisation en eau du sol). Lors de la phase tardive de réponse à la sécheresse, entre la fermeture stomatique et la défaillance hydraulique, le THF est régulé par une combinaison de traits impliqués dans les dépenses en eau : faible g_{res} , faible sensibilité du g_{res} aux températures plus élevées, faible P50 (xylème plus résistant à la cavitation) et P_{gs88} plus précoce.

Les résultats de cette analyse de sensibilité montrent l'importance de prendre en compte ces différents traits clés spécifiques des phases de réponses à la sécheresse dans l'étude de la mortalité des arbres dans les cas de sécheresse et chaleur extrêmes.

2. Key hydraulic traits control the dynamics of plant desiccation in four contrasting tree species during drought

Chris J. Blackman^{1,2}, Lise-Marie Billon², Julien Cartiailler², José M. Torres-Ruiz², Hervé Cochard²

^{1,2}ARC Centre of Excellence for Plant Success in Nature and Agriculture, School of Natural Sciences, University of Tasmania, Hobart 7001, Australia

²Université Clermont-Auvergne, INRAE, PIAF, Clermont-Ferrand, France

Key words: drought, time to hydraulic failure, traits, *SurEau*

Running head: traits that determine plant desiccation time

Correspondence: Hervé Cochard, Université Clermont-Auvergne, INRAE, PIAF, Clermont-Ferrand, France. Email: herve.cochard@inrae.fr

2.1. Abstract

Trees are at risk of mortality during extreme drought, yet our understanding of the traits that govern the timing of drought-induced mortality remains limited. To address this, we tested *SurEau*, a trait-based soil-plant-atmosphere model designed to predict the dynamics of plant desiccation, against those observed in potted trees of four contrasting species exposed to drought. *SurEau* was parameterised with a range of plant hydraulic and allometric traits, soil, and climatic variables. We found strong agreement between predicted and observed dynamics of plant water potential (MPa) during early phase drought leading to stomatal closure in all four study species, as well as during the latter phase of drought leading to hydraulic failure in the three evergreen species (*Cedrus atlantica*, *Pinus halepensis*, and *Quercus ilex*). A strong leaf shedding response following stomatal closure decoupled predicted and observed water potentials in the deciduous species *Populus nigra*. A global model's sensitivity analysis revealed that for a common plant size and soil volume, two relatively consistent sets of traits

control longer desiccation times prior to and following stomatal closure, respectively. For each species, low maximum stomatal conductance (g_{smax}) and early stomatal closure (P_{gs88}) most strongly controlled longer desiccation times from full hydration to stomatal closure, while early P_{gs88} , low shoot residual conductance (g_{res}), high xylem embolism resistance (P_{50}), and a high phase transition temperature (T_p) in *Populus nigra*, controlled longer desiccation times from stomatal closure to hydraulic failure. Our findings point to *SurEau* as a highly useful model for predicting the dynamics of plant desiccation during drought and suggest adjustments made in key hydraulic traits are beneficial to delaying the onset of drought-induced mortality in trees.

2.2. Introduction

Reports of drought-induced tree mortality are increasing in many forested regions of the world as temperatures rise and drought stress intensifies with global climate change (Allen et al., 2015; Roberts et al., 2022). These reports are driving major research efforts into the mechanisms of tree mortality, and it is now widely recognised that catastrophic failure of the water transport system (hydraulic failure) is one of the leading causes of tree death during severe drought (Anderegg et al., 2016; Choat et al., 2018; Klein et al., 2022; McDowell et al., 2022). Hydraulic failure occurs when soil drying reaches critical levels and increasing tension within the water conducting xylem exceed species thresholds, causing widespread cavitation and the formation of embolisms that occlude the water transport pathway (Tyree and Sperry, 1989). Tree species exhibit a range of response strategies that minimise their exposure to and ultimately delay the onset of such lethal levels of drought stress (Pivovarovoff et al., 2016; Blackman et al., 2019a). However, our ability to predict the timing to hydraulic failure and therefore tree mortality during drought remains limited, largely because of a lack of knowledge of the traits and processes that determine plant desiccation times across diverse species.

The dynamics of plant desiccation during drought is broadly defined by the behaviour of stomata and their regulation of plant water loss. Under mild drought conditions, the stomata are open to facilitate photosynthetic gas exchange, with rates of plant and soil dehydration driven largely by the size and allometry of trees in combination with their intrinsic water transport

capacity. As drought stress intensifies, stomata close to preserve the remaining water content in the soil, as well as within internal plant tissues, and prevent the onset of embolism formation (Buckley, 2019; Creek et al., 2020). Nevertheless, plants continue to lose water through leaf cuticles and ‘leaky’ stomata (Schuster et al., 2017; Duursma et al., 2019; Machado et al., 2021), as well as through other tissues including the bark (Wolfe, 2020). These residual water losses slowly deplete internal water stores and decrease water potentials, ultimately leading to hydraulic failure, complete tissue desiccation and plant death (Mantova et al., 2022). Taken together, rates of water loss prior to and following stomatal closure influence the time it takes for a given tree to use-up available soil water and dehydrate to lethal levels of drought stress. Nevertheless, in contrast to the considerable attention given to understanding stomatal regulation of plant water status during drought, our understanding of the traits and processes that shape the dynamics of plant desiccation and hydraulic dysfunction following stomatal closure remains limited (Choat et al., 2018).

The time needed for plants to dehydrate to lethal levels of drought stress following stomatal closure depends on the interplay of several traits and processes that determine rates of water loss, total remaining water storage, and the limits of drought tolerance in terms of xylem embolism resistance (Gleason et al., 2014; Blackman et al., 2016; Martin-StPaul et al., 2017; Cochard et al., 2021). Long desiccation times following stomatal closure should be maximal in species that exhibit low residual leaf conductance (g_{min}), large water storage reservoirs relative to leaf area, leaf shedding, and strong embolism resistance. However, trait trade-offs, for example, between the level of capacitive discharge of internal water reserves and xylem embolism resistance (Scholz et al., 2011), preclude certain combinations of traits and imply long drought survival times are achievable in species with contrasting traits and drought response strategies (Pineda-García et al., 2013; Pivovarovoff et al., 2016). Indeed, evidence from experimental and modelling studies clearly shows the importance of considering a range of traits when assessing the dynamics of plant desiccation and drought mortality risk across diverse species (Wolfe, 2017; Blackman et al., 2019a; Blackman et al., 2019b; De Kauwe et al., 2020).

Process-based models aimed at simulating gas exchange and hydraulic responses under optimal

and water-limiting conditions offer a promising way forward to better understand plant responses to drought (Mencuccini et al., 2019). Yet very few consider the water relations of plants under severe drought conditions at the very limit of their survival. To address this, the mechanistic soil-plant hydraulic model *SurEau* was recently developed to simulate the temporal dynamics of plant water status up to and beyond the point of stomatal closure (Martin-StPaul et al., 2017; Cochard et al., 2021). In addition to the drivers of plant-water use and stomatal responses to water-stress, the model describes processes linked to water loss following stomatal closure, depletion of internal water storages, and xylem embolism leading to hydraulic failure. Martin-StPaul *et al* (2017) were the first to present and use *SurEau* to test hypotheses surrounding the role of coordinated stomatal closure and embolism resistance in determining drought mortality risk across diverse species. Since then, the model has been used to predict future increases in drought-induced tree mortality with increasing temperature (Brodribb et al., 2020) and simulate patterns of stomatal closure and cavitation during drought (Lamarque et al., 2020; López et al., 2021). Importantly, *SurEau* enables predictions to be made of the time to hydraulic failure (THF), that is, the time it takes for trees (and crops) to use up available soil water and dehydrate to critical levels of water stress (Lemaire et al., 2021). However, the model remains to be directly validated against patterns of desiccation in tree species exposed to experimental drought.

In this study, we provide the first direct experimental validation of the dynamics of desiccation in trees, as predicted using the model *SurEau*. We parameterised *SurEau* with a range of hydraulic, allometric and drought-response traits measured in potted trees of two angiosperm and two conifer species known to exhibit contrasting water-use and drought adaptation strategies. The predicted dynamics of plant water potential was tested against those observed in experimental plants during an imposed extreme drought by withholding water. We also applied a global sensitivity analysis with the aim of elucidating the relative contribution of different traits to the predicted time needed to reach critical levels of drought stress, focusing on rates of desiccation prior to and following stomatal closure. We expected that when normalised by canopy area, pot size and climate during drought, higher values for the time (i.e., longer desiccation times) needed for plants to dehydrate from full hydration to water potentials

at stomatal closure would be driven most strongly by ‘water-use’ traits. In contrast, we expected longer desiccation times from water potentials at stomatal closure to hydraulic failure would be driven most strongly by a combination of ‘water-loss’ traits, such as low residual branch conductance (g_{res}), and drought tolerance traits, specifically a greater ability to resist drought-induced embolism (P50).

2.3. Materials and methods

Species and experimental design

A group of four tree species, consisting of two angiosperms (*Populus nigra* L. and *Quercus ilex* L.) and two conifers (*Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière and *Pinus halepensis* Mill.), were selected for their contrasting water-use and drought tolerance traits. *Populus nigra* is a fast-growing broad leaf deciduous species restricted to low lying areas with high moisture availability. *Quercus ilex* is an evergreen species native to the Mediterranean region where its distribution overlaps with *Pinus halepensis*. *Cedrus atlantica* is native to the Atlas Mountains in northwestern Africa, where it can form vast forests, especially in more humid regions. Trees of each species were grown in large 100 L (*Pinus halepensis* and *Q. ilex*) or 80 L (*C. atlantica* and *Populus nigra*) pots located at the INRAE site in Crouel, Clermont-Ferrand, central France (45.7772° N, 3.0870° E) at an elevation of 350 m. The trees were grown under well-watered conditions over multiple years, with plant age at the start of the experiment ranging from 3-5 years. During the winter months of each year, all individuals were moved to nearby glasshouses to avoid frost damage. The medium used to grow the plants was a sandy clay soil with a relative water content at field capacity of 37% and residual water content of 9%.

In May 2019 (Northern Hemisphere Spring), 18 potted individuals of each species were moved to a rain exclusion facility at the INRAE site and placed on high-capacity (300 kg, 50g resolution) balances (PW12CC3, HBM), programmed to record pot mass (g) every 5 minutes. The exposed soil of each pot was covered with cling film to minimise water evaporation. Rain was excluded from the plants by a large retractable open-ended trapezoid transparent shelter. A rain gauge positioned on a nearby roof triggered the shelter to close (that is, the shelter moved over top of the plants) during periods of rain and reopen when the rain stopped. A weather

station was installed close to the shelter providing hourly climatic data for air temperature, humidity, PAR, and wind speed.

Twelve plants per species were assigned to a water stressed (WS) treatment, while six plants per species were assigned as well-watered (WW) controls. All plants were initially maintained under well-watered conditions, with water being added to the soil via an automated irrigation system programmed to maintain soil water content at saturation. Drought was applied to the WS plants by disconnecting the irrigation and withholding water. For the purposes of improved experimental management, the beginning of each species dry-down treatment was staggered, with *Pinus halepensis* commencing on 10th July 2019, *Populus nigra* commencing on 2nd August 2019, *Q. ilex* commencing on 11th August 2019, and *C. atlantica* commencing on 9th September 2019 (see Figure 29).

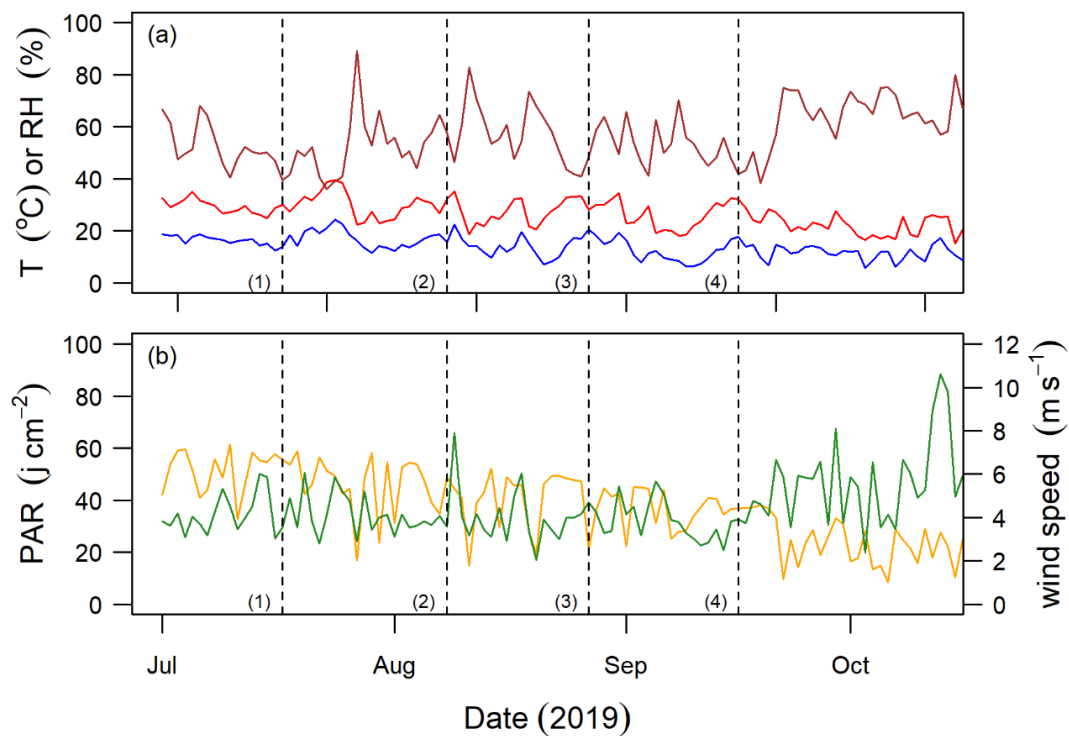


Figure 29: Climate variables recorded on-site during the dry-down experiment. Plot (a) shows minimum (blue) and maximum (red) daily temperature and mean daily relative humidity (brown). Plot (b) shows mean daily photosynthetic active radiation (yellow) and wind speed (green). Numbered dashed lines indicate the start date of each species dry-down treatment:

Pinus halepensis (1), *Populus nigra* (2), *Quercus ilex* (3), and *Cedrus atlantica* (4)

Allometry

Maximum canopy leaf area (LA; m²) was estimated for individual trees of each species from allometric relationships developed between LA and stem volume (m³). Six to eight side-branches differing in size and position were cut from the main stem from each of 5-6 well-watered plants per species. Stem volume was calculated from measurements of branch length and basal diameter, assuming the shape of a cylinder, while LA was calculated by multiplying branch leaf dry weight (g) by species mean specific leaf area (SLA; m².g⁻¹). SLA was determined from the relationship between projected area (m²) and dry weight (g) of 5-10 representative leaves sampled from five well-watered trees per species. For individuals of each species, total canopy leaf area was calculated by measuring the volume (length and basal diameter) of all branches arising from the main stem and solving the linear regression equation fitted to the relationship between LA and stem volume across sampled branch sizes. The height and basal diameter of the main stem of each individual was also measured and its volume calculated. See Table 1 for species allometric values.

Dry-down treatment

For each species, the WS treatment was commenced by stopping irrigation and allowing trees to use-up available soil water and dehydrate to water potentials associated with at least 50% loss of stem hydraulic conductance ($P50_{stem}$). All WS trees reached their respective target water potential, with the exception *C. atlantica*, which were dried down late in the season and only reached water potentials corresponding to 24% loss of hydraulic function, as determined by micro-CT measurements, before cooler and more humid weather set in. Individual pots were re-watered to field capacity upon trees reaching their target water potential. Levels of hydraulic dysfunction due to embolism were confirmed in each of the WS trees, as well as the WW controls, by sampling branches shortly after re-watering, and using an X-ray microtomograph (Nanotom 180 XS, GE, Wunstorf, Germany) to measure embolism accumulation expressed as a percentage loss of xylem function (Torres-Ruiz et al., 2015). For *Populus nigra* and *Q. ilex*,

which both have long vessels, branches or whole shoots > 1 m in length were sampled for micro-CT.

Drought response measurements

Predawn and midday xylem water potentials (MPa) were measured in WW and WS trees every 2-5 days using a Scholander-type pressure chamber (PMS Instrument Company, Albany, USA). The evening prior to each measurement date, an individual leaf from each tree, or small shoot in the case of *C. atlantica* and *Pinus halepensis*, were covered by an aluminum sleeve to prevent leaf transpiration and ensure measurements represented xylem water potentials.

The dynamics of plant transpiration (E ; $\text{mmol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) during drought were captured via the balance data. We calculated daily midday canopy transpiration in WS trees during drought by normalising the mass loss of water by canopy leaf area over the course of 2 hours around midday. The water potential at stomatal closure was identified by fitting a ‘Weibull’ function to the pooled midday E vs water potential data across trees of each species, respectively (Supporting Information Fig. S1).

Hydraulic traits

Hydraulic vulnerability to drought induced embolism was characterised for each species using representative vulnerability curves sourced from previous studies (see Table 5). The hydraulic vulnerability of leaves and stems was assumed to be the same within species.

Pressure-volume curves were generated for each species using bench dehydration (Tyree and Hammel, 1972). A single leaf of *Populus nigra*, or small shoot of *Q. ilex*, *Pinus halepensis*, and *C. atlantica*, was sampled from four-six individuals, respectively. The relationship between relative water content and water potential measured during bench dehydration was used to determine turgor loss point (TLP, MPa), solute potential at full turgor (MPa), leaf modulus of elasticity (ϵ , MPa).

Minimum residual conductance (g_{res} , $\text{mmol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and its phase transition temperature (T_p) was determined using six-eight small branches, per species, dried-down inside a climate-controlled Drought-box (Billon et al., 2020). Branches, 40-50 cm long, were hydrated

overnight, recut in air and the cut-end sealed with melted paraffin wax. Each branch was measured for length (mm), basal diameter (mm) and saturated mass (g) before being suspended on one of eight strain gauges inside the Drought-box. Climate conditions were initially set to 30°C and 40% relative humidity and the branches allowed to dehydrate, with changes in mass representing branch water loss. Stomatal closure occurred after a period of between 2-6 hours, depending on species. After 24 hours inside the Drought-box, branches were removed, their leaves and stems separated, and oven dried at 70°C. g_{res} was determined from water loss data beyond the point of stomatal closure. To do this, rates of water loss were normalised by the VPD (KPa) recorded inside the Drought-box and double-sided leaf area for the two angiosperms and projected leaf area for the two conifer species. Leaf area was calculated by multiplying total leaf dry weight by species mean SLA.

The phase transition temperature (T_p , °C), which defines the temperature point at which g_{res} markedly increases across a range of temperatures, was determined on a separate set of branches sampled from well-watered plants of each species and dried down in the Drought-Box (Billon et al 2020). In these experiments, branches were dried down under six stepwise increases in temperature (30, 35, 40, 45, 50, and 55°C), with concurrent decreases in RH (40, 30, 23, 18, 14, and 11%) to maintain the water concentration of air at 10.6 g kg⁻¹. g_{res} was calculated at each temperature step as described above. From these data, we calculated T_p for each species using an Arrhenius plot as described in Bueno et al (Bueno et al., 2019a), while Q_{10a} and Q_{10b} were calculated as the Q_{10} of the relationship between g_{res} and temperature below and above the T_p value, respectively.

Modelled dynamics of plant desiccation

SurEau is a mechanistic soil-plant-atmosphere hydraulic model that predicts plant responses under simulations of water stress. It works by segmenting the soil-plant-atmosphere into compartments, with water fluxes between segments determined by gradients of water potential. In the model, differences in capacitance between leaf symplastic and stem apoplastic compartments are calibrated from pressure-volume curves and xylem vulnerability curves, respectively. In doing so, *SurEau* accounts for the buffering effect of symplastic capacitance

on water fluxes under well-hydrated conditions and the early onset of drought, as well as the dynamics of plant desiccation once xylem cavitation begins to occur. A detailed description of the model and its function, including equation derivations, is provided by Cochard et al (2021). We modelled the dynamics of plant desiccation, as represented by changes in plant water potential (MPa), and the dynamics of plant water use, as represented by changes in relative extractable water from the soil (%). To do this we parameterised *SurEau* with plant (hydraulic, gaseous and allometric), soil, and climatic variables associated with each of the four species and conditions during their respective dry-down experiments. Drought simulations were performed on all WS individuals of each species, respectively, with each simulation starting at soil saturation and ending at hydraulic failure of the plant, defined as the water potential associated with 99% loss of leaf hydraulic conductivity. Model input consisted of variables measured on experimental plants, including species means for pressure-volume traits, stomatal closure point, g_{res} , and T_p , and individual tree-level values for allometric traits such as plant height and leaf area. Input values for species hydraulic vulnerability (stem P50) were sourced from the literature. Climate input variables were drawn from hourly climate data measured on site during each species dry-down experiment. Soil input parameters used to calculate field capacity etc were constant across species. Input variables related to the length of roots was calculated using a fractal representation of tree allometry (see Cochard et al 2021). Table 5 provides a summary of selected trait means for each species, while Supporting Information Table S1 provides a full list of model input variables.

Table 5 : *Plant allometric, gas exchange and hydraulic trait means used to parameterise the model SurEau for predicting the dynamics of plant desiccation during drought for the four study species. Also included are the response variables Ψ_{min} , and PLC, recorded for each species at the end of the experimental drought. Note that allometric values represent species means, yet model simulations were run using individual-level data*

	Units	<i>Pin_hale</i>	<i>Pop_nigr</i>	<i>Que_ilex</i>	<i>Ced_atla</i>
Canopy leaf area	m ²	3.64	1.94	1.77	1.24
Height	m	2.08	1.24	1.49	1.14
Basal diam.	cm	5.7	1.9	3.6	3.8

<i>P50</i>	MPa	-4.67*	-2.2*	-7.13*	-5.14*
<i>Slope</i>	% MPa ⁻¹	78	100	23	69
<i>TLP</i>	MPa	-2.15	-2.07	-2.83	-3.14
<i>Pi0</i>	MPa	-1.26	-1.52	-1.89	-2.14
<i>ε</i>	MPa	9.27	15.9	16.2	13.0
<i>g_{smax}</i>	mmol s ⁻¹ m ⁻²	60	220	100	120
<i>Pg_{s88}</i>	MPa	-2.96	-1.14	-4.04	-2.57
<i>g_{res}</i>	mmol s ⁻¹ m ⁻²	0.58	4.5	1.19	1.21
<i>T_p</i>	°C	42.1	35.0	43.2	41.3
<i>Q_{10a}</i>		1.13	1.2	1.06	1.22
<i>Q_{10b}</i>		2.99	4.8	1.52	1.83
<i>Ψ_{min}</i>	MPa	-5.25	-2.54	-8.61	-3.46
<i>PLC</i>	%	60.8	82.5	-	24.0

Notes: *Pin_hale* = *Pinus halipensis*; *Pop_nigr* = *Populus nigra*; *Que_ilex* = *Quercus ilex*; *Ced_atla* = *Cedrus atlantica*; *P50* = 50% loss in xylem hydraulic conductivity; *TLP* = turgor loss point; *Pi0* = osmotic potential at full turgor; *ε* = modulus of elasticity; *g_{smax}* = maximum stomatal conductance; *Pg_{s88}* = 88% stomatal closure; *g_{res}* = minimum branch conductance; *T_p* = phase transition temperature; *Q_{10a}* and *Q_{10b}* = *Q₁₀* of the relationship between *g_{res}* and temperature below and above *T_p*; *Ψ_{min}* = minimum water potential during drought; *PLC* = percentage loss in conductivity measured in stems immediately after peak drought stress. * indicates *P50* values sourced from previous studies: *Pin_hale* (S. Delzon, unpublished); *Pop_nigr* (H. Cochard, unpublished); *Que_ilex* (Lobo et al., 2018); *Ced_atla* (Cochard, 2006).

Sensitivity analysis

A global model's sensitivity analysis (Sobol, 2001) was performed to elucidate the hydraulic traits that contribute to variation in *THF*, as predicted by *SurEau*. Two different phases were deemed to influence the dynamics of plant desiccation during drought, depending on whether

leaf xylem water potential occurred above or below the stomatal closure point. Thus, two time-based metrics were used in the sensitivity analysis to explore the relative contribution of input variables to longer plant desiccation times from 1) full hydration to water potentials at stomatal closure (T_{close}) and 2) stomatal closure to water potentials at hydraulic failure (T_{cav}). An additional metric of the overall time from full hydration to the point of hydraulic failure was also defined (THF). We conducted the sensitivity analysis by generating a population of 5000 genotypes of each species, respectively, with trait values randomly sampled from a $\pm 25\%$ range of the trait means measured in experimental plants. We then took the top 1% of genotypes with the longest desiccation times and computed the deviation from the whole population. Simulations were run with plant size, leaf area and soil volume set constant across species (see Supporting Information Table S2). Daily climate inputs were also set constant according to the conditions typical of a summer's day (see Supporting Information Table S2).

2.4. Results

Modelled vs observed plant desiccation dynamics

We observed strong agreement between predicted (model output) and observed dynamics of plant desiccation during different phases of drought in each of the four study species, respectively (Figure 30). In all species, following the cessation of water input, the predicted and observed predawn and midday xylem water potentials declined rapidly and converged at, or shortly after, the point of stomatal closure. Following stomatal closure, rates of water potential decline was lower in all species. The relationship between predicted and observed water potential during the post-stomatal closure phase of drought was close to 1:1 in the three evergreen species *C. atlantica*, *Pinus halepensis*, and *Q. ilex*. In contrast, the deciduous species *Populus nigra* showed deviation in predicted and observed water potentials following stomatal closure. This was most likely due to a strong leaf shedding response in experimental trees that occurred during local heatwave conditions. Levels of xylem embolism recorded in WS trees at the end of the drought was 24% in *C. atlantica*, 61% in *Pinus halepensis*, and 83% in *Populus nigra* (Table 5).

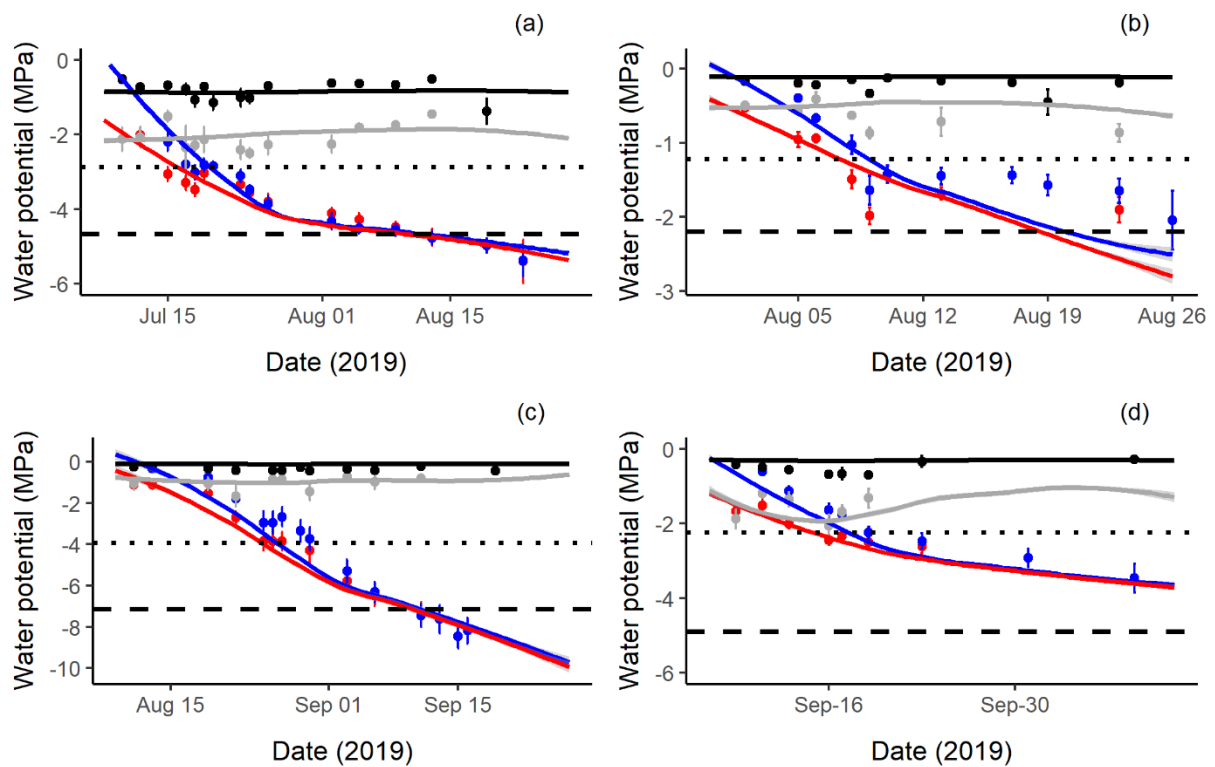


Figure 30: Plots showing strong correspondence between observed and modelled water potential dynamics during drought in each of the four study species: (a) *Pinus halepensis*; (b) *Populus nigra*; (c) *Quercus ilex*; (d) *Cedrus atlantica*. In each plot, the colouring and symbol type indicate observed (circles) and modelled (lines) predawn and midday water potentials for water stressed (WS; blue and red lines, respectively) and control (WW; black and grey lines, respectively) plants. 95% confidence intervals for the modelled data are shown as grey shading. In each plot, the horizontal lines indicate the water potential at stomatal closure (P_{gs88} ; dotted line) and 50% loss of hydraulic conductivity (P_{50} ; dashed line)

We also observed strong correspondence between predicted and observed dynamics in whole-tree transpiration as represented by changes in relative extractable soil water content during drought (Supporting Information Fig S2).

Species rank in time to hydraulic failure

When standardised for leaf area and soil volume, and when dried down under standardised climatic conditions, plants of the four study species varied in their predicted time to hydraulic

failure, with longer *THF* predicted for the two conifer species compared to the two angiosperms (Figure 31). Overall, the shortest *THF* was predicted for plants of the deciduous species *Populus nigra*, while the longest was predicted for plants of *Pinus halepensis*. In contrast, when using non-standardised data and allowing for differences in plant size and leaf area (but maintaining common soil and climatic variables), species rank was altered, with the longest time to hydraulic failure predicted for *C. atlantica* (Supporting Information Fig S3).

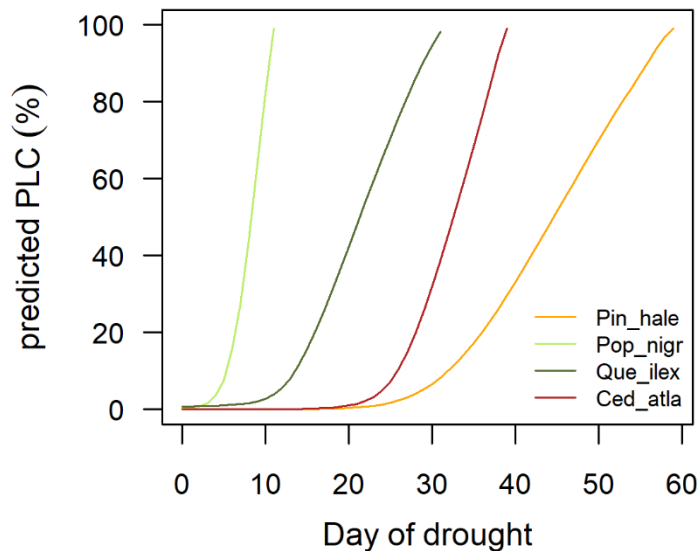


Figure 31: Modelled dynamics of percentage loss of conductance (PLC) due to embolism during a simulated drought in the four study species (yellow = *Pinus halepensis*; light green = *Populus nigra*; dark green = *Quercus ilex*; red = *Cedrus atlantica*). In the model, plants of each species were standardised by leaf area and pot size and dried down under the same climatic conditions

Among the four study species, predicted time to hydraulic failure using standardised data (Fig. 3) was weakly correlated with branch residual conductance (g_{res}) but was unrelated to the water potential at stomatal closure (P_{gs88}) and hydraulic vulnerability (P_{50}) (Supporting Information Fig S4).

Traits that contribute most to time to hydraulic failure

Global sensitivity analysis revealed that two different sets of traits contributed to lower rates of desiccation depending on whether leaf water potential was above or below the turgor loss point. These sets of traits were relatively consistent across the four study species. For each species, the predicted time to stomatal closure (T_{close}) was most strongly controlled by water use traits, including maximum stomatal conductance (g_{smax}), the water potential at stomatal closure (Pg_{s88}) and, to a lesser extent, branch residual conductance (g_{res}) and the Q_{10a} sensitivity of g_{res} (Figure 32). Meanwhile, the time to hydraulic failure following stomatal closure (T_{cav}), as well as overall THF , was largely determined by Pg_{s88} , g_{res} , Q_{10a} , and the water potential at 50% loss of hydraulic conductivity (P_{50}). The predicted time to hydraulic failure for *Populus nigra* was also controlled by the phase transition temperature (T_p) and its influence on rates of residual water loss during elevated temperatures.

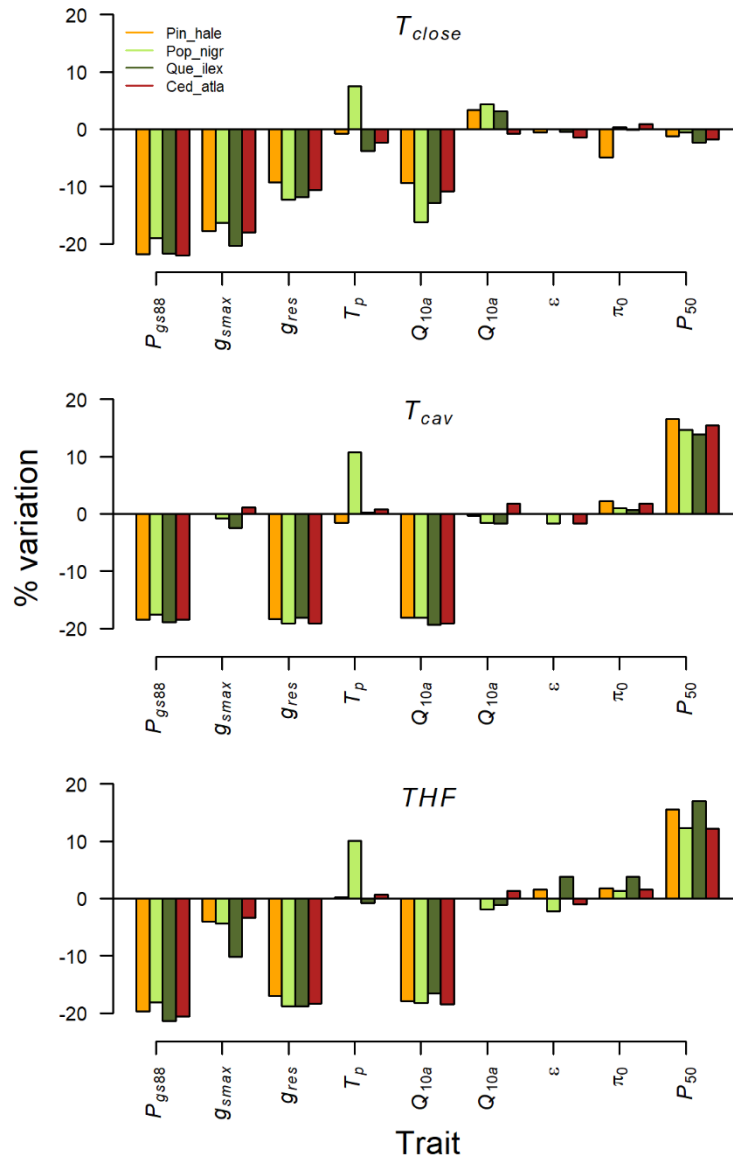


Figure 32: Global sensitivity analysis, focusing on the traits that contribute the most to higher values for the time to stomatal closure (T_{close}), the subsequent time to hydraulic failure (T_{cav}), and the overall time from full hydration to hydraulic failure (THF). Colours represent the four species in the study: *Pin_hale* = *Pinus halepensis* (orange); *Pop_nigr* = *Populus nigra* (light green); *Que_ilex* = *Quercus ilex* (dark green); *Ced_atla* = *Cedrus atlantica* (red). See Table 1 for trait abbreviations

2.5. Discussion

Predicting tree mortality risk during drought

In this study, we explicitly tested the mechanistic soil-plant-atmosphere model *SurEau*, and its

ability to predict the dynamics of desiccation in experimental plants exposed to drought. We found an overall strong correspondence between predicted and observed dynamics of plant water potential during the early phase of dry-down leading to stomatal closure in all four study species, and during the latter phase of dry-down leading to hydraulic failure in the three evergreen species (*C. atlantica*, *Pinus halepensis* and *Q. ilex*). We also found strong correspondence between predicted and observed dynamics of soil water content, and thus plant transpiration, during drought for all species. These findings suggest *SurEau* can be used to predict the dynamics of plant desiccation as well as the timing of key physiological responses during drought, including the onset of hydraulic failure. Given that hydraulic failure is the leading mechanism of tree death when exposed to extreme drought (Adams et al., 2017; Nolan et al., 2021), this predictive capacity may greatly improve our ability to assess species mortality risk under future climates.

Our findings build on recent work highlighting the importance of incorporating hydraulic traits into soil-plant-atmosphere models of tree mortality risk during drought (Martin-StPaul et al., 2017; Mencuccini et al., 2019; De Kauwe et al., 2020; Cochard et al., 2021), including a recent study that uses a newly developed version of *SurEau* (*SurEau-Ecos*) to predict tree mortality at stand and regional scales (Ruffault et al., 2022). *SurEau* is parameterised with traits that are commonly derived from measurements made in plant eco-physiological studies, including leaf gas exchange, pressure-volume dynamics, and hydraulic vulnerability curves. As input variables, the model uses these measurements to predict key mechanisms of plant desiccation during drought, including the dynamics of plant water status following stomatal closure as influenced by residual transpiration, xylem cavitation and the draw-down of internal water reservoirs. Unlike many studies on the response of plants to drought, we grew trees in large pots with large soil volumes that buffered the shock of drought stress commonly seen in experimental plants. Nevertheless, gaining knowledge of rooting depth and its influence on *THF* in trees in the field remains a significant challenge, despite widespread recognition of the role that rooting depth, as well as factors such as tree size and stand density, has on soil water access and survival during drought (Fensham and Fairfax, 2007; Nardini et al., 2016; Ripullone et al., 2020; Chitra-Tarak et al., 2021; Pivovarovoff et al., 2021; Britton et al., 2022).

Although we observed strong agreement in the dynamics of plant desiccation leading to hydraulic failure in the three evergreen species, observed water potentials in trees of the deciduous species *Populus nigra* deviated from those predicted by the model following stomatal closure. For *Populus nigra*, this deviation coincided with a strong leaf shedding response observed in WS trees over the course of a few days (data not shown). Leaf shedding is well known as an adaptive response to drought, especially in tropical dry forests (Méndez-Alonzo et al., 2012; Wolfe et al., 2016; Ribeiro et al., 2021) and is typically associated with species that exhibit some level of hydraulic vulnerability segmentation (Tyree and Ewers, 1991; Tyree, MT; Cochard, H; Cruiziat, P; Sinclair, B; Ameglio, 1993). In such species, the shedding of vulnerable leaves during drought is thought to minimise hydraulic dysfunction in carbon expensive stems. In the current study, the leaf shedding response in *Populus nigra* trees was followed by a slower rate of xylem water potential decline, almost to the point of homeostasis, that ultimately delayed the onset of stem hydraulic failure. This response points to the need to consider hydraulic vulnerability segmentation and leaf shedding and their influence on reducing evaporative surface area when developing models of *THF* (Blackman et al., 2019b; Levionnois et al., 2020). Indeed, *SurEau* does allow for differences in hydraulic vulnerability between leaves and stems, though we did not measure it in the current study.

Traits that contribute to longer THF

Global sensitivity analysis revealed that a relatively consistent set of input parameters controlled most of the variation in predicted *THF*. For each species, longer times for plants to reach water potentials at stomatal closure (T_{close}) was driven largely by ‘water-use’ traits, including low maximum stomatal conductance (g_{smax}) and high stomatal sensitivity (Pg_{s88}), both of which reduce rates of plant transpiration and drawn-down of available soil water. In contrast, longer times for plants to reach critical levels of drought stress associated with hydraulic failure following stomatal closure (T_{cav}) was controlled most strongly by a combination of ‘water-loss’ traits, including early Pg_{s88} , low residual branch conductance (g_{res}) and a low sensitivity of g_{res} to increasing temperature post stomatal closure (Q_{10b}), as well as drought tolerance traits, namely a greater ability to resist drought-induced embolism (P_{50}). It was these traits that also

most strongly controlled longer desiccation times, from full hydration to hydraulic failure, highlighting the importance of measuring ‘water-loss’ and drought tolerance traits when assessing species mortality risk during drought (Brodribb et al., 2020). Nevertheless, it is also important to note that when standardized for plant size, leaf area, soil volume and climate, the rank order of modelled *THF* among our four study species was not strongly correlated with any of the measured drought tolerance traits, including hydraulic vulnerability to embolism, highlighting the range of strategies plants may employ in delaying the onset of hydraulic failure during drought (Pivovarov et al., 2016; Blackman et al., 2019a).

Despite these differences in predicted *THF* among the four study species, the sets of traits controlling longer T_{close} and longer T_{cav} , respectively, were largely consistent across species. This suggests a similarity in the relative sensitivity of traits exhibited across species for delaying the onset of hydraulic failure. It may also suggest plants can minimise the risk of hydraulic failure under future drought conditions by adjusting any number of these highlighted traits. However, whether plants make these adjustments will depend not only on their ‘cost’ to different aspects of plant function, for example the potential cost of increased embolism resistance in terms of reduced hydraulic efficiency (Hölttä et al., 2011; Koçillari et al., 2021), but also on a species adaptive capacity (Aspinwall et al., 2015). For example, lower levels of residual leaf conductance in plants grown under soil water deficit and/or elevated temperatures has been reported in some (Duursma et al., 2019) but not other species (Bueno et al., 2019c). Meanwhile, the capacity to adjust xylem embolism resistance in response to environmental change is low in species of pine (Lamy et al., 2014; López et al., 2016) but may be higher in cool temperate angiosperms (Schuldt et al., 2016; Torres-Ruiz et al., 2019; Lemaire et al., 2021). We acknowledge that leaf area and soil volume was not included in our sensitivity analysis. Nevertheless, longer dehydration times is also likely to be achievable via changes in resource allocation such as the sapwood to leaf area ratio (Mencuccini and Bonosi, 2001) and root growth (Chitra-Tarak et al., 2021).

The notable exception to the observed consistency in traits controlling longer desiccation times across species, was the addition of the phase transition temperature (T_p) and its influence on longer desiccation times from stomatal closure to hydraulic failure in *Populus nigra*. Compared

to the three evergreen species, the lower T_p value recorded for *Populus nigra* (at 35°C) means that trees of this species are at greater risk of rapid dehydration during elevated daytime temperatures. This may help explain the rapid loss of leaves observed in droughted trees of *Populus nigra* following stomatal closure, which coincided with local heatwave conditions. It also highlights the need to consider traits such as T_p , as well as the Q_{10} temperature sensitivity of g_{res} , when predicting the temporal dynamics of plant desiccation under variable climatic conditions. This is especially important considering trees are at a greater risk of drought-induced hydraulic failure during hot-drought conditions (Allen et al., 2015).

2.6. Conclusion

Hydraulic failure is arguably the leading cause of tree death during extreme drought events. Given that forest trees in numerous parts of the world are facing increased drought severity as global temperatures continue to rise, there is an urgent need to develop process-based models that can predict the dynamics of tree desiccation leading to mortality during drought and heatwave conditions. In this paper, we show how *SurEau*, a soil-plant-atmosphere model, can predict the temporal dynamics of both transpirational water loss and plant water status under variable climatic conditions, and thus the timing of critical levels of drought stress associated with hydraulic failure. We also show that a few key hydraulic traits control longer desiccation times across species. Understanding how these traits vary within and across diverse species, as well as their responsiveness to changes in climatic conditions is a priority for future research. We acknowledge a number of challenges remain for process-based models such as *SurEau* to adequately capture variation in traits that contribute to determining plant desiccation times. These include leaf area and rooting depth in mature trees in the field, drought-response processes linked to root growth and leaf shedding, and interactions with neighbours in competitive forest systems.

2.7. Acknowledgments

We kindly thank folks from the VEGEPOLE and PHENOBIS platform for their help with tree

maintenance and balance installation. Thanks also to Pierre Conchon for technical assistance with the tomograph, and to Danielle Creek, Marylou Mantova, Lia Lamacque, and Cedric Lemaire for help with early morning water potential measurements. This study was funded through an ANR project: 18-CE20-0005.

2.8. Authors' contributions

CJB, LMB, JMTR and HC designed the experiment. CJB, LMB and JC managed the experiment and collected the data. HC ran the *SurEau* model. CJB, LMB, JMTR, and HC developed the manuscript.

Conclusion et perspectives

Dans un contexte de changement climatique, la mortalité des arbres pose un problème majeur quant à leurs multiples effets bénéfiques sur l'environnement. La plupart des espèces est touchée par cette mortalité peu importe leur climat de croissance. En plus des facteurs biotiques (insectes, plantes invasives...), les arbres peuvent mourir par 2 possibles mécanismes : par manque de carbone suite à la fermeture précoce des stomates entraînant une réduction des échanges gazeux et impactant ainsi la production de composés organiques (ou carbonés) par photosynthèse, ou par le maintien des stomates fonctionnels qui en résulte un maintien d'un apport de carbone favorable à la croissance mais entraînant une transpiration élevée et une déshydratation importante des plantes. Ce projet s'est concentré sur la mortalité des arbres due à un manque d'eau, induisant une sécheresse de l'arbre par rupture de la colonne hydraulique dans les vaisseaux du xylème et donc par défaillance hydraulique.

Grâce aux mesures effectuées sur les arbres en pots placés sur la plateforme de balances à l'été 2019, correspondant au chapitre 3 de cette thèse, nous avons pu valider les modélisations du modèle *SurEau* sur la prédiction du temps de défaillance hydraulique. Nous avons pu effectuer une analyse de sensibilité globale afin de déterminer l'importance des différents traits hydrauliques sur le temps de défaillance hydraulique. Il a été déterminé que les traits principaux ayant un rôle sur le retard d'apparition de la défaillance hydraulique sont la fermeture précoce des stomates (P_{gs88}), la faible transpiration résiduelle (g_{res}), la faible sensibilité du g_{res} à l'augmentation de la température, traduit par un faible Q_{10b} ainsi que la forte résistance à la cavitation (P50). Bien que ne ressortant pas pour toutes les espèces de l'analyse de sensibilité, le T_p , ou température de transition de phase, a montré son importance primordiale pour *Populus nigra* car la valeur de T_p de cette espèce est de 35°C et correspond à la température enregistrée au moment où les plants ont commencé à perdre leurs feuilles. Il est donc nécessaire de prendre en compte le T_p en plus de g_{res} et du Q_{10} ainsi que le P50 et le point de fermeture stomatique dans l'étude du temps de défaillance hydraulique dans les cas de sécheresses à températures élevées. Il serait intéressant d'effectuer un référencement de ces trois traits hydrauliques sur plus d'espèces. A ce jour, il existe un manque de données de ces traits sur les espèces des climats

tempérés ou tropicaux, les études ayant porté jusqu'à présent plutôt sur des espèces désertiques. (Slot et al., 2021) ont montré une absence de corrélation entre la transpiration minimale (g_{min}) et le gradient de pluie dans les régions tropicales ainsi que des différences significatives dans les réponses du g_{min} à la température (T_p) pour ces espèces. Ces mesures de g_{min} ne prennent pas en compte les pertes en eau à travers les tiges herbacées ou ligneuses alors que la conductance de ces organes a été montrée comme déterminante pour certaines espèces dans les risques de mortalité due à la sécheresse (Wolfe, 2020). Une autre question peut également être posée : le g_{res} est-il un trait fixe dépendant de l'espèce ? il est pertinent de s'intéresser aux différences de conductance résiduelles intra-espèce, à une possible acclimatation des plantes à leur environnement en modulant leur g_{res} . Des traits hydrauliques peuvent s'acclimater chez des plantes cultivées dans un environnement non optimal, tel que le P50 mesuré sur des tiges et présentant une diminution de sa valeur chez des plants de peuplier acclimatés à la sécheresse, cette diminution de P50 retardant le temps de défaillance hydraulique de plus de 200% (Lemaire et al., 2021). Dans cette étude, les différences de conductance résiduelle entre des plants en conditions hydriques optimales et des plants acclimatés à la sécheresse n'étaient pas significatives. Des résultats similaires ont été observés par (Grünhofer et al., 2022) montrant une non modification de g_{res} en fonction de l'environnement de plants de *Populus* × *canescens* cultivées en conditions hydriques contrastées. Il serait cependant pertinent de s'intéresser à d'autres espèces mésophiles et xérophiles afin de déterminer si leurs stratégies d'acclimatation sont équivalentes et si leurs g_{res} peuvent s'acclimater à la sécheresse. Une autre étude préliminaire a également démontré une plasticité du g_{res} au sein d'une même espèce pour des plants de *Populus nigra* et *Pinus pinaster* au sein d'un gradient de températures à travers le continent Européen. Enfin, d'autres résultats préliminaires ont démontré des différences de g_{res} en fonction des saisons. En effet, la conductance cuticulaire mesurée sur des branches d'*Abies alba* au début et en fin d'été sur les mêmes arbres ont montré une diminution par 2 du g_{res} chez les arbres affaiblis et une diminution plus faible mais présente du g_{res} pour les arbres en bonne santé. Ces valeurs de g_{res} , très différentes entre arbres affaiblis et en bonne santé au début de l'été, s'équilibrent à la fin de l'été.

Ces trois traits hydrauliques (g_{res} , T_p et Q_{10}) ont la particularité de pouvoir être calculés à partir

de la même courbe de l'évolution du g_{res} en fonction de la température, le g_{res} étant la mesure faite à température ambiante, le T_p étant le point d'inflexion de la courbe à une certaine température et les Q_{10a} et Q_{10b} les pentes de la courbe avant et après le T_p respectivement. A l'opposé de gres, les paramètres T_p , Q_{10a} et Q_{10b} sont relativement peu documentés dans la littérature. La question s'étant posée : peut-on comparer entre elles les valeurs de conductance résiduelle présentées dans la littérature scientifique alors que les expérimentations ont été réalisées sur différentes structures et organes (cuticules isolées, feuilles ou branches) avec des protocoles différents ? afin d'homogénéiser les conditions des mesures de de la conductance résiduelle, un outil de phénotypage autonome, la DroughtBox, a été développé et validé. Il a été présenté dans le chapitre 1 du manuscrit et a fait l'objet d'une publication d'un article technique dans le journal Plant, Cell & Environment en 2020. La fiabilité de la DroughtBox a été montré pour la stabilité de l'environnement imposé (hygrométrie et température), la rapidité de changement de cet environnement ainsi que la reproductibilité et la sensibilité des mesures des pertes en eau résiduelles sur feuilles ou sur branches dans un environnement stable ou évoluant, permettant également la mesure du T_p et des Q_{10} . L'objectif de cet article technique est de permettre à la communauté scientifique étudiant ces traits hydrauliques de pouvoir disposer d'un outil de type DroughtBox performant et de faible coût. Le DroughtBox est également adaptable aux besoins spécifiques des laboratoires car l'automatisation est simplifiée par un programme informatique sous Python®. La fiabilité des mesures de g_{res} obtenues grâce à la DroughtBox a été démontrée, cependant la technique est destructive car il est nécessaire de couper des rameaux sur la plante et il n'est pas possible de déterminer la cinétique de déshydratation sur plant entier pour prendre en compte la capacité de rétention en eau du sol ni la capacitance du tronc. Cependant, il a été montré l'importance de prendre en compte la conductance résiduelle de l'écorce (g_{bark}) dans les cinétiques de mortalité des arbres. Ce g_{bark} tient compte de l'épaisseur de l'écorce, de sa densité ainsi que de la présence de lenticelles et leur implication à la fois dans l'absorption d' O_2 pour la respiration de la tige et dans les pertes en eau résiduelle, il a aussi été montré l'importance de l'écorce externe dans la barrière hydraulique, réduisant de 6 fois la conductance de vapeur d'eau (Loram-Lourenço et al., 2022). L'importance du g_{bark} est également déterminante dans pour les espèces à feuilles caduques

(Wolfe, 2020), une fois les feuilles tombées, le g_{res} devient g_{bark} et les pertes en eau ne semblent pas diminuer assez pour éviter la défaillance hydraulique, comme observé sur des plants de peuplier au cours de l'expérimentation sur la plateforme de phénotypage (Chapitre 3). C'est pourquoi la DroughtBox est en phase d'amélioration afin de pouvoir mesurer toutes les pertes résiduelles sur plants entiers incluant également les racines et les tiges/tronc afin de déterminer le temps de défaillance hydraulique en n'omettant aucune piste.

Toutes les perspectives précédemment énoncées ont également pour but d'améliorer le modèle *SurEau* grâce aux données des traits hydrauliques pour différents biomes, différentes espèces aux différentes caractéristiques (feuilles caduques ou persistantes, caractéristiques de l'écorce), ajoutant également les traits hydrauliques g_{res} , T_p et Q_{10} mesurés pour des plants entiers mais également en implémentant le modèle avec les variations intra-spécifiques saisonnières de g_{res} pour les espèces étudiées car la modélisation d'une vague de chaleur couplée à une sécheresse en début d'été par rapport à la fin de l'été ne montrera pas la même cinétique de temps de défaillance hydraulique.

La méthode de mesure de g_{res} et T_p ayant été améliorée grâce à la DroughtBox, nous avons par la suite voulu déterminer les composants physiologiques, chimiques et physiques pouvant intervenir dans la détermination de ces deux traits hydrauliques, correspondant au chapitre 2 de cette thèse. La bibliographie sur ce sujet reste pour le moment très limitée bien que quelques pistes aient été avancées comme le rôle des alcanes dans le g_{res} et des triterpénoïdes pentacycliques dans le T_p . Ces résultats ayant été démontrés principalement sur des espèces désertiques subissant de fortes chaleur couplées à des sécheresses, il y avait un manque de données sur des espèces continentales, vivant dans un même milieu. Il est ressorti de notre étude que la cuticule des feuilles était un système complexe et qu'il est difficile d'attribuer un rôle à une seule famille de composés chimiques pour chaque trait hydraulique. Bien que la méthode d'analyse utilisée ne permet pas d'identifier et de quantifier chaque composé des cires cuticulaires et plus spécifiquement les composés ayant des rôles principaux dans la conductance hydraulique des molécules d'eau à travers la cuticule, il a été déterminé que les mesures de T_p sont plus pertinentes sur feuille entière que sur cuticule isolée, que l'extraction des cires affecte l'organisation des molécules en son sein et compromet la barrière hydrique. Nous avons

également pu observer que les variables morphologiques des feuilles des espèces étudiées, le SLA, la densité stomatique ou la surface occupée par les stomates sur la feuille n'étaient pas des paramètres déterminants pour g_{res} . Enfin, l'idée principale de cette étude, ayant fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, est d'essayer de proposer un consensus sur l'analyse des cires cuticulaires dans la communauté scientifique afin de pouvoir obtenir une base de données comparables entre elles. Une grande campagne d'analyses de la composition des cires cuticulaires en lien avec le g_{res} et T_p avec des protocoles de mesures communs pourrait faire l'objet d'une méta-analyse permettant de mieux comprendre comment les composés chimiques ainsi que l'organisation de ces cires permettent la formation d'une barrière plus ou moins efficace contre les pertes en eau, et ce, en fonction de différentes espèces provenant de différents biomes terrestres.

La compréhension précise de l'hydraulique des arbres dans les conditions de sécheresse couplée à de fortes températures est indispensable afin de mieux prévenir la forte mortalité des arbres. Les différents traits hydrauliques impliqués dans la cinétique de défaillance hydraulique nécessitent des études poussées et ont également fait l'objet de la rédaction d'un article de synthèse du 4^{ème} International Xylem Meeting de 2019 à Padoue, Italie, publié dans le journal *New Phytologist* (Cardoso et al., 2020).

Bibliographie

- Adams HD, Zeppel MJB, Anderegg WRL, Hartmann H, Landhäusser SM, Tissue DT, Huxman TE, Hudson PJ, Franz TE, Allen CD, et al** (2017) A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality. *Nature Ecology & Evolution* **1**: 1285–1291
- Allen CD, Breshears DD, McDowell NG** (2015) On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* **6**: 1–55
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH (Ted), et al** (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259**: 660–684
- Anderegg WRL, Klein T, Bartlett M, Sack L, Pellegrini AFA, Choat B, Jansen S** (2016) Meta-analysis reveals that hydraulic traits explain cross-species patterns of drought-induced tree mortality across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 5024–5029
- Arve L, Torres S, Olsen JE, Tanino KK** (2011) Stomatal responses to drought stress and air humidity. *In Prof. Arun Shanker, ed, IntechAbiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations. InTech*, pp 267–280
- Arya GC, Sarkar S, Manasherova E, Aharoni A, Cohen H** (2021) The Plant Cuticle: An Ancient Guardian Barrier Set Against Long-Standing Rivals. *Frontiers in Plant Science* **12**: 1264
- Aspinwall MJ, Loik ME, Resco de Dios V, Tjoelker MG, Payton PR, Tissue DT** (2015) Utilizing intraspecific variation in phenotypic plasticity to bolster agricultural and forest productivity under climate change. *Plant, Cell & Environment* **38**: 1752–1764
- Bakan B, Marion D** (2017) Assembly of the Cutin Polyester: From Cells to Extracellular Cell Walls. *Plants* 2017, Vol 6, Page 57 **6**: 57
- Bechtold U** (2018) Plant life in extreme environments: How do you improve drought tolerance?

- Bentrup FW** (2017) Water ascent in trees and lianas: the cohesion-tension theory revisited in the wake of Otto Renner. *Protoplasma* **254**: 627–633
- Bi H, Kovalchuk N, Langridge P, Tricker PJ, Lopato S, Borisjuk N** (2017) The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biology* **17**: 1–13
- Billon LM, Blackman CJ, Cochard H, Badel E, Hitmi A, Cartailleur J, Souchal R, Torres-Ruiz JM** (2020) The DroughtBox: A new tool for phenotyping residual branch conductance and its temperature dependence during drought. *Plant, Cell & Environment* 1–11
- Blackman CJ, Brodribb TJ, Jordan GJ** (2012) Leaf hydraulic vulnerability influences species' bioclimatic limits in a diverse group of woody angiosperms. *Oecologia* **168**: 1–10
- Blackman CJ, Creek D, Maier C, Aspinwall MJ, Drake JE, Pfautsch S, O'Grady A, Delzon S, Medlyn BE, Tissue DT, et al** (2019a) Drought response strategies and hydraulic traits contribute to mechanistic understanding of plant dry-down to hydraulic failure. *Tree Physiology* **39**: 910–924
- Blackman CJ, Li X, Choat B, Rymer PD, De Kauwe MG, Duursma RA, Tissue DT, Medlyn BE** (2019b) Desiccation time during drought is highly predictable across species of Eucalyptus from contrasting climates. *New Phytologist* nph.16042
- Blackman CJ, Pfautsch S, Choat B, Delzon S, Gleason SM, Duursma RA** (2016) Toward an index of desiccation time to tree mortality under drought. *Plant Cell and Environment* **39**: 2342–2345
- Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Léger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, et al** (2011) Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 Promotes Wax Very-Long-Chain Alkane Biosynthesis and Influences Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology* **156**: 29–45
- Brendel O, Cochard H** (2011) How Plant Species Cope with Water Stress. *In* Y Birot, C Gracia, M Palahí, eds, *What Science Can Tell Us - Water for Forests and People in the Mediterranean Region - A Challenging Balance*. pp 76–80

- Britton TG, Brodrribb TJ, Richards SA, Ridley C, Hovenden MJ** (2022) Canopy damage during a natural drought depends on species identity, physiology and stand composition. *New Phytologist* **233**: 2058–2070
- Brodrribb T, Hill RS** (1999) The importance of xylem constraints in the distribution of conifer species. *New Phytologist* **143**: 365–372
- Brodrribb TJ** (2017) Progressing from ‘functional’ to mechanistic traits. *New Phytologist* **215**: 9–11
- Brodrribb TJ, McAdam SAM, Jordan GJ, Martins SCV** (2014) Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 14489–14493
- Brodrribb TJ, Powers J, Cochard H, Choat B** (2020) Hanging by a thread? Forests and drought. *Science* **368**: 261–266
- Buckley TN** (2019) How do stomata respond to water status? *New Phytologist* **224**: 21–36
- Bueno A, Alfarhan A, Arand K, Burghardt M, Deininger AC, Hedrich R, Leide J, Seufert P, Staiger S, Riederer M** (2019a) Effects of temperature on the cuticular transpiration barrier of two desert plants with water-spender and water-saver strategies. *Journal of Experimental Botany* **70**: 1613–1625
- Bueno A, Alfarhan A, Arand K, Burghardt M, Deininger A-C, Hedrich R, Leide J, Seufert P, Staiger S, Riederer M** (2019b) Temperature effects on the cuticular transpiration barrier of two desert plants with water-spender and water-saver life strategies. *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/erz018
- Bueno A, Sancho-Knapik D, Gil-Pelegrín E, Leide J, Peguero-Pina JJ, Burghardt M, Riederer M** (2019c) Cuticular wax coverage and its transpiration barrier properties in *Quercus coccifera* L. leaves: does the environment matter? *Tree Physiology* 827–840
- Burghardt M, Riederer M** (2003) Ecophysiological relevance of cuticular transpiration of deciduous and evergreen plants in relation to stomatal closure and leaf water potential. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1941–1949
- Burghardt M, Riederer M** (2006) Cuticular transpiration. *In* M Riederer, C Müller, eds, *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell, pp 292–311

- Cardoso AA, Billon LM, Fanton Borges A, Fernández-de-Uña L, Gersony JT, Güney A, Johnson KM, Lemaire C, Mrad A, Wagner Y, et al** (2020) New developments in understanding plant water transport under drought stress. *The New phytologist* **227**: 1025–1027
- Chapotin SM, Razanameharizaka JH, Holbrook NM** (2006) Baobab trees (*Adansonia*) in Madagascar use stored water to flush new leaves but not to support stomatal opening before the rainy season. *New Phytologist* **169**: 549–559
- Chen M, Zhang Y, Kong X, Du Z, Zhou H, Yu Z, Qin J, Chen C** (2021) Leaf Cuticular Transpiration Barrier Organization in Tea Tree Under Normal Growth Conditions. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2021.655799
- Chitra-Tarak R, Xu C, Aguilar S, Anderson-Teixeira KJ, Chambers J, Detto M, Faybishenko B, Fisher RA, Knox RG, Koven CD, et al** (2021) Hydraulically-vulnerable trees survive on deep-water access during droughts in a tropical forest. *New Phytologist* **231**: 1798–1813
- Choat B, Brodribb TJ, Brodersen CR, Duursma RA, López R, Medlyn BE** (2018) Triggers of tree mortality under drought. *Nature* 2018 558:7711 **558**: 531–539
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, et al** (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**: 752–755
- Cochard H** (2014) The basics of plant hydraulics. *Journal of Plant Hydraulics* **1**: 001
- Cochard H** (2019) A new mechanism for tree mortality due to drought and heatwaves. *bioRxiv*. doi: 10.1101/531632
- Cochard H** (2006) Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique* **7**: 1018–1026
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T** (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**: 410–418
- Cochard H, Delzon S, Badel E** (2015) X-ray microtomography (micro-CT): a reference technology for high-resolution quantification of xylem embolism. *Plant Cell and Environment* 201–206

- Cochard H, Pimont F, Ruffault J, Martin-StPaul N** (2021) SurEau: a mechanistic model of plant water relations under extreme drought. *Annals of Forest Science* **78**: 1–23
- Creek D, Lamarque LJ, Torres-ruiz JM, Parise C, Burlett R, David T** (2020) Xylem embolism in leaves does not occur with open stomata : evidence from direct observations using the optical visualization technique. *Journal of Biological Chemistry* **71**: 1151–1159
- Cruziat P, Améglio T, Cochard H** (2001) La cavitation : Un mécanisme perturbant la circulation de l'eau chez les végétaux. *Mécanique et Industries* **2**: 289–298
- Cui YN, Li XT, Yuan JZ, Wang FZ, Guo H, Xia ZR, Wang SM, Ma Q** (2020) Chloride is beneficial for growth of the xerophyte *Pugionium cornutum* by enhancing osmotic adjustment capacity under salt and drought stresses. *Journal of Experimental Botany* **71**: 4215–4231
- Darwin F** (1898) Observations on Stomata.
- Delzon S, Cochard H** (2014) Recent advances in tree hydraulics highlight the ecological significance of the hydraulic safety margin. *New Phytologist* **203**: 355–358
- Devitt JK, Chung A, Schenk JJ** (2022) Inferring the genetic responses to acute drought stress across an ecological gradient. *BMC Genomics* **23**: 1–23
- Dietrich L, Hoch G, Kahmen A, Körner C** (2018) Losing half the conductive area hardly impacts the water status of mature trees. *Scientific Reports* 2018 8:1 **8**: 1–9
- Dixon H, Joly J** (1895) On the ascent of sap. *The Royal Society* **186**: 563–576
- Dlugokencky E, Trans P** (2021) Trends in Atmospheric Carbon Dioxide, Methane and Nitrous Oxide.
- Dogniaux M** (2021) Suivi de la concentration atmosphérique de CO₂ par satellite : performances et sensibilités des prochains concepts d'observation dans le proche infrarouge. <http://www.theses.fr>
- Duca M** (2015) Plant Physiology.
- Dufresne JL** (2021) GIEC et sensibilité climatique : on fait le bilan (radiatif) – Institut Pierre-Simon Laplace. <https://www.ipsl.fr/article/giec-et-sensibilite-climatique-on-fait-le-bilan-radiatif/>
- Duursma RA, Blackman CJ, Lopéz R, Martin-StPaul NK, Cochard H, Medlyn BE** (2019)

On the minimum leaf conductance: its role in models of plant water use, and ecological and environmental controls. *New Phytologist* **221**: 693–705

Fensham RJ, Fairfax RJ (2007) Drought-related tree death of savanna eucalypts: Species susceptibility, soil conditions and root architecture. *Journal of Vegetation Science* **18**: 71–80

Fernández V, Bahamonde HA, Peguero-Pina JJ, Gil-Pelegrín E, Sancho-Knapik D, Gil L, Goldbach HE, Eichert T (2017) Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *Journal of Experimental Botany* **68**: 5293–5306

Fichot R, Brignolas F, Cochard H, Ceulemans R (2015) Vulnerability to drought-induced cavitation in poplars: Synthesis and future opportunities. *Plant, Cell and Environment* **38**: 1233–1251

Gleason SM, Blackman CJ, Cook AM, Laws CA, Westoby M (2014) Whole-plant capacitance, embolism resistance and slow transpiration rates all contribute to longer desiccation times in woody angiosperms from arid and wet habitats. *Tree Physiology* **34**: 275–284

Grünhofer P, Herzig L, Sent S, Valeska Zeisler-Diehl V, Schreiber L (2022) Increased cuticular wax deposition does not change residual foliar transpiration. *Plant, Cell & Environment* 1157–1171

Hammond WM, Williams AP, Abatzoglou JT, Adams HD, Klein T, López R, Sáenz-Romero C, Hartmann H, Breshears DD, Allen CD (2022) Global field observations of tree die-off reveal hotter-drought fingerprint for Earth's forests. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**: 1–11

Hochberg U, Rockwell FE, Holbrook NM, Cochard H (2018) Iso/Anisohydry: A Plant–Environment Interaction Rather Than a Simple Hydraulic Trait. *Trends in Plant Science* **23**: 112–120

Hölttä T, Mencuccini M, Nikinmaa E (2011) A carbon cost–gain model explains the observed patterns of xylem safety and efficiency. *Plant, Cell & Environment* **34**: 1819–1834

van den Honert TH (1948) Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Society* **3**: 146

- Hopkins WG, Hüner NPA** (2009) Introduction to Plant Physiology, Fourth Edi.
- Huang H, Jiang Y** (2019) Chemical Composition of the Cuticle Membrane of Pitaya Fruits (*Hylocereus Polyrhizus*). *Agriculture* 2019, Vol 9, Page 250 **9**: 250
- Hygen G** (1951) Studies in Plant Transpiration I. *Physiologia plantarum* **4**:
- Jeffree CE** (2007) The Fine Structure of the Plant Cuticle. *Annual Plant Reviews*. pp 11–125
- Jenks MA, Ashworth EN** (1999) Plant Epicuticular Waxes: Function, Production, and Genetics. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK, pp 1–68
- Jentsch A, Kreyling J, Beierkuhnlein C** (2007) A new generation of climate-change experiments: events, not trends. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**: 365–374
- Jetter R, Kunst L, Samuels AL** (2007) Composition of Plant Cuticular Waxes. *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 145–181
- Jetter R, Riederer M** (2016) Localization of the Transpiration Barrier in the Epi- and Intracuticular Waxes of Eight Plant Species: Water Transport Resistances Are Associated with Fatty Acyl Rather Than Alicyclic Components. *Plant Physiology* **170**: 921–934
- De Kauwe MG, Medlyn BE, Ukkola AM, Mu M, Sabot MEB, Pitman AJ, Meir P, Cernusak LA, Rifai SW, Choat B, et al** (2020) Identifying areas at risk of drought-induced tree mortality across South-Eastern Australia. *Global Change Biology* **26**: 5716–5733
- Kerstiens G** (2006) Water transport in plant cuticles: An update. *Journal of Experimental Botany*. pp 2493–2499
- Kerstiens G** (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1813–1832
- Klein T, Torres-Ruiz JM, Albers JJ** (2022) Conifer desiccation in the 2021 NW heatwave confirms the role of hydraulic damage. *Tree Physiology* **42**: 722–726
- Koch K, Ensikat HJ** (2008) The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* **39**: 759–772
- Koçillari L, Olson ME, Suweis S, Rocha RP, Lovison A, Cardin F, Dawson TE, Echeverría A, Fajardo A, Lechthaler S, et al** (2021) The Widened Pipe Model of plant hydraulic

- evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**: e2100314118
- Lamarque LJ, Delzon S, Toups H, Gravel AI, Corso D, Badel E, Burlett R, Charrier G, Cochard H, Jansen S, et al** (2020) Over-accumulation of abscisic acid in transgenic tomato plants increases the risk of hydraulic failure. *Plant Cell and Environment* **43**: 548–562
- Lamy JB, Delzon S, Bouche PS, Alia R, Vendramin GG, Cochard H, Plomion C** (2014) Limited genetic variability and phenotypic plasticity detected for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytologist* **201**: 874–886
- Larter M, Brodribb TJ, Pfautsch S, Burlett R, Cochard H, Delzon S** (2015) Extreme aridity pushes trees to their physical limits. *Plant Physiology* **168**: 804–807
- Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, Riederer M, Vogg G** (2007) The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: Effects of a deficiency in a β -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiology* **144**: 1667–1679
- Leide J, Hildebrandt U, Vogg G, Riederer M** (2011) The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *Journal of Plant Physiology* **168**: 871–877
- Lemaire C, Blackman CJ, Cochard H, Menezes-Silva PE, Torres-Ruiz JM, Herbette S** (2021) Acclimation of hydraulic and morphological traits to water deficit delays hydraulic failure during simulated drought in poplar. *Tree physiology* **41**: 2008–2021
- Lens F, Picon-Cochard C, Delmas CEL, Signarbieux C, Buttler A, Cochard H, Jansen S, Chauvin T, Doria LC, Del Arco M, et al** (2016) Herbaceous Angiosperms Are Not More Vulnerable to Drought-Induced Embolism Than Angiosperm Trees. *Plant Physiology* **172**: 661–667
- Levionnois S, Ziegler C, Jansen S, Calvet E, Coste S, Stahl C, Salmon C, Delzon S, Guichard C, Heuret P** (2020) Vulnerability and hydraulic segmentations at the stem–leaf transition: coordination across Neotropical trees. *New Phytologist* **228**: 512–524
- Li S, Lens F, Espino S, Karimi Z, Klepsch M, Schenk HJ, Schmitt M, Schuldt B, Jansen**

- S (2016) Intervessel pit membrane thickness as a key determinant of embolism resistance in angiosperm xylem. *IAWA Journal* **37**: 152–171
- Lobo A, Torres-Ruiz JM, Burlett R, Lemaire C, Parise C, Francioni C, Truffaut L, Tomášková I, Hansen JK, Kjær ED, et al** (2018) Assessing inter- and intraspecific variability of xylem vulnerability to embolism in oaks. *Forest Ecology and Management* **424**: 53–61
- López R, Cano FJ, Choat B, Cochard H, Gil L** (2016) Plasticity in vulnerability to cavitation of *pinus canariensis* occurs only at the driest end of an aridity gradient. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–10
- López R, Cano FJ, Martin-StPaul NK, Cochard H, Choat B** (2021) Coordination of stem and leaf traits define different strategies to regulate water loss and tolerance ranges to aridity. *New Phytologist* **230**: 497–509
- Loram-Lourenço L, Farnese FS, Alves RDFB, Dario BMM, Martins AC, Aun MA, Batista PF, Silva FG, Cochard H, Franco AC, et al** (2022) Variations in bark structural properties affect both water loss and carbon economics in neotropical savanna trees in the Cerrado region of Brazil. *Journal of Ecology* **110**: 1826–1843
- Machado R, Loram-Lourenço L, Farnese FS, Alves RDFB, de Sousa LF, Silva FG, Filho SCV, Torres-Ruiz JM, Cochard H, Menezes-Silva PE** (2021) Where do leaf water leaks come from? Trade-offs underlying the variability in minimum conductance across tropical savanna species with contrasting growth strategies. *New Phytologist* **229**: 1415–1430
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB** (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**: 2184–2199
- Mantova M, Herbette S, Cochard H, Torres-Ruiz JM** (2022) Hydraulic failure and tree mortality: from correlation to causation. *Trends in Plant Science* **27**: 335–345
- Martinson R, Lambrinos J, Mata-González R** (2019) Water Stress Patterns of Xerophytic Plants in an Urban Landscape. *HortScience* **54**: 818–823
- Martin-StPaul N, Delzon S, Cochard H** (2017) Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology Letters* **20**: 1437–1447
- Mathez EA, Smerdon J** (2009) Climate change: the science of global warming and our energy

future. *Choice Reviews Online*. doi: 10.5860/choice.47-0290

- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West AG, Williams DG, et al** (2008) Mechanisms of Plant Survival and Mortality during Drought: Why Do Some Plants Survive while Others Succumb to Drought? Published by: Wiley on behalf of the New Phytologist Trust Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/30149305> REFERENCES Linked refere. *Tansley review* **178**: 719–739
- McDowell NG, Allen CD** (2015) Darcy's law predicts widespread forest mortality under climate warming. *Nature Climate Change* **5**: 669–672
- McDowell NG, Sapes G, Pivovarov A, Adams HD, Allen CD, Anderegg WRL, Arend M, Breshears DD, Brodribb T, Choat B, et al** (2022) Mechanisms of woody-plant mortality under rising drought, CO₂ and vapour pressure deficit. *Nature Reviews Earth and Environment* **3**: 294–308
- Meinzer FC, Johnson DM, Lachenbruch B, McCulloh KA, Woodruff DR** (2009) Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology* **23**: 922–930
- Mencuccini M, Bonosi L** (2001) Leaf/sapwood area ratios in Scots pine show acclimation across Europe. <https://doi.org/10.1139/x00-173> **31**: 442–456
- Mencuccini M, Manzoni S, Christoffersen B** (2019) Modelling water fluxes in plants: from tissues to biosphere. *New Phytologist* **222**: 1207–1222
- Méndez-Alonzo R, Paz H, Zuluaga RC, Rosell JA, Olson ME** (2012) Coordinated evolution of leaf and stem economics in tropical dry forest trees. *Ecology* **93**: 2397–2406
- Nardini A, Casolo V, Dal Borgo A, Savi T, Stenni B, Bertoincin P, Zini L, McDowell NG** (2016) Rooting depth, water relations and non-structural carbohydrate dynamics in three woody angiosperms differentially affected by an extreme summer drought. *Plant, Cell & Environment* **39**: 618–627
- Naylor D, Coleman-Derr D** (2018) Drought stress and root-associated bacterial communities. *Frontiers in Plant Science* **8**: 2223
- Nolan RH, Gauthey A, Losso A, Medlyn BE, Smith R, Chhajed SS, Fuller K, Song M, Li**

- X, Beaumont LJ, et al** (2021) Hydraulic failure and tree size linked with canopy die-back in eucalypt forest during extreme drought. *New Phytologist* **230**: 1354–1365
- Oliveira AFM, Salatino A** (2000) Major constituents of the foliar epicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **55**: 688–692
- Pallardy SG** (2008) *Physiology of Woody Plants* 3rd Ed., Third. Academic Press Inc.
- Pickard WF** (1981) The ascent of sap in plants. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **37**: 181–229
- Pineda-García F, Paz H, Meinzer FC** (2013) Drought resistance in early and late secondary successional species from a tropical dry forest: the interplay between xylem resistance to embolism, sapwood water storage and leaf shedding. *Plant, Cell & Environment* **36**: 405–418
- Pivovarov AL, Cook VMW, Santiago LS** (2018) Stomatal behaviour and stem xylem traits are coordinated for woody plant species under exceptional drought conditions. *Plant Cell and Environment* **41**: 2617–2626
- Pivovarov AL, McDowell NG, Rodrigues TB, Brodribb T, Cernusak LA, Choat B, Grossiord C, Ishida Y, Jardine KJ, Laurance S, et al** (2021) Stability of tropical forest tree carbon-water relations in a rainfall exclusion treatment through shifts in effective water uptake depth. *Global Change Biology* **27**: 6454–6466
- Pivovarov AL, Pasquini SC, De Guzman ME, Alstad KP, Stemke JS, Santiago LS** (2016) Multiple strategies for drought survival among woody plant species. *Functional Ecology* **30**: 517–526
- Ratzmann G, Meinzer FC, Tietjen B** (2019) Iso/Anisohydry: Still a Useful Concept. *Trends in Plant Science* **24**: 191–194
- Ribeiro DR, Silva JLA, do Nascimento MT, Vitória AP** (2021) Leaf habits and their relationship with leaf and wood traits in tropical dry forests. *Trees* 2021 36:1 **36**: 7–24
- Riederer M** (2006) Thermodynamics of the water permeability of plant cuticles: Characterization of the polar pathway. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2937–2942
- Riederer M, Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier

- properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2023–2032
- Ripullone F, Camarero JJ, Colangelo M, Voltas J** (2020) Variation in the access to deep soil water pools explains tree-to-tree differences in drought-triggered dieback of Mediterranean oaks. *Tree Physiology* **40**: 591–604
- Roberts DC, Mintenbeck K, Wegener A, Ayanlade S** (2022) Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of working group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC. doi: 10.1017/9781009325844
- Ruffault J, Pimont F, Cochard H, Dupuy J-L, Martin-StPaul N** (2022) SurEau-Ecos v2.0: a trait-based plant hydraulics model for simulations of plant water status and drought-induced mortality at the ecosystem level. *Geoscientific Model Development* **15**: 5593–5626
- Sack L, Holbrook NM** (2006) Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 361–381
- Sánchez FJ, Manzanares M, De Andrés EF, Tenorio JL, Ayerbe L** (2001) Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions. Influence on harvest index and canopy temperature. *European Journal of Agronomy* **15**: 57–70
- Šantrůček J, Šimánová E, Karbalková J, Šimková M, Schreiber L** (2004) A new technique for measurement of water permeability of stomatous cuticular membranes isolated from *Hedera helix* leaves. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1411–1422
- Scholz FG, Phillips NG, Bucci SJ, Meinzer FC, Goldstein G** (2011) Hydraulic Capacitance: Biophysics and Functional Significance of Internal Water Sources in Relation to Tree Size. In DT Meinzer F., Lachenbruch B., ed, *Size- and Age-Related Changes in Tree Structure and Function*. Springer, Dordrecht, pp 341–361
- Schönherr J, Eckl K, Gruler H** (1979) Water permeability of plant cuticles: The effect of temperature on diffusion of water. *Planta* 1979 147:1 **147**: 21–26
- Schreiber L** (2001) Effect of temperature on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1893–1900
- Schuldt B, Knutzen F, Delzon S, Jansen S, Müller-Haubold H, Burlett R, Clough Y,**

- Leuschner C** (2016) How adaptable is the hydraulic system of European beech in the face of climate change-related precipitation reduction? *New Phytologist* **210**: 443–458
- Schuster AC, Burghardt M, Alfarhan A, Bueno A, Hedrich R, Leide J, Thomas J, Riederer M** (2016a) Effectiveness of cuticular transpiration barriers in a desert plant at controlling water loss at high temperatures. *AoB PLANTS*. doi: 10.1093/aobpla/plw027
- Schuster AC, Burghardt M, Alfarhan A, Bueno A, Hedrich R, Leide J, Thomas J, Riederer M** (2016b) Effectiveness of cuticular transpiration barriers in a desert plant at controlling water loss at high temperatures. *AoB PLANTS*. doi: 10.1093/aobpla/plw027
- Schuster AC, Burghardt M, Alfarhan A, Bueno A, Hedrich R, Leide J, Thomas J, Riederer M** (2016c) Effectiveness of cuticular transpiration barriers in a desert plant at controlling water loss at high temperatures. *AoB PLANTS*. doi: 10.1093/aobpla/plw027
- Schuster AC, Burghardt M, Riederer M** (2017) The ecophysiology of leaf cuticular transpiration: are cuticular water permeabilities adapted to ecological conditions? *Journal of experimental botany* **68**: 5271–5279
- Seufert P, Staiger S, Arand K, Bueno A, Burghardt M, Riederer M** (2022) Building a Barrier: The Influence of Different Wax Fractions on the Water Transpiration Barrier of Leaf Cuticles. *Frontiers in Plant Science* **12**: 3170
- Slot M, Nardwattanawong T, Hernández GG, Bueno A, Riederer M, Winter K** (2021) Large differences in leaf cuticle conductance and its temperature response among 24 tropical tree species from across a rainfall gradient. *New Phytologist* **232**: 1618–1631
- Sobol IM** (2001) Global sensitivity indices for nonlinear mathematical models and their Monte Carlo estimates. *Mathematics and Computers in Simulation* **55**: 271–280
- Sperry JS, Alder NN, Eastlack SE** (1993) The effect of reduced hydraulic conductance on stomatal conductance and xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany* **44**: 1075–1082
- Sperry JS, Hacke UG, Pittermann J** (2006) Size and Function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *American Journal of Botany* **93**: 1490–1500
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A** (2014) *Plants Physiology*.
- Teixeira ACT, Garcia AR, Ilharco LM, Gonçalves Da Silva AMPS, Fernandes AC** (2010)

- Phase behaviour of oleanolic acid, pure and mixed with stearic acid: Interactions and crystallinity. *Chemistry and Physics of Lipids* **163**: 655–666
- Teskey R, Wertin T, Bauweraerts I, Ameye M, McGuire MA, Steppe K** (2015) Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. *Plant Cell and Environment* **38**: 1699–1712
- Torres-Ruiz JM, Cochard H, Fonseca E, Badel E, Gazarini L, Vaz M** (2017) Differences in functional and xylem anatomical features allow *Cistus* species to co-occur and cope differently with drought in the Mediterranean region. *Tree Physiology* **37**: 755–766
- Torres-ruiz JM, Cochard H, Mencuccini M, Delzon S, Badel E** Direct observation and modelling of embolism spread between xylem conduits : a case study in Scots pine . doi: 10.1111/pce.12840
- Torres-Ruiz JM, Jansen S, Choat B, McElrone AJ, Cochard H, Brodribb TJ, Badel E, Burlett R, Bouche PS, Brodersen CR, et al** (2015) Direct X-ray microtomography observation confirms the induction of embolism upon xylem cutting under tension. *Plant Physiology* **167**: 40–43
- Torres-Ruiz JM, Kremer A, Carins Murphy MR, Brodribb T, Lamarque LJ, Truffaut L, Bonne F, Ducouso A, Delzon S** (2019) Genetic differentiation in functional traits among European sessile oak populations. *Tree Physiology* **39**: 1736–1749
- Trivedi P, Batista BD, Bazany KE, Singh BK** (2022) Plant–microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytologist* **234**: 1951–1959
- Tyree, MT; Cochard, H; Cruiziat, P; Sinclair, B; Ameglio T** (1993) Drought-induces leaf shedding in walnut: evidence for vulnerability segmentation. *Plant, Cell and Environment* **16**: 879–882
- Tyree MT, Ewers FW** (1991) The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* **119**: 345–360
- Tyree MT, Hammel HT** (1972) The Measurement of the Turgor Pressure and the Water Relations of Plants by the Pressure-bomb Technique. *Journal of Experimental Botany* **23**: 267–282

- Tyree MT, Sperry JS** (1989) Vulnerability Of Xylem To Cavitation And Embolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**: 19–38
- Tyree MT, Yang S** (1990) Water-storage capacity of Thuja, Tsuga and Acer stems measured by dehydration isotherms. Planta **182**: 420–426
- Tyree MT, Zimmermann MH** (2002) Xylem Structure and the Ascent of Sap, Second. Springer Berlin Heidelberg
- Verma AK** (2021) Influence of Climate Change on Balanced Ecosystem, Biodiversity and Sustainable Development: an Overview. International Journal of Biological Innovations **03**: 331–337
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA, Riederer M** (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. Journal of Experimental Botany **55**: 1401–1410
- Waters ER** (2003) Molecular adaptation and the origin of land plants. Molecular Phylogenetics and Evolution **29**: 456–463
- Wolfe BT** (2020) Bark water vapour conductance is associated with drought performance in tropical trees. doi: 10.1098/rsbl.2020.0263
- Wolfe BT** (2017) Retention of stored water enables tropical tree saplings to survive extreme drought conditions. Tree Physiology **37**: 469–480
- Wolfe BT, Sperry JS, Kursar TA** (2016) Does leaf shedding protect stems from cavitation during seasonal droughts? A test of the hydraulic fuse hypothesis. New Phytologist **212**: 1007–1018
- Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S** (2021) Response Mechanism of Plants to Drought Stress. Horticulturae 2021, Vol 7, Page 50 **7**: 50
- Yeats TH, Rose JKC** (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. PLANT PHYSIOLOGY **163**: 5–20

Annexes

New developments in understanding plant water transport under drought stress

Amanda A. Cardoso¹, Lise-Marie Billon², Ana Fanton Borges³, Laura Fernandez-de-Uña⁴, Jess T. Gersony⁵, Aylin Güney^{6,7}, Kate M. Johnson⁸, Cédric Lemaire², Assaad Mrad⁹, Yael Wagner¹⁰ and Gaii Petit^{11*}

¹Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA;

²Université Clermont Auvergne, INRAE, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France;

³Yale School of Forestry and Environmental Studies, Yale University, 195 Prospect Street, New Haven, CT 06511, USA;

⁴Université de Lorraine, AgroParisTech, INRA, UMR Silva, 54000 Nancy, France;

⁵Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA;

⁶Institute of Botany, University of Hohenheim, Garbenstr. 30, D-70599 Stuttgart, Germany;

⁷Department of Biology, Faculty of Science, Akdeniz University, 07058 Antalya, Turkey;

⁸Biological Sciences, School of Natural Sciences, University of Tasmania, Hobart, TAS, Australia;

⁹Nicholas School of the Environment, Duke University, Durham, NC 27708, USA;

¹⁰Department of Plant & Environmental Sciences, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel;

¹¹Department TeSAF, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy

(*Author for correspondence: tel +39 827 2689; email gaii.petit@unipd.it)

New Phytologist, 2020

Fourth Xylem International Meeting, Padua, Italy, 25–27 September 2019

The Fourth Xylem International Meeting (XIM4) brought together over 100 plant scientists to discuss a wide range of topics related to embolism resistance and efficiency of long-distance water transport through plants, and their implications for cultivated and natural systems. The diversity of methods, plant species, and physiological processes discussed in the context of water stress at the meeting highlighted a need to integrate spatial and temporal data about plant functioning, specifically in regard to climate-change related challenges.

A more holistic view of the plant water transport

Structural traits, such as pit characteristics and conduit diameter, have been traditionally associated with xylem safety and efficiency. Furthering our understanding of these relationships,

it was shown that the hydration of pit membranes, their chemical composition, and three-dimensional structure play a key role in the resistance to air-seeding and embolism spread (J. Werner, Ulm University, Germany; Zhang et al., 2020). Resolving conduit network characteristics, such as conduit grouping and intra-organ anatomical trait correlations like those between pit membrane porosity and conduit diameter, was also shown to be important in upscaling xylem anatomy to drought-induced embolism resistance (Mrad et al., 2018). Though conduit diameter remains the easiest anatomical trait to measure, the lack of more comprehensive knowledge on the inter and intraspecific scaling of conduit size and pit traits prevents a more robust understanding of the link between conduit diameter and drought-induced (F. Lens, Leiden University, the Netherlands) or freeze-induced embolism resistance (A. Lintunen, University of Helsinki, Finland). The development of noninvasive techniques (e.g. optical vulnerability and synchrotron-based X-ray microtomography) has enabled the study of hydraulics in soft organs, creating a breakthrough in plant vascular research, as demonstrated by the many studies presenting the application of such methods at XIM4. By using non invasive methods, for instance, a high number of investigations highlighted intraspecific variation in xylem resistance in the stems (C. Lemaire, Université Clermont Auvergne, France; L. Lamarque, University of Bordeaux, France) and leaves (A. Cardoso, Purdue University, West Lafayette, IN, USA; Hochberg et al., 2017) of woody species, both in time (seasonally) and in space (on different locations of the plant). Large intraspecific variation in xylem resistance has also been shown to result in heterogeneous mortality across the canopy in a tree species exposed to drought, with considerable impacts on plant photosynthesis even after rehydration (Cardoso et al., 2020a). On the contrary, little intraspecific plasticity of functional and anatomical xylem traits was reported for different species across wide aridity gradients when samples were taken at a fixed distance from the apex (E. Robert, CREAM, Barcelona, Spain). Such contrasting results indicate the need to consider known axial trends of anatomical traits when selecting the site on a branch/stem axis for physiological experiments to avoid potential bias in the interpretation of results (Lechthaler et al., 2019). The use of more rigorous sampling protocols and the new, noninvasive methods will likely lead to further insights into the phenotypic plasticity of xylem's anatomical and functional traits that

plants may develop as a response to future climate changes. A number of XIM4 contributions emphasized that, in order to build a holistic picture of the hydraulic processes controlling plant responses to drought, hydraulics at the extremities of the water transport system (i.e. soil–roots and leaves–atmosphere) must be further investigated. The presence of biochemical barriers at both root–soil and leaf–atmosphere interfaces (suberized cell walls of exo and endodermis in roots and extracellular biopolymers of the leaf cuticle, respectively) likely play a key role in water transport efficiency and safety, as they reduce the free diffusion of water and nutrients (Schreiber, 2010). Moreover, declines in soil hydraulic conductivity and root hydraulic conductance during moderate drought have been shown to be linked to the disconnection between roots and the rhizosphere (Rodriguez-Dominguez & Brodribb, 2020), with consequent limitations to leaf transpiration (A. Carminati, University of Bayreuth, Germany). At the other extremity of the hydraulic path, increasing vapor pressure deficit in the atmosphere is long known to be tightly associated with leaf water losses through stomata (McAdam & Brodribb, 2015) and the leaf cuticle (L-M. Billon, Université Clermont Auvergne, France). A better integration of the hydraulics at the extremities in the modeling of plant–water relations will increase our ability to understand plant behavior in the context of water stress.

Extended frontiers of xylem hydraulics to better understand plant responses to climate change

Hydraulic failure due to xylem embolism is recognized as a major trigger of tree mortality under drought (Choat et al., 2018). Plant species display different mechanisms to avoid air-seeding and subsequent hydraulic failure. Declines in stomatal conductance were shown to preserve leaf and stem xylem from embolism in a herbaceous grass (D. Corso, University of Tasmania, Australia) and in woody angiosperms (Creek et al., 2019), as well as in a pair of lycophyte species (S. McAdam, Purdue University, West Lafayette, IN, USA), suggesting an evolutionary trait coordination across land plants (Cardoso et al., 2020b). Indeed, a trait-based model showed that the time of plant desiccation was longer with wider differences between the water potential at 50% loss in stem hydraulic conductance and stomatal closure (Blackman et al., 2019). Nevertheless, water loss through the cuticle (g_{min}) was shown to continue well beyond the point of stomatal closure, potentially leading to further increases in xylem tension during

prolonged droughts (Duursma et al., 2018). Owing to the importance of leaf water loss to the whole-plant water status, lowering g_{min} was proposed as an important mechanism preventing the development of excessively low water potentials during drought (L-M. Billon). Additionally, reversible collapse of minor veins in leaves has also been suggested to effectively buffer embolism in major veins in red oak leaves (N. Holbrook, Harvard University, Cambridge, MA, USA; Zhang et al., 2016). It has long been debated whether plants can refill embolized conduits with water, or if embolized conduits are permanently lost. Through the direct observation of embolism via noninvasive methods, refilling under tension has been shown to be an artefact. However, xylem refilling upon rewatering remains uncertain. Lack of refilling upon rewatering in intact plants was found in leaves of a herbaceous grass (Johnson et al., 2018) and stems of two woody species (L. Lamarque, University of Bordeaux, France; R. Rehschuh, Karlsruhe Institute of Technology, Germany), and it has been suggested to occur in silver birch (Y. Salmon, University of Helsinki, Finland). This suggests that xylem refilling upon rewatering may be possible in some species and plant organs but not in others. The formation of new xylem every year plays a key role in plant responses to environmental cues, as a central process in stress acclimation (E. Ziaco, University of Nevada, Reno, USA; G. Battipaglia, University of Campania, Caserta, Italy) and recovery (J. Gričar, Slovenian Forestry Institute, Ljubljana, Slovenia). Growing areas of research on cambial activity and retrospective dendro-anatomy (i.e. the study of time series of wood anatomical traits) are expanding the time resolution of our analyses of xylem physiology, extending our understanding of how intra and interannual environmental variability affects the xylem hydraulic functioning. Alongside hydraulic failure, carbon (C) starvation is an important factor contributing to plant damage during drought, and a combination of these processes has been proposed to result in a cascade of events that ultimately lead to plant mortality (N. G. McDowell, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA, USA). The association between hydraulic failure and C starvation may be due to the role of carbohydrate supply for preventing and repairing xylem embolism, as well as the role of carbohydrates in regrowth following drought relief and osmotic regulation (McDowell et al., 2019). The interplay of C and water dynamics is a novel frontier for plant physiologists, and novel techniques such as Raman

spectroscopy (enabling the measurement of sucrose at the cellular level; J. Gersony, Harvard University, Cambridge, MA, USA) could help us better understand phenomena like drought-induced tree mortality.

Future directions of plant hydraulics

The plant hydraulic community is aware of climate change threats – see the manifesto signed by all conference participants in Cochard et al. (2019). Our ability to predict, and therefore mitigate, the negative effects of climate change in plants from both cultivated and natural systems relies on a deep and comprehensive knowledge of the plant hydraulic system as a whole. A better understanding of plant water relations is also critical for predicting the contribution of forest ecosystems to the global C and water cycles by implementing the information of plant hydraulics into climate models. To achieve this, several gaps in our understanding of basic plant functioning still need to be filled. Whereas most experimental plant hydraulic studies have been performed using potted plants under controlled environments, it is clear from XIM4 that our current understanding would benefit from experiments on plants in their natural environment. Such experiments would allow us to access the whole soil–plant–atmosphere continuum and the interaction between the different components of this continuum during drought. Robust studies in the field are also important in improving our ability to scale-up plant processes from the individual to the ecosystem level. Significant recent progress has been made in developing new technologies to assess drought damage, understanding the traits associated with drought resistance and building a more holistic picture of plant resistance to drought. However, a number of important questions surrounding plant hydraulics have been highlighted at XIM4, such as the role of carbohydrate metabolism in drought physiology, the existence and importance of postdrought refilling, the intraspecific variation in plant hydraulic traits, and the interaction of different components of the soil–plant–atmosphere continuum. New tools and methodologies presented at XIM4 provide us with the opportunity to address some of these critical knowledge gaps to improve our understanding of plant biology with implications for industry and broader society in the face of global climate change.

Acknowledgements

We thank the participants of XIM4 for their scientific contributions to the meeting. Participation of KMJ, JTG, AM, CL and AFB in XIM4 was supported by Federation of European Societies of Plant Biology. Participation of L-MB, YW, AG, AAC and LF-d-U was supported by the New Phytologist Trust.

Author contributions

AAC wrote the report draft based on the contributions of all authors.

References

- Blackman CJ, Li X, Choat B, Rymer PD, De Kauwe MG, Duursma RA, Tissue DT, Medlyn BE.** 2019. Desiccation time during drought is highly predictable across species of Eucalyptus from contrasting climates. *New Phytologist* 224: 632–643.
- Cardoso AA, Batz TA, McAdam SAM.** 2020a. Xylem embolism resistance determines leaf mortality during drought in *Persea americana*. *Plant Physiology* 182: 547–554.
- Cardoso AA, Visel D, Kane CN, Batz TA, Sanchez CG, Kaack L, Lamarque LJ, Wagner Y, King A, Torres-Ruiz JM et al.** 2020b. Drought-induced lacuna formation in the stem causes hydraulic conductance to decline before xylem embolism in *Selaginella*. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.16649.
- Choat B, Brodribb TJ, Brodersen CR, Duursma RA, Lopez R, Medlyn BE.** 2018. Triggers of tree mortality under drought. *Nature* 558: 531–539.
- Cochard H, Petit G, Torres-Ruiz JM, Delzon S.** 2019. The hydraulic community has taken a step forward towards non-invasive measurements. *Journal of Plant Hydraulics* 6: e-002.
- Creek D, Lamarque LJ, Torres-Ruiz JM, Parise C, Burlett R, Tissue DT, Delzon S.** 2019. Xylem embolism in leaves does not occur with open stomata: evidence from direct observations using the optical visualization technique. *Journal of Experimental Botany* 71: 1151–1159.
- Duursma RA, Blackman CJ, Lopez R, Martin-StPaul NK, Cochard H, Medlyn BE.** 2018. On the minimum leaf conductance: its role in models of plant water use, and ecological and environmental controls. *New Phytologist* 221: 693–705.

- Hochberg U, Windt CW, Ponomarenko A, Zhang Y-J, Gersony J, Rockwell FE, Holbrook NM.** 2017. Stomatal closure, basal leaf embolism, and shedding protect the hydraulic integrity of grape stems. *Plant Physiology* 174: 764–775.
- Johnson KM, Jordan GJ, Brodribb TJ.** 2018. Wheat leaves embolized by water stress do not recover function upon rewatering. *Plant, Cell & Environment* 41: 2704–2714.
- Lechthaler S, Turnbull T, Gelmini Y, Pirotti F, Anfodillo T, Adams MA, Petit G.** 2019. A standardization method to disentangle environmental information from axial trends of xylem anatomical traits. *Tree Physiology* 39: 495–502.
- McAdam SAM, Brodribb TJ.** 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiology* 167: 833–843.
- McDowell NG, Brodribb TJ, Nardini A.** 2019. **Hydraulics in the 21st century.** *New Phytologist* 224: 537–542.
- Mrad A, Domec J, Huang C-W, Lens F, Katul G.** 2018. A network model links wood anatomy to xylem tissue hydraulic behaviour and vulnerability to cavitation. *Plant, Cell & Environment* 41: 2718–2730.
- Rodriguez-Dominguez CM, Brodribb TJ.** 2020. Declining root water transport drives stomatal closure in olive under moderate water stress. *New Phytologist* 225: 126–134.
- Schreiber L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* 15: 546–553.
- Zhang Y, Carmesin C, Kaack L, Klepsch MM, Kotowska M, Matei T, Schenk HJ, Weber M, Walther P, Schmidt V et al.** 2020. High porosity with tiny pore constrictions and unbending pathways characterise the 3D structure of intervessel pit membranes in angiosperm xylem. *Plant, Cell & Environment* 43: 116–130.
- Zhang YJ, Rockwell FE, Graham AC, Alexander T, Holbrook NM.** 2016. Reversible leaf xylem collapse: a potential ‘circuit breaker’ against cavitation. *Plant Physiology* 172: 2261–2274. Key words: drought, embolism, functional traits, hydraulic conductance, stomata, xylem.