



**HAL**  
open science

**Effets d'une augmentation de dioxyde de carbone et d'ozone sur les échanges gazeux et la composition minérale des tissus foliaires de *Quercus rubra* (L), *Picea abies* (L.) Karst. et *Fagus sylvatica* (L.) cultivés en chambres à ciel ouvert ; interactions avec des déficits hydriques**

Didier Le Thiec

► **To cite this version:**

Didier Le Thiec. Effets d'une augmentation de dioxyde de carbone et d'ozone sur les échanges gazeux et la composition minérale des tissus foliaires de *Quercus rubra* (L), *Picea abies* (L.) Karst. et *Fagus sylvatica* (L.) cultivés en chambres à ciel ouvert ; interactions avec des déficits hydriques. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1994. Français. NNT : 1994NAN10334 . tel-01748610

**HAL Id: tel-01748610**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748610v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré de Nancy I

*Ecole doctorale : Biologie et Santé*  
*U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques*

EFFETS D'UNE AUGMENTATION DE DIOXYDE DE CARBONE ET D'OZONE SUR  
LES ECHANGES GAZEUX ET LA COMPOSITION MINERALE DES TISSUS FOLIAIRES DE  
*QUERCUS RUBRA* (L.), *PICEA ABIES* (L.) KARST. ET *FAGUS SYLVATICA* (L.)  
CULTIVES EN CHAMBRES A CIEL OUVERT; INTERACTIONS AVEC DES DEFICITS HYDRIQUES.

présentée par Didier LE THIEC

Thèse sur publications  
Spécialité : Biologie Forestière

Soutenue publiquement le 12 décembre 1994 devant la commission d'examen

Jury : MM.	P. Dizengremel	<i>Université de Nancy I</i>	Président
	D. Laffray	<i>Université de Paris XII</i>	Rapporteur
	P.M. Badot	<i>Université de Franche - Comté</i>	Rapporteur
	M. Mousseau	<i>Université de Paris XI - CNRS</i>	Examineur
	J.P. Garrec	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>	Examineur

Université Henri Poincaré, Nancy I  
Faculté des Sciences  
Domaine Scientifique Victor Grignard  
BP 239  
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cédex

INRA  
Centre de Recherches Forestières de Nancy  
Unité Ecophysiologie Forestière  
Equipe Pollution Atmosphérique  
54280 Champenoux

*A mes parents*

*A Viviane*

## REMERCIEMENTS

*Je voudrais dans un premier temps exprimer mes remerciements aux membres du jury,*

*à Monsieur DIZENGRÈMÈL, Professeur à la Faculté des Sciences de Nancy qui m'a enseigné la physiologie végétale et qui m'a fait l'honneur de bien vouloir présider ce jury,*

*à Monsieur LAFFRAY, Professeur à l'Université de Paris Val-de-Marne, pour sa grande disponibilité à corriger certaines publications de ce rapport et pour avoir accepté avec sympathie et amitié d'examiner ce travail et d'en être rapporteur,*

*à Monsieur BADOT, Professeur à l'Institut des Sciences et des Techniques de l'Environnement de Montbéliard, pour avoir accepté également de juger ces travaux et d'en être rapporteur,*

*à Madame MOUSSEAU, Professeur à l'Université de Paris XI, qui a bien voulu examiner ce travail et faire part de ses remarques,*

*à Monsieur GARREC, Directeur de Recherches à l'INRA, qui m'a accueilli dans son laboratoire.*

*Je tiens également à exprimer ma très grande reconnaissance à Martin DIXON, pour son amitié, pour son aide efficace au cours des longues heures passées ensemble au Col du Donon et à Sainte-Marguerite.*

*Tous mes remerciements à François Willm pour sa formation et son aide lors des mesures des échanges gazeux.*

*Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes du laboratoire de pollution atmosphérique: Gilles, Laurence, Linda, Lu ainsi que Gilbert Aussenac, Jean-Marie Berger, Maurice Bonneau, Claude Bréchet, André Clément, Jean Dexheimer, Matthew Dixon, Erwin Dreyer, Michel Dumas, Lorette Estève, Gilbert Fiegel, Joelle Gérard, André Granier, Patrick Gross, Jean-Marc Guehl, Guy Landmann, Yves Lefevre, Pascal Loosveldt, Dave Parker, Hervé Perrin, Suzie Ridler, Ben Simperingham, Kevin Staines, Geneviève Villemin, les bûcherons : Pascal, Thierry et Serge.*

## Table des matières

Introduction .....	1
<b>I. Niveaux d'approche et techniques d'études .....</b>	<b>7</b>
1. Sites expérimentaux, dispositifs et matériel végétal .....	7
a) Sites expérimentaux .....	7
b) Origine du matériel végétal .....	8
c) Choix du système d'exposition.....	8
d) Exposition des arbres à l'ozone, au CO <sub>2</sub> et au déficit hydrique .....	9
2. Données climatiques .....	10
3. Mesures de l'état hydrique des arbres .....	10
4. Echanges gazeux et teneurs en chlorophylle .....	12
a) Etude des surface foliaires .....	12
b) Teneur en chlorophylle .....	13
c) Mesures de l'assimilation nette de CO <sub>2</sub> et conductance stomatique .....	14
d) Concentration intercellulaire de CO <sub>2</sub> (Ci) .....	15
e) Efficience de l'utilisation de l'eau .....	16
5. Concentration en éléments minéraux .....	16
<b>II. Effets de l'ozone et de la sécheresse - Interactions .....</b>	<b>18</b>
1. Effets de l'ozone.....	18
a) Echanges gazeux foliaires .....	18
b) Teneurs minérales .....	21
2. Effets de la sécheresse .....	22
a) Echanges gazeux foliaires .....	22
b) Teneurs minérales .....	23
3. Interactions ozone - sécheresse .....	24
a) Les épicéas .....	24
b) Le hêtre .....	25
<b>III. Effet d'une augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique - Interaction avec une sécheresse .....</b>	<b>27</b>
1. Echanges gazeux foliaires.....	27
2. Teneurs minérales .....	30
<b>IV. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>31</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>34</b>
<b>Liste des documents fournis en annexe .....</b>	<b>47</b>

## Liste des figures et tableaux

- Figure 1 :** Représentation schématique du dispositif expérimental installé au Col du Donon indiquant l'emplacement des différents traitements ozone, sécheresse ainsi que la répartition des capteurs des différents paramètres microclimatiques..... 7-8
- Figure 2 :** Evolution des teneurs moyennes journalières en ozone au cours du mois de juillet 1993 dans les différents traitements au Col du Donon..... 7-8
- Figure 3 :** Représentation schématique du dispositif expérimental installé à Ste-Marguerite indiquant l'emplacement des différents traitements CO<sub>2</sub>, ainsi que la répartition des capteurs des différents paramètres microclimatiques. .... 9
- Figure 4 :** Evolution des concentrations moyennes journalières (au cours du mois de juillet 1993) et horaires (02 juillet 1993) en dioxyde de carbone dans les différents traitements à Ste Marguerite. .... 9-10
- Figure 5 :** Evolution des moyennes journalières de l'éclairement, de l'humidité relative et de la température au cours du mois de juillet 1993 au Col du Donon dans les chambres à ciel ouvert avec et sans bâche. .... 9-10
- Figure 6 :** Evolution de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, de la conductance stomatique à la vapeur d'eau et de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les deux clones d'épicéa, pour les aiguilles de l'année (1993) et les aiguilles de un an (1992). Les valeurs représentent la moyenne de mesures faites sur 10 jours en juillet et août 1993 entre 07 et 09 heures GMT (n=20). Les conditions microclimatiques moyennes étaient les suivantes: T°: 17,86 ± 4,84 °C; déficit de pression de vapeur d'eau: 1,2 ± 0,14 kPa; humidité relative dans la chambre de mesure: 56,23 ± 11,67 %; densité de flux de photons photosynthétiquement actif: 885 ± 268 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Les résultats du test d'égalité de Student-Newman et Keuls sont représentés par les lettres (l'ordre alphabétique désigne la décroissance des valeurs et la différence des lettres indique la différence significative des moyennes). .... 17
- Figure 7 :** Evolution de la croissance aérienne chez les deux clones d'épicéa au cours de la saison 1993. Chaque point représente la valeur moyenne de 6 mesures pour les verticilles et de 3 mesures pour la pousse terminale. La barre d'erreur indique l'écart type moyen pour l'ensemble des mesures. .... 18
- Figure 8 :** Evolutions de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, de la conductance stomatique à la vapeur d'eau et de l'efficacité de l'eau chez le hêtre (les valeurs représentent la moyenne de mesures faites sur 10 jours en juillet et août 1993 entre 07 et 09 heures GMT (n=20), ainsi que celles de la cinétique journalière (18 août 1993) de la conductance, de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et des concentrations d'ozone. Les conditions microclimatiques moyennes étaient les suivantes: T°: 17,86 ± 4,84 °C; déficit de pression de vapeur d'eau: 1,2 ± 0,14 kPa; humidité relative dans la chambre de mesure: 56,23 ± 11,67 %; densité de flux de photons photosynthétiquement actif: 885 ± 268 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Les résultats du test d'égalité de Student-Newman et Keuls sont représentés par les lettres (l'ordre alphabétique désigne la décroissance des valeurs et la différence des lettres indique la différence significative des moyennes)..... 20
- Figure 9 :** Evolution du potentiel hydrique de base ( $\Psi_{wp}$ ), de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) de la conductance stomatique ( $g_w$ ) et de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> (A) chez le chêne rouge et l'épicéa sur le dispositif de Ste-Marguerite au cours de la saison 1993. Les valeurs représentent la moyenne de 6 mesures effectuées entre 07 et 09 heures GMT. La densité de flux de photons photosynthétiquement actif: étaient de 956 ± 305 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. .... 27

<b>Figure 10 :</b>	Evolution des courbes de réponses A en fonction de $C_i$ chez le chêne rouge et l'épicéa sur le dispositif de Ste-Marguerite au cours de la saison 1993. Les courbes tracées sont polynomiales ou logarithmiques. Les mesures ont été effectuées entre 07 et 09 heures GMT. ....	28
<b>Tableau 1 :</b>	Description des deux sites d'expérimentation et déroulement de l'expérience. ....	7
<b>Tableau 2 :</b>	Caractéristiques des sondes, chargées de mesurer les paramètres microclimatiques, utilisées sur les deux sites. ....	7
<b>Tableau 3 :</b>	Evolution des teneurs en chlorophylles selon les traitements appliqués au Col du Donon durant la saison de mesure en 1993 (n = 10). Les valeurs des déviations standards sont données entre parenthèses. Les résultats du test d'égalité de Student-Newman et Keuls sont représentés par les lettres (l'ordre alphabétique désigne la décroissance des valeurs et la différence des lettres indique la différence significative des moyennes). Les résultats de l'analyse de la variance sont aussi représentés: - ns : non significatif; * : significatif ( $\alpha \leq 0,05$ ); ** : hautement significatif ( $\alpha \leq 0,01$ ); *** : très hautement significatif ( $\alpha \leq 0,001$ ). ....	19
<b>Tableau 4 :</b>	Résumé des principaux effets de l'ozone et de la sécheresse sur les échanges gazeux et la nutrition minérale chez les deux clones d'épicéa et chez le hêtre (ns = non significatif). ....	25



---

***SYNTHESE***

## Introduction

Les travaux que nous avons effectués s'inscrivent dans le cadre des études du laboratoire sur l'impact de la pollution atmosphérique et des changements globaux de l'atmosphère sur les arbres forestiers.

L'énergie qui nous parvient du soleil donne naissance aux phénomènes climatiques, à l'échauffement, aux déplacements et aux modifications de l'atmosphère, des océans et des glaces, en interaction avec la biosphère.

L'effet de serre est un des principaux phénomènes résultant de l'interaction de la Terre et du rayonnement solaire. Le rayonnement lumineux à courte longueur d'onde qui arrive directement du soleil et dont une part est réfléchi par la haute atmosphère et les nuages, traverse l'atmosphère sans y être absorbé par ses différents gaz. Une partie de ce rayonnement est réfléchi vers l'espace. Une autre plus grande, échauffe la surface terrestre et donc la biosphère. Cette surface terrestre échauffée émet du rayonnement de grande longueur d'onde vers l'espace. Mais cette fois, une partie substantielle de ce rayonnement est absorbé par les molécules de certains gaz de l'atmosphère comme la vapeur d'eau, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et l'ozone (O<sub>3</sub>) troposphérique entre autres.

On constate actuellement dans l'atmosphère une continuelle et concomitante augmentation du CO<sub>2</sub> et de l'ozone. Ces deux gaz participent à l'effet de serre et agissent directement sur la physiologie des arbres. En effet l'ozone est un polluant très phytotoxique tandis que le dioxyde de carbone est le "carburant" pour le processus de photosynthèse.

### *Augmentation de l'ozone troposphérique*

Les végétaux sont exposés de manière durable à la pollution atmosphérique. Initialement les effets toxiques de la pollution atmosphérique sur les plantes se sont manifestés surtout dans les grandes villes et à proximité des centres industriels où des dépérissements forestiers ont été mis en évidence.

Cependant, depuis le début des années 1970, les symptômes de dépérissement observés ont évolué : les dépérissements sont observés loin des centres urbains et industriels; ils se produisent aussi bien sur sols acides que calcaires; ils touchent la plupart des espèces et plus particulièrement les résineux, qu'ils soient âgés ou jeunes.

Ce dépérissement forestier est considéré comme le résultat d'un processus multifactoriel. Il fut interprété en France comme une conséquence de stress hydriques touchant surtout des forêts poussant sur des sols pauvres en éléments minéraux voire carencés; la pollution atmosphérique et l'ozone en particulier, agissant comme un facteur aggravant, sans oublier malgré tout la présence de dépôts acides (Bonneau & Landmann, 1988; Bonneau & Landmann, 1993).

L'ozone est formé de trois atomes d'oxygène. Il est le produit de processus physico-chimiques très complexes. Il est formé de façon continue dans l'atmosphère à partir de l'oxygène, des oxydes d'azote et des hydrocarbures par réactions photochimiques. En raison de ces modes de formation et de destruction, la concentration en ozone varie avec l'altitude. Les mouvements d'air horizontaux et verticaux influencent fortement sa distribution. L'ozone troposphérique (compris dans la partie inférieure de l'atmosphère: 0-15 km d'altitude) est actuellement en forte augmentation.

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, on mesure la concentration atmosphérique en ozone au niveau du sol. Ainsi, il y a un siècle environ, la station de mesure du parc de Monsouris à Paris enregistrait une concentration "naturelle" en ozone de 10 ppb. Actuellement, en Europe de l'Ouest, les concentrations sont 2 à 4 fois supérieures en moyenne durant l'année. La teneur moyenne en ozone dans l'hémisphère Nord croît d'environ 1 à 2 % tous les ans depuis le début du siècle (Logan, 1985; Penkett, 1988). Une simulation permet d'estimer l'évolution à long terme de l'ozone sur la base des données actuelles et de prévoir vers 2050 des teneurs, en été, aux latitudes moyennes de l'hémisphère Nord, comprises entre 100 et 160 ppb, soit 3 à 4 fois les moyennes actuelles (Marenco, 1990).

Dans ce contexte, un important programme de recherches a été entrepris afin de préciser les effets écophysologiques de l'exposition à des concentrations en ozone de deux espèces d'arbres: l'épicéa et le hêtre. Si un certain nombre de résultats est acquis (le plus souvent en conditions contrôlées) sur le comportement vis-à-vis de l'ozone de jeunes semis et jeunes plants, peu d'informations sont disponibles sur des arbres un peu plus âgés ou même adultes (et génétiquement différents) en conditions se rapprochant de celles rencontrées dans la nature.

Ce travail d'écophysologie a pour objectif général de décrire et quantifier les réponses à long terme des arbres à une pollution atmosphérique par l'ozone. Nous avons mené parallèlement une étude de l'impact d'une contrainte hydrique édaphique sur la physiologie des arbres soumis ou non à une fumigation d'ozone. L'effet majeur d'un déficit hydrique consisterait essentiellement en la fermeture des stomates, réduisant ainsi la pénétration de l'ozone dans les tissus foliaires. Néanmoins, la fermeture des stomates visant à diminuer les pertes en eau peut induire un certain nombre de contraintes supplémentaires (comme un manque en carbone pour la plante). L'étude de l'interaction ozone - sécheresse a pour but de rechercher d'éventuelles modifications des réponses des arbres soumis à une fumigation d'ozone (aggravation ou protection) lorsqu'ils se trouvent en condition de contrainte hydrique.

Les travaux présentés ci-après ont été réalisés dans le but d'analyser les mécanismes des perturbations des échanges gazeux (conductance stomatique et assimilation nette de CO<sub>2</sub>) et de la nutrition minérale en situation de stress (ozone seul, sécheresse seule et interaction ozone + sécheresse).

Parallèlement à ces études, un important travail a consisté à décrire la croissance des arbres, phénomène étroitement dépendant de l'environnement atmosphérique par l'intermédiaire des feuilles et de la photosynthèse, mais aussi dépendant de la nutrition minérale. L'approche globale, menée ici, de cette

nutrition minérale, nous a permis de quantifier les conséquences des deux stress. Mais peu d'études ont été réalisées de façon plus fine, c'est à dire à un niveau histologique, pour pouvoir apporter un complément d'information pour une meilleure compréhension des réponses physiologiques des arbres. Aussi, nous avons entrepris une analyse de certains éléments minéraux comme le potassium et le calcium qui interviennent dans des processus fondamentaux tels que le contrôle de l'ouverture stomatique, la photosynthèse.

Les organes les plus concernés par les attaques de l'ozone sont les feuilles. L'ozone pénètre essentiellement par l'ostiole et se retrouve alors en contact avec les parois cellulaires. Ce passage s'accompagne souvent d'une variation de pH due aux réactions des molécules d'eau pariétales avec celles d'ozone (Heath, 1987). A l'intérieur de la cellule, de nombreuses réactions chimiques donnent naissance à des dérivés chimiques extrêmement nocifs pour la cellule comme le radical peroxyde  $\text{HO}_2\cdot$  et l'ion superoxyde  $\text{O}_2^-$  (Heath, 1987). Ces derniers peuvent alors interagir pour former le radical hydroxyl  $\text{HO}\cdot$  qui attaque directement les lipides et les protéines membranaires. Cet ion superoxyde détruirait les doubles liaisons des acides gras insaturés (Heath, 1980) et altérerait les protéines liées du plasmalemme par oxydation des groupements sulfydryles en ponts disulfures (Dominy & Heath, 1985). Tous ces dérivés peuvent agir sur certaines pompes et transporteurs membranaires ce qui entraîne de graves perturbations de la perméabilité membranaire (pouvant influencer le transport de certains ions et donc le fonctionnement normal de certaines enzymes (Heath & Castillo, 1988). Ces perturbations peuvent être limitées s'il existe des mécanismes de protection; ainsi, des antioxydants comme le glutathion, l'ascorbate, l' $\alpha$ -tocophérol et les  $\beta$ -carotènes se retrouvent dans le cytosol, les mitochondries, les chloroplastes. De même les enzymes de protection se retrouvent aux mêmes endroits mais aussi dans les parois, la vacuole, les péroxysomes (Polle & Junkermann, 1994).

Darrall (1989) dresse le bilan des acquis en matière d'effets des polluants sur la photosynthèse, la réponse stomatique, la respiration et la distribution du carbone chez les plantes. Ainsi, selon le cas, cet auteur a constaté une ouverture ou une fermeture voire même aucun effet sur la conductance stomatique. Cependant en général, l'exposition à de fortes concentrations d'ozone entraîne la fermeture des stomates, alors que des concentrations faibles induisent plutôt un léger surcroît d'ouverture des stomates. Les travaux sur le fonctionnement des stomates à des concentrations réalistes d'ozone sont encore trop peu nombreux; le seul résultat vraiment admis actuellement est la fermeture des stomates pour des concentrations supérieures à 200 ppb. Mais Freer-Smith & Taylor (1992) pensent qu'il existe un seuil où l'ozone induirait des phénomènes d'ouverture stomatique. Ce seuil serait inférieur aux concentrations à partir desquelles une diminution de l'activité photosynthétique est enregistrée.

Si les membranes des chloroplastes ont fait l'objet d'études approfondies, c'est qu'elles jouent un rôle très important dans la fixation photosynthétique du  $\text{CO}_2$ . L'ozone semblerait inhiber les deux photosystèmes (I et II) directement (Sugahara, 1984). A l'inverse Heath (1980) montre sur *Chlorella sorokiniana* que les perturbations photosynthétiques seraient dues à la perte d'ions suite à des lésions du plasmalemme.

La plupart des travaux sur la respiration (Dizengremel & Citerne, 1988; Darrall, 1989) font état d'une augmentation de l'activité respiratoire foliaire mais la respiration racinaire, elle, tendrait à diminuer (Hofstra *et al.*, 1981), bien que ce phénomène soit influencé par la répartition des assimilats à l'intérieur de la plante (Cooley & Manning, 1987).

Un des principaux effets observés de la sécheresse est la réduction de la croissance. La sécheresse tendrait aussi à augmenter le rapport de biomasse racines/parties aériennes. Au niveau cellulaire, une déshydratation sévère des tissus peut entraîner une modification de la conformation des protéines, une altération de la structure lamellaire de la bi-couche phospholipidique des membranes, ainsi que l'augmentation de certains solutés au dessus d'un seuil de toxicité (Stewart, 1989).

C'est essentiellement en développant des mécanismes permettant une meilleure rétention de l'eau, une croissance soutenue de l'appareil racinaire que les arbres vont répondre à une diminution de la disponibilité en eau du sol (Ludlow, 1989). Ainsi, les stomates jouent un rôle prépondérant dans les réactions au stress hydrique. Le développement et la croissance des arbres dépendent notamment de l'utilisation et du transport de l'eau, des éléments minéraux et de la fixation du carbone. La capacité d'un arbre à optimiser la fixation du dioxyde de carbone de l'atmosphère tout en minimisant la perte d'eau apparaît comme un processus d'adaptation des espèces à la sécheresse. Ainsi, deux stratégies interviennent:

- la stratégie d'évitement, basée sur la réduction des pertes d'eau par augmentation de la résistance stomatique,
- la stratégie de tolérance par maintien de l'état de turgescence des cellules de garde des stomates malgré les déficits hydriques.

Certains auteurs ont suggéré que le fonctionnement stomatique pouvait être contrôlé par la capacité photosynthétique des feuilles afin d'optimiser le coût en eau pour la fixation du CO<sub>2</sub> (Wong *et al.*, 1979). Les premiers effets de la déshydratation sur l'appareil photosynthétique pourraient être une inhibition réversible de l'activité des enzymes chloroplastiques du fait de l'augmentation passive de certains solutés ou de l'acidification du stroma (Berkowitz & Whalen, 1985) mais ces altérations de l'appareil photosynthétique ne se font que dans les cas extrêmes de sécheresse.

L'ozone et le stress hydrique ont donc une action sur les échanges gazeux des plantes. Lorsque ces deux stress sont associés, il est donc difficile de préciser à l'avance lequel de l'un ou de l'autre a une action prédominante, dans quel sens va aller leur interaction sur les échanges gazeux de la plante et par conséquent, quels impacts auront leurs effets sur d'autres paramètres fondamentaux comme la nutrition minérale et la croissance. Ainsi, un de nos buts était de décrire des modifications à long terme de quelques grands processus physiologiques et non des mécanismes très fins de physiologie.

### *Augmentation du dioxyde de carbone*

Certains gaz, déjà présents dans l'atmosphère à l'état de traces, ont vu leurs concentrations augmenter depuis le début de l'ère industrielle. C'est le cas par exemple du dioxyde de carbone, en raison de la déforestation et de la combustion des combustibles fossiles. Les mesures systématiques du taux de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère ont débuté en 1958. Elles mettent en évidence un accroissement exponentiel des concentrations de CO<sub>2</sub> qui sont passées de 275  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  en 1860 à 315  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  en 1958 puis à 355  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  en 1990, soit un accroissement de 25% en un peu plus d'un siècle (Pearman, 1988). Si rien n'est fait pour enrayer ce processus, ces teneurs doubleront avant la fin du siècle prochain. On estime qu'entre 1860 et 1984 environ 183 milliards de tonnes de carbone ont été émises par les combustions de carbone fossile (ce qui représente une émission d'environ 150 milliards de tonnes de CO<sub>2</sub>). Près de la moitié de ces émissions reste dans l'atmosphère tandis que l'autre est recyclée. Les différents réservoirs impliqués dans ce cycle sont : l'atmosphère, les océans (qui contiennent 60 fois plus de carbone que l'atmosphère) et la biosphère terrestre comprenant les réserves de combustibles fossiles, les sols et la végétation. Les forêts représentent 80% de la biomasse végétale terrestre totale; aussi tout changement au niveau de ce réservoir modifie (perte ou gain) l'ensemble du cycle du carbone du système biomasse-atmosphère (Schneider, 1989).

Les recherches actuelles sont effectuées dans l'hypothèse d'un doublement de la quantité de CO<sub>2</sub> atmosphérique, ce qui correspondrait à l'atmosphère de la seconde moitié du XXI<sup>ème</sup> siècle.

Ainsi, il est important de connaître les réponses de différentes espèces forestières à ces changements atmosphériques et climatiques et éventuellement d'identifier celles qui y seraient les mieux adaptées. De nombreuses études ont été réalisées dans un premier temps sur les plantes C<sub>4</sub> puis les plantes C<sub>3</sub>. De ces travaux, il ressort principalement que l'augmentation de CO<sub>2</sub> a un effet stimulant sur la physiologie et la croissance des arbres poussant dans un milieu sans contrainte.

Dans le contexte des études du laboratoire sur les changements globaux (augmentation des concentrations en CO<sub>2</sub> atmosphérique, augmentation de la température, diminution de la pluviométrie) (Johnsen, 1993), nous avons entrepris de préciser la réponse de deux espèces d'arbres: le chêne rouge d'Amérique et l'épicéa, à une augmentation de CO<sub>2</sub> atmosphérique et de savoir si cette réponse est modifiée en cas de contrainte hydrique, pour les paramètres suivants: croissance aérienne, échanges gazeux foliaires et nutrition minérale.

L'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique a des impacts directs sur les arbres en agissant sur la photosynthèse, la répartition des assimilats et le bilan hydrique, et des impacts indirects dus à des changements climatiques induits.

A court terme, l'élévation de la concentration en CO<sub>2</sub> stimule la photosynthèse pour deux raisons, la première est le fait que plus de molécules de CO<sub>2</sub> sont utilisables pour la carboxylation du ribulose 1-5 bisphosphate; deuxièmement, la compétition entre l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> au niveau de la Rubisco est en faveur du

CO<sub>2</sub>. Mais cette stimulation de la photosynthèse dépend de l'activité de différents processus comme la carboxylation du ribulose 1-5 bisphosphate par la Rubisco, la régénération de ce ribulose 1-5 bisphosphate, la fourniture en phosphate inorganique (Stitt, 1991).

Ces réponses de la photosynthèse peuvent être modifiées à long terme et dépendent étroitement de la translocation du carbone dans les différents organes "puits" (Ammerlaan & de Visser, 1993).

Les résultats obtenus sur des arbres exposés à un taux élevé en CO<sub>2</sub> atmosphérique ont mis en évidence d'autres réponses qui se retrouvent fréquemment chez les plantes C<sub>3</sub> (Eamus & Jarvis, 1989; Jarvis, 1989; Stitt, 1991; Mousseau & Saugier, 1992; Ceulemans & Mousseau, 1994) à savoir :

- augmentation de l'accroissement total en biomasse,
- augmentation du poids sec par unité de surface foliaire,
- augmentation du rapport biomasse souterraine/biomasse aérienne par suite d'une augmentation de la masse des racines fines,
- diminution de la conductance stomatique,
- augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'eau,
- diminution des concentrations en éléments minéraux.

*Remarque: Nos études ont été effectuées après un an de fumigation à l'ozone et au CO<sub>2</sub> et continueront en 1994 (la biomasse sera finalement obtenue à la fin de cette année).*

Nota : dans la suite du texte, les renvois aux figures et tableaux des annexes sont indiqués en italique.
---

## I. Niveaux d'approche et techniques d'études

L'étude de l'influence à long terme des nouveaux climats de pollution sur les écosystèmes forestiers nécessite des dispositifs se trouvant en conditions naturelles ou les plus proches de celles-ci.

Dans ce premier chapitre, les sites choisis pour l'implantation des dispositifs et les techniques mises en oeuvre pour la réalisation des études seront présentés avec les discussions sur ces choix. Les principales caractéristiques du matériel végétal sélectionné sont décrites. Les différents paramètres physiologiques (état hydrique des arbres, échanges gazeux, teneurs en chlorophylles, concentrations en éléments minéraux) et leurs principes d'analyse sont décrits dans le but de mettre en évidence les effets sur les arbres de diverses contraintes.

Les différents protocoles de prélèvements, de mesures, d'analyses, utilisés au cours de cette étude sont présentés dans la partie matériels et méthodes des publications (annexes 1, 2, 3, 4, 5, 6) et détaillés par la suite lorsque des précisions s'avéraient nécessaires à la compréhension des systèmes utilisés.

### 1) Sites expérimentaux, dispositifs et matériel végétal

#### *a) Sites expérimentaux*

L'étude de l'influence des climats de pollution sur les écosystèmes forestiers a été réalisée sur deux sites expérimentaux de terrain: le Col du Donon (Massif Vosgien: 48° 29' N, 7° 05' E, altitude 727 m) où nous avons étudié les effets de l'augmentation des concentrations en ozone et de la sécheresse; et Sainte-Marguerite (Massif Central: 45° 39' N, 3° 14' E, altitude 340 m) où nous avons étudié les effets de l'augmentation du dioxyde de carbone dans l'atmosphère et de la sécheresse.

Le choix de l'implantation du dispositif au Col du Donon s'appuie en particulier sur les conclusions des travaux du programme de recherches DEFORPA (Dépérissement des Forêts et Pollution Atmosphérique). En effet, ces conclusions suspectent, entre autres, les fortes teneurs en ozone d'être co-responsables, avec la sécheresse et les dépôts acides (qui se conjugue à la pauvreté chimique de certains sols) du dépérissement des forêts. Le Col du Donon, secteur où d'importants phénomènes de dépérissement ont été enregistrés et où les teneurs en ozone sont élevées (Ulrich, 1990) constituait donc le site idéal pour une étude sur les effets de l'ozone. Nous avons installé notre dispositif dans une clairière sur la parcelle Etoile I (composée à 60 % d'épicéas, 35 % de sapins et 5 % de hêtres), située à proximité de la tour de mesure de la pollution atmosphérique de l'ASPA (Agence pour la Surveillance de la Pollution atmosphérique en Alsace). Le peuplement âgé, d'une hauteur moyenne de 35 m est installé sur un sol brun ocreux à pH voisin de 4,8 et est soumis à un climat de type montagnard (Ulrich, 1990).

Le site de Ste-Marguerite, localisé dans une région volcanique a été retenu pour la présence de sources naturelles en CO<sub>2</sub>, que l'usine d'eau minérale de Ste-Marguerite mettait à notre disposition et qui nous permettait d'envisager des études à long terme. La station de Ste-Marguerite se trouve dans une



Tableau 1 : Description des deux sites d'expérimentation et déroulement de l'expérience.

Sites	Ste-Marguerite (Massif Central) Etude sur le CO <sub>2</sub>	Col du Donon (Massif Vosgien) Etude sur l'ozone
<b>Description du site d'installation</b>		
- site d'installation	prairie	clairière en forêt
- altitude	342 m	727 m
- couvert	hors couvert	hors couvert
<b>Description des chambres à ciel ouvert</b>		
- forme: diamètre/hauteur	ronde : 3 m / 2,5 m	décagonale : 3 m/ 2,8 m
- matériel	film transparent de polyéthylène	plaques en plexiglas
- filtres	aucun	filtres à poussière
- contrôle de l'injection de gaz	débitmètre volumique	débitmètre volumique
- taux de renouvellement de l'air	4 x par minute	6 x par minute
- mode de plantation des arbres	plantation dans une ancienne terre agricole importée	plantation dans le sol <i>in situ</i>
<b>Date de plantation</b>	3 avril 1991	19 avril 1990
<b>Age des plants</b>		
- épicéas	5 ans	5 ans
- hêtres	/	3 ans
- chênes rouges	3 ans	/
<b>Date de mise en route de la ventilation</b>	30 octobre 1991	2 mars 1992
<b>Date d'injection des gaz</b>	22 avril 1992	17 juillet 1992
<b>Niveau de sécheresse</b>	$\Psi = - 1,2$ MPa	$\Psi = - 0,82$ MPa

prairie au bord de l'Allier, à quelques centaines de mètres de l'usine d'eau minérale. Le pH du sol (terre agricole importée de Saint-Just-en-Chevalet) est voisin de 5,3. Le climat est de type continental avec des influences méditerranéennes.

*b) Origine du matériel végétal*

Différentes espèces ont été sélectionnées:

- pour le Col du Donon:

- *Fagus sylvatica* (L.) : les arbres ont été élevés en pépinière à St-Dié-des-Vosges et étaient âgés de trois ans au moment de la plantation (19 avril 1990).

- *Picea abies* (L.) Karst. : les arbres proviennent de deux clones: le clone 780371 "Istebna", de provenance polonaise et le clone 781351 "Gérardmer", de provenance vosgienne. Les plants, fournis par l'AFOCEL (Association Forêt Cellulose - Charrey-sur-Saône), sont âgés de trois ans et sont issus d'un bouturage d'ordre trois. Ils ont séjourné deux ans en pépinière (INRA, Champenoux) avant d'être transplantés (19 avril 1990).

Ces deux essences ont été choisies car elles ont un grand intérêt économique en France mais aussi en Europe; de plus elles sont fortement représentées en Lorraine.

- pour Ste-Marguerite:

- *Quercus rubra* (L.) : les arbres ont été élevés en pépinière (INRA, Champenoux). Ils étaient âgés de trois ans au moment de la plantation (3 avril 1991). Le chêne rouge d'Amérique est une espèce nord - américaine largement utilisée comme essence de reboisement en France depuis plusieurs années.

- *Picea abies* (L.) Karst. : les arbres, âgés de cinq ans lors de leur plantation (3 avril 1991), ont également été élevés en pépinière (INRA, Champenoux); mais ici il ne s'agit pas de clones.

Le tableau 1 indique les principales caractéristiques de ces arbres.

*c) Choix du système d'exposition*

L'annexe 1 (page 48) souligne l'intérêt des chambres à ciel ouvert pour étudier l'impact de la pollution atmosphérique sur les végétaux. Bien que cette technique vise à simuler l'environnement naturel des arbres, les composantes climatiques sont malgré tout modifiées: la température, l'humidité relative, la vitesse du vent, la qualité et la quantité de lumière, les précipitations. L'existence de gradients verticaux et horizontaux de microclimat et de distribution des polluants à l'intérieur des chambres ont déjà été mis en évidence (Heagle *et al.*, 1988). L'existence de tels gradients est inhérente à la présence des parois de la chambre et au système de ventilation de l'air. Cette ventilation, chargée d'éviter l'élévation de la température dans la chambre, diminue la transpiration et affecte l'absorption des gaz par les feuilles et les dépôts de polluants sur les surfaces foliaires.

Tableau 2 : Caractéristiques des sondes, chargées de mesurer les paramètres microclimatiques, utilisées sur les deux sites.

<b>Capteurs</b>	Thermo-Hygromètre	Quantum sensor	Analyseur ozone	Analyseur CO <sub>2</sub>	Résistivimètre
<b>Marque</b>	Vaisala	Licor	Environnement SA	Schlumberger	Bamo mesures
<b>Type</b>	HMP 35D	LI 190 SB	1003 AH	ANIR 12	Bamoset 800
<b>Sonde</b>	PT100 et Humicap	Photomètre	Absorption UV	Absorption IR	électrodes
<b>Gamme</b>	- 40/+60 °C ; 0-100%	400-700 nm	0-2000 µg/m <sup>3</sup>	0-1000 µg/m <sup>3</sup>	0-400 kΩ/cm
<b>Précision</b>	± 0,1 °C ; ± 1%	± 5%	± 3%	± 3%	± 1 KΩ/cm

Figure 1: Représentation schématique du dispositif expérimental installé au Col du Donon indiquant l'emplacement des différents traitements ozone, sécheresse ainsi que la répartition des capteurs des différents paramètres microclimatiques.

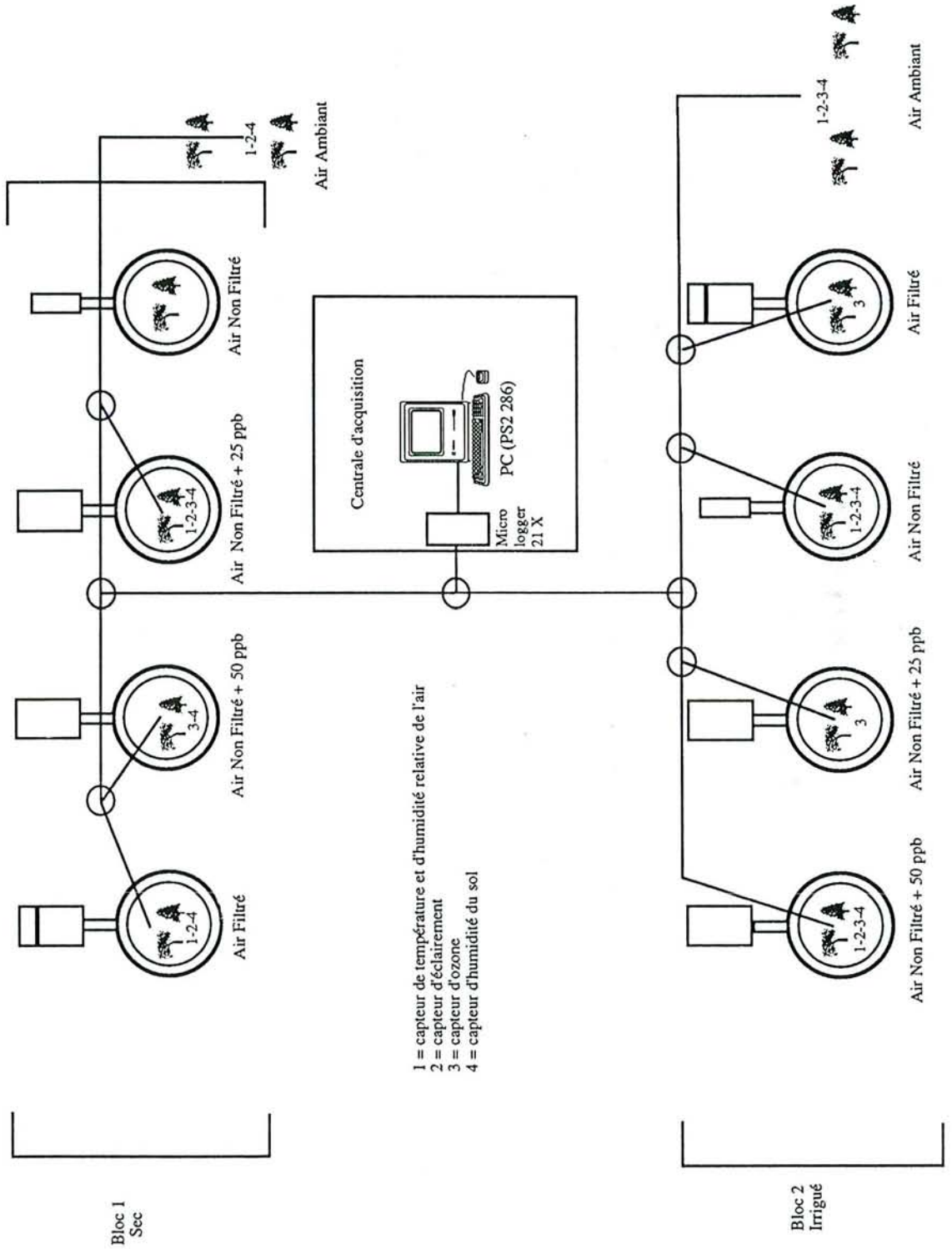
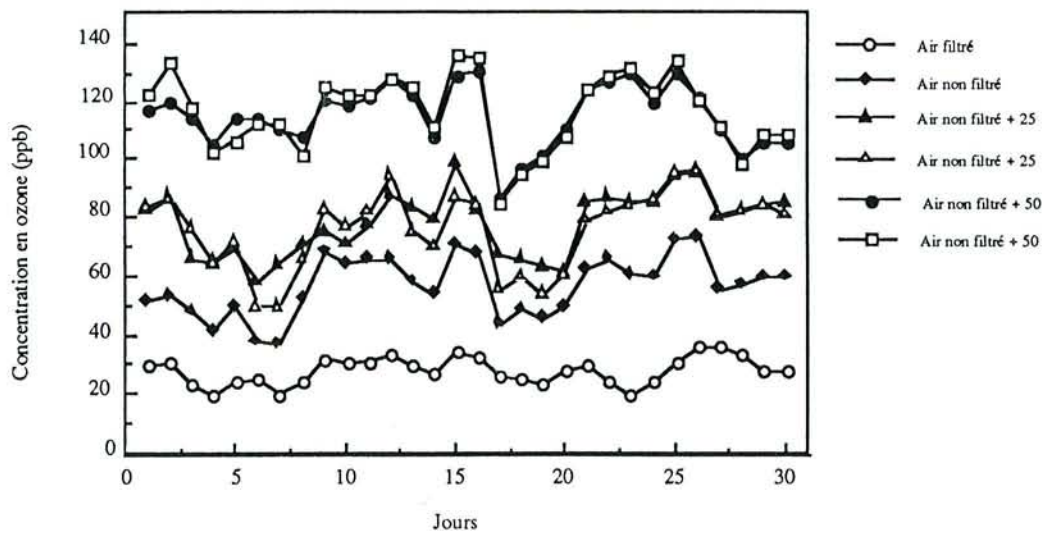


Figure 2 : Evolution des teneurs moyennes journalières en ozone au cours du mois de juillet 1993 dans les différents traitements au Col du Donon.



Ainsi, Olszyk *et al.* (1980) montrent l'importance des dépôts de poussières dans les chambres. Dans notre cas, la mise en place de filtre à poussières nous a permis de nous affranchir de ce problème. La purification de l'air sur charbon actif peut purifier d'autres gaz que l'ozone et donc induire une différence supplémentaire par rapport aux conditions naturelles.

Le dispositif "chambre à ciel ouvert" offre l'énorme avantage de pouvoir modifier et contrôler la composition de l'atmosphère qu'il y règne, mais par grand vent, les entrées d'air externe dans la chambre doivent être limitées afin de maintenir la concentration fixée dans l'enceinte (Unsworth *et al.*, 1984). Un venturi est installé au dessus de chaque chambre afin de limiter ces entrées. La vitesse de l'air pulsé devrait être adaptée à la vitesse du vent extérieur pour empêcher une éventuelle pénétration d'air extérieur (Schmitt & Ruck, 1987).

Le tableau 1 présente les conditions de mise en oeuvre de ces chambres.

Différents capteurs (tableau 2) placés dans les chambres nous renseignent sur les caractéristiques microclimatiques.

#### *d) Exposition des arbres à l'ozone, au CO<sub>2</sub> et au déficit hydrique*

- Au Col du Donon: huit chambres à ciel ouvert ont été construites et comprennent chacune 3 hêtres, 3 épicéas "Istebna" et 3 épicéas "Gérardmer". Quatre blocs sans chambre, de 9 arbres chacun (3 "Istebna", 3 "Gérardmer" et 3 hêtres) servent de témoin (air ambiant).

Cinq traitements sont mis en oeuvre:

- .Air Ambiant (AA)
- .Air Filtré (AF/FA)
- .Air Non Filtré (ANF/NFA)
- .Air Non Filtré + 25 ppb d'ozone (ANF + 25/NFA + 25)
- .Air Non Filtré + 50 ppb d'ozone (ANF + 50/NFA + 50).

Chaque traitement est représenté par deux chambres à ciel ouvert, excepté le témoin pour lequel nous avons donc quatre répétitions. Les concentrations en ozone de 25 et de 50 ppb ont été choisies car elles sont de l'ordre de grandeur de celles que nous pourrions avoir dans l'atmosphère au cours du siècle prochain.

La figure 1 représente le dispositif utilisé. L'ozone est produit par décharges électriques dans de l'oxygène pur grâce à un ozoneur (Trailigaz "labo 76"). L'ajout d'ozone à différentes concentrations est régulé par quatre débitmètres volumiques. La figure 2 montre un exemple de l'évolution des concentrations en ozone enregistrées dans les différentes chambres durant un mois.

L'imposition du stress hydrique a débuté le 1<sup>er</sup> juillet 1993 au niveau des 4 chambres à ciel ouvert du bloc 1. La mise en place de ce stress a nécessité le creusement de tranchées de 70 cm de profondeur autour des chambres concernées afin de minimiser les arrivées d'eau latérales. Une structure en bois supportant une bâche en plastique transparente et imperméable a été installée pour empêcher la pluie de

Figure 3 : Représentation schématique du dispositif expérimental installé à Ste-Marguerite indiquant l'emplacement des différents traitements CO<sub>2</sub>, ainsi que la répartition des capteurs des différents paramètres microclimatiques.

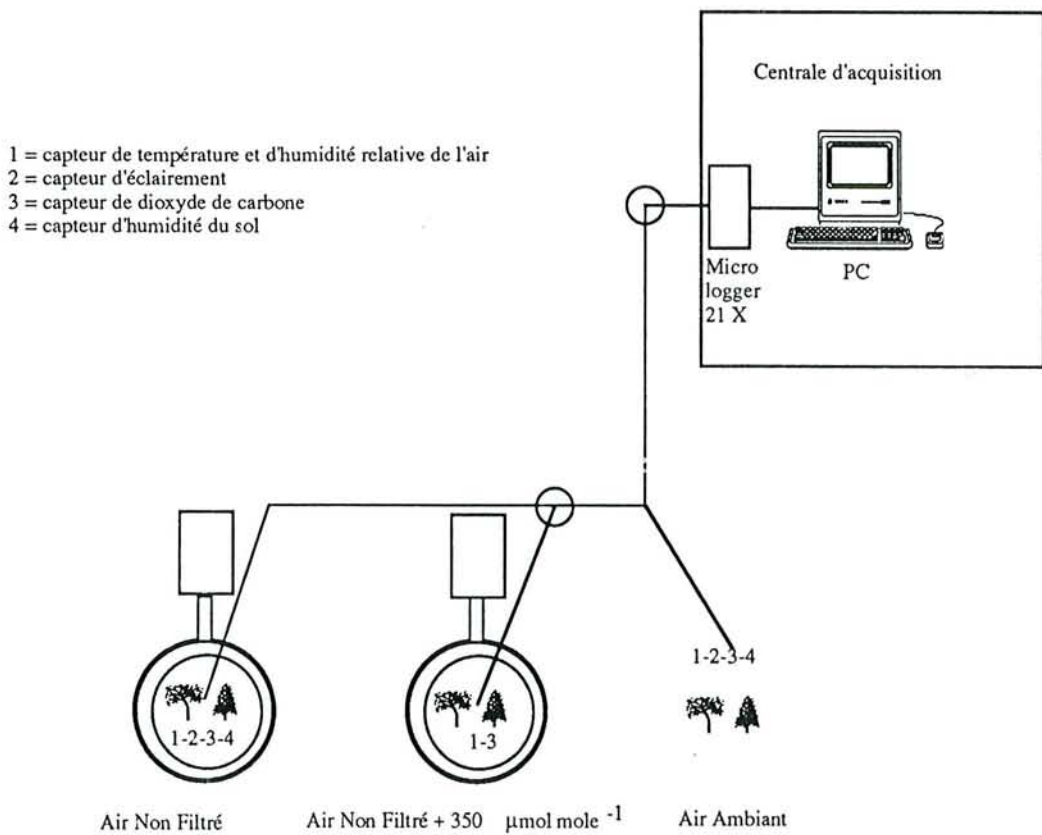


Figure 4 : Evolution des concentrations moyennes journalières (au cours du mois de juillet 1993) et horaires (02 juillet 1993) en dioxyde de carbone dans les différents traitements à Ste Marguerite.

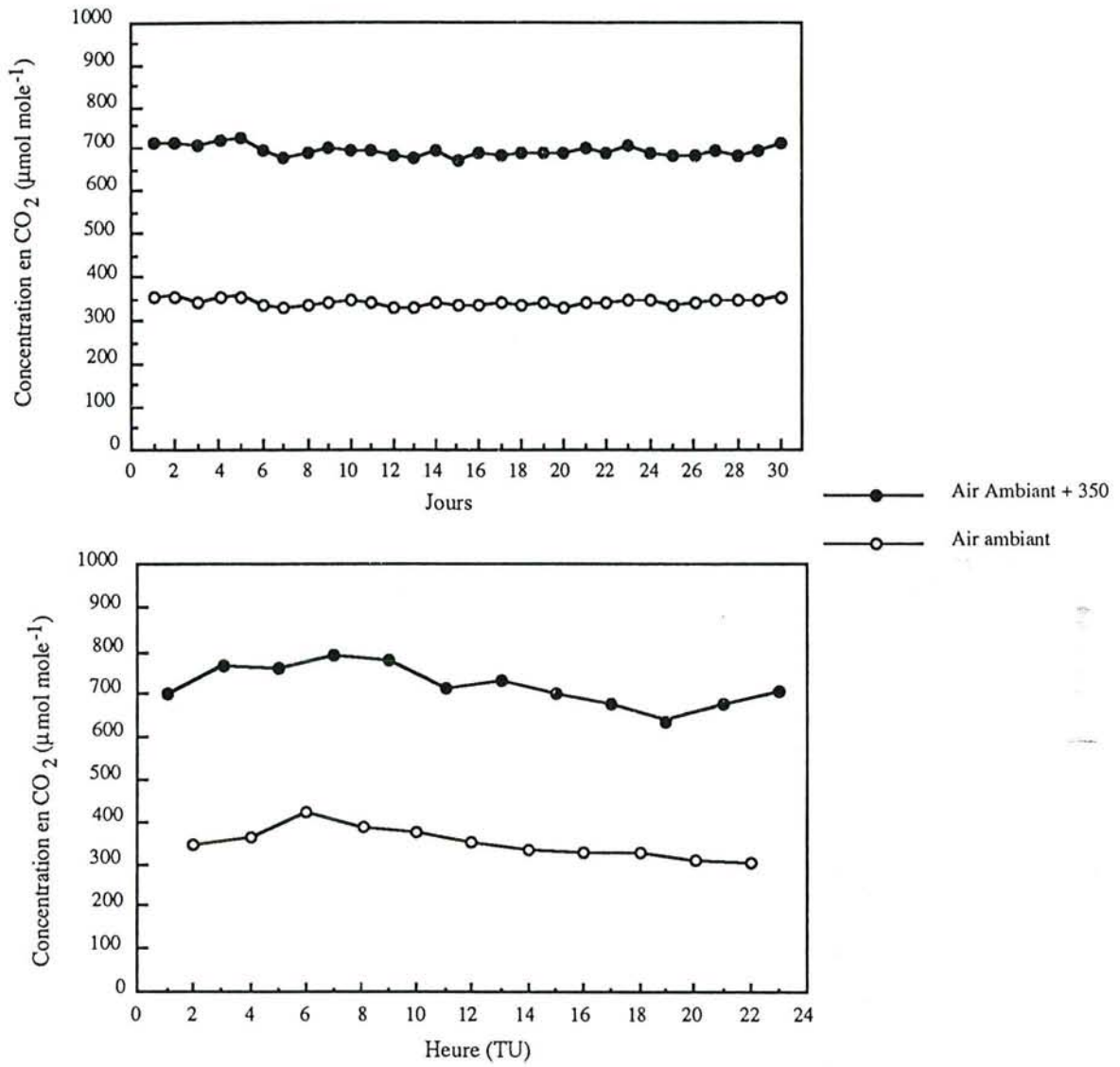
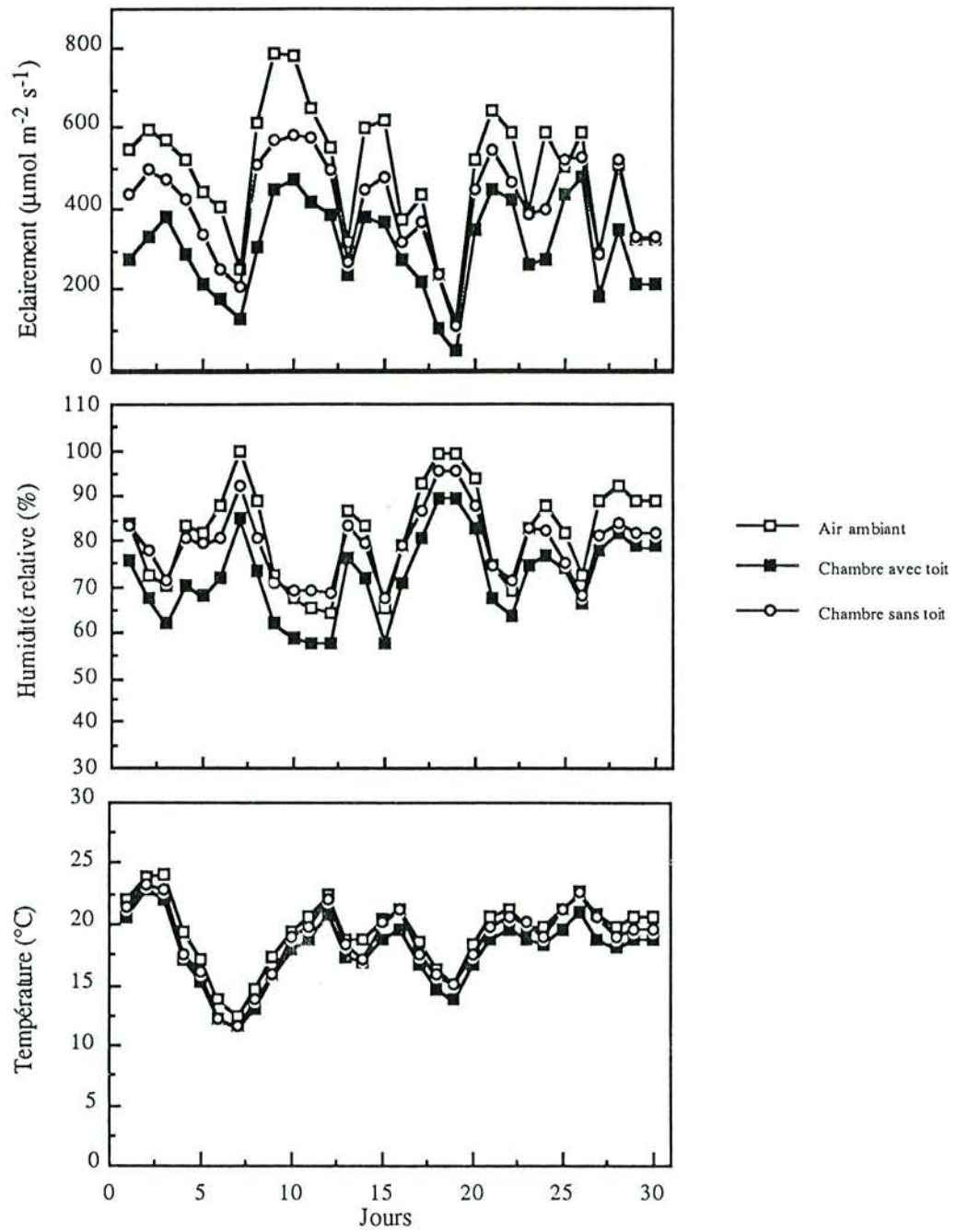




Figure 5 : Evolution des moyennes journalières de l'éclairement, de l'humidité relative et de la température au cours du mois de juillet 1993 au Col du Donon dans les chambres à ciel ouvert avec et sans bâche.



pénétrer à l'intérieur des chambres (annexes 2 et 3; pages 57 et 65). Les arbres dans les autres traitements ainsi que dans le traitement AA ont été arrosés.

Les variations des concentrations d'ozone et de la pluviométrie sur le site sont donnés dans les annexes 2 (*figure 1*, page 60) et 3 (*figure 1*, page 82).

Il est à noter qu'il n'y avait aucune différence significative entre chambres à l'intérieur d'un même traitement avant l'imposition de la sécheresse.

- A Ste-Marguerite: la figure 3 représente le dispositif; deux chambres à ciel ouvert ont été construites autour de huit arbres chacune: 4 épicéas et 4 chênes. Trois traitements ont été mis en oeuvre:

.Air Non Filtré (ANF / NFA)

.Air Non Filtré + 350  $\mu\text{mol mole}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  (ANF + 350 / NFA + 350)

.Air Ambient (AA).

Le volume de  $\text{CO}_2$  injecté dans une des chambres est contrôlé par un débitmètre volumique.

La figure 4 montre un exemple des concentrations en  $\text{CO}_2$  enregistrées pour chaque chambre.

Il faut noter que pour l'ensemble des traitements, une sécheresse naturelle s'est installée durant les mois d'été 1993.

## 2) Données climatiques

Les données climatiques des deux sites sont fournies dans les annexes 1, 2, 3, 5 et 6. La figure 5 indique les différences de température, d'éclairement et d'humidité relative entre les chambres avec ou sans toit, et les témoins, pour le site du Donon. On remarque que le facteur le plus affecté par la présence de la bâche est l'éclairement; en effet, celle-ci filtre 11% du rayonnement solaire photosynthétiquement actif.

Le type de chambre à ciel ouvert mis en oeuvre à Ste-Marguerite, différent de celui du Col du Donon et plus ancien, filtre 18 % du rayonnement solaire photosynthétiquement actif.

## 3) Mesure de l'état hydrique des arbres

L'état hydrique des arbres dépend de l'état hydrique du sol dans lequel ils poussent. Deux électrodes couplées à un résistivimètre, plantées à une profondeur de 20 cm permettent de calculer la quantité d'eau que contient un sol (exprimée en %). La mesure de l'humidité du sol est très délicate en milieu naturel en raison de sa variabilité spatiale. Au Col du Donon, où la texture, la structure et la densité du sol présentent une forte variabilité spatiale, les sondes de résistivité se sont montrées peu fiables.

L'état hydrique des plants peut être déterminé à partir des deux paramètres principaux que sont la teneur en eau relative et le potentiel hydrique. Le potentiel hydrique est une grandeur thermodynamique qui caractérise l'état énergétique de l'eau dans un milieu hydraté. Il est défini comme le travail qu'il faut fournir à une unité de masse d'eau pour l'amener de l'état d'eau liée à l'état d'eau libre, ceci à température

constante et à pression atmosphérique ambiante. Le potentiel hydrique d'un organe se décompose en la somme de quatre grandeurs (Tyree & Jarvis, 1982) :

- le potentiel osmotique qui exprime l'effet de la concentration en solutés dans l'eau,
- le potentiel de turgescence qui résulte de la pression des parois cellulaires sur l'eau symplasmique,
- le potentiel matriciel qui résulte des interactions entre l'eau en phase liquide et la matrice,
- le potentiel de gravité.

Les deux dernières composantes sont souvent négligeables.

En fin de nuit, les stomates sont fermés et le potentiel hydrique est proche du potentiel d'équilibre qui s'établit entre le sol et la plante (Aussenac & Granier, 1978). Il s'agit du potentiel hydrique de base utilisé couramment comme une estimation du potentiel hydrique du sol dans l'horizon le plus humide du système racinaire (Bréda *et al.*, 1994). Théoriquement, le potentiel hydrique de base renseigne sur l'alimentation hydrique de la plante et donc sur la contrainte qui lui est imposée (Aussenac & Finkelstein, 1983). Il est mesuré à l'aide d'une bombe à pression (Skye) selon la méthode de Scholander *et al.* (1965).

En réalité, le potentiel hydrique de base n'indique pas le début de dessèchement induisant la fermeture stomatique. Il a été démontré que le potentiel hydrique de base est insensible à une réduction de 60 % de la fraction disponible de la réserve hydrique du sol chez le chêne (Bréda, 1994). L'équilibre hydrique qui se met en place durant la nuit, entre le sol et l'arbre, provient essentiellement des racines profondes; la majorité des racines superficielles ne sont pas bien hydratées en raison de la haute résistance des mouvements d'eau développée dès que le sol sèche. Cet équilibre en fin de nuit pourrait donc masquer un déficit hydrique important durant la journée.

Les mesures que nous avons effectuées nous ont quand même renseigné sur l'évolution dans le temps des intensités des sécheresses.

Des mesures simultanées de teneur en eau du sol (humidité volumique et pondérale), de potentiel hydrique du sol (à l'aide de tensiomètres, micro psychromètres) et de fraction disponible de la réserve hydrique ainsi que de la teneur en eau relative de la plante nous auraient donné beaucoup plus de renseignements pour l'analyse de la régulation stomatique que le potentiel hydrique de base. Ceci n'a pas été réalisé faute de matériel et de disponibilité humaine.

#### 4) Echanges gazeux et teneurs en chlorophylles

Les échanges gazeux entre la feuille et l'atmosphère ont été mesurés à l'aide d'un système portable: Li 6200 (Li-Cor, U.S.A.) entre 10 h et midi. Les mesures sont faites sur une surface donnée de feuille ou d'aiguille. Les résultats sont exprimés en fonction des flux entrants ou sortants de CO<sub>2</sub> ou d'H<sub>2</sub>O par unité de temps et par unité de surface. C'est pourquoi il est nécessaire de connaître cette surface foliaire.

##### a) Etude des surfaces foliaires

Les surfaces foliaires des feuillus ont été mesurées à l'aide d'un planimètre ( $\Delta T$  Area Meter, MK2) fournissant des mesures très précises. Pour ce qui est des aiguilles d'épicéa, leur surface non plane rend les mesures plus complexes. Oren *et al.* (1986) mesurent la surface projetée des aiguilles au planimètre et appliquent un facteur multiplicatif de 2,5 pour obtenir la surface développée. Comme les aiguilles d'épicéa des deux clones ont des formes différentes, nous avons jugé cette méthode trop imprécise et avons préféré mesurer les surfaces à l'aide d'un microscope électronique à balayage; la méthode et les différentes équations obtenues sont données dans les annexes 2 (page 57) et 5 (page 93) et sont les suivantes (S, mm<sup>2</sup>; Poids Sec, mg):

.Clone Istebna - aiguilles de l'année:

$$S = 2,38 ((\text{Poids Sec} + 0,033636)/0,159) - 2,7333$$

.Clone Istebna - aiguilles de un an:

$$S = 2,0096 ((\text{Poids Sec} + 0,75062)/0,26989) - 2,2885$$

.Clone Gérardmer - aiguilles de l'année:

$$S = 3,39 ((\text{Poids Sec} + 0,60571)/0,23922) - 9,8333$$

.Clone Gérardmer - aiguilles de un an:

$$S = 2,8151 ((\text{Poids Sec} + 1,8876)/0,3261) - 8,0781$$

.Epicéa de Ste Marguerite - aiguilles de l'année:

$$S = 3,4527 ((\text{Poids Sec} + 0,46697)/0,23021) - 8,8434$$

.Epicéa de Ste Marguerite - aiguilles de un an:

$$S = 2,8508 ((\text{Poids Sec} + 1,0511)/0,31729) - 7,1282$$

Afin de connaître la validité de cette méthode, nous l'avons comparée à d'autres méthodes classiques. Un même lot d'aiguilles provenant des épicéas de Ste-Marguerite a servi pour la comparaison:

- aiguilles de l'année: poids sec = 363,9 mg; longueur = 1582 mm  
surface projetée = 1250 mm<sup>2</sup>
- aiguilles de 1 an: poids sec = 557,0 mg; longueur = 1759 mm  
surface projetée = 1465 mm<sup>2</sup>

Les résultats obtenus sont les suivants:

Méthode	utilisée	Malka (1988)	Oren <i>et al.</i> (1986)	Horntvedt (1988)	Riederer <i>et al.</i> (1988)
S (mm <sup>2</sup> ) (aiguilles de l'année)	5456	4109	3125	4442	5171
S (mm <sup>2</sup> ) (aiguilles de 1 an)	5007	4569	3662	5795	7785

- la formule de Malka:  $S \text{ (cm}^2\text{)} = 0,26 \times L \text{ (cm)} - 0,04$  est obtenue en mesurant la longueur des aiguilles et en additionnant la surface totale de différentes coupes transversales dont le périmètre a été mesuré en projetant les coupes sur un microlecteur.

- les formules de Horntvedt :  $S \text{ (mm}^2\text{)} = 1,9 + 12,2 \times \text{Poids Sec (mg)}$  pour les aiguilles de l'année  
 $S \text{ (mm}^2\text{)} = 2,1 + 10,4 \times \text{Poids Sec (mg)}$  pour les aiguilles de 1 an sont obtenues par détermination du poids sec des aiguilles et de la surface de différentes coupes transversales.

- les formules de Riederer *et al.* :  $S \text{ (mm}^2\text{)} = 3,279 \times L \text{ (mm)} - 16,31$  pour les aiguilles de l'année  
 $S \text{ (mm}^2\text{)} = 4,440 \times L \text{ (mm)} - 24,78$  pour les aiguilles de 1an sont obtenues par détermination de la longueur des aiguilles et de la surface projetée multipliée par 2,74.

Les résultats obtenus au microscope électronique à balayage sont proches de ceux obtenus par les méthodes de Horntvedt (1988), Riederer *et al.* (1988) et Malka (1988). Quant à la méthode d'Oren *et al.* (1986), bien que souvent utilisée, fournit des résultats assez éloignés des autres.

Afin de conserver un maximum de précision, nous avons opté pour notre formule spécifique à chaque clone et correspondant à nos conditions de culture.

#### b) Teneurs en chlorophylle

Les teneurs en chlorophylles ont été exprimées par rapport au poids sec et par rapport à la surface foliaire selon la méthode de Barnes *et al.* (1992) qui utilise le diméthylsulfoxyde pour extraire les chlorophylles (2 cm<sup>2</sup> de feuille ou une quinzaine d'aiguilles sont coupées en morceaux et sont plongées dans 5 ml de DMSO puis sont congelées; les tubes sont mis ensuite au bain marie à 65°C pendant 2H pour les feuilles et 3H30 pour les aiguilles); la densité optique de la solution obtenue est mesurée par spectrophotométrie à 648,2 et 664,9 nm.

c) Mesures de l'assimilation nette de  $CO_2$  et conductance stomatique

Une feuille entière ou un rameau d'épicéa est enfermée pendant 15 secondes dans la chambre de mesure de l'appareil Li-Cor. Cette chambre est reliée par un circuit fermé à un analyseur, qui mesure la baisse de  $CO_2$  dans l'air de la chambre. La densité du flux de photons photosynthétiquement actifs est mesurée par un capteur quantique. La température et l'humidité relative de l'air sont mesurées respectivement par un thermocouple et une sonde capacitive (VAISALA). Un thermocouple appliqué sous la feuille mesure la température foliaire. En plus de l'ensemble de ces paramètres, l'assimilation nette de  $CO_2$  (A), la transpiration (E) sont mesurées et la conductance stomatique à la vapeur d'eau ( $g_{sw}$ , représentant le degré d'ouverture de l'ostiole) est calculée par unité de surface foliaire. Une évaluation préalable de la conductance de la couche limite ( $g_{bw}$ ) est nécessaire. Elle est réalisée en plaçant dans la chambre un papier buvard imbibé d'eau, de surface connue (en fait nous élaborons une équation à partir de plusieurs papiers de surfaces différentes) et en calculant la conductance totale de ce papier à partir des paramètres fournis par les capteurs. Ainsi la conductance de la couche limite utilisée est de:

. 0,8 mol  $m^{-2} s^{-1}$  pour les feuilles de hêtre,

. 100000 mol  $m^{-2} s^{-1}$  pour les aiguilles d'épicéa car nous considérons la résistance de la couche limite comme négligeable vu la géométrie et la morphologie d'un rameau d'épicéa,

. x mol  $m^{-2} s^{-1}$  suivant la formule:  $g_{bw} = 1/2((0,23918 + 0,025265 \times \text{Surface}))$  pour les feuilles de chêne.

Les équations, propres au système de mesure de l'appareil Li-Cor sont détaillées dans le manuel de références techniques Li-Cor (1987) et par Leuning & Sands (1989); les principales équations nous intéressant sont les suivantes:

$$g_{tw} = \frac{E \left[ 1 - \frac{w_i + w_a}{2} \right]}{w_i - w_a} \quad (\text{équation 1})$$

$$\frac{1}{g_{sw}} = \frac{1}{g_{tw}} - \frac{1}{g_{bwo}} \left[ \frac{K^2 + 1}{(K + 1)^2} \right] \quad (\text{équation 2})$$

$$C_i = \frac{\left[ g_{tc} - \frac{E}{2} \right] C_a - A}{\left[ g_{tc} + \frac{E}{2} \right]} \quad (\text{équation 3})$$

$$\frac{1}{g_{tc}} = \frac{1.6}{g_{sw}} + \frac{1.37}{g_{bw}} \quad (\text{équation 4})$$

avec :  $g_{tw}$  : conductance foliaire totale à l'eau  
 $E$  : taux de transpiration  
 $w_j$  : fraction molaire de vapeur d'eau dans la cavité sous stomatique  
 $w_a$  : fraction molaire de vapeur d'eau dans l'air  
 $g_{sw}$  : conductance stomatique à la vapeur d'eau  
 $g_{bw}$  : conductance de la couche limite  
 $g_{bwo}$  : conductance de la couche limite sur une face de la feuille  
 $C_j$  : fraction molaire de  $CO_2$  dans la cavité sous stomatique  
 $C_a$  : fraction molaire de  $CO_2$  dans l'air  
 $g_{tc}$  : conductance totale au  $CO_2$   
 $K$  : rapport stomatique d'une face de la feuille sur l'autre ( $K = 0$  pour les feuilles de hêtre et de chêne car elles sont hypostomatiques; pour les aiguilles nous considérons aussi que  $K = 0$ )  
 $A$  : taux d'assimilation nette de  $CO_2$   
 $1,37$  : rapport des coefficients de diffusion du  $CO_2$  et de la vapeur d'eau au niveau de la couche limite  
 $1,6$  : rapport des coefficients de diffusion du  $CO_2$  et de la vapeur d'eau au niveau de l'air.

La conductance foliaire pour la vapeur d'eau ( $g_{tw}$ ), obtenue à l'aide de l'équation 1 et la conductance de la couche limite ( $g_{bw}$ ) permettent d'accéder à la conductance stomatique à la vapeur d'eau ( $g_{sw}$ )(équations 2 et 4).

En général, la résistance stomatique à la diffusion des gaz limite les échanges gazeux. La connaissance de  $A$  et de  $g_{sw}$  ne permet pas cependant de vérifier si les baisses de  $A$  induites par une contrainte résultent exclusivement d'une fermeture des stomates ou d'autres mécanismes non stomatiques.

#### *d) Concentration intercellulaire de $CO_2$ ( $C_j$ )*

L'analyse des relations existant entre l'assimilation nette de  $CO_2$  et la fraction molaire de  $CO_2$  dans la cavité sous-stomatique ( $C_j$ ) permet théoriquement de déterminer l'existence de limitations non stomatiques du taux d'assimilation nette de  $CO_2$  ( $A$ ).

Si seule la conductance foliaire pour le  $CO_2$  ( $g_{tc}$ ) limite  $A$ ,  $C_j$  doit diminuer lorsque les stomates se ferment. Le calcul de  $C_j$  est effectué d'après les équations de Von Caemmerer & Farquhar (1981)(équation 3).

Ce calcul peut conduire à une surestimation de  $C_j$  si le  $CO_2$  n'est pas réparti uniformément dans les espaces intercellulaires; ce cas peut se présenter si les échanges gazeux ne sont pas uniformes sur toute la surface de la feuille (fermeture des stomates par îlot) ou s'il existe d'importantes barrières internes à la diffusion latérale du  $CO_2$  (Terashima *et al.*, 1988).

Compte tenu de ce possible artefact et de la difficulté à estimer avec précision la température foliaire (Tyree & Wilmot, 1990), donc la conductance et  $C_i$ , l'interprétation des variations de  $C_i$  suite à une contrainte requiert beaucoup de prudence.

#### *e) Efficience d'utilisation de l'eau*

L'efficience d'utilisation de l'eau (WUE: water use efficiency) est obtenue normalement en calculant le rapport de la biomasse sur l'eau consommée. Cependant, si cette expression de WUE par ce rapport reste souvent utilisée, elle n'est pas exclusive. En effet, nous pouvons utiliser les rapports  $A/\text{Transpiration}$  et  $A/g_{sw}$  qui correspondent à une valeur instantanée et intrinsèque.

*Remarque: le terme  $g_w$  dans les annexes équivaut ici à  $g_{sw}$ .*

### **5) Concentration en éléments minéraux**

La mesure des concentrations en éléments minéraux dans les cellules des tissus foliaires est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage équipé d'un système de microanalyse X (diode au silicium - lithium). Le principe de fonctionnement du microscope et de la mesure du rayonnement X est donné par Maurice (1983) et Eberhart (1989).

La microanalyse par sonde électronique et spectrométrie de rayons X est une méthode d'analyse spectrochimique fine basée sur des processus physiques. Cette technique permet de déterminer la concentration des éléments en présence dans un volume de matière très réduit. Son principe est fondé sur le traitement du rayonnement X émis par un échantillon bombardé par un faisceau d'électrons focalisé à sa surface.

Lorsqu'on analyse dans un spectromètre le rayonnement émis par une cible bombardée par un faisceau d'électrons convenablement accélérés, on différencie :

- le spectre continu, constitué par une distribution continue de la longueur d'onde,
- le spectre caractéristique, constitué par une série de raies de hauteurs différentes et de longueurs d'onde discrètes.

Le spectre continu est dû au freinage des électrons par le champ électromagnétique des atomes de la cible.

Pour expliquer le mécanisme d'émission du spectre caractéristique, considérons un atome dans un état stable, c'est à dire dans un état d'énergie minimale. Supposons qu'une particule (électron) ou une radiation (photon) interagisse avec cet atome. La quantité d'énergie perdue par l'agent exciteur lors de la collision est emmagasinée par l'atome qui se trouve alors porté dans un état d'énergie supérieure (état excité). Au cours de l'interaction, un électron est chassé de son orbitale, laissant un "trou" sur le niveau correspondant. C'est le phénomène d'ionisation. Pour revenir à l'état d'équilibre, l'atome va progressivement libérer l'énergie emmagasinée en réalisant des transitions électroniques qui



correspondent au passage d'un électron d'un niveau moins lié vers un niveau plus lié. C'est le phénomène de désexcitation. L'énergie libérée va permettre:

- soit l'éjection d'un électron appartenant à un niveau encore plus externe: c'est un électron Auger,
- soit l'émission d'un photon X dont l'énergie est égale à la différence des deux énergies de liaison des niveaux mis en jeu lors de la transition électronique.

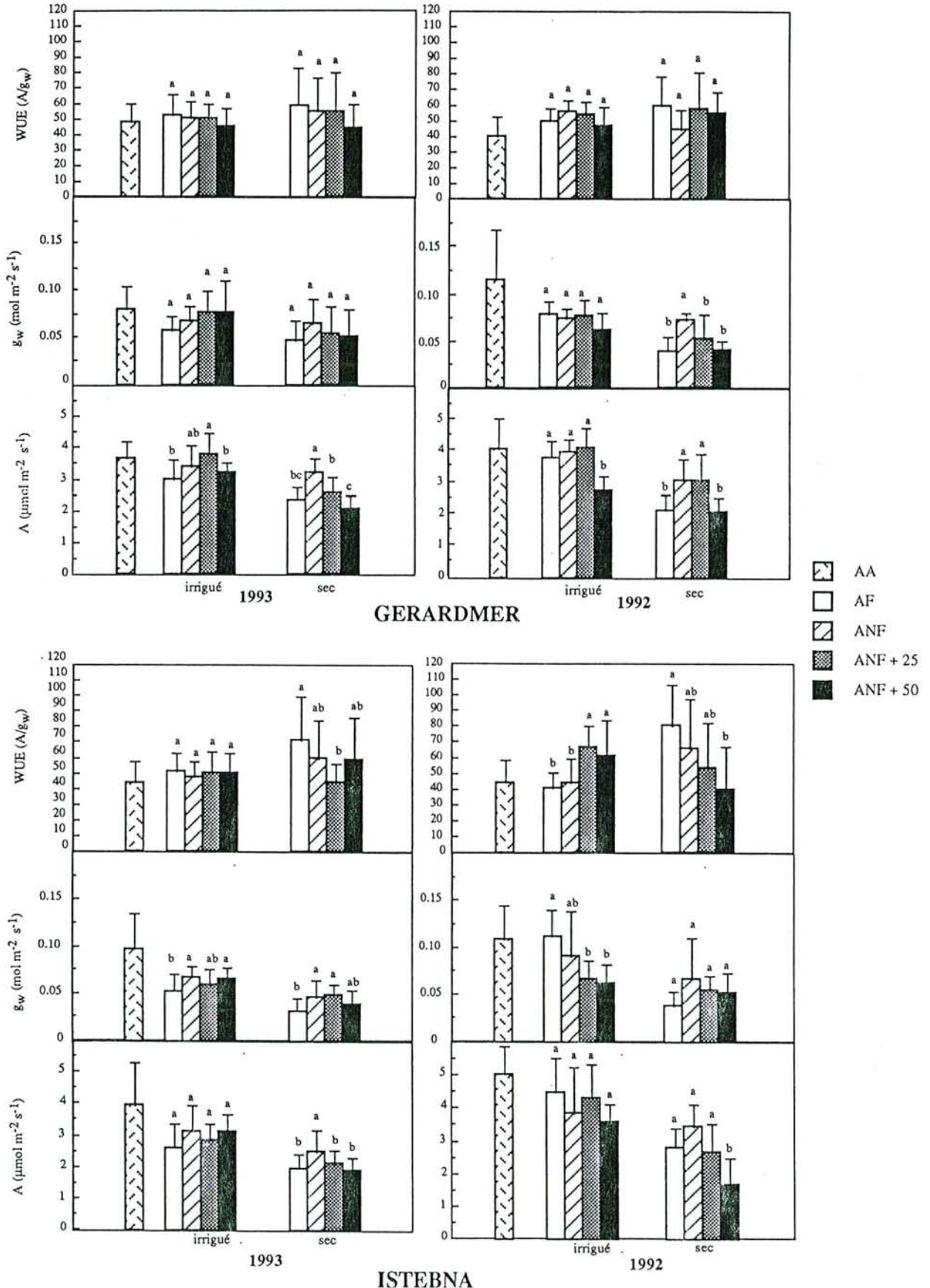
D'autres transitions électroniques vont se succéder mettant en jeu des niveaux de moins en moins liés, jusqu'à ce que l'atome retrouve son état stable.

L'analyse quantitative, c'est-à-dire la mesure de l'intensité des principales raies caractéristiques de l'échantillon et des témoins et le calcul des concentrations apparentes puis réelles, est généralement obtenue à l'aide du programme de calcul de l'ordinateur associé. Une étude précédente sur le choix des témoins a été réalisée (Le Thiec, 1991). Notre choix s'est porté sur des témoins composés de poudre végétale. S'il existe des difficultés pour obtenir des analyses quantitatives précises compte tenu de la géométrie de nos échantillons et du système d'analyse, nos études préliminaires sur des échantillons standard dont les concentrations en éléments sont connues, ont montré la validité de nos résultats.

La préparation des échantillons et les conditions d'analyse sont détaillées dans les annexes 3 (page 65), 4 (page 86) et 6 (page 102). Les principales sont les suivantes:

- tension d'accélération: 15 kV,
- angle du porte-objets avec l'horizontale: 45°,
- temps d'analyse: 100 s,
- grandissement: 6000 pour tous les tissus (stomate, épiderme, mésophylle, parenchymes et endoderme) et 400 pour le cylindre central,
- diode placée à 20 mm.

Figure 6 : Evolution de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, de la conductance stomatique à la vapeur d'eau et de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les deux clones d'épicéa, pour les aiguilles de l'année (1993) et les aiguilles de un an (1992). Les valeurs représentent la moyenne de mesures faites sur 10 jours en juillet et août 1993 entre 07 et 09 heures GMT (n=20). Les conditions microclimatiques moyennes étaient les suivantes: T°: 17,86 ± 4,84 °C; déficit de pression de vapeur d'eau: 1,2 ± 0,14 kPa; humidité relative dans la chambre de mesure: 56,23 ± 11,67 %; densité de flux de photons photosynthétiquement actif: 885 ± 268 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Les résultats du test d'égalité de Student-Newman et Keuls sont représentés par les lettres (l'ordre alphabétique désigne la décroissance des valeurs et la différence des lettres indique la différence significative des moyennes).



## II. Effets de l'ozone et de la sécheresse - Interactions

### 1) Effets de l'ozone

#### a) Echanges gazeux foliaires

Alors que les expériences de courte durée d'exposition à l'ozone renseignent sur les effets immédiats du polluant sur les processus photosynthétiques, les études à long terme permettent de déterminer la capacité du métabolisme cellulaire à résister aux stress oxydants et d'établir une relation entre les perturbations des échanges gazeux et la croissance des arbres.

Généralement l'ozone abaisse le taux d'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, d'autant plus que les plantes sont sénescentes (Coyne & Bingham, 1982; Pierre & Queiroz, 1983; Reich, 1983; Pell, 1988; Darrall, 1989; Wallin, 1990; Galaup, 1992). Ces effets sont d'autant plus importants que la concentration d'ozone est élevée (Yang *et al.*, 1983; Wallin, 1990). Certaines espèces sont plus sensibles que d'autres (Coyne & Bingham, 1981).

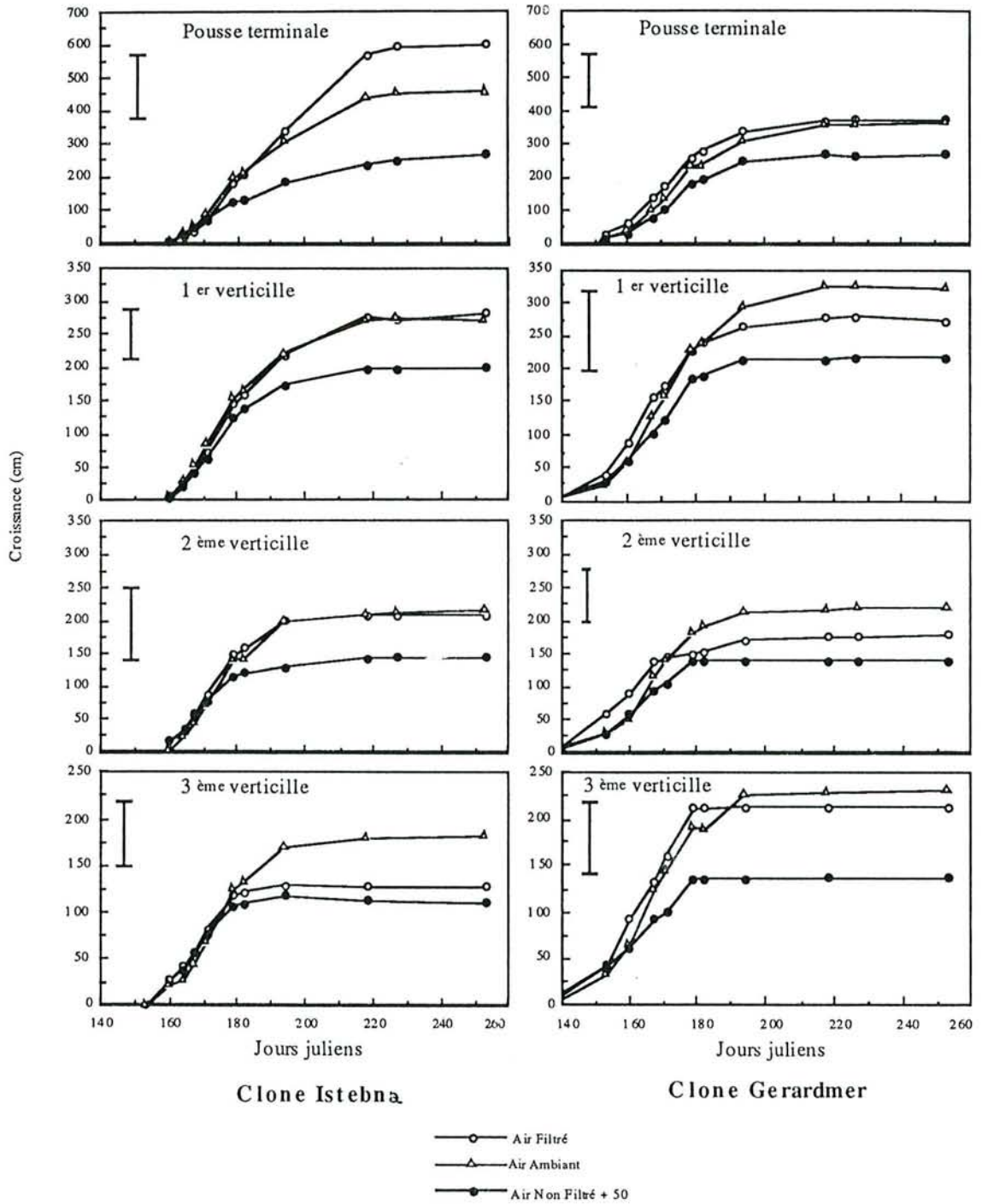
A partir de notre étude, la comparaison des résultats des traitements "ozone" avec le traitement "air filtré" montre que les aiguilles de l'année ne subissent pas de baisse de la photosynthèse mais ont plutôt tendance à augmenter leur taux d'assimilation de CO<sub>2</sub> (figure 6, *annexe 2 : figure 3*, page 61). Cette tendance est associée à un accroissement de la conductance stomatique suggérant un contrôle stomatique de la photosynthèse. De tels effets ont déjà été observés sur *Picea abies* (Dobson *et al.*, 1990; Freer-Smith & Dobson, 1989; Wallin, 1990).

La pénétration de l'ozone dans les plantes se fait généralement par simple diffusion moléculaire suivant un gradient de concentration (Wieser & Havranek, 1993). Aussi, une augmentation de l'ouverture stomatique implique un plus grand flux d'ozone dans les feuilles. En réponse à l'augmentation de ce photo-oxydant à l'intérieur de ses tissus, la plante augmente son activité antioxydant (associée à un taux plus élevé de photosynthèse) (Alscher & Amthor, 1988). Hausladen *et al.* (1990) ont également mis en évidence ce phénomène. Ils ont découvert une augmentation de plusieurs systèmes antioxydants chez *Picea rubens* exposé pendant deux ans à l'ozone.

Il existe plusieurs voies de formation des antioxydants (ascorbate, glutathion), toutes dépendent de la réduction de NADPH (Dizengremel & Petrini, 1993) lequel peut être fourni par la voie des pentoses phosphates mais aussi par l'enzyme malique à NADP, impliquant la voie anaplérotique de fixation du carbone (PEPc). De même l'activité de certaines enzymes (superoxyde dismutase, catalase...) est augmentée (Melhorn *et al.*, 1986; Polle *et al.*, 1992).

La croissance des plantes résulte de l'intégration et de la coordination des processus de photosynthèse, de respiration, de transport et de biosynthèse. Ceux-ci sont contrôlés de façon génétique et modifiés par les facteurs environnementaux. Le budget carboné est d'une importance prépondérante pour

Figure 7: Evolution de la croissance aérienne chez les deux clones d'épicéa au cours de la saison 1993. Chaque point représente la valeur moyenne de 6 mesures pour les verticilles et de 3 mesures pour la pousse terminale. La barre d'erreur indique l'écart type moyen pour l'ensemble des mesures.



le processus de croissance des plantes supérieures. Le carbone assimilé en photosynthétats peut être d'une part utilisé par la respiration et d'autre part véhiculé sous forme de saccharose vers les organes de croissance. La respiration, quant à elle, fournit les acides organiques nécessaires à la synthèse d'acides aminés. Un équilibre entre ces différentes allocations du carbone est donc nécessaire pour assurer une bonne croissance (*Remarque: le gain de carbone obtenu par la photosynthèse ne peut être corrélé avec l'augmentation de la biomasse, une partie de ce carbone devant servir à la respiration*).

Cet équilibre est remis en cause lors d'une exposition à l'ozone à long terme:

- soit la présence d'ozone dans l'air ambiant, en concentration faible mais supérieure à la normale, ne diminue pas l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et elle peut même l'augmenter dans certains cas comme le nôtre ainsi il peut éventuellement en résulter une augmentation de la croissance,

- soit la présence de fortes concentrations en ozone diminue l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et il en résulte un ralentissement de la croissance comme celui que nous avons observé (figure 7, annexe 2 : figure 2, page 60),

- soit l'action de l'ozone modifie la redistribution des assimilats en favorisant les parties aériennes (pour la réparation des dégâts causés par l'ozone) au détriment des organes racinaires (voir la partie sur les teneurs minérales).

*Remarque: il est difficile de corréler les résultats d'assimilation nette de CO<sub>2</sub> avec la croissance car le problème n'est peut être pas tant la variation de l'activité photosynthétique de quelques aiguilles ou feuilles choisies que la surface totale photosynthétiquement efficace car l'ozone peut aussi entraîner une accélération de la sénescence et même une chute des feuilles ou des aiguilles.*

Les variations des échanges gazeux sont fonction aussi de l'âge des aiguilles; (*remarque: les valeurs de conductance et d'assimilation sont plus faibles dans les aiguilles de l'année, ceci étant certainement dû au fait que ces valeurs sont exprimées par rapport à une surface qui est différente selon le clone et l'année*). Ainsi, dans les aiguilles âgées de 1 an, l'ozone provoque de façon significative une baisse graduelle de la conductance stomatique chez le clone Istebna; la photosynthèse, elle, ne baisse pas de façon significative. Ces changements entraînent l'augmentation de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (figure 6, annexe 2: figure 4, page 61). Chez le clone Gérardmer, seule une baisse non significative de la conductance stomatique a été enregistrée aux fortes concentrations en ozone. L'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, au contraire, baisse significativement.

L'ozone interfère davantage avec les systèmes chloroplastiques du mésophylle qu'avec les stomates. Ainsi, Coyne & Bingham (1981, 1982) observent que la perte de la capacité photosynthétique chez *Pinus ponderosa* est plus importante que la baisse de conductance, ce qui suggère des dommages plus sévères au niveau des cellules mésophylliennes qu'au niveau des stomates.

De nombreux auteurs signalent des effets négatifs de l'ozone sur la photosynthèse. La plupart indiquent que l'assimilation de CO<sub>2</sub> par les plantes soumises à l'ozone est limitée par la diminution de la

Tableau 3 : Evolution des teneurs en chlorophylles selon les traitements appliqués au Col du Donon durant la saison de mesure en 1993 (n = 10). Les valeurs des déviations standards sont données entre parenthèses. Les résultats du test d'égalité de Student-Newman et Keuls sont représentés par les lettres (l'ordre alphabétique désigne la décroissance des valeurs et la différence des lettres indique la différence significative des moyennes). Les résultats de l'analyse de la variance sont aussi représentés: - ns : non significatif; \* : significatif ( $\alpha \leq 0,05$ ); \*\* : hautement significatif ( $\alpha \leq 0,01$ ); \*\*\* : très hautement significatif ( $\alpha \leq 0,001$ ).

Traitements	Chl a + b (mg g <sup>-1</sup> dw)					Chl a + b (g m <sup>-2</sup> )				
	GER 93	GER 92	IST 93	IST 92	hêtre	GER 93	GER 92	IST 93	IST 92	hêtre
irrigué AA	3-478 (1-41)	3-855 (0-76)	3-066 (0-95)	3-999 (0-90)	5-238 (0-97)	0-115 (0-07)	0-210 (0-04)	0-136 (0-059)	0-323 (0-075)	0-186 (0-072)
sec FA	3-342 a (0-81)	3-728 a (0-92)	3-261 a (0-67)	3-621 ab (0-56)	5-406 a (1-70)	0-124 a (0-002)	0-181 a (0-037)	0-148 a (0-034)	0-263 a (0-062)	0-188 a (0-051)
sec NFA	3-232 a (0-62)	3-424 a (0-27)	3-125 a (0-92)	3-758 a (0-67)	5-451 a (1-42)	0-121 a (0-054)	0-183 a (0-025)	0-144 a (0-048)	0-283 a (0-043)	0-206 a (0-057)
sec NFA+25	3-129 a (0-89)	3-417 a (0-80)	2-787 a (0-92)	3-343 ab (0-59)	4-998 a (0-72)	0-114 a (0-044)	0-179 a (0-031)	0-127 a (0-057)	0-272 a (0-051)	0-198 a (0-023)
sec NFA+50	3-173 a (0-91)	2-492 a (0-71)	3-349 a (0-94)	2-839 b (0-53)	4-908 a (1-30)	0-105 a (0-042)	0-125 b (0-038)	0-182 a (0-052)	0-222 a (0-051)	0-188 a (0-043)
irrigué FA	3-053 a (0-71)	3-572 a (0-53)	2-503 a (0-71)	3-541 a (0-76)	5-410 a (0-66)	0-101 a (0-037)	0-209 a (0-038)	0-130 a (0-055)	0-309 a (0-053)	0-240 a (0-018)
irrigué NFA	3-035 a (0-98)	3-434 a (0-58)	2-785 a (0-83)	3-511 a (0-70)	3-153 b (1-04)	0-098 a (0-037)	0-181 a (0-042)	0-127 a (0-039)	0-336 a (0-034)	0-167 b (0-058)
irrigué NFA+25	2-550 a (0-85)	3-094 a (0-45)	2-614 a (0-57)	3-295 a (0-69)	3-563 b (1-06)	0-101 a (0-046)	0-187 a (0-037)	0-130 a (0-043)	0-300 a (0-074)	0-148 b (0-059)
irrigué NFA+50	2-360 a (0-86)	2-416 b (0-49)	2-823 a (0-98)	2-818 a (0-37)	2-859 b (1-11)	0-077 a (0-040)	0-141 b (0-032)	0-131 a (0-064)	0-255 a (0-064)	0-102 b (0-033)
O <sub>3</sub>	ns	***	ns	*	ns	ns	***	ns	*	ns
sécheresse	*	ns	ns	ns	***	*	ns	ns	ns	*
O <sub>3</sub> x sécheresse	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	***

capacité du mésophylle à utiliser le CO<sub>2</sub> (Reich *et al.*, 1986, Temple, 1986); notamment l'efficacité de carboxylation de la Rubisco serait diminuée (Wallin, 1990) ainsi que la régénération du ribulose 1-5 bisphosphate. Par contre la conductance du dioxyde de carbone dans la phase aqueuse pourrait être modifiée mais selon Farquhar & Sharkey (1982) cette conductance aurait un rôle mineur sur la concentration en CO<sub>2</sub> dans les chloroplastes.

Les relations entre la conductance stomatique et l'ozone sont donc très complexes. L'humidité relative, l'intensité lumineuse, la concentration en ozone, l'âge des feuilles et le génotype sont quelques uns des facteurs qui influencent les effets de l'ozone sur la conductance stomatique (Reich & Lassoie, 1984; Jensen & Roberts, 1986; Keller & Häsler, 1987). Ces différentes études suggèrent que l'ozone pourrait directement perturber la fonction stomatique aussi bien qu'altérer la conductance au travers d'une limitation de la fixation du CO<sub>2</sub>.

Seule Maier-Maercker (1989) propose un mécanisme d'action sur les stomates par déliquescence des cellules subsidiaires et des cellules de garde entraînant:

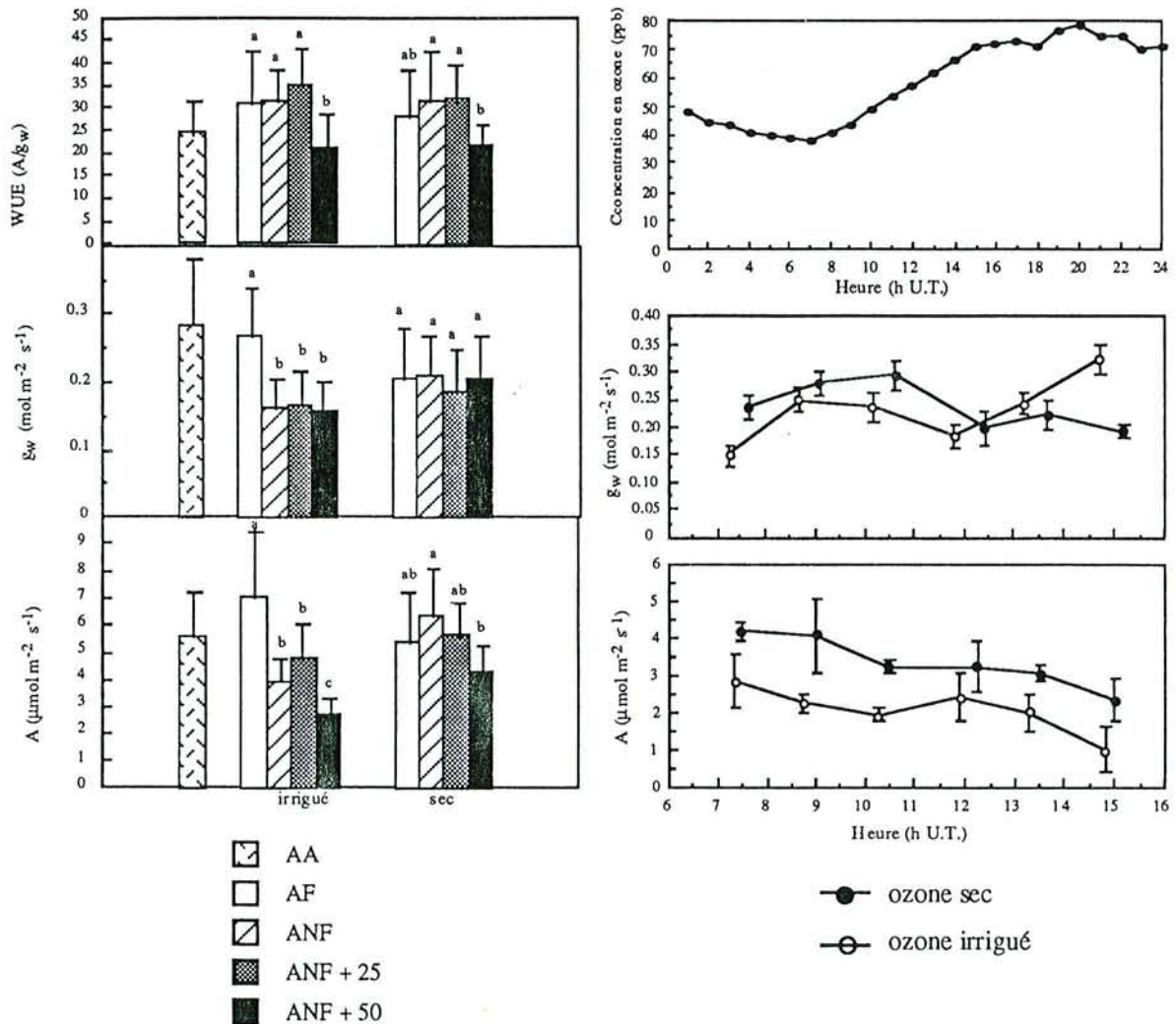
- une diminution de la transpiration pérystomatique et donc une perte de sensibilité des stomates aux variations des conditions d'évaporation,
- une perturbation de la régulation stomatique,
- une sensibilité accrue à des épisodes de sécheresse.

Aussi, Heath (1994) propose que l'ozone pourrait inhiber les pompes K<sup>+</sup>/ATPases et ainsi réduire la turgescence des cellules de garde et diminuer la conductance. L'annexe 7 (page 127) résume les différentes hypothèses de l'action de l'ozone sur les cellules de garde.

A partir de nos expérimentations, nous avons constaté les résultats suivants: les aiguilles de 1 an du clone Istebna sont caractérisées par une conductance stomatique élevée (0,10 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); cette dernière permettrait la pénétration d'un flux d'ozone plus important à l'intérieur des feuilles. En présence d'ozone, il semblerait que le clone Istebna parvienne à diminuer cette conductance pour limiter cette entrée sans pour autant limiter son taux d'assimilation nette de CO<sub>2</sub>. En ce qui concerne le clone Gérardmer, il ne réagit pas en fermant ses stomates et les fortes teneurs en ozone (ANF + 50) qui pénètrent, peuvent perturber les systèmes photosynthétiques.

Les dosages des teneurs en chlorophylles (tableau 3, annexe 2 : tableau 1, page 62) concordent avec les observations faites précédemment, quelle que soit l'expression des résultats considérée (par rapport au poids sec ou par rapport à la surface). Cependant il faut interpréter ces valeurs avec précautions, notamment lorsqu'il s'agit d'une éventuelle corrélation entre le taux de photosynthèse et celui de chlorophylles comme celle mise en évidence par Wallin (1990). En effet la chlorophylle est présente certainement en quantité supérieure à ce que la plante a réellement besoin pour assurer sa photosynthèse normale (Barnes, Dreyer, communications personnelles).

Figure 8: Evolution de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, de la conductance stomatique à la vapeur d'eau et de l'utilisation de l'efficacité de l'eau chez le hêtre (les valeurs représentent la moyenne de mesures faites sur 10 jours en juillet et août 1993 entre 07 et 09 heures GMT (n=20), ainsi que celles de la cinétique journalière (18 août 1993) de la conductance, de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et des concentrations d'ozone. Les conditions microclimatiques moyennes étaient les suivantes: T°: 17,86 ± 4,84 °C; déficit de pression de vapeur d'eau: 1,2 ± 0,14 kPa; humidité relative dans la chambre de mesure: 56,23 ± 11,67 %; densité de flux de photons photosynthétiquement actif: 885 ± 268 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Les résultats du test d'égalité de Student-Newman et Keuls sont représentés par les lettres (l'ordre alphabétique désigne la décroissance des valeurs et la différence des lettres indique la différence significative des moyennes).





Chez le hêtre, l'ozone provoque une diminution de la conductance jusqu'à un niveau seuil qui ne varie pas si les concentrations augmentent davantage (figure 8; annexe 2 : figure 5, page 62). Par contre l'assimilation nette diminue d'autant plus que la concentration en ozone augmente, traduisant alors une atteinte des systèmes photosynthétiques. L'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau baisse en conséquence.

#### b) Teneurs minérales

L'action de l'ozone ne se limite pas à la partie aérienne, elle peut affecter indirectement le système racinaire (réduction de la biomasse des racines)(Cooley & Manning, 1987). L'ozone n'agit pas directement sur les racines car il ne pénètre pas dans le sol (Turner *et al.*, 1973).

Heggstad *et al.* (1988) émettent l'hypothèse qu'à la suite d'une réduction de la photosynthèse et donc d'une diminution de la concentration en assimilats, le système racinaire serait affecté en priorité. De même, McLaughlin & McConathy (1983) ont montré que l'ozone réduisait la fixation du carbone mais entraînait également une redistribution des assimilats disponibles au profit des jeunes feuilles plutôt qu'au niveau des racines ou des feuilles plus âgées. Ce phénomène constituerait un mécanisme adaptatif à l'échelle de la plante entière permettant de maintenir un taux de croissance relative mais aussi de réparer les tissus foliaires endommagés. Plusieurs études indiquent que les concentrations ambiantes d'ozone pourraient altérer le flux de carbone, notamment au niveau des racines (Tingey *et al.*, 1976; McLaughlin *et al.*, 1982; Spence *et al.*, 1990). En particulier une insuffisance de distribution de saccharose dans les racines pourrait réduire la vigueur du système racinaire et augmenter la susceptibilité des arbres à d'autres facteurs comme la sécheresse.

Pour des niveaux de pollution plus importants, les dégâts sur les capacités photosynthétiques de la plante sont tels que toute adaptation est insuffisante.

Si le système racinaire est affecté comme nous l'avons vu précédemment, on aurait pu s'attendre à observer une baisse des éléments minéraux dans les feuilles. Or nous avons observé le phénomène inverse pour l'ensemble des éléments minéraux chez les deux clones d'épicéas et chez le hêtre (excepté pour le potassium qui baisse) (annexe 3: tableau 1, page 83). Barnes & Pfirmann (1992) et Lucas *et al.* (1993) expliquent cette augmentation par l'hypothèse d'une stimulation de l'utilisation des ions par les racines.

Ces changements dans les concentrations en éléments minéraux pourraient également être le résultat d'un effet direct de l'ozone au niveau des feuilles et notamment au niveau de la perméabilité membranaire des cellules (annexe 7, page 127). Heath & Castillo (1988), Chevone *et al.* (1990), Fink (1991) ont proposé différents mécanismes: l'ozone augmenterait la perméabilité des membranes (Heath & Frederick, 1979); il pourrait aussi altérer les propriétés physiques de celles-ci (Pauls & Thompson, 1981). Généralement le transport du saccharose, métabolite majeur véhiculé via le phloème, est un processus qui requiert de l'ATP et l'intégrité fonctionnelle des membranes cellulaires et qui implique la présence d'ions K<sup>+</sup> (Giaquinta, 1983). Heath & Castillo (1988) pensent que ces modifications ont une grande importance

pour le transport des ions  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  et suggèrent que l'ozone pourrait être à l'origine d'une augmentation de  $Ca^{2+}$  libre dans le cytoplasme pouvant devenir néfaste pour la cellule. Cette augmentation de la teneur foliaire en calcium pourrait agir sur le fonctionnement des stomates (fermeture) bien que cette action ne soit pas clairement mise en évidence au niveau des mesures de conductance comme chez *Commelina communis* par Ruiz & Mansfield (1994).

Ces changements dans les éléments minéraux pourraient également être dus à une remobilisation des éléments à partir des organes les plus sénescents.

L'ozone influencerait également les mycorhizes indirectement par l'intermédiaire d'un changement du métabolisme de l'arbre. D'autre part, Fink (1991) indique que le processus d'exportation du calcium en excès hors de la cellule mésophyllienne, caractérisant les conifères, serait perturbé par l'ozone.

## 2) Effets de la sécheresse

### a) Echanges gazeux foliaires

Les deux clones d'épicéa ainsi que les hêtres répondent à une diminution de la disponibilité en eau du sol, évaluée à l'aide du potentiel hydrique de base (- 0,82 MPa), par une réduction de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (figures 6, 8; annexe 2 : figures 3, 4, 5, pages 61 et 62) accompagnée d'une diminution du taux d'assimilation nette de  $CO_2$ , ce qui suggère une limitation stomatique de la photosynthèse.

Dans le tableau suivant, nous indiquons les baisses en % de  $g_{sw}$  et A avec la sécheresse (en condition "air filtré"):

Plants	baisse de $g_{sw}$	baisse de A
Istebna 1993	- 41 %	- 23 %
Istebna 1992	- 65 %	- 36 %
Gérardmer 1993	- 20 %	- 21 %
Gérardmer 1992	- 49 %	- 43 %
Hêtre	- 23 %	- 23 %

Nous remarquons que les baisses de  $g_{sw}$  et de A sont du même ordre de grandeur à l'exception des deux années du clone Istebna pour lesquelles le pourcentage de baisse de A est nettement inférieur à celui de  $g_{sw}$ . En effet, chez ce clone la diminution de  $g_{sw}$  en réponse à un dessèchement du sol est beaucoup plus marquée que la baisse de A, et ceci pour les deux années. Le clone Istebna a donc une fermeture stomatique traduisant un caractère plus évitant que le clone Gérardmer vis à vis de la sécheresse. Ceci a pour conséquence une augmentation substantielle de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau ( $A/g_{sw}$ ).

Une telle réponse est habituellement considérée comme un caractère adaptatif à des conditions de faible disponibilité en eau (Schulze & Hall, 1982). Mais selon Ni & Pallardy (1991) de hautes valeurs de WUE seraient au contraire désavantageuses (en effet dans le cas de sécheresses extrêmes, l'eau du sol pourrait être utilisée par d'autres plantes). Pour Farquhar *et al.* (1989) l'efficacité d'utilisation de l'eau serait déterminée en partie génétiquement. La différence d'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau observée entre Istebna et Gérardmer lors de la sécheresse est significative et pourrait expliquer les meilleures performances d'Istebna en période de sécheresse.

Bien que simultanée à la diminution de  $g_{sw}$ , la baisse de A pourrait également résulter de limitations mésophylliennes (d'origine biochimique ou biophysique) ou d'une augmentation de la résistance à la diffusion du  $CO_2$  dans la phase liquide. Epron (1993) envisage trois hypothèses pour expliquer les limitations d'origine biochimiques: l'acide abscissique (ABA); un arrêt de croissance qui se répercuterait sur la translocation des assimilats et sur l'activité des enzymes chloroplastiques; l'acidification du stroma (l'effet protecteur des fortes concentrations en  $K^+$  pourrait accréditer cette hypothèse). Une concentration extrachloroplastique en  $K^+$  favorise l'alcalinisation du stroma.

Sage & Reid (1994) indiquent différentes possibilités de limitation de la diffusion du  $CO_2$  dans le mésophylle comme par exemple l'augmentation du nombre de chloroplastes.

#### *b) Teneurs minérales*

Dans une étude précédente (Le Thiec *et al.*, 1994 *b*; annexe 4, page 86) nous avons mis en évidence la corrélation entre les variations des concentrations en potassium dans les cellules de garde des stomates et les conductances stomatiques (augmentation du potassium entraînant une augmentation de la conductance stomatique: Laffray, 1987; McRobbie, 1988, Garrec *et al.*, 1991).

La sécheresse est responsable de la diminution des conductances stomatiques avec parallèlement une diminution des teneurs en potassium (*annexe 3 : tableau 2*, page 84). Dans l'annexe 4 (*figure 5*, page 89) nous indiquons une corrélation entre l'augmentation des concentrations en calcium des cellules de garde et la sécheresse, chez le clone Istebna. Cependant, ce phénomène ne s'est pas produit pour le clone Istebna du Col du Donon, cela pourrait être dû à la différence d'intensité dans les stress hydriques appliqués: -1,5 MPa contre -0,82 MPa ou alors au fait que les arbres utilisés dans l'étude à Montardon (annexe 4, page 86) aient été arrosés avec une eau très enrichie en calcium (Landmann, communication personnelle).

L'hypothèse d'un contrôle de l'ouverture stomatique par l'état hydrique du sol (Gollan *et al.*, 1986) par l'intermédiaire d'un signal hormonal entre les racines et les feuilles (Davies *et al.*, 1990) a été souvent avancée. L'acide abscissique est généralement considéré comme le régulateur stomatique le plus probable (Davies & Zhang, 1991). Même une sécheresse modérée du sol peut stimuler l'accumulation de l'ABA dans les racines superficielles (Zhang & Davies, 1989).

Il a été également trouvé que, lorsque l'ABA provoquait une fermeture des stomates, il y avait une réduction de l'accumulation des ions  $K^+$  dans les cellules de garde. Willmer (1983) a suggéré que les

effets de l'ABA étaient fortement liés au transport de  $K^+$ . Cette expulsion des ions  $K^+$  hors des cellules de garde dépendrait d'un métabolisme énergétique (Weyers *et al.*, 1982). L'ABA peut également interagir avec les ions calcium, le calcium lui-même pouvant causer une perte de turgescence des cellules de garde (Mansfield *et al.*, 1990). Le calcium agirait par une augmentation intracellulaire de sa concentration, résultant d'une augmentation de sa concentration apoplastique puis d'une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique aux ions  $Ca^{2+}$ . Lorsque l'ABA arrive au niveau de la surface de la cellule de garde, il agirait comme un premier messenger et provoquerait l'ouverture des canaux calcium de la membrane plasmique; à ce moment les ions  $Ca^{2+}$  agirait en second messenger en entrant dans la cellule (annexe 7, page 127).

D'une manière plus générale, la sécheresse en diminuant la disponibilité en eau du sol diminue l'alimentation minérale et affecte donc les compositions minérales des deux espèces (annexe 3, tableaux 1, 2, 3, pages 83, 84 et 85). Au niveau histologique nous remarquons que les teneurs en potassium diminuent dans le cylindre central et l'endoderme mais augmentent dans le mésophylle des deux clones d'épicéas. Ceci est le fait soit de la baisse de l'alimentation générale en potassium, soit d'un passage plus important du potassium du cylindre central vers le mésophylle via l'endoderme. Chez le hêtre, les concentrations en potassium baissent dans tous les compartiments cellulaires.

Il en est de même pour les concentrations en calcium. Celui-ci augmente dans le mésophylle du clone Istebna mais diminue chez Gérardmer. Fink (1991) explique l'augmentation de cet élément dans les cellules mésophylliennes par le fait qu'il ne peut plus être évacué normalement hors des cellules.

### 3) Interactions ozone - sécheresse

#### a) Les épicéas

Les interactions entre sécheresse et traitement à l'ozone dépendent très fortement de la durée et de l'intensité des deux contraintes. Les résultats présentés dans la littérature sont de ce fait très souvent contradictoires. Ainsi pour Aben (1988) puis Wieser & Havranek (1993), la limitation des échanges gazeux protégerait les plantes contre des stress oxydants en réduisant les flux d'ozone sur l'appareil photosynthétique. Au cours de nos expériences, nous avons constaté que les variations de conductance stomatique enregistrées au niveau des aiguilles de l'année soumises à l'ozone et au stress hydrique sont similaires aux variations enregistrées chez les arbres soumis à des conditions hydriques non stressantes, excepté pour le traitement ANF + 50 pour lequel la fermeture stomatique est plus importante. Cependant, dans le traitement ANF + 50, le taux de photosynthèse est réduit au même niveau que celui du traitement AF, ce qui explique la baisse enregistrée de l'efficacité d'utilisation de l'eau (figure 6, annexe 2 : figure 3, page 61). La mise en oeuvre d'un mécanisme antioxydant pourrait expliquer le taux continuellement élevé de photosynthèse dans les traitements ANF et ANF + 25, comparativement au traitement AF; Freer-Smith, (1993) quant à lui émet l'hypothèse d'une perte partielle des aptitudes de régulation stomatique suite à un traitement par l'ozone.

Lors de l'étude globale des éléments minéraux, nous avons montré que la sécheresse entraînait une baisse de l'ensemble de ces éléments chez les deux clones. Quant à l'ozone, il provoque une augmentation de calcium et de potassium.

L'interaction ozone - sécheresse se manifeste alors:

- chez le clone Gérardmer, par une augmentation plus forte de la concentration en potassium que lors du traitement ozone seul,

- chez le clone Istebna, par des concentrations en calcium plus faibles que lorsque le traitement sécheresse seule est appliqué. L'effet de la sécheresse semble donc être accentué par l'ozone.

Par contre lors d'une approche histologique, nous ne retrouvons pas ce type d'interaction. Ceci pourrait être le fait que l'approche globale fait appel à l'analyse chimique qui englobe plusieurs compartiments foliaires (la cuticule, les parois cellulaires, le contenu cellulaire, l'hypoderme, les canaux résinifères), tandis que l'approche histologique par microanalyse X ne concerne que le contenu cellulaire (vacuole et cytoplasme) et une partie des parois cellulaires de cellules isolées. La microanalyse X révèle l'existence d'interactions ozone - sécheresse: au niveau de l'épiderme des aiguilles du clone Gérardmer pour le potassium et le calcium et au niveau du potassium mésophyllien et du calcium épidermique et endodermique, chez le clone Istebna. En dehors du fait que les réactions des deux clones à la combinaison des deux stress divergent, il est actuellement difficile d'expliquer, par un mécanisme précis, les différents résultats obtenus.

#### *b) Le hêtre*

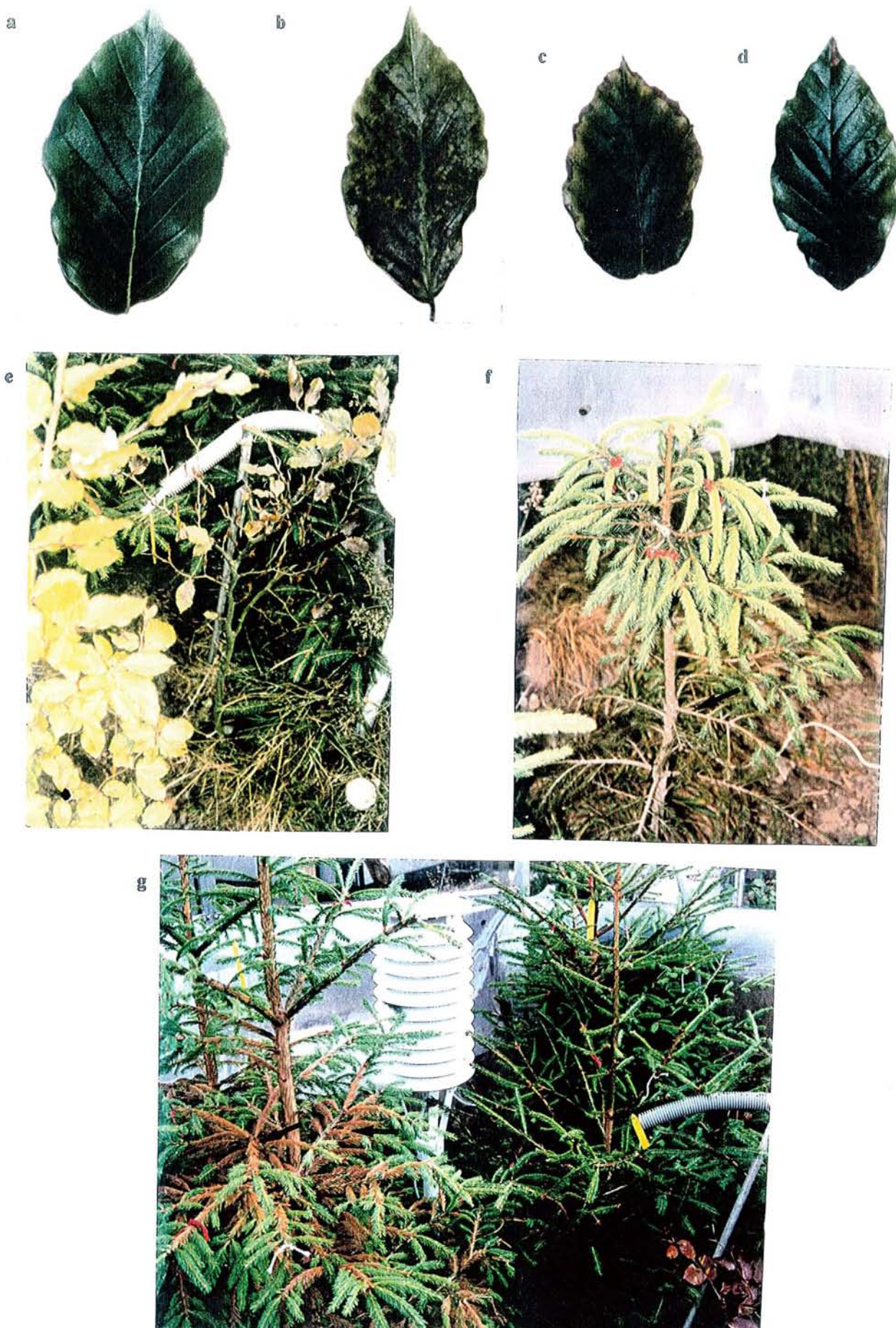
Chez le hêtre, les réponses stomatiques sont très différentes de celles obtenues chez les épicéas. En effet les conductances mesurées après traitements combinés (sécheresse + ozone) sont supérieures à celles mesurées lors des traitements irrigués. Pour expliquer ce phénomène, il faut se rappeler que la sécheresse appliquée est modérée, qu'elle ne provoque pas une fermeture totale des stomates et que nos mesures ont été effectuées le matin. Si l'on regarde l'évolution de la cinétique journalière des conductances, on s'aperçoit que les stomates des arbres non irrigués se ferment l'après-midi alors que ceux des arbres irrigués restent ouverts (figure 8, *annexe 2 : figure 6*, page 62). A ce moment de la journée, les concentrations d'ozone sont les plus fortes (figure 8). Ainsi la fermeture stomatique implique une entrée moindre de l'ozone dans les tissus foliaires et donc une dose cumulée d'ozone plus faible. Le dosage des chlorophylles (*annexe 2 : tableau 1*, page 62) fournit des résultats similaires suggérant que les perturbations dues à l'ozone sont plus faibles lorsque la sécheresse est appliquée. Freer-Smith (1993), Taylor & Dobson (1989) rapportent de tels résultats chez le hêtre.

A un autre niveau d'étude (à l'échelle de la feuille entière), nous avons vu précédemment que la sécheresse provoquait une baisse générale de calcium et de potassium dans les feuilles de hêtre alors que l'ozone provoquait une baisse en potassium mais une augmentation en calcium. La combinaison des deux stress se traduit uniquement par un effet sur le potassium: augmentation des concentrations dans le

Tableau 4 : Résumé des principaux effets de l'ozone et de la sécheresse sur les échanges gazeux et la nutrition minérale chez les deux clones d'épicéa et chez le hêtre. (ns = non significatif).

	Clone Gérardmer		Clone Istebna		Hêtre
	aiguilles de l'année	aiguilles de 1 an	aiguilles de l'année	aiguilles de 1 an	
<b>OZONE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- augmentation de <math>g_w</math> (ns)</li> <li>- augmentation de A</li> <li>- augmentation des teneurs totales en K et Ca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math> (ns)</li> <li>- baisse de A à + 50 ppb</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- augmentation de <math>g_w</math></li> <li>- augmentation de A (ns)</li> <li>- augmentation des teneurs totales en K et Ca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A (ns)</li> <li>- augmentation de WUE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A</li> <li>- baisse de WUE à + 50 ppb</li> <li>- augmentation des teneurs totales en Ca</li> <li>- diminution des teneurs totales en K</li> <li>- nécroses des feuilles</li> <li>- chute précoce des feuilles</li> </ul>
	- diminution de la croissance		- diminution de la croissance		
<b>SECHERESSE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A</li> <li>- augmentation de WUE</li> <li>- baisse des teneurs totales en K et Ca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A</li> <li>- augmentation de WUE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A</li> <li>- augmentation de WUE</li> <li>- baisse des teneurs totales en K et Ca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A</li> <li>- augmentation de WUE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de <math>g_w</math></li> <li>- baisse de A</li> <li>- baisse des teneurs totales en K et Ca</li> <li>- jaunissement en bordure</li> </ul>
<b>OZONE - SECHERESSE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de A à + 50 ppb</li> <li>- baisse de WUE (ns)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- augmentation de <math>g_w</math> (ANF et + 25 ppb)</li> <li>- augmentation de A (ANF et + 25 ppb)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de WUE</li> <li>- baisse des teneurs totales en Ca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baisse de WUE</li> <li>- baisse de A à + 50 ppb</li> <li>- chute des aiguilles à + 50 ppb</li> <li>- brunissement à + 25 ppb</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- effet protecteur de la sécheresse</li> </ul>

**Planche 1** : Représentation des différents symptômes visuels (nécroses, défoliations, colorations) provoqués par l'ozone chez le hêtre et l'épicéa en fin de saison de végétation. a: feuille de hêtre (Air Filtré); b: feuille de hêtre (Air Non Filtré + 50 ppb d'ozone); c: feuille de hêtre (Air Filtré + sécheresse); d: feuille de hêtre (Air Non Filtré + 50 ppb d'ozone + sécheresse); e: chute précoce des feuilles de hêtre (Air Non Filtré + 50 ppb d'ozone); f: chute des aiguilles de la partie basse des épicéas (clone Istebna, Air Non Filtré + 50 ppb d'ozone + sécheresse); g: jaunissement des aiguilles âgées du clone Istebna (Air Non Filtré + 25 ppb d'ozone + sécheresse).



traitement ANF + 50. Lors de l'approche histologique, nous retrouvons cet effet au niveau des cellules de l'épiderme inférieur et des stomates. En effet ces deux types de cellules sont en contact les premières avec l'ozone et elles jouent un grand rôle dans les échanges gazeux entre la feuille et l'atmosphère.

Le tableau 4 nous résume les principaux effets de l'ozone et de la sécheresse sur les deux espèces étudiées.

Les symptômes visuels sont représentés sur la planche 1.

Les photographies a, b, c, d montrent les nécroses sur les feuilles de hêtre en fin de saison. L'ozone (b) provoque des taches brunes nécrotiques internervaires sur toute la surface. La sécheresse (c) provoque un jaunissement et un brunissement en bordure des feuilles. Les effets combinés de la sécheresse avec l'ozone se répercutent par un effet de la sécheresse (jaunissement en bordure); les nécroses dues à l'ozone ne sont plus observables. La sécheresse protège donc le hêtre contre les effets nocifs de l'ozone. La fumigation à l'ozone entraîne aussi une chute précoce des feuilles en fin de saison (e). L'ozone pourrait donc entraîner une sénescence précoce des feuilles.

La chute des aiguilles du clone Istebna (f) dans le traitement à + 50 ppb d'ozone combiné à la sécheresse confirme aussi les résultats des mesures des échanges gazeux, ainsi que le jaunissement et le brunissement des aiguilles âgées du clone Istebna dans le traitement à + 25 ppb d'ozone combiné au stress hydrique (g).



### III. Effet d'une augmentation de CO<sub>2</sub> atmosphérique - Interaction avec une sécheresse

#### 1) Echanges gazeux foliaires

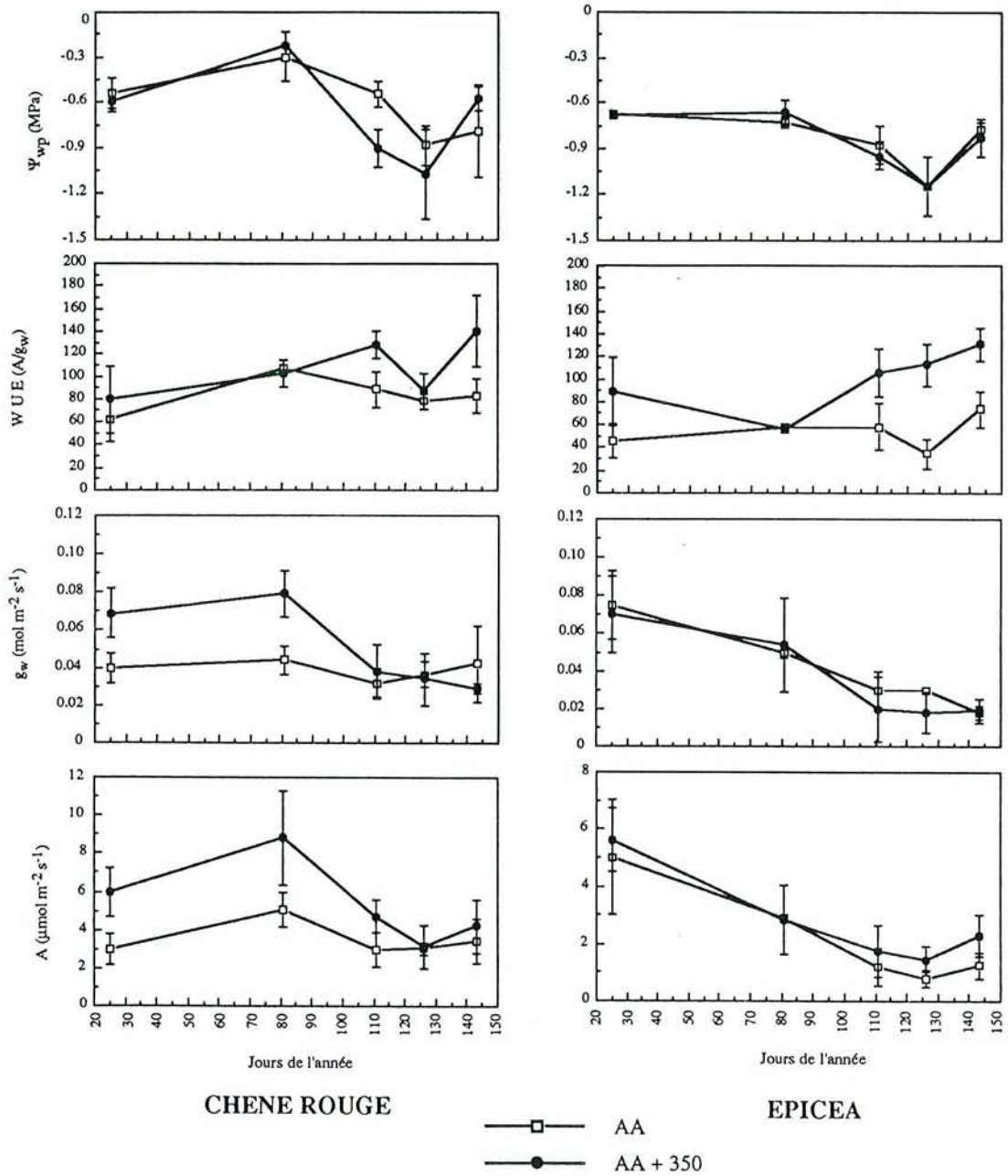
La plupart des expériences sur l'augmentation de CO<sub>2</sub> atmosphérique ont été réalisées avec une concentration de 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  et ont mis en évidence le plus souvent une augmentation de 50% de la photosynthèse des plantes C<sub>3</sub> (Wolfe, 1994). Ce phénomène, comme nous l'avons écrit en introduction, résulte d'une augmentation de la fixation de CO<sub>2</sub> au niveau du site de carboxylation de la Rubisco mais aussi d'une diminution de la compétition avec l'oxygène pour le même site (Mousseau & Saugier, 1992). En effet, en conditions normales, l'oxygène est en compétition avec le CO<sub>2</sub>. En augmentant la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique, le rapport CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> augmente et l'inhibition de la photosynthèse par l'oxygène s'en trouve diminuée (Jensen, 1977).

Les stomates constituent la voie d'entrée du CO<sub>2</sub>. Plusieurs études montrent que la densité stomatique tend à diminuer avec une élévation de CO<sub>2</sub> atmosphérique (Woodward, 1987). Ce changement pourrait affecter l'utilisation du CO<sub>2</sub> mais aussi le taux de perte d'eau de la plante. Nos résultats ne mettent pas en évidence de différences dans la densité stomatique après exposition au CO<sub>2</sub>, quelle que soit l'espèce. De même nous n'avons observé aucun changement dans la taille et le nombre des cellules; les teneurs en chlorophylle n'ont pas changé non plus. Dans notre cas, nous pouvons conclure que l'élévation de la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique n'influence pas les échanges gazeux foliaires par l'intermédiaire du nombre et de la taille des cellules ou des teneurs en chlorophylles.

Les valeurs de conductance stomatique (figure 9, annexe 5 : figure 3, page 96) sont plus élevées dans le traitement ANF + 350 chez le chêne rouge alors qu'elles sont identiques pour l'ensemble des traitements chez l'épicéa. Beadle *et al.* (1979), Barton *et al.* (1993) ont également mis en évidence une augmentation de la conductance stomatique chez l'épicéa de Sitka en présence de fort taux de CO<sub>2</sub>, de même que Norby & O'Neill (1991) et Wullschlegel *et al.* (1992) sur *Liriodendron tulipifera*. Mansfield *et al.* (1990) considèrent pourtant ce fait comme rare.

Généralement, de faibles concentrations en CO<sub>2</sub> atmosphérique provoquent une ouverture stomatique et de fortes concentrations une fermeture (Raschke, 1975; Knapp *et al.* 1994; Townend, 1993). D'autres études (Mott, 1988) révèlent que la réponse stomatique au CO<sub>2</sub> est directement contrôlée par la concentration en CO<sub>2</sub> intracellulaire et non par celle ambiante ou celle à l'intérieur de la cavité sous-stomatique. En réalité trois facteurs seraient déterminants dans la réponse stomatique: les concentrations intercellulaire et ambiante de CO<sub>2</sub> et l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>. Généralement la concentration intercellulaire augmente quand la concentration atmosphérique augmente. Toutefois le changement de concentration intercellulaire dépend également de l'activité photosynthétique et de l'effet rétroactif associé à la réponse de fermeture des stomates suite à l'augmentation de la concentration intercellulaire et atmosphérique.

Figure 9: Evolution du potentiel hydrique de base ( $\Psi_{wp}$ ), de l'efficace d'utilisation de l'eau (WUE) de la conductance stomatique ( $g_w$ ) et de l'assimilation nette de  $CO_2$  (A) chez le chêne rouge et l'épicéa sur le dispositif de Ste-Marguerite au cours de la saison 1993. Les valeurs représentent la moyenne de 6 mesures effectuées entre 07 et 09 heures GMT. La densité de flux de photons photosynthétiquement actif: étaient de  $956 \pm 305 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



Différentes hypothèses du mécanisme de perception par les cellules de garde de l'augmentation de  $C_i$  ont été émises (annexe 7, page 127). Raschke, (1979) suppose que de hauts niveaux de malate (dus à une augmentation de  $CO_2$ ) causeraient une fuite des ions de la vacuole en réduisant la semi-perméabilité du tonoplaste et du plasmalemme. Cette fuite des ions entraînerait une perte de turgescence des cellules de garde et provoquerait ainsi leur fermeture. Un autre mécanisme, proposé par Mansfield *et al.* (1990), fait intervenir des hormones telles que l'ABA, les cytokinines et les auxines. D'autres hypothèses comme des modifications de l'activité des pompes à protons (Edwards & Bowling, 1985) ou des changements dans la photophosphorylation (Melis & Zeiger, 1982) ont également été proposées.

Ainsi, plusieurs modes d'action du  $CO_2$  sur les stomates ont été proposés dans la littérature; mais nous ne savons pas encore clairement et de façon définitive quels sont les effets directs du dioxyde de carbone sur les stomates.

La sensibilité des stomates au  $CO_2$  varie avec les conditions environnementales et les espèces. Ainsi, selon Eamus & Jarvis (1989) la température, la concentration en  $CO_2$ , le déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère, la densité de flux de photons et l'état hydrique des plantes peuvent influencer directement la réponse des stomates à une augmentation de  $CO_2$ .

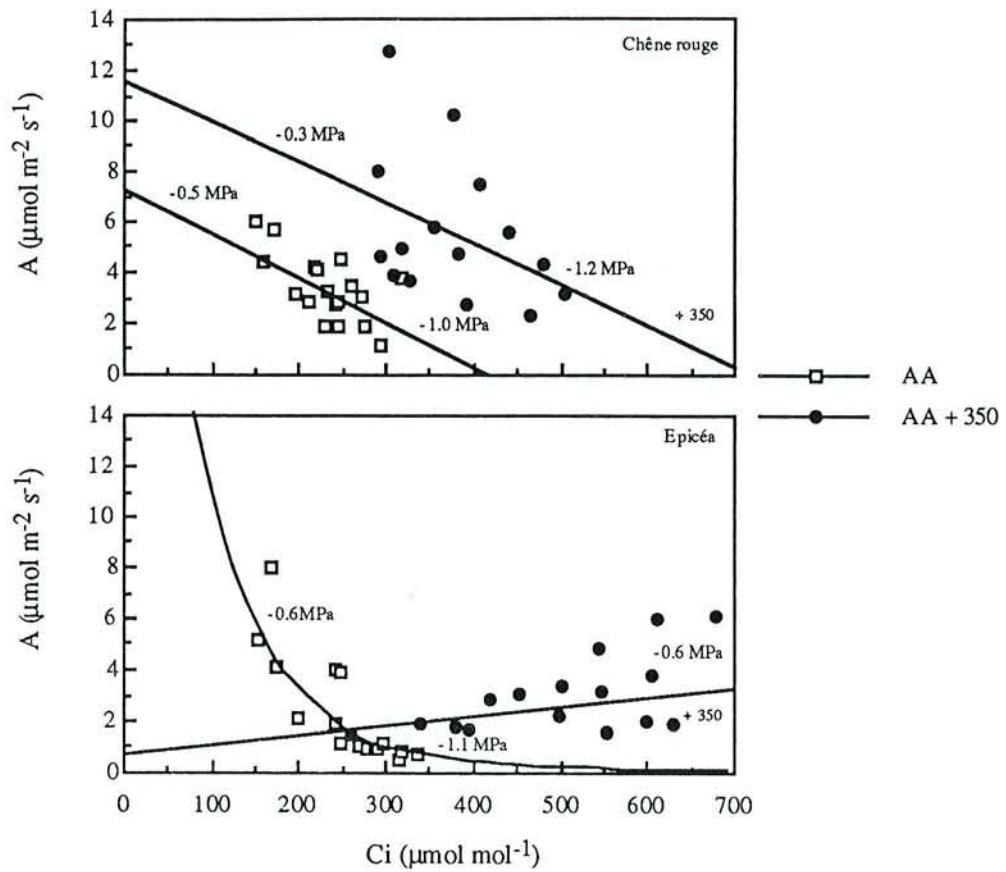
Le taux d'assimilation nette de  $CO_2$  varie de la même façon que les conductances stomatiques chez l'Épicéa et le chêne (figure 9, annexe 5 : figures 3, 4, page 96). Ainsi, l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau ne diffère pas entre les traitements.

Chez le chêne, la comparaison des conductances stomatiques pourrait être faussée par le fait des faibles conductances du traitement ANF. L'effet de la chambre n'est pas en cause car le traitement extérieur a montré les mêmes conductances; de plus, les Épicéas ont des valeurs de conductance et d'assimilation très proches de celles que l'on rencontre dans la littérature en conditions naturelles, à éclaircissement saturant et concentration en  $CO_2$  ambiante (Schulze *et al.*, 1990; Le Thiec *et al.*, 1994 a).

Les mesures que nous avons effectuées l'ont été pendant la deuxième année de fumigation de  $CO_2$ . Le chêne rouge apparaît comme une espèce ne montrant pas le phénomène couramment appelé acclimatation. Sharkey *et al.* (1991) confirment ce fait lors d'une expérience d'une durée de 45 jours. Ainsi, le chêne rouge et d'autres espèces continuent à photosynthétiser davantage après une longue période d'exposition au  $CO_2$ . Ceci peut se faire grâce à un accroissement de la taille ou du nombre des organes de stockage des sucres (feuilles, racines). Cette capacité serait déterminée en partie génétiquement mais aussi contrôlée par l'effet fertilisant de l'azote. Aussi, nous remarquons que le pourcentage d'augmentation du diamètre des troncs augmente fortement la première année de fumigation mais ce n'est plus le cas la deuxième année (annexe 5, tableau 2, page 97); est ce là une adaptation de la plante? De même la croissance apicale des Épicéas est augmentée dans le traitement AA + 350 (annexe 5, figure 5, page 97), ceci traduit certainement un changement dans l'allocation du carbone durant la deuxième année de fumigation.

McConnaughay *et al.* (1993), Wolfe (1994) indiquent que cette capacité à maintenir à long terme de hauts taux photosynthétiques est due au fait que le volume du sol n'est pas restrictif pour les racines.

Figure 10: Evolution des courbes de réponses A en fonction de  $C_i$  chez le chêne rouge et l'épicéa sur le dispositif de Ste-Marguerite au cours de la saison 1993. Les courbes tracées sont polynomiales ou logarithmiques. Les mesures ont été effectuées entre 07 et 09 heures GMT.



Quant au phénomène d'acclimatation, il s'observe généralement dans des expériences où les arbres ont poussé en pots ou sous conditions nutritionnelles pauvres (Kaushal *et al.*, 1989; Ceulemans *et al.*, 1993). Au niveau physiologique, cette acclimatation résulterait d'un excès de sucres ou d'amidon dans les feuilles, lequel inhiberait la photosynthèse par un processus rétroactif (Sage *et al.*, 1989). Stitt (1991), quant à lui, émet l'hypothèse d'une réduction de la concentration en phosphates inorganiques dans les chloroplastes ou d'une baisse de l'activité Rubisco.

Au cours de l'été, une sécheresse s'est imposée naturellement. Les valeurs de potentiel hydrique de base ( $\Psi_{wp}$ ) ont donc diminué en réponse à la diminution de la teneur en eau du sol, pour atteindre une valeur moyenne de -1,2 MPa. Chez le chêne rouge, la chute de  $\Psi_{wp}$  s'est accompagnée d'une réduction de la conductance stomatique pour l'ensemble des traitements avec un effet plus marqué dans le cas du traitement ANF + 350. La réduction concomitante de la photosynthèse s'est faite dans des proportions moindres, favorisant une meilleure efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau, surtout chez les épicéas.

Les résultats que nous obtenons chez l'épicéa soumis à une augmentation de concentration en  $CO_2$  atmosphérique, en période de contraintes hydriques, concordent avec ce que de nombreux auteurs ont trouvé en situation hydrique normale: à savoir, une baisse de la conductance dans le traitement  $CO_2$ , une plus grande assimilation nette de  $CO_2$  et une efficacité d'utilisation de l'eau plus grande (Norby & O'Neill, 1989, 1991; Pettersson & Mc Donald, 1992). En absence de changement dans les conductances, l'augmentation de WUE proviendrait uniquement d'une stimulation de la photosynthèse (Gunderson *et al.*, 1993).

Ceci pourrait confirmer que la réponse des plantes au  $CO_2$  est intimement liée aux conditions d'environnement dans lesquelles se trouvent les racines.

Les changements éventuels dans la concentration intercellulaire de  $CO_2$  en relation avec la baisse de photosynthèse peuvent nous indiquer s'il existe des limitations stomatiques ou non stomatiques de la photosynthèse.

Dans le cas du chêne rouge, la baisse de photosynthèse est associée à une augmentation de  $C_i$  (figure 10); cela suggère que la réduction de l'assimilation nette de  $CO_2$  est due à une limitation non stomatique de la photosynthèse.

Briggs *et al.* (1986) mettent en évidence l'existence d'une limitation non stomatique de la photosynthèse chez des arbres soumis à un stress hydrique. Cette limitation non stomatique pourrait être le résultat d'une capacité moindre du mésophylle à fixer le  $CO_2$  ou d'une augmentation de la résistance à la diffusion du  $CO_2$  dans la phase liquide. Les épicéas de notre dispositif répondent de façon complètement différentes (figure 10) à savoir une baisse de l'assimilation nette de  $CO_2$  associée à une baisse de  $C_i$  pour le traitement AA + 350. Il nous est impossible de l'expliquer. Ainsi les relations entre A et  $C_i$  doivent être interprétées avec les plus grandes précautions.

La plupart des résultats indiquant l'existence de limitations d'origine non stomatique au cours d'une sécheresse édaphique ont été obtenus à partir du calcul de la fraction molaire de  $CO_2$  dans les espaces intercellulaires et de l'analyse des relations entre A et  $C_i$ . Dans une majorité de situations,  $C_i$  augmente,

reste constant ou diminue trop faiblement pour expliquer la réduction observée de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> (Cornic & Miginiac, 1983; Epron & Dreyer, 1990; Weber & Gates, 1990).

De nombreux auteurs ont montré que lors d'une sécheresse, les échanges gazeux n'étaient pas homogènes sur toute la surface foliaire et que cette hétérogénéité pouvait conduire à une surestimation de C<sub>i</sub> (Downton *et al.*, 1988; Sharkey & Seemann, 1989). Par ailleurs C<sub>i</sub> correspond à la concentration en CO<sub>2</sub> existant au niveau des cavités sous-stomatiques et peut être différent de la concentration existant au niveau des chloroplastes (Renou *et al.*, 1990; Cornic & Briantais, 1991). Epron (1993) conclut que "dans la majorité des situations de sécheresse, il n'y aurait pas de limitation d'origine biochimique de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>; celle-ci n'étant limitée que par une augmentation de la résistance à la diffusion du CO<sub>2</sub> entre l'air et le stroma." Cependant, il n'écarte pas l'éventualité d'une origine biochimique par un rétrocontrôle négatif de la baisse de CO<sub>2</sub> dû à la fermeture stomatique sur l'ensemble des réactions biochimiques, notamment la Rubisco.

## 2) Teneurs minérales

La plupart des travaux étudiant l'impact de l'augmentation des concentrations en CO<sub>2</sub> atmosphérique ont mis en évidence une baisse des concentrations foliaires en certains éléments minéraux, corrélée avec une augmentation de croissance (Porter & Grodzinski, 1989; Wolfe, 1994; Ceulemans & Mousseau, 1994). Brown (1991) et Overdieck (1993) ont interprété ce phénomène comme l'effet d'une dilution. L'augmentation du rapport C/N résultant de la baisse en azote traduit effectivement un déséquilibre entre nutrition carbonée et azotée lequel pourrait avoir des conséquences sur les processus photosynthétiques comme la baisse de la quantité de Rubisco (Tissue *et al.*, 1993) ainsi que sur les répartitions des éléments minéraux dans la plante.

L'étude par microanalyse X révèle que les diminutions des teneurs en éléments minéraux corrélées à l'augmentation du taux de CO<sub>2</sub> n'affectaient pas forcément tous les tissus foliaires. Il semblerait que cette réponse diffère avec l'âge des aiguilles chez l'épicéa et selon leur compartimentation. Chez le chêne rouge soumis au traitement ANF + 350, nous avons observé une augmentation des teneurs en potassium dans tous les tissus alors que les concentrations en calcium ont tendance à diminuer. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de CO<sub>2</sub> provoque une augmentation de la croissance et que pour celle-ci le potassium est un élément essentiel, servant notamment aux activités enzymatiques et à la pression de turgescence pour l'élongation cellulaire (Lüttge & Clarkson, 1989). Le calcium serait plutôt mobilisé pour la construction des parois cellulaires (que nous n'analysons pas). La sécheresse quant à elle n'a eu aucun effet.

#### IV. Conclusions - Perspectives

L'analyse des mécanismes des échanges gazeux sur deux clones d'épicéa et sur le hêtre a montré le rôle phytotoxique de l'ozone sur les arbres. Ceci confirme les résultats obtenus auparavant par quelques auteurs (Darrall, 1989, Freer-Smith, 1993, Pearson & Mansfield, 1993) avec la différence suivante: nous avons travaillé sur des arbres âgés de huit ans plantés directement dans le sol et donc soumis à des conditions proches des conditions naturelles, alors que les travaux antérieurs concernaient souvent de jeunes arbres poussant généralement en pots.

Ainsi, les arbres ne subissent aucune condition artificielle (à part la chambre) qui pourrait fausser les résultats et nos interprétations. L'importance de telles précautions est mise en évidence par McConnaughay *et al.* (1993) qui démontrent par exemple que les résultats de certaines études sur l'effet de l'augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique sur des plantes poussant en pot seraient dépendants des conditions de mise en oeuvre des expérimentations.

La mise en oeuvre de traitements avec différentes concentrations d'ozone avait pour but de déterminer éventuellement la concentration d'ozone à partir de laquelle les arbres subissent certains dégâts. Ainsi, dans les aiguilles de l'année des deux clones d'épicéa, les concentrations ambiantes de + 25 ppb et + 50 ppb d'ozone provoquent une légère ouverture stomatique, qui n'est cependant pas significative pour le clone Gérardmer. La réponse est la même quelle que soit la concentration d'ozone appliquée. Pour les aiguilles de ces deux clones soumis à fumigation d'ozone, l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> suit les mêmes tendances que les conductances stomatiques. Cependant, l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> du clone Gérardmer soumis à la plus forte dose d'ozone (+ 50 ppb) n'est pas accrue par rapport au traitement air filtré. Peut être s'agit-il d'une première manifestation de la toxicité de l'ozone et notamment de son action nocive sur la capacité photosynthétique des plantes.

Les résultats décrits précédemment permettent d'émettre deux hypothèses quant aux modes d'action de l'ozone. Soit l'ozone agit directement sur les stomates, soit il agit sur la photosynthèse laquelle interviendrait par la suite sur l'ouverture des stomates (les relations des courbes de A en fonction de C<sub>i</sub> nous permettraient peut être de répondre à cette question). L'ozone reconnu comme un agent oxydant puissant, pourrait causer certains dégâts à l'intérieur des cellules; afin de réparer ces dommages, celles-ci augmenteraient leur assimilation de carbone dans le but de synthétiser soit des composés antioxydants pour détruire les dérivés de l'ozone, soit de réparer directement les détériorations dues à l'ozone.

Les conductances stomatiques des aiguilles de 1 an diminuent fortement pour le clone Istebna de même que les taux d'assimilation nette de CO<sub>2</sub> pour le clone Gérardmer dans le traitement à forte dose d'ozone. Ainsi, ces deux clones répondent par des mécanismes certainement différents à l'augmentation d'ozone. Cette réponse est en rapport avec la dose que les aiguilles reçoivent. L'ozone pourrait agir soit :

- sur les stomates sans changement notable de la photosynthèse,
- sur les stomates et limiter la photosynthèse,
- sur les processus photosynthétiques sans effet rétroactif sur la conductance,
- sur les processus photosynthétiques avec effet rétroactif sur la conductance.

Le clone Istebna, apparemment, met en oeuvre des mécanismes (peut être stomatiques) pour lutter contre les effets de l'ozone alors que le clone Gérardmer semble subir ces effets. Toutefois, ces conclusions demandent à être vérifiées par des mesures supplémentaires, notamment pour mettre en évidence l'origine stomatique ou non de ces éventuelles limitations de la photosynthèse. Ainsi, des mesures de perméabilité des membranes, de fluorescence de la chlorophylle, de dégagements photosynthétiques d'oxygène (système Hansatech par exemple), de concentrations en composés antioxydants, de quantité et d'activité spécifique d'enzymes (Rubisco), ainsi qu'une étude ultrastructurale des tissus foliaires (dont le protocole de préparation est donné en annexe 8, page 128) permettraient de préciser l'action de l'ozone sur les capacités de carboxylation et les photosystèmes des aiguilles et des feuilles. La plupart de ces manipulations sont en cours ou ont été réalisées au cours de l'année 1994.

Chez le hêtre, l'ozone provoque une forte baisse de conductance stomatique jusqu'à un niveau seuil; l'assimilation de carbone quant à elle, diminue d'autant plus que la concentration en ozone augmente. Ces résultats mettent en évidence un effet phytotoxique prononcé de l'ozone sur le hêtre.

En condition de sécheresse, la résistance stomatique des hêtres exposés à l'ozone est plus faible que celle mesurée chez les arbres soumis à l'ozone mais irrigués. Ce phénomène pourrait réduire la pénétration de l'ozone dans les feuilles et ainsi protéger l'arbre des effets nocifs de l'ozone (Tingey & Hogsett, 1985; Reich, 1987). Dans le cas des épicéas (Istebna), le stress hydrique semble par contre aggraver les effets de l'ozone. L'ozone pourrait perturber le contrôle stomatique de la régulation des pertes d'eau (Reich & Lassoie, 1984; Maier-Maercker & Koch, 1991). Il pourrait agir directement sur le fonctionnement des stomates en perturbant la perméabilité des membranes (Heath & Frederick, 1979; Dominy & Heath, 1985). De même l'ozone pourrait aussi agir de façon indirecte sur la composition minérale des feuilles par l'intermédiaire des racines soit par une répartition différente des assimilats, soit par une stimulation de l'utilisation des ions par les racines (Lucas *et al.*, 1993).

Ces résultats suggèrent que de longues expositions à des concentrations réalistes d'ozone pourraient diminuer la croissance des arbres. Des études complémentaires comme celles que nous avons décrites précédemment seraient nécessaires ainsi que des études sur la répartition des assimilats dans les différents organes de l'arbre notamment au niveau des racines, des cinétiques journalières de mesures des échanges gazeux, avant, pendant et après une sécheresse, avec un suivi beaucoup plus affiné des conditions hydriques du sol et de la plante.



L'étude des impacts de l'augmentation des teneurs en CO<sub>2</sub> atmosphérique sur les échanges gazeux et la nutrition minérale des plantes a permis de mettre en évidence des réactions très différentes, d'une espèce à l'autre.

Ainsi: • en conditions non limitantes (en eau et éléments minéraux)

- le chêne rouge montre une augmentation de conductance stomatique et d'assimilation nette de CO<sub>2</sub> en réponse à une augmentation de CO<sub>2</sub> atmosphérique; cette réponse est obtenue après deux ans d'expérience,

- l'épicéa ne montre pas de changement dans la conductance stomatique ni de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>,

- le chêne rouge et l'épicéa montrent une baisse générale en éléments minéraux qui ne se retrouve pas au niveau histologique,

• en conditions limitantes en eau

- les deux espèces: chêne rouge et épicéa ferment leurs stomates et l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> diminue. En condition de stress hydrique et en présence de fortes teneurs en CO<sub>2</sub>, ces réponses se trouvent modulées: les fortes concentrations en CO<sub>2</sub> permettraient une meilleure utilisation de l'efficacité de l'eau, ainsi le CO<sub>2</sub> serait bénéfique pour la plante en situation de sécheresse.

Ces résultats nécessitent cependant encore quelques confirmations, notamment dans la réponse stomatique de chênes rouges. Il serait important de savoir si dans nos conditions, les chênes rouges ne finiraient pas par s'adapter et par retrouver un taux de photosynthèse plus bas; de même une étude plus fine du cycle des éléments minéraux (en particulier de l'azote) est nécessaire, ainsi que des études de la respiration car un changement dans ce taux de respiration pourrait affecter tout le budget carboné de l'arbre. La répartition des assimilats ainsi que celle des éléments minéraux nous aiderait à mieux comprendre ce qui se passe à l'échelle de l'arbre entier. Aussi, nous manquons encore de renseignements sur les réponses ultrastructurales foliaires suite à une exposition à de fortes teneurs en CO<sub>2</sub>. Enfin, il serait intéressant d'essayer de rapporter ces études au niveau d'un écosystème plus important que celui de la chambre à ciel ouvert.

*Handwritten notes:*  
chêne: → gs et → A  
Epicéa  
+ sécheresse → A et → wv

## Références bibliographiques

- Aben JMM. 1988. Estimation of the plant-related resistances determining the ozone flux to broad bean plants (*Vicia faba* var metissa), after long-term exposure to ozone in an open top chamber. In : *Air Pollution and Ecosystems*. (Mathy P, ed.). Reidel D, Publishing Company, 616-619.
- Alsher RG, Amthor JS. 1988. The physiology of free-radical scavenging: maintenance and repair processes. In : *Air Pollution and Plant Metabolism*. (Schulte-Hostede S, Darrall NM, Blank LW, Wellburn AR, eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 94-115.
- Ammerlaan FHM, de Visser AJC. 1993. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on photosynthesis and carbohydrate utilisation: consequences for regrowth of *Lolium perenne*. In : *Climate change: crops and terrestrial ecosystems*. (van de Geijn SC, Goudriaan J, Berendse F, eds.) Agrobiologische Thema's 9, CABO-DLO, Wageningen. 1-22.
- Aussenac G, Finkelstein D. 1983. Influence de la sécheresse sur la croissance et la photosynthèse du cèdre. *Annales des Sciences Forestières* 40: 67-77.
- Aussenac G, Granier A. 1978. Quelques résultats de cinétique journalière du potentiel de sève chez les arbres forestiers. *Annales des Sciences Forestières* 35: 19-32.
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32: 85-100.
- Barnes JD, Pfirrmann Y. 1992. The influence of CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>, singly and in combination, on gas exchange, growth and nutrient status of radish (*Raphanus sativus* L.). *New Phytologist* 121: 403-412.
- Barton CVM, Lee HSJ, Jarvis PGA. 1993. Branch bag and CO<sub>2</sub> control system for long-term CO<sub>2</sub> enrichment of mature Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.]. *Plant, Cell and Environment* 16: 1139-1148.
- Beadle CL, Jarvis PG, Neilson RE. 1979. Leaf conductance as related to xylem water potential and carbon dioxide concentration in Sitka spruce. *Physiologia Plantarum* 45: 158-166.
- Berkowitz GA, Whalen C. 1985. Leaf K<sup>+</sup> interaction with water stress inhibition of non stomatal-controlled photosynthesis. *Plant Physiology* 79: 189-193.
- Bonneau M, Landmann G. 1988. De quoi la forêt est-elle malade? *La recherche* 205: 1542-1553.

- Bonneau M, Landmann G. 1993.** Pollution atmosphérique et dépérissement des forêts dans les montagnes françaises. *Programme DEFORPA - Rapport 1992 - Nancy* : Institut National de la Recherche Agronomique. 365 pp.
- Bréda N. 1994.** Analyse du fonctionnement hydrique des chênes sessile (*Quercus petrae*) et pédonculé (*Quercus robur*) en conditions naturelles; effets des facteurs du milieu et de l'éclaircie. *Thèse de l'Université de Nancy I*. 59 pp.
- Bréda N, Granier A, Barataud F, Moyne C. 1994.** Soil water dynamics in an oak stand. Part I. Soil moisture, water potentials and root water uptake. *Plant and Soil*, sous presse.
- Briggs GM, Jurik TW, Gates DM. 1986.** Non-stomatal limitation of CO<sub>2</sub> assimilation in three species during natural drought conditions. *Physiologia Plantarum* 66: 521-526.
- Brown KR. 1991.** Carbon dioxide enrichment accelerates the decline in nutrient status and relative growth rate of *Populus tremuloides* Michx. seedlings. *Tree Physiology* 8: 161-173.
- Castillo FJ, Heath RL. 1990.** Ca<sup>2+</sup> transport in membrane vesicles from pinto bean leaves and its alteration after ozone exposure. *Plant Physiology* 94: 788-795.
- Ceulemans R, Mousseau M. 1994.** Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on woody plants. *New Phytologist* 127: 425-446.
- Ceulemans R, Perez-Leroux A, Impens I. 1993.** The direct impact of rising CO<sub>2</sub> and temperature on plants, with particular reference to trees. In : *Biological Indicators of Global Change*. (Symoens JJ, Devos P, Rammeloo J, Verstraeten C, eds.). Royal academy of Overseas Sciences Publish, Brussels, 155-171.
- Chevone BI, Seiler JR, Melkonian J, Amundson RG. (1990).** Ozone - water stress interactions. In : *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms* (Alscher RG, Cumming JR, eds.). *Plant Biology* 12: 311-328.
- Cooley DR, Manning WJ. 1987.** The impact of ozone on assimilate partitioning in plants: a review. *Environmental Pollution* 47: 95-113.
- Cornic G, Miginiac E. 1983.** Non stomatal inhibition of net CO<sub>2</sub> uptake by (+/-) abscisic acid in *Pharbitis nil*. *Plant physiology* 73: 529-533.
- Cornic G, Briantais JM. 1991.** Partitioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> reduction in a C<sub>3</sub> leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO<sub>2</sub> concentrations and during drought stress. *Planta* 183: 178-184.

- Coyne PI, Bingham GE. 1981. Comparative ozone dose response of gas exchange in a ponderosa pine stand exposed to long-term fumigation. *Journal of Air Pollution Control Association*. 31: 38-41.
- Coyne PI, Bingham GE. 1982. Variation in photosynthesis and stomatal conductance in an ozone-stressed ponderosa pine stand: light response. *Forest Science* 28: 257-273.
- Darrall NM. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12: 1-30.
- Davies WJ, Mansfield TA, Hetherington AM. 1990. Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. *Plant, Cell and Environment* 13: 709-719.
- Davies WJ, Zhang J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 55-76.
- Dizengremel P, Citerne A. 1988. Air pollutant effects on mitochondria and respiration. In : *Air Pollution and Plant Metabolism* (Schulte-Hostede S, Darrall NM, Blank LW, Wellburn AR, eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 169-188.
- Dizengremel P, Petrini M. 1994. Effects of air pollutants on the pathways of carbohydrates breakdown. In: *Plant responses to the gaseous environment: molecular, metabolic and physiological aspects*. (Alscher R, Wellburn A, eds.). Chapman and Hall, Londres, 255-278.
- Dobson MC, Taylor G, Freer-Smith PH. 1990. The control of ozone uptake by *Picea abies* (L.) Karst. and *P. sitchensis* (Bong.) Carr. during drought and interacting effects on shoot water relations. *New Phytologist* 116: 465-474.
- Dominy PJ, Heath RL. 1985. Inhibition of the K<sup>+</sup>-stimulated ATPase of the plasmalemma of pinto bean leaves by ozone. *Plant Physiology* 77: 43-45.
- Downton WJS, Loveys BR, Grant WJR. 1988. Non uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non stomatal inhibition of photosynthesis. *New Phytologist* 110: 503-509.
- Eamus D, Jarvis PG. 1989. The direct effects of increase in the global atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on natural and commercial temperate trees and forests. *Advances in Ecological Research* 19: 1-55.
- Eberhart JP. 1989. Microscopie électronique à balayage. In : *Analyse structurale et chimique des matériaux. Diffraction des rayons X, électrons et neutrons. Spectrométrie des rayons X, électrons et ions. Microscopie électronique*. Dunod édition Paris. 513-538.

- Edwards A, Bowling DJF. 1985.** Evidence for a CO<sub>2</sub> inhibited proton extrusion pump in the stomatal cells of *Tradescantia virginiana*. *Journal of Experimental Botany* 36: 91-98.
- Epron D, Dreyer E. 1990.** Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis by leaf water deficits in three oak species: a comparison of gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence data. *Annales des Sciences Forestières* 47: 435-450.
- Epron D. 1993.** Effets des déficits hydriques et des forts éclaircissements sur la photosynthèse de jeunes semis de chênes en conditions contrôlées et de chênes adultes en condition naturelles. *Thèse de l'Université de Nancy I*. 57 pp.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989.** Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.
- Farquhar GD, Sharkey TD. 1982.** Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 317-345.
- Fink S. 1991.** Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. *New Phytologist* 119: 41-51.
- Freer-Smith PH. 1993.** The interacting effects of drought and pollution on whole-plant physiology. In : *Effects of air pollution on agricultural crops in Europe. Results of the European open-top chambers project. Air Pollution Research Report 46.* (Jäger HJ, Unsworth M, De Temmerman L, Mathy P, eds.). 307-320.
- Freer-Smith PH, Dobson MC. 1989.** Ozone flux to *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. and *Picea abies* (L.) Karst. during short episodes and the effects of these on transpiration and photosynthesis. *Environmental Pollution* 59: 161-176.
- Freer-Smith PH, Taylor G. 1992.** Comparative evaluation of the effects of gaseous pollutants, acidic deposition and mineral deficiencies on gas exchange of trees. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 42: 321-332.
- Galaup S. 1992.** Etude des effets combinés de l'ozone et de la contrainte hydrique sur la productivité et le fonctionnement stomatique du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivé en chambres à ciel ouvert. *Thèse de l'Université de Paris Val de Marne*. 251 pp.
- Garrec JP, Laitat E, Richardin I, Rose C. 1991.** Dépérissement forestier et perturbations minérales aux niveaux histologique et cellulaire dans les aiguilles de *Picea abies* L. Etude par microanalyse X. *Annales des Sciences Forestières* 48: 321-332.
- Giaquinta RT. 1983.** Phloem loading of sucrose. *Annual Review of Plant Physiology* 34: 347-387.

- Gollan T, Passioura JB, Munns R. 1986. Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 459-464.
- Gunderson CA, Norby RJ, Wullschleger SD. 1993. Foliar gas exchange responses of two deciduous hardwoods during 3 years of growth in elevated CO<sub>2</sub>: no loss of photosynthetic enhancement. *Plant, Cell and Environment* 16: 797-807.
- Hausladen A, Madamanchi NR, Fellows S, Alscher RG, Amundson RG. 1990. Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New Phytologist* 115: 447-458.
- Heagle AS, Kress LW, Temple PJ, Kohut RJ, Miller JE, Heggstad HE. 1988. Factors influencing ozone dose-yield response relationships in open-top field chamber studies. In : *Assessment of Crop Loss from Air Pollutants*. (Heck WW, Taylor OC, Tingey DT, eds.), Elsevier Applied Science, London, New York.
- Heath RL. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 395-431.
- Heath RL. 1987. The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Recent Advances in Phytochemistry* 21: 29-54.
- Heath RL. 1994. Alterations of plant metabolism by ozone. In : *Plant Responses to the Gaseous Environment: molecular, metabolic and physiological aspects*. (Alscher R, Wellburn A, eds.). Chapman and Hall, Londres, 121-145.
- Heath RL, Castillo FJ. 1988. Membrane disturbance in response to air pollutants. In : *Air Pollution and Plant Metabolism* (Schulte-Hostede S, Darrall NM, Blank LW, Wellburn AR, eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 55-75.
- Heath RL, Frederick PE. 1979. Ozone alteration of membrane permeability in *Chlorella*. I: permeability of potassium ion as measured by <sup>86</sup>rubidium tracer. *Plant Physiology* 64: 455-459.
- Heggstad HE, Anderson EL, Gosh TJ, Lee EH. 1988. Effects of ozone and soil water deficit on roots and shoots of field-grown soybeans. *Environmental Pollution* 50: 259-278.
- Heller R. 1977. *Abrégé de Physiologie Végétale*. I. Nutrition. Masson, Paris. 244 p.
- Hinckley TM, Braatne JH. 1994. Stomata. In : *Plant Environment Interactions*. (Wilkinson RE, ed.). Dekker M, Inc., New York, 323-355.

- Hite DRC, Outlaw WH. 1994.** Regulation of ion transport in guard cells. In: *Plant Responses to the Gaseous Environment: molecular, metabolic and physiological aspects.* (Alscher R, Wellburn A, eds.). Chapman and Hall, Londres, 181-195.
- Hofstra G, Ali A, Wukasz RT, Fletcher RA. 1981.** The rapid inhibition of root respiration after exposure of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to ozone. *Atmospheric Environment* 15: 483-487.
- Horntvedt R. 1988.** The effect of acid precipitation on epicuticular wax in Norway spruce and lodgepole pine. *Meddelelser fra Norsk Institutt for Skogforskning* 40: 1-13.
- Jarvis PG. 1989.** Atmospheric carbon dioxide and forests. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society London B.* 324: 369-392.
- Jensen R.G. 1977.** Ribulose 1-5 biphosphate carboxylase oxygenase. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 379-400.
- Jensen KF, Roberts BR. 1986.** Changes in yellow-poplar stomatal resistance with SO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> fumigation. *Environmental Pollution* 41: 235-245.
- Johnsen KH. 1993.** Growth and ecophysiological responses of black spruce seedlings to elevated CO<sub>2</sub> under varied water and nutrient additions. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 1033-1042.
- Keller T, Häsler R. 1987.** Some effects of long-term ozone fumigations on Norway spruce. I. Gas exchange and stomatal response. *Trees* 1: 129-133.
- Kaushal P, Guehl JM, Aussenac G. 1989.** Differential growth response to atmospheric carbon dioxide enrichment in seedlings of *Cedrus atlantica* and *Pinus nigra* ssp. Laricio var. Corsicana. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 1351-1358.
- Knapp AK, Fahnestock JT, Owensby CE. 1994.** Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> alters stomatal responses to variable sunlight in a C<sub>4</sub> grass. *Plant, Cell and Environment* 17: 189-195.
- Laffray D. 1987.** Microanalyse des éléments potassium et chlore dans les cellules stomatiques. Etude comparée de leurs modalités d'action dans les mécanismes du mouvement des stomates. *Thèse de l'Université de Paris Val-de-Marne.* 206 pp.
- Le Thiec D. 1991.** Etude par microanalyse X des perturbations minérales dans les aiguilles d'épicéas (*Picea abies*) dépérissants. Approche quantitative. DESS de microscopie électronique appliquée. *Université de Paris Val-de-Marne.* pp 45.

- Le Thiec D, Dixon M, Garrec JP. 1994 a. The effects of slightly elevated ozone concentrations and mild drought stress on the physiology and growth of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. and beech, *Fagus sylvatica* (L.), in open-top chambers. *New Phytologist* 128 (4), sous presse.
- Le Thiec D, Rose C, Garrec JP, Laffray D, Louguet P, Galaup S, Loosveldt P. 1994 b. Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Canadian Journal of Botany* 72: 86-92.
- Leuning R, Sands P. 1989. Theory and practice of a portable photosynthesis instrument. *Plant, Cell and Environment* 12: 669-678.
- Li-Cor. 1987. Li-6200, technical reference. Li-Cor, Lincoln, U.S.A.
- Logan JA. 1985. Tropospheric ozone: seasonal behaviour, trends, and anthropogenic influence. *Journal of Geophysical Research*: 90D6: 10463-10482.
- Lucas PW, Rantanen L, Mehlorn H. 1993. Needle chlorosis in Sitka spruce following a three-year exposure to low concentrations of ozone: changes in mineral content, pigmentation and ascorbic acid. *New Phytologist* 124: 265-275.
- Ludlow MM. 1989. Strategies of response to water stress. In : *Structural and Functional responses to Environmental Stresses*. (Kreb KH, Richter H, Hinckley TM, eds.) SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, 269-281.
- Lüttge U, Clarkson DT. 1989. Mineral nutrition: Potassium. *Progress in Botany* 50: 51-73.
- Maier-Maercker U. 1989. Delignification of subsidiary and guard cells of *Picea abies* (L.) Karst. by fumigation with ozone. *Trees* 3: 57-64.
- Maier-Maercker U, Koch. 1991. Experiments on the control capacity of stomata of *Picea abies* (L.) Karst. after fumigation with ozone and in environmentally damaged material. *Plant, Cell and Environment* 14: 175-184.
- Malka P. 1988. Etude en chambre à ciel ouvert, des effets de doses subnécrotiques d'ozone et de dioxyde de soufre sur la croissance et le fonctionnement stomatique de *Picea abies*. *Thèse de l'Université de Paris Val-de-Marne*. 225 pp.
- Mansfield TA, Hetherington AM, Atkinson CJ. 1990. Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 55-75.
- Marenco A. 1990. Origine, distribution et évolution à long terme de l'ozone troposphérique. *Pollution Atmosphérique* 128: 421-426.



- Maurice F. 1983. Microanalyse par sonde électronique et spectrométrie de rayons X: interactions électron-matière, émission X. In : *Microanalyse en Biologie* (Quintana C et Halpern S, eds.). Société Française de Microscopie Electronique, Paris, 3-24.
- McConnaughay KDM, Berntson GM, Bazzaz FA. 1993. Limitations to CO<sub>2</sub>-induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia* 94: 550-557.
- McLaughlin SB, McConathy RK, DuVick D, Mann LK. 1982. Effects of chronic air pollution stress on photosynthesis, carbon allocation, and growth of white pine trees. *Forest Science* 28: 60-70.
- McLaughlin SB, McConathy RK. 1983. Effects of SO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on allocation of <sup>14</sup>C-labelled photosynthetate in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 73: 630-635.
- McRobbie EAC. 1988. Control of ion fluxes on stomatal guard cells. *Botanica Acta* 101: 140-148.
- Melhorn H, Seufert G, Schmidt A, Kunert KI. 1986. Effects of SO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on production of antioxidants in conifers. *Plant Physiology* 82: 336-338.
- Melis A, Zeiger R. 1982. Chlorophyll *a* fluorescence transients in mesophyll and guards cells. *Plant Physiology* 69: 642-647.
- Mott KA. 1988. Do stomata respond to CO<sub>2</sub> concentrations other than intercellular? *Plant Physiology*, 86: 200-203.
- Mousseau M, Saugier B. 1992. The direct effect of increased CO<sub>2</sub> on gas exchange and growth of forest tree species. *Journal of Experimental Botany* 43: 1121-1130.
- Ni BR, Pallardy SG. 1991. Response of gas exchange to water stress in seedlings of woody angiosperms. *Tree Physiology* 8: 1-9.
- Norby RJ, O'Neill EG. 1989. Growth dynamics and water use of seedlings of *Quercus alba* L. in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *New Phytologist* 111: 491-500.
- Norby RJ, O'Neill EG. 1991. Leaf area compensation and nutrient interactions in CO<sub>2</sub> enriched seedlings of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *New Phytologist* 117: 515-528.
- Olszyk DM, Tibbitts TW, Herzberg WM. 1980. Environment in open-top field chambers utilized for air pollution studies. *Journal of Environment Quality* 9: 610-615.
- Oren R, Schulze E-D, Matyssek R, Zimmermann R. 1986. Estimating photosynthetic rate and annual carbon gain in conifers from specific leaf weight and leaf biomass. *Oecologia* 70: 187-193.

- Overdieck D. 1993.** Elevated CO<sub>2</sub> and the mineral content of herbaceous and woody plants. *Vegetatio* 104/105: 403-411.
- Pauls KP, Thompson JE. 1981.** Effects of *in vitro* treatment with ozone on the physical and chemical properties of membranes. *Physiologia Plantarum* 53: 255-262.
- Pearman GI. 1988.** Greenhouse gases: evidence for atmospheric changes and anthropogenic causes. In : *Greenhouse Planning for Climatic Change* (Pearmann GI, ed.) EJ Brill, The Netherlands, 3-21.
- Pearson M, Mansfield TA. 1993.** Interacting effects of ozone and water stress on the stomatal resistance of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytologist* 123: 351-358.
- Pell EJ. 1988.** Secondary metabolism and air pollutants. In : *Air Pollution and Plant Metabolism* (Schulte-Hostede S, Darral NM, Blank LW, Wellburn AR, eds.). Elsevier Applied Science, Munich, 222-237.
- Penkett SA. 1988.** Indications and causes of increase in the troposphere. In : *The changing Atmosphere.* (Rowland FS, Isakon ISA, eds.). Wiley Interscience, New York, 91-103.
- Pettersson R, McDonald AJS. 1992.** Effects of elevated carbon dioxide concentration on photosynthesis and growth of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) at optimal nutrition. *Plant, Cell and Environment* 15: 911-919.
- Pierre M, Queiroz O. 1983.** Rapport fin de contrat S.R.E.T.I.E. PA-81-163-2190.
- Polle A, Chakrabarti K, Chakrabarti S, Seifert F, Schramel P, Rennenberg H. 1992.** Antioxidants and manganese deficiency in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.) trees. *Plant Physiology* 99: 1084-1089.
- Polle A, Junkermann W. 1994.** Does atmospheric hydrogen peroxide contribute to damage to forest trees? *Environmental Science and Technology* 28: 812-815.
- Porter MA, Grodzinski B. 1989.** Growth of bean in high CO<sub>2</sub>: effects on shoot mineral composition. *Journal of Plant Nutrition* 12: 129-144.
- Raschke K. 1975.** Stomatal action. *Annual Review of Plant Physiology* 26: 309-340.
- Raschke K. 1979.** Movements of stomata. In : *Physiology of Movements.* (Haupt W, Feinleib ME, eds.). Encyclopaedia of Plant Physiology, Springer Verlag, Berlin, Vol 7: 381-441.
- Reich PB. 1983.** Effects of low concentrations of O<sub>3</sub> on net photosynthesis, dark respiration and chlorophyll contents in aging hybrid poplar leaves. *Plant Physiology* 73: 291-296.

- Reich PB, 1987. Quantifying plant responses to ozone: a unifying theory. *Tree Physiology* 3: 63-92.
- Reich PB, Lassoie JP. 1984. Effect of low level ozone exposure on leaf diffusive conductance and water-use efficiency in hybrids poplars. *Plant, Cell and Environment* 7: 661-668.
- Reich PB, Schoettle AW, Amundson RG. 1986. Effects of low concentrations of O<sub>3</sub>, leaf age and water stress on leaf diffusive conductance and water use efficiency in soybean. *Physiologia Plantarum* 63: 58-64.
- Renou JL, Gerbaud A, Just D, André M. 1990. Differing substomatal and chloroplastic CO<sub>2</sub> concentrations in water stressed wheat. *Planta* 182: 415-419.
- Riederer M, Kurbasik K, Steinbrecher R, Voss A. 1988. Surface areas, lengths and volumes of *Picea abies* (L.) Karst. needles: determination, biological variability and effect of environmental factors. *Trees* 2: 165-172.
- Ruiz LP, Mansfield TA. 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytologist* 127: 473-481.
- Sage RF, Sharkey TD, Seeman JR. 1989. Acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub> in five C<sub>3</sub> species. *Plant Physiology* 89: 590-596.
- Sage RF, Reid CD. 1994. Photosynthetic response mechanisms to environmental change in C<sub>3</sub> plants. In : *Plant-Environment Interactions*. (Wilkinson RE, ed.). Georgia, 413-499.
- Schmitt F, Ruck B. 1987. Flow visualisation studies of aerodynamic characteristics of an open-top chamber. *Environmental Pollution* 48: 223-235.
- Schneider SH. 1989. The greenhouse effect: science and policy. *Science* 243: 771-781.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap measure in plants. *Science* 148: 339-346.
- Schulze ED, Hall AE. 1982. Stomatal responses, water loss and CO<sub>2</sub> assimilation rates of plants in contrasting environments. In : *Physiological plant ecology II : water relations and carbon assimilation*. (Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds.). Springer Verlag, Berlin, 263-324.
- Schulze ED, Mc Craiken I, Zimmermann R, Benecke U. 1990. Performance of two *Picea abies* L. Karst. Stand at different stages of decline. VIII. Photosynthesis and nutrition under polluted and clear air conditions of Germany and New Zealand. *Oecologia* 82: 158-161.

- Sharkey TD, Seeman JR. 1989. Mild water stress effects on carbon reduction cycle intermediates, ribulose biphosphate carboxylase activity and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiology* 89: 1060-1065.
- Sharkey TD, Loreto F, Delwiche CF. 1991. High carbon dioxide and sun/shade effects on isoprene emission from oak and aspen tree leaves. *Plant, Cell and Environment* 14: 333-338.
- Spence RD, Rykiel EJ, Sharpe PJH. 1990. Ozone alters carbon allocation in loblolly pine: assessment with carbon-11 labelling. *Environmental Pollution* 64: 93-106.
- Stewart GR. 1989. Desiccation injury, anhydrobiosis and survival. In : *Plant under stress*. (Jones HG, Flowers TJ, Jones MB. eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 115-130.
- Stitt M. 1991. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741-762.
- Sugahara K. 1984. Effects of air pollutants on light reactions in chloroplasts. In : *Gaseous Air Pollutants and Plant Metabolism*. Butterworths. Proceedings of an International Symposium. August 1982. Oxford (U.K.), 169-180.
- Taylor G, Dobson MC. 1989. Photosynthetic characteristics, stomatal responses and water relations of *Fagus sylvatica* : impact of air quality at a site in southern Britain. *New Phytologist* 113: 265-273.
- Temple PJ. 1986. Stomatal conductance and transpirational response of field-grown cotton to ozone. *Plant, Cell and Environment* 9: 315-321.
- Terashima I, Wong SC, Osmond CB, Farquhar GD. 1988. Characterisation of non-uniform photosynthesis induced by abscisic acid in leaves having different mesophyll anatomies. *Plant Cell Physiology* 29: 385-394.
- Tingey DT, Wilhour RG, Standley C. 1976. The effect of chronic ozone exposures on the metabolite content of ponderosa pine seedlings. *Forest Science* 22: 234-241.
- Tingey DT, Hogsett WE. 1985. Water stress reduces ozone injury via a stomatal mechanism. *Plant Physiology* 77: 944-947.
- Tissue DT, Thomas RB, Strain BR. 1993. Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrients on photosynthesis and rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant Cell and Environment* 16: 859-865.
- Townend J. 1993. Effects of elevated carbon dioxide and drought on the growth and physiology of clonal Sitka spruce plants (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Tree Physiology* 13: 389-399.

- Turner NC, Rich S, Waggoner PE. 1973. Removal of ozone by soil. *Journal of Environmental Quality* 2: 259.
- Tyree MT, Jarvis PG. 1982. Water in tissues and cells. In : *Physiological Plant Ecology. B.* (Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds.). Springer-Verlag, Berlin, 37-77.
- Tyree MT, Wilmot TR. 1990. Errors in the calculation of evaporation and leaf conductance in steady-state porometry: the importance of accurate measurement of leaf temperature. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 1031-1035.
- Ulrich E. 1990. Que peut-on conclure des mesures de polluants gazeux réalisés à la tour du Donon? (massif forestier des Vosges). Rapport DEFORPA. Ecole nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France. 107 pp.
- Unsworth MH, Heagle AS, Heck WW. 1984. Gas exchange in open-top field chambers I and II. Resistance to ozone uptake by soybeans. *Atmospheric Environment* 18: 373-385.
- Von Caemmerer S, Farquhar GD. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
- Wallin G. 1990. On the impact of tropospheric ozone on photosynthesis and stomatal conductance of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. *Thèse de l'Université de Göteborg*. pp 52.
- Weber JA, Gates DM. 1990. Gas exchange in *Quercus rubra* (northern red oak) during a drought: analysis of relations among photosynthesis, transpiration, and leaf conductance. *Tree Physiology* 7: 215-225.
- Weyers JDB, Paterson NW, Fitzimons PJ, Dudley JM. 1982. Metabolic inhibitors block ABA-induced stomatal closure. *Journal of Experimental Botany* 33: 1270-1278.
- Wieser G, Havranek WM. 1993. Ozone uptake in the sun and shade crown of spruce : quantifying the physiological effects of ozone exposure. *Trees* 7: 227-232.
- Willmer CM. 1983. *Stomata*. Longman. London and New York. pp 166.
- Wolfe DW. 1994. Physiological and growth responses to atmospheric carbon dioxide concentration. In : *Handbook of Plant and Crop Physiology*. (Pessarakli M, ed.). Dekker M, Inc., New York, sous presse.
- Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD. 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282: 424-426.

- Woodward FI. 1987.** Stomatal numbers are sensitive to increase in CO<sub>2</sub> from pre-industrial levels. *Nature* 327: 617-618.
- Wullschleger SD, Norby RJ, Hendrix DL. 1992.** Carbon exchange rates, chlorophyll content, and carbohydrate status of two forest tree species exposed to carbon dioxide enrichment. *Tree Physiology* 10: 21-31.
- Yang YS, Skelly JM, Chevone BI, Birch JB. 1983.** Effects of long-term ozone exposure on photosynthesis and dark respiration of eastern white pine. *Environmental Science Technology*, 17: 371-373.
- Zhang J, Davies WJ. 1989.** Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell and Environment* 12: 73-81.

## Liste des documents fournis en annexes

- Annexe 1 :** Le Thiec D, Dixon M. (1994). *Intérêt des chambres à ciel ouvert pour l'étude de l'impact de la pollution atmosphérique sur les végétaux*. Colloque pollution atmosphérique à l'échelle locale et régionale. 7-9 Décembre 1993. Ecole Normale Supérieure de Cachan (accepté le 15 septembre 1994).
- Annexe 2 :** Le Thiec D, Dixon M and Garrec JP (1994). The effects of slightly elevated ozone concentrations and mild drought stress on the physiology and growth of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. and beech, *Fagus sylvatica* (L.), in open-top chambers. *New Phytologist* **128** (4), sous presse.
- Annexe 3 :** Le Thiec D, Dixon M and Garrec JP (1995). Seasonal and annual variations of potassium and calcium contents in different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst needles and *Fagus sylvatica* (L.) leaves exposed to ozone and mild water stress. *Annales des Sciences Forestières*, sous presse.
- Annexe 4 :** Le Thiec D, Rose C, Garrec JP, Laffray D, Louguet P, Galaup S, Loosveldt P (1994). Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Canadian Journal of Botany* **72**: 86-92.
- Annexe 5 :** Dixon M, Le Thiec D, Garrec JP (1995). The growth and gas exchange response of soil planted Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) and red oak (*Quercus rubra* L.) exposed to elevated CO<sub>2</sub>. and to naturally occurring drought stress. *New Phytologist*, **129** (2), sous presse.
- Annexe 6 :** Le Thiec D, Dixon M and Garrec JP (1994). Seasonal and annual variations of phosphorus, calcium, potassium and manganese contents in different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst needles and *Quercus rubra* (L.) leaves exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Trees*, sous presse.
- Annexe 7 :** Modèle résumant les différentes actions de l'ozone, du dioxyde de carbone, du calcium et de l'acide abscissique sur les mouvements stomatiques.
- Annexe 8 :** Protocole expérimental de préparation des échantillons (feuilles et aiguilles) pour une étude ultrastructurale.

## **Annexe 1**

Intérêt des chambres à ciel ouvert pour l'étude de l'impact de la pollution atmosphérique sur les végétaux.

Le Thiec D, Dixon M. (1995)

Actes du Colloque pollution atmosphérique à l'échelle locale et régionale. 7-9 Décembre 1993.  
Ecole Normale Supérieure de Cachan (accepté le 15 septembre 1994).



**INTERET DES CHAMBRES A CIEL OUVERT POUR L'ETUDE DE  
L'IMPACT DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE SUR LES VEGETAUX**

**Didier LE THIEC et Martin DIXON**

**INRA - Centre de Recherches Forestières de Nancy  
Laboratoire Pollution Atmosphérique  
54280 Champenoux**

## Summary

Open-top chambers allow an experimental manipulation of atmospheric pollution concentrations that is situated between the controlled, reproducible conditions of the laboratory and ecological studies in the field which attribute pollution effects to correlations with genetic, bioclimatic, atmospheric and soil parameters (Sellden et al, 1987). Conditions in the chambers are a little different to those found in natural conditions (notably temperature, light and relative humidity), but this technique is currently the best suited to simulate a desired pollution climate. It allows an *in situ* increase or exclusion (by means of filters) of pollutants. The various advantages and disadvantages of the chambers are discussed.

## Résumé

La technique des chambres à ciel ouvert est un procédé intermédiaire entre les dispositifs permettant de soumettre des plantes sélectionnées à une pollution atmosphérique en conditions entièrement contrôlées et reproductibles en laboratoire et les études écologiques de terrain où à l'inverse l'analyse est tributaire de la variabilité des paramètres génétiques, bioclimatiques, atmosphériques et édaphiques (Sellden et al., 1987). Avec des conditions peu différentes des conditions naturelles (température, éclairage, humidité relative notamment), cette technique est, à l'heure actuelle, la mieux adaptée pour simuler un climat de pollution donné. Elle permet de reproduire *in situ* les effets de la pollution ou au contraire, d'exclure les polluants de l'air ambiant. Les avantages et désavantages des chambres à ciel ouvert sont présentées.

## Introduction

Un des problèmes principaux en écotoxicologie est l'extrapolation à partir d'expériences en laboratoire des situations en plein champ. Beaucoup de ces tests sont effectués sur des individus, or il est impossible ou presque d'extrapoler ces résultats à un écosystème.

D'après Manning et Krupa (1992), pour étudier l'action d'un polluant sur les végétaux il faut :

- décrire la relation dose-réponse.
- confirmer que certains polluants sont les agents primaires de la cause d'un problème observé sur une espèce donnée ou sur un nombre d'espèces, dans une région donnée.
- comprendre le mécanisme de dommage sur des espèces spécifiques et/ou indicatrices de pollution (sensibles ou tolérantes).
- recenser les différentes réponses sur des variétés, cultivars, plant d'altitude ou de ville etc. ...
- analyser la perte de production, incluant aussi la qualité
- analyser la croissance (notamment chez les arbres).
- comprendre le fonctionnement d'un écosystème à petite échelle.
- développer une base de données.

Une plante vivant dans un environnement sans cesse fluctuant peut répondre différemment à l'action d'un polluant. En effet, des facteurs physiques comme les mouvements d'air, la température, la lumière (en intensité et composition spectrale), l'eau (l'humidité relative de l'air, l'humidité du sol) peuvent affecter les réponses des plantes. De même, des facteurs biologiques et culturels comme la diversité génétique, le stade de développement, les pratiques culturales, le milieu de croissance, les pesticides etc.. peuvent modifier cette réponse à un polluant.

Généralement trois méthodologies sont employées pour l'étude de l'impact d'un polluant sur les végétaux:

- des dispositifs d'exposition où l'environnement est contrôlé (système fermé)(ex: serres modifiées, enceintes phytotroniques, chambre de croissance, cuvettes où une partie de la plante est enfermée etc. ... ) (Roberts et al., 1988).
- des dispositifs d'exposition en plein champ (système complètement ouvert)(Colls et Baker, 1988).
- des dispositifs de chambres à ciel ouvert (Jäger et al. 1988).

### Les chambres fermées

Le principal avantage des chambres fermées est le contrôle précis des concentrations des polluants. Ceci est particulièrement important pour les études détaillées des effets de mélange de polluants, des interactions avec des insectes ou des agents pathogènes, des dépôts secs, mais aussi pour les comparaisons à niveaux constants ou fluctuants où une valeur contrôle est requise.

Elles permettent d'aborder l'étude fine des mécanismes d'action des polluants de l'air au niveau de grands processus physiologiques.

Les systèmes fermés en milieu extérieur (serres) sont généralement largement ventilés et n'apparaissent pas modifier énormément les conditions naturelles environnementales mais le contrôle de l'augmentation de la température est difficile à mettre en place et son coût est assez élevé. Les systèmes fermés en laboratoire sont essentiels quand les traitements polluants ont besoin d'être répétés sous des conditions expérimentales identiques ou pour l'étude des interactions climat-pollution. Cependant ces systèmes sont très onéreux en fonctionnement et les conditions de culture sont trop différentes des conditions rencontrées en milieu naturel (principalement au niveau de l'interception des pluies et de l'éclairement).

### Les systèmes en plein champ

Les systèmes d'exposition en plein champ sont souvent utilisés pour étudier l'effet d'une augmentation de polluant atmosphérique sur le développement, la croissance et la production des plantes de culture agricoles. Ils présentent en général quatre avantages:

- pas de changement de quantité d'éclairement solaire, de composition spectrale.
- pas de changement dans la température, dans les flux d'air.
- pas d'altération dans la quantité d'eau reçue.
- baisse des effets de "bordure".

Par contre ces systèmes ont quand même des limitations biologiques, techniques et financières:

- généralement ce sont des systèmes où les niveaux de pollution locale sont très faible.
- mauvais contrôle de l'homogénéité du climat de pollution
- pas de possibilité de filtrer l'air.
- la transpiration de la végétation voisine peut influencer l'humidité relative de l'air.
- très complexe à construire et très onéreux au niveau de la régulation du niveau de pollution.
- limitation en analyse statistique.

## Les chambres à ciel ouvert

Elles ont été développées par Heagle et al. (1973) pour des études à long terme de la pollution atmosphérique sur les plantes céréalières. Elles ont souvent été décrites comme un compromis entre les deux systèmes cités auparavant. Une relative bonne représentativité du climat de pollution et d'autres facteurs environnementaux peut être obtenu.

Il existe deux manières d'utiliser les chambres à ciel ouvert pour étudier les effets des polluants:

- en comparant les traitements avec air filtré (exclusion des polluants) et sans air filtré, il est possible de vérifier si les concentrations ambiantes de polluants sur des sites particuliers sont susceptibles de provoquer des effets visibles sur les plantes ou d'altérer leur croissance (les systèmes en plein champ sont incapables de le tester).

- en injectant des polluants (seul ou en mélange), il est possible de mettre au point et de conduire des expériences (de simulation) destinées à tester des hypothèses (relations cause à effet et dose-réponse).

Cette technique a été éprouvée aux Etats Unis dans le cadre du National Crop Loss Assessment Network (NCLAN), programme d'évaluation des pertes de production des cultures agricoles, pour lequel elle a semblé particulièrement adaptée.

La chambre à ciel ouvert est un système où les conditions expérimentales se rapprochent le plus des conditions naturelles comparativement au système des chambres fermées.

Le principe consiste à isoler à l'aide de parois cylindriques un volume donné dont on peut contrôler parfaitement l'atmosphère. Ainsi les plantes qui se trouvent à l'intérieur bénéficient d'un environnement avec des paramètres proches des conditions naturelles. L'aménagement d'une ouverture au sommet permet d'éviter les phénomènes d'effet de serre.

La chambre (schéma 1, photographies 1 et 2) où les végétaux sont exposés est un cylindre en polyéthylène de 3 m de diamètre et de 2,4 m de hauteur. Un venturi de 40 cm de hauteur est ajouté au sommet du cylindre afin de réduire l'intrusion d'air ambiant par le haut de la chambre et d'homogénéiser les concentrations à l'intérieur de la chambre.

L'air ambiant pulsé à l'aide d'une turbine passe à travers un filtre à particule, puis un filtre à charbon activé de 2,4 m<sup>2</sup> de surface développée. L'air épuré de ses principaux polluants est distribué à l'intérieur de la chambre grâce à un diffuseur circulaire perforé, plaqué le long de la paroi de la chambre. Celui-ci répartit l'air de manière homogène. Le taux de renouvellement de l'air est de 6 fois par minute. On obtient ainsi un système en légère surpression où, en l'absence de vents supérieurs à 3 m/s, l'air s'échappe par l'ouverture sommitale en empêchant l'air extérieur de pénétrer.

Cependant l'utilisation de ces chambres à ciel ouvert introduit un léger changement dans les facteurs environnementaux naturels. Selon Unsworth (1988), l'environnement est significativement différent des systèmes en plein champ. En effet les radiations solaires peuvent être altérées (effet filtre des parois), ce qui peut entraîner un déséquilibre de la balance thermique entre la plante et le sol; les mouvements d'air différents à l'intérieur de la chambre peuvent avoir une influence sur la température de l'air et du sol, sur le taux d'évaporation de la plante. Manning et Krupa (1992) ont décrit quelques avantages et désavantages dans l'utilisation des chambres à ciel ouvert, dont voici les principaux:

avantages	désavantages
- utilisation sur plus de 15 ans (surtout pour les comparaisons entre des traitements air filtré et non filtré)	- problèmes de comparaison des traitements air filtré, non filtré et ambiant
- les plantes de culture agricole peuvent pousser à maturité	- espace limité dans les chambres
- étude des relations dose-réponse	- l'utilisation à long terme peut masquer les effets sur les plantes pérennes et les arbres
- interception de la pluie possible	- effets micro-climatiques (température, humidité, éclaircissement, mouvement d'air)
- mélange de polluant	- usage de pesticides
- plantation en pot ou en plein sol	- problème de pollinisation
- transportable	- emplacement dans la chambre

## Conclusion

La description succincte de ces quelques méthodologies pour l'étude des effets de la pollution atmosphérique sur les végétaux a permis de montrer que chacune d'elles possèdent des avantages et inconvénients. Quoi qu'il en soit la technique des chambres à ciel ouvert semble la mieux adaptée pour étudier "in situ" l'impact des polluants atmosphériques en se rapprochant le plus des conditions naturelles. En particulier elle est actuellement largement utilisée pour étudier les effets de l'augmentation du CO<sub>2</sub> sur les végétaux.

## Bibliographie

- Ashenden TW and McLeod AR. 1993.** Systems for exposing crops to gases. In *CEC. Air Pollution Research Report 46, Effects of Air Pollution on Agricultural Crops in Europe. Results of the European Open-Top Chambers Project. Proceeding of the final symposium of the European Open-Top Chambers Project. 23-25 November 1992, Tervuren, Belgium.* 163-174.
- Colls JJ and Baker CK. 1988.** The methodology of open-field fumigations. In *Air Pollution and Ecosystems. Proceedings of an international symposium hold in Grenoble, France, 18-22 May, 1987.* Edited by Mathy P. D Reidel Publishing Company, Dordrecht. 361-371.
- Heagle AS, Body DE and Heck WN. 1973.** An open-top field chamber to access the impact of air pollution on plants. *Journal of environmental Quality* 2: 365-368.
- Jäger HJ, Weigel HJ, Guderian R, Arndt U and Seufert G. 1988.** Methodological approaches: Part I: Experiments with open-top chambers: results, advantages and limitations. In *Air Pollution and Ecosystems. Proceedings of an international symposium hold in Grenoble, France, 18-22 May, 1987.* Edited by Mathy P. D Reidel Publishing Company, Dordrecht. 327-337.
- Manning WJ and Krupa SV. 1992.** Experimental methodology for studying the effects of ozone on crops and trees. In *Surface level ozone exposures and their effects on vegetation.* Edited by Lefhorn AS. Lewis Publishers, Inc. Chelsea. 93-156.
- Roberts TM, Brown KA and Blank LW. 1988.** Methodological aspects of the fumigations of forest trees with gaseous pollutants using closed chambers. In *Air Pollution and Ecosystems. Proceedings of an international symposium hold in Grenoble, France, 18-22 May, 1987.* Edited by Mathy P. D Reidel Publishing Company, Dordrecht. 338-360.
- Sellden G, Skarby L and Wallin G. 1987.** Consideration of tree growth and metabolism measurements protocols. In *CEC. Air Pollution Research Report 5, Microclimate and plant growth in open-top chambers.. Proceeding of the 2nd European open-top chambers workshop, 17-19 September 1986, Freiburg.* 57-62.
- Unsworth MH. 1988.** Principles of microclimate and plant growth in open-top chambers. In *CEC. Air Pollution Research Report 5, Microclimate and plant growth in open-top chambers. Proceeding of the 2nd European open-top chambers workshop, 17-19 September 1986, Freiburg.* 16-29.

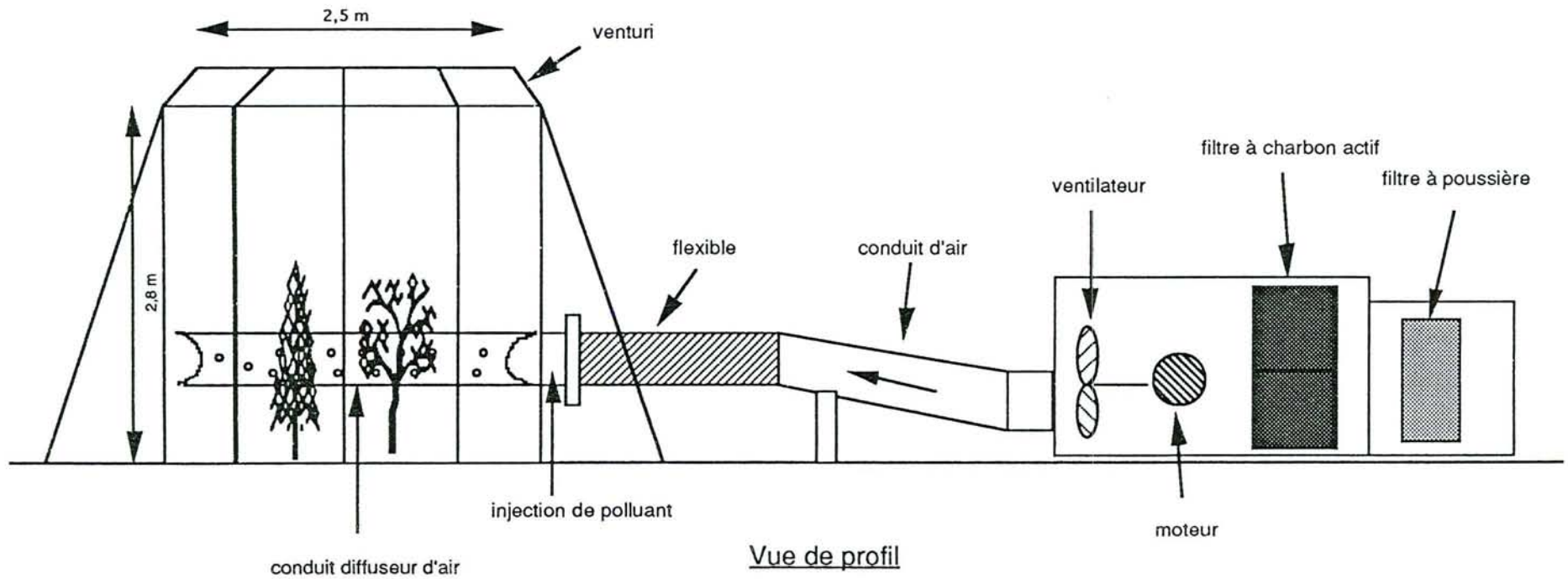
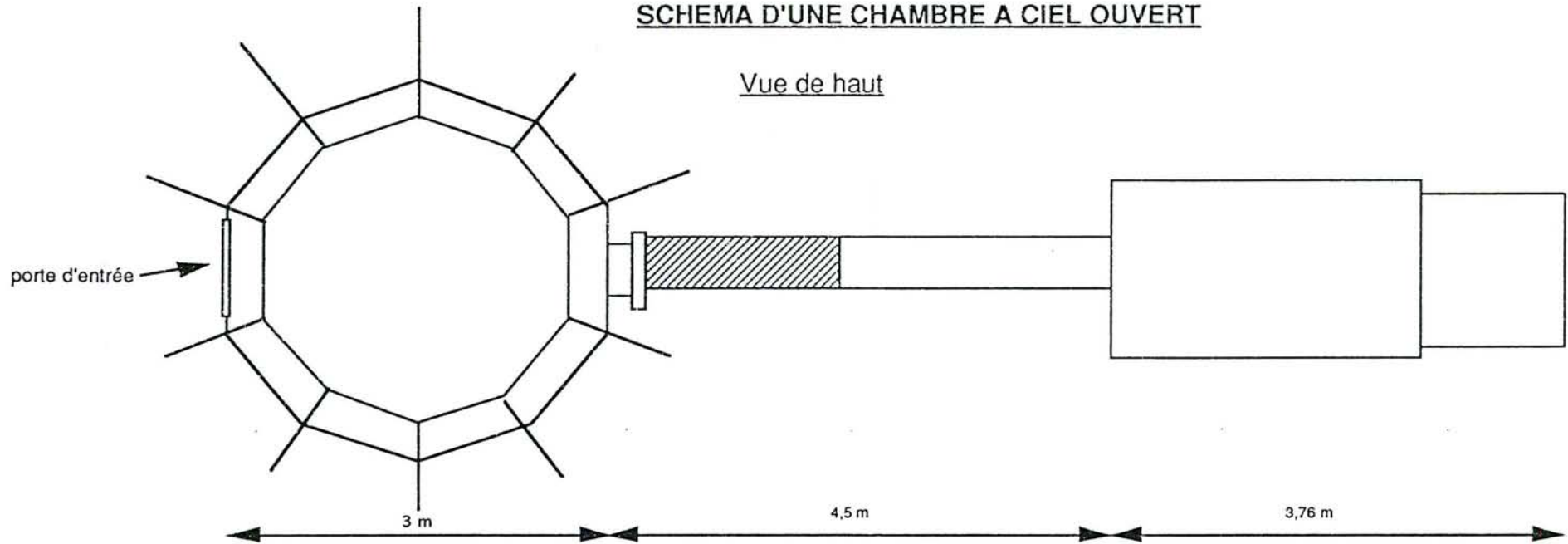
Dispositif expérimental du col du Donon (Vosges) où les effets de l'ozone sur différentes espèces d'arbres sont étudiés grâce à la technique des chambres à ciel ouvert. La photographie du haut représente une chambre à ciel ouvert dans laquelle l'air est filtré. La photographie du bas représente les différents traitements appliqués: air filtré, air non filtré, air non filtré + 50  $\mu\text{g m}^{-3}$ , air non filtré + 100  $\mu\text{g m}^{-3}$ , air ambiant.





# SCHEMA D'UNE CHAMBRE A CIEL OUVERT

Vue de haut



Vue de profil

## **Annexe 2**

The effects of slightly elevated ozone concentrations and mild drought stress on the physiology and growth of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. and beech, *Fagus sylvatica* (L.), in open-top chambers.

Le Thiec D, Dixon M, Garrec JP (1994)

New Phytologist **128** (4)

# The effects of slightly elevated ozone concentrations and mild drought stress on the physiology and growth of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. and beech, *Fagus sylvatica* L., in open-top chambers

BY DIDIER LE THIEC, MARTIN DIXON AND JEAN PIERRE GARREC

*INRA-Centre de Recherches Forestières. Unité Ecophysiologie Forestière-Laboratoire de Pollution Atmosphérique, 54 280 Champenoux, France*

(Received 20 April 1994; accepted 12 July 1994)

## SUMMARY

Two clones of eight-year old trees of Norway spruce and beech, planted directly into the soil and in open-top chambers, were exposed to elevated ozone concentrations and subjected to mild soil drought. When ambient ozone was increased by 50 ppb, the shoot extension of both Norway spruce clones was significantly reduced. The mild drought stress was begun in July 1993 and following a soil-drying associated with a spell of fine weather, the drought remained relatively constant for over a month. During this period, gas exchange parameters were regularly monitored between 7:00 and 9:00 GMT and on two occasions followed throughout the day. Both clones responded to the mild drought by reducing stomatal conductance and photosynthesis. There were no apparent interactions between drought and ozone. The reaction of beech was more complicated. Ozone caused a significant decrease in stomatal conductance and photosynthesis in well-watered treatments. All the ozone-drought stress treated trees had greater stomatal conductance than the non-drought stressed equivalents in the morning, but the situation was reversed as the day went on. As peak ozone concentrations occur in the afternoon, it is hypothesized that over a period of time the drought stressed trees are less affected by ozone as they receive a lower cumulative dose. Coupled with the low values of vapour pressure deficit occurring in the morning, the ozone-treated, drought-stressed trees can support relatively higher rates of photosynthesis than the well-watered equivalents. The chlorophyll contents of beech lent support to this hypothesis, as ozone associated reductions were less marked in drought stressed trees.

Key words: Ozone, drought stress, photosynthesis, stomatal conductance, beech, Norway spruce.

## INTRODUCTION

Present day ozone concentrations in Western Europe are often in excess of levels known to reduce yields and damage crops (Heggstad & Lesser, 1990) and although there is no firm evidence to date, ambient concentrations may well be damaging to trees (Dobson, Taylor & Freer-Smith, 1990). It is widely assumed that with increasing motor traffic and continued economic growth, future ozone episodes will be at even higher levels. Thus the role of ozone in tree physiology and growth and its relation to other stresses must be investigated if we are to understand how increasing concentrations of this pollutant will influence forest trees.

Much work has been performed on the effects of

ozone on tree physiology, although results have often seemed contradictory, as a consequence of differences in experimental conditions and genotypic differences between plants (Darrall, 1989). It is known that ozone reduces photosynthesis, that the effective dose received by the plant can be limited by stomatal closure and that plants possess antioxidants which can protect against the pollutant and its solution products.

Recent interest in ozone has been prompted by the forest decline that became increasingly apparent during the 1980s and in which ozone was widely suspected of playing a major role. The French 'DEFORPA' investigation did, however, suggest that drought stress was the major contributing factor. Prinz, Krause & Jung (1987) noted that symptoms of

forest decline became less severe during wetter years. Because of the importance of drought stress, the investigation of the interactive effects of water stress and ozone should be made a priority, particularly as the predicted climate change may well increase drought frequency. Furthermore, the same anticyclonic weather conditions that give rise to drought stresses also favour the formation of tropospheric ozone.

Work combining ozone and drought stress has been rather rare, particularly concerning trees. Work on crops carried out under the NCLAN field study, particularly on soybean, revealed significant drought/ozone interactions. This was manifested by greater growth reductions in the presence of ozone for well-watered plots (Heggstad *et al.*, 1985; Heagle *et al.*, 1987). The interaction was concentration dependent with lower ozone concentrations (below 70 ppb) promoting root growth and thus alleviating the effects of drought by increasing soil water availability. Adams *et al.* (1990), using twice ambient ozone levels found a decrease in fine root production in loblolly pine, which could leave the trees more susceptible to drought stress. It has also been proposed that ozone can protect plants against drought stress by acting to decrease stomatal conductance. Reich, Schoettle & Amundson (1985) found such a result and Tingey & Hogsett (1985), by using a chemical reagent which caused stomatal opening, obtained similar ozone sensitivities for droughted and well-watered plants. Harkov & Brennan (1980) found that potted hybrid poplar seedlings had less visible ozone damage due to lower stomatal conductances when water stressed. Dobson *et al.* (1990) studying *Picea sitchensis* and Eamus *et al.* (1990) working on *Picea abies* both found that well-watered trees had greater stomatal conductances in the presence of ozone. Recently Pearson & Mansfield (1993) showed that drought-stressed beech trees had relatively greater stomatal conductances when exposed to ozone. There is thus much debate today as to whether stomatal closure can indeed protect against ozone damage by reducing the ozone flux to the internal tissues.

That these results seem so contradictory shows that there is a real paucity of work in this area, particularly field-based work. We present here our results concerning soil-planted trees exposed to summer drought in conjunction with elevated ozone concentrations. We have investigated growth over the season coupled with regular physiological measurements during the period of drought stress.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Plant material and experimental site*

In 1989 a region of mixed Norway spruce-beech forest at Col du Donon in the French Vosges mountains was cleared to make an experimental site.

The site coordinates are 48° 29' N, 7° 05' E, it is 727 m above sea level, and is positioned on a west facing slope.

On 19 April 1990 five-year-old Norway spruce and beech trees were planted into the soil. The soil was classified as 'typic dystrochrept' and there were no deficiencies in N, P, Ca, Mn, K or Mg. The Norway spruce plants [*Picea abies* (L.) Karst.] consisted of two clones: clone one (780371) came from a Polish provenance called Istebna (IST) and clone two (781351) from a French provenance called Gerardmer (GER). The beech trees (*Fagus sylvatica* L.), were not clonal. The trees were supplied by AFOCEL (Association Forêt Cellulose) of France.

Shortly after the trees were planted, eight open-top-chambers (see Impens, 1992 for details of the chambers) were erected enclosing nine trees in each chamber—three beech and three individuals from each of the two Norway spruce clones. Four plots of nine trees outside chambers served as controls. Ambient air was sucked into the chamber at a rate of 120 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>, providing a complete change of air approximately every 10 s. A diffuser gave a more equal distribution of pollutant enriched air in the chamber. The hourly mean daytime temperature difference between the inside of the chamber and the exterior never varied by more than 2 °C.

##### *Treatments*

Ozone was produced by an electric discharge generator (Trailigaz 'LABO 76') supplied with pure oxygen. From 17 July 1992 to 29 October 1992, 25 ppb ozone was continuously added to two of the chambers and 50 ppb to another two. Two chambers were ventilated with non-filtered air, whilst the remaining two were fitted with activated charcoal filters which considerably reduced the ozone levels (by 75% ± 12%). From 30 October 1992 to 30 March 1993 the added concentrations were reduced by 25 ppb. From 31 March 1993, the experimental treatments were repeated and continued until 31 October 1993. Using an 'Environment S.A.' analyzer, the ozone concentration in any one chamber was recorded for two 5-min periods every hour. Photosynthetically active radiation, air temperature and air and soil humidity were also recorded (unpublished data).

Between 27 March and 30 June 1993, work was carried out to allow imposition of a drought stress on the trees. Four chambers representing each treatment were selected and trenches of 70 cm depth dug around them. These trenches served to both reduce the lateral transfer of surface water and to prevent roots growing out of the chamber to obtain water. Sloping roofs of between 4.3 m and 4.5 m high were constructed and covered in clear plastic to prevent rain entering the chambers. The difference in light received between covered and uncovered chambers

was 11%. The drought stress commenced 01 July 1993 and lasted until 20 August 1993.

There were thus the following different treatments: (1) Filtered air: FA; (2) Non-filtered air: NFA; (3) Ambient air, outside chambers: AA; (4) Non-filtered air with 25 ppb ozone added: NFA+25; (5) Non-filtered air with 50 ppb ozone added: NFA+50.

Each of these treatments excepting AA, had a drought-stressed chamber (DS) and an unstressed (well-watered) chamber (NS).

The resistivity of the soil to water gave an idea of soil water content, but in order to have a better estimate of the water available to the plant, frequent measurements of the predawn leaf water potential ( $\Psi_{wp}$ ) were made. These were performed using a Skye pressure chamber (Scholander *et al.*, 1965) on shoots of Norway spruce and beech leaves.

### Growth

Norway spruce shoot extension was intensively monitored until the end of June 1992 (before the addition of ozone), when no further significant growth occurred. The length of the growth apex of the first whorl and of the terminal leader were measured. No significant differences between shoot growth were found (unpublished data). In 1993 both parameters were again monitored prior to the addition of the drought stress to see if ozone affected this component of plant growth.

### Leaf gas exchange

The net  $\text{CO}_2$  assimilation rate  $A$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and leaf conductance to water vapour:  $g_w$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) were measured using the LiCor model 6200 (USA) portable photosynthesis chamber. During the measurement period the following values of microclimatic parameters were obtained: (1) Air temperature in the chamber:  $17.86 \pm 4.84$  °C; (2) Leaf-air vapour pressure difference (VPD):  $1.2 \pm 0.14$  kPa; (3) Relative humidity of the chamber air:  $56.23 \pm 11.67$  %; (4) Photon flux density of photosynthetically active radiation:  $885 \pm 268$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

The differences between roofed and unroofed chambers were only statistically significant for light and temperature. Even so, the temperature difference was less than 1 °C for the 24-hour average.

At the base of a Norway spruce shoot of one-year old (1992) growth, needles were removed to ensure a good seal with the chamber. Starting 5 d later, measurements were made on this same shoot throughout the season in order to reduce the destruction caused when determining the needle surface area. Because there was no further shoot extension it was assumed that the foliage area remained constant. Current-year (1993) growth was

destructively harvested until the end of the shoot extension period, when one shoot was monitored for the rest of the season.

Measurements were made on only six trees per treatment (two from each clone and two beech) to reduce the time taken and thus limit microclimatic variability. These measurements were carried out on one shoot from each clone and four leaves (at the same time) from each beech tree. They were carried out on 10 separate occasions between 7:00 and 9:00 GMT and any one series of measurements never took more than 1 h to complete. On two occasions the measurements were continued at hourly intervals to follow diurnal variations in the measured parameters. The same day as gas exchange measurements were made, the  $\Psi_{wp}$  was also recorded.

To determine the surface area of the measured material required two different methods. Beech leaves were simply traced and these images passed under a video camera coupled to an image analyser (Delta-T devices, UK). Because spruce needles are three dimensional, their surface area is much more difficult to assess. By use of a scanning electron microscope needles were cut into millimetre sections and then the area of each section was traced out. This method allowed a calculation of correlations between dry weight (d.wt, mg), surface area ( $S$ ,  $\text{mm}^2$ ) of the needles. The formulae determined were as follows ( $n = 35$ ):

Istebna current-year needles:

$$S = 2.38((d.wt + 0.033636)/0.159) - 2.7333, r^2 = 0.961.$$

Istebna one-year old needles:

$$S = 2.0096((d.wt + 0.75062)/0.26989) - 2.2885, r^2 = 0.935.$$

Gerardmer current-year needles:

$$S = 3.39((d.wt + 0.60571)/0.23922) - 9.8333, r^2 = 0.961.$$

Gerardmer one-year old needles:

$$S = 2.8151((d.wt + 1.8876)/0.3261) - 8.0781, r^2 = 0.950.$$

### Foliage chlorophyll content

Each month the foliage was analyzed to determine the quantities of chlorophyll *a* and *b*. Analyses were carried out on 2  $\text{cm}^2$  of first flush beech leaf and ten needles from the first three whorls of current-year and one-year old growth of Norway spruce. Care was taken to avoid using plant material that had been excessively shaded. Chlorophyll contents were determined according to the method described in Barnes *et al.* (1992).

### Statistical methods

The statistical treatment employed was the analysis of variance (ANOVA) by the GLM procedure (SAS Institute Inc., 1985). Test of equality of averages using Student-Newman-Keuls was applied equally (the same letters indicate that averages are not significantly different, and the alphabetic order corresponds to decreasing values).

Significance was as follows: ns = not significant; \* = significant ( $P < 0.05$ ); \*\* = highly significant ( $P < 0.01$ ); \*\*\* = extremely significant ( $P = 0.001$ );  $\alpha = 0.05$ .

## RESULTS

### Pollution and environmental factors

Concentrations of  $\text{SO}_2$  and  $\text{NO}_x$  were consistently low (mean  $\text{SO}_2 = 0.5$  ppb, mean  $\text{NO}_x = 2.6$  ppb), whilst ozone levels (45 ppb in summer) have shown annual cycles with the highest concentrations in spring and summer (Fig. 1). Average summer levels in Western Europe are slightly lower (40 ppb) than those recorded at our experimental site. The slight increase probably results from the site's altitude which favours ozone production.

Figure 1 shows the rainfall at the experimental site during the period of plant growth. During the period when the drought-stressed trees were unwatered, there were high levels of rainfall. This relatively high rainfall can perhaps explain the pre-dawn leaf water potential results. Following an initial decrease at the beginning of the drought stress period the potentials remained relatively constant ( $-0.82 \pm -0.11$  MPa;  $n = 104$ ), with no significant differences between species or ozone treatment. Because the trees were planted in the soil, there must have been incursion of soil water from outside the chambers, despite the trenches that were dug to reduce this, or the rooting system of trees was deep enough to obtain water. The  $\Psi_{wp}$  of the non-stressed trees remained between  $-0.05$  and  $-0.2$  MPa. Although when the experiment began, we had intended to follow physiological parameters as soil drought stress increased, because from 08 July 1993 to 20 August 1993 there was so little change in  $\Psi_{wp}$ , we grouped the gas exchange measurements together and considered different measurement days as replicates (providing light was not limiting). When comparing within-treatment differences between the beginning and end of the drought period we found no significant differences for any treatment or controls.

### Growth measurements

The length of the terminal leader for FA, AA and NFA+50 of the Istebna clone during the growing period is shown in Figure 2. The NFA and NFA+25

treatments had almost identical curves to the FA treatment, but have not been shown for the sake of clarity. From this graph it is apparent that a growth reduction as a consequence of a reduced growth rate, rather than any differences in the duration of the growth period, occurred in the NFA+50 treatment. This was statistically significant at the 0.01 level. There is also a growth increase from the chamber effect, which may be due to various factors e.g. light quality or quantity, temperature differences, either

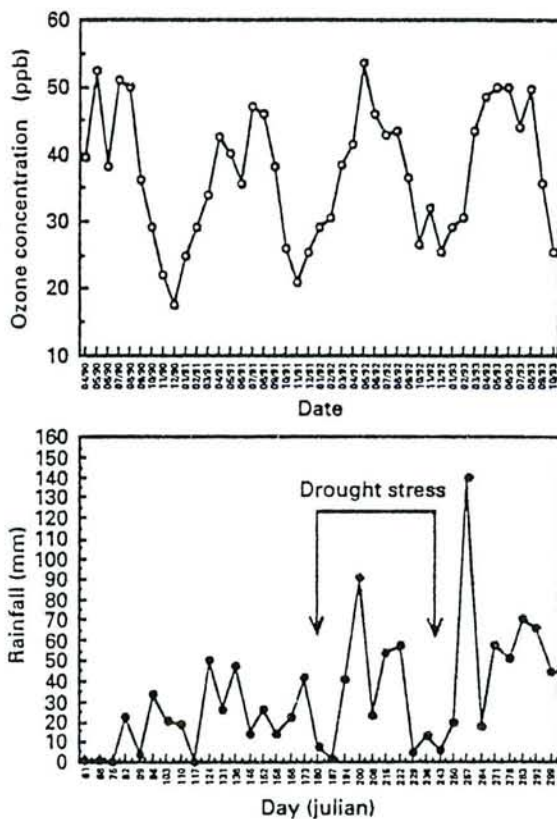


Figure 1. Mean monthly ozone concentrations at Col du Donon, since the plating of the trees and mean weekly rainfall totals for the vegetation period covered by the experiment.

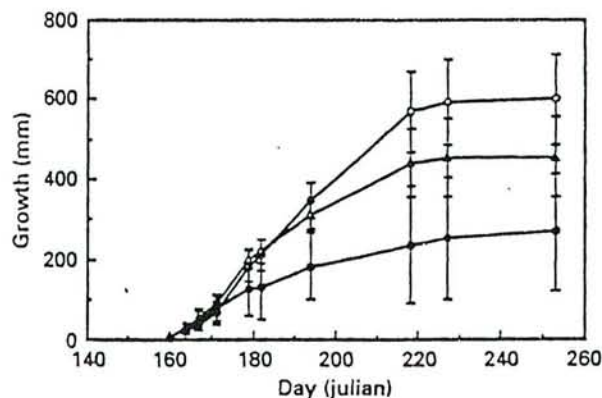
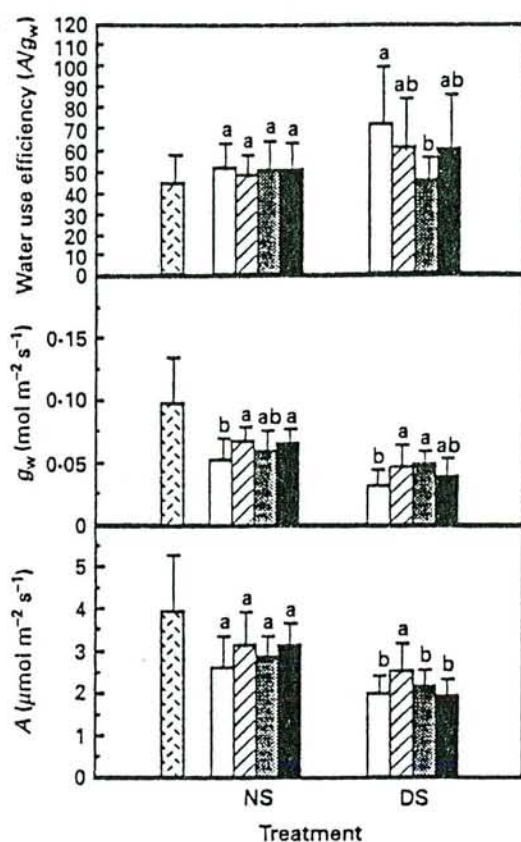


Figure 2. Istebna terminal leader growth curve for 1993 vegetation period. Vertical bars show SD ( $n = 6$ ).  $\Delta$ —, AA;  $\circ$ —, FA;  $\bullet$ —, NFA+50 ppb.

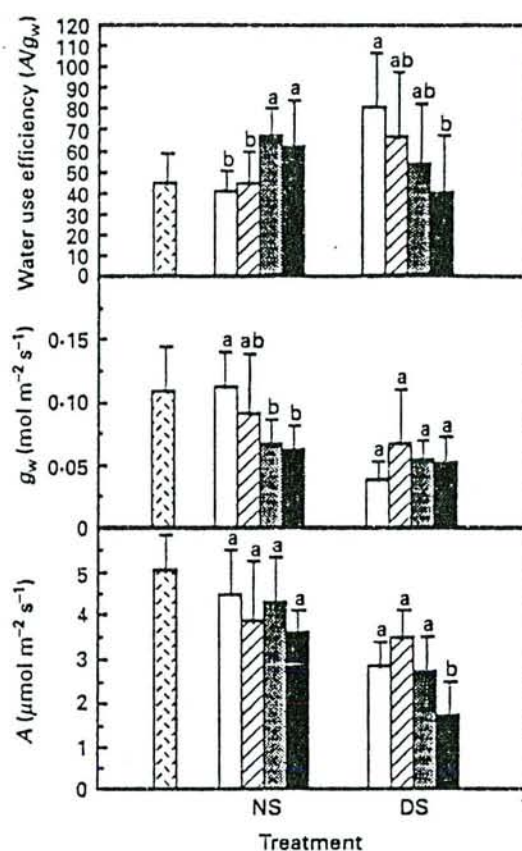


**Figure 3.** Water use efficiency, stomatal conductance and photosynthesis for current-year needles of the Istebna clone. Vertical bars show SD ( $n = 20$ ). Measurements taken between 1 July and 20 August. □, AA; □, FA; ▨, NFA; ▩, NFA+25; ■, NFA+50.

of the chamber air temperature or at the leaf surface or differences in stomatal conductance affecting water balance or ozone dose received.

#### Gas exchange measurements

Figures 3–5 show the net photosynthesis ( $A$ ), stomatal conductance to water vapour ( $g_w$ ), and instantaneous water use efficiency ( $A/g_w$ ) of current and one-year old needles of the Istebna clone and first flush leaves of the beech trees from 10 different measurement days. There was frequently a reduced stomatal conductance as a result of the open-top chambers, almost certainly resulting from the ventilation used to disperse the pollutant mixture. This would lead to a decreased boundary layer resistance in chamber foliage, which would cause increased rates of evapotranspiration and hence stomatal closure. Undroughted, current-year Istebna needles showed little variability between ozone treatments for  $A$  or  $g_w$ . Ozone significantly decreased  $g_w$  in beech by over 30% for all treatments and the  $A$  reduction was most marked in NFA+50 trees. Thus in beech the stomatal closure was independent of the ozone concentration, but photosynthesis showed largest reductions in the highest concentrations. The effect



**Figure 4.** Water use efficiency, stomatal conductance and photosynthesis for one-year old needles of the Istebna clone. Vertical bars show SD ( $n = 20$ ). Measurements taken between 1 July and 20 August. □, AA; □, FA; ▨, NFA; ▩, NFA+25; ■, NFA+50.

of drought on both years growth in Istebna was to reduce stomatal conductance and the rate of photosynthesis. In beech the FA reacted in a similar way, but the NFA treatments had increased rates of photosynthesis and  $g_w$  when drought stressed. Anova tests revealed an extremely significant interaction of ozone and drought in beech. Gerardmer reacted in a very similar way to Istebna, except that 1992 needles in NFA+50 had a greater reduction in photosynthesis.

When the diurnal variations in  $g_w$  and  $A$  were monitored, differences between treatments of Norway spruce showed no interactions between ozone and drought stress. In beech, however, the combined effects of ozone and drought stress were associated with an earlier stomatal closure (Fig. 6).

Water use efficiency (WUE) graphs are shown in Figures 3–5. The drought stressed Istebna clone had a reduced  $A/g_w$  in the presence of ozone, particularly for one-year-old needles. Beech as well had a reduced water use efficiency in the presence of ozone.

#### Chlorophyll contents

Table 1 shows the mean chlorophyll contents obtained during the growing season. Both one-year-

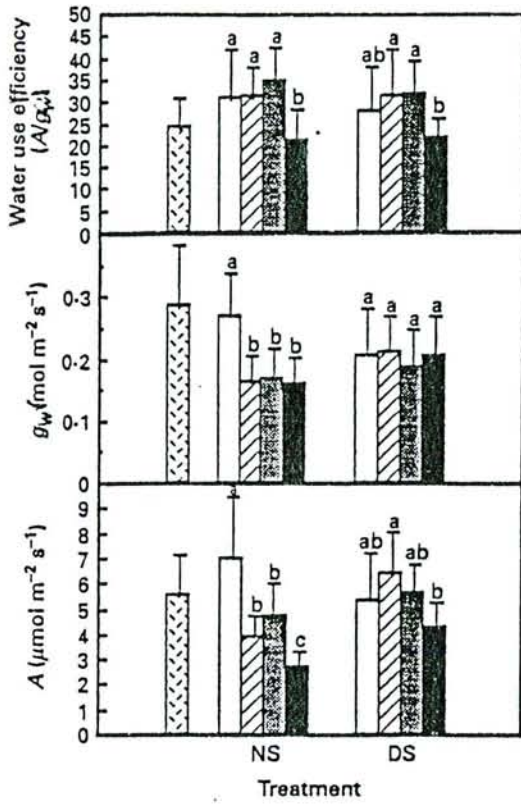


Figure 5. Water use efficiency, stomatal conductance and photosynthesis for first flush beech leaves. Vertical bars show SD ( $n = 20$ ). Measurements taken between 1 July and 20 August.  $\square$ , AA;  $\square$ , FA;  $\square$ , NFA;  $\square$ , NFA+25;  $\blacksquare$ , NFA+50.

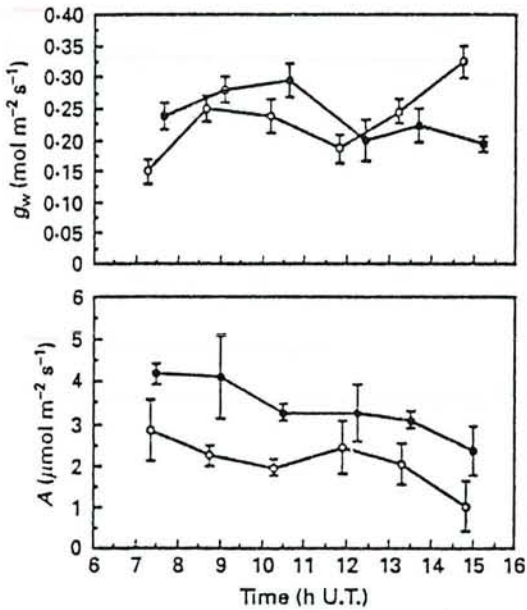


Figure 6. Diurnal changes in beech stomatal conductance and photosynthesis for 18 August 1993. Mean values of  $g_w$  were calculated for all ozone treatments taken together ( $n = 6$ ). The photosynthesis results are for NFA+50. ( $n = 2$ ). Vertical bars show SD.  $\circ$ ,  $\text{O}_3$  NS;  $\bullet$ ,  $\text{O}_3$  DS. h U.T. = GMT

old needles and beech leaves had a reduced chlorophyll content as ozone levels increased. In drought stressed beech trees, however, the reduction was less

Table 1. The effect of ozone and drought stress on total chlorophyll (Chl) contents ( $n = 10$ ; SD in parentheses). See text for abbreviations of treatments

Treatment	Chl a+b ( $\text{g m}^{-2}$ )		
	IST 93	IST 92	Beech
NS AA	0.136 (0.059)	0.323 (0.075)	0.186 (0.072)
DS FA	0.148 a (0.034)	0.263 a (0.062)	0.188 a (0.051)
DS NFA	0.144 a (0.048)	0.283 a (0.043)	0.206 a (0.057)
DS NFA+25	0.127 a (0.057)	0.272 a (0.051)	0.198 a (0.023)
DS NFA+50	0.182 a (0.052)	0.222 a (0.051)	0.188 a (0.043)
NS FA	0.130 a (0.055)	0.309 a (0.053)	0.240 a (0.018)
NS NFA	0.127 a (0.039)	0.336 a (0.034)	0.167 b (0.058)
NS NFA+25	0.130 a (0.043)	0.300 a (0.074)	0.148 b (0.059)
NS NFA+50	0.131 a (0.064)	0.255 a (0.064)	0.102 b (0.033)
$\text{O}_3$	ns	*	ns
Drought	ns	ns	*
$\text{O}_3 \times$ drought	ns	ns	***

marked and although showing the same trend, was no longer statistically significant. There was thus an extremely significant interaction between ozone and drought in relation to beech chlorophyll levels. Current-year needles showed more variation and it was difficult to establish any ozone associated differences.

DISCUSSION

In Norway spruce, NFA+50 was found to reduce shoot extension significantly in both clones (Fig. 2 shows Istebna) and the rate of photosynthesis of NS one-year-old needles showed a reduction in the NFA+50 treatment (statistically significant in the Gerardmer clone only). It therefore seems likely that this reduced shoot extension can be explained by the lower photosynthetic rates of one-year-old needles. Such a reduction of photosynthesis in one-year-old needles exposed to ozone has been found elsewhere (e.g. Küppers & Klumpp, 1988).

As expected, the imposition of a drought stress led to reduced stomatal conductance for all treatments and for both years' growth (Figs 3, 4). This stomatal closure was accompanied by decreased assimilation rates suggesting a stomatal limitation of photosynthesis. It has been proposed (e.g. Wieser & Havranek, 1993; Aben, 1988) that this stomatal limitation of the photosynthesis can protect plants from oxidative stress by reducing the ozone flux to the photosynthetic apparatus. However upon examin-



ing the DS results there was no positive effect in the NFA+50 treatment. In fact the one-year-old needles showed an even greater relative reduction in photosynthesis when droughted (Fig. 4). There was also no positive effect upon the water use efficiency (WUE) from the DS. Because the ozone treated plants had lower WUE, it seems that some form of mesophyll damage to the photosynthetic mechanism had occurred. This casts further doubt on the idea of drought stress offering protection from ozone damage, and to understand better this, the experimental conditions should be reiterated. The trees used in our experiment were exposed to elevated ozone concentrations prior to the drought stress developing, as well as during the drought stress. Their reaction to the drought stress was thus a consequence of their recent pollution history. Other investigations (Tseng, Seiler & Chevone, 1988; Roberts & Cannon, 1992) imposed a drought stress on trees that had previously been grown at much lower ozone concentrations than those used during their experiment. In Western Europe, however, high ozone concentrations occur in May or June (Ulrich, 1990), which is often prior to the development of drought as reserves of water are comparatively high. Also, other experiments (e.g. Temple *et al.*, 1992) have used more severe drought stresses than in our experiment. Thus although we cannot discount a reduction in ozone damage due to drought, in the semi-natural conditions used here, no positive effect was observed.

From the results for beech it is clear that trees subjected to elevated ozone concentrations in the absence of drought stress show significantly reduced assimilation rates and stomatal conductance. Freer-Smith (1993) reported other work with *Fagus sylvatica* showing a similar effect. There is no difference in the degree of stomatal closing, but NFA+50 has a significantly lower rate of photosynthesis than NFA or NFA+25. In fact it is over 50% lower than FA. Beech was thus more susceptible to ozone than either of the Norway spruce clones. Taylor & Dobson (1989) also found decreases in  $A$  and  $g_w$  of beech exposed to ambient ozone levels.

When the drought stress was imposed, the trees in FA showed reductions in  $g_w$  and  $A$ . All the treatments exposed to ozone, however, had increased  $g_w$  values when droughted. Before the drought there were no significant differences (data not shown) in  $g_w$  between the ozone treatments. It therefore seems that the conductance increase in the presence of ozone was a genuine response to the drought.

In order to explain these results it is necessary to examine the diurnal variations in  $g_w$ . All ozone treatments showed little inter-treatment variation over the day and their values were grouped together for the sake of clarity (Fig. 6). In the morning, the drought stressed treatments had greater  $g_w$  values than their non-stressed equivalents. This was

followed by a midday stomatal closure. When the stomata re-opened in the afternoon, however, the non-stressed trees had greater  $g_w$  values. At this time the environmental parameters that control the rate of evapotranspiration from the tree had increased from their relatively low morning levels. It is therefore our hypothesis that as rates of water loss are greater in the afternoon, it is at this time that the trees exposed to ozone closed their stomata in response to the mild soil drought stress. Because our gas exchange measurements in Figure 5 were taken between 7:00 and 9:00 GMT we found that the drought was associated with a stomatal opening, rather than the expected closure.

The chlorophyll results provide further evidence for the effect of drought stress that may be seen as beneficial in this context. In the non-stressed treatments the reductions in chlorophyll content associated with ozone were greater than in the drought stressed treatments. Furthermore there was no reduction in chlorophyll in the presence of ozone for drought stressed trees. The filtered air trees showed no difference in chlorophyll content whether they had been drought stressed or not.

To conclude, a mild drought stress in the presence of realistic ozone concentrations provoked a different response between the two investigated species. Studies of harsher drought stresses will be performed to see if this inter-specific difference is consistent over a range of drought severities. Although ideally measurements should be made on mature natural stands, we feel that this experiment can be more confidently applied to natural conditions, than a lot of previous work which was performed in greenhouses with potted plants. Measurements will continue to be made, so that the cumulative, interactive effects of the stresses can be assessed.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Ministère de l'Agriculture, Ministère de l'Environnement and Région Lorraine. We thank Mr Christophe Rose for his technical assistance. Also the ONF, Dave Parker and Ben Simperingham for help with the drought stress installation, Gilbert Fiegele of ASPA for supplying us with pollutant concentrations, Pascal Loosveldt for help with the statistics and François Willm for his invaluable help and advice on using the LiCor photosynthesis system.

Thanks are also due to Professor Daniel Laffray and Dr Jeremy Barnes for a technical review of the paper.

#### REFERENCES

- Aben JMM. 1988. Estimation of the plant-related resistances determining the ozone flux to broad bean plants (*Vicia faba var metissa*), after long-term exposure to ozone in an open top chamber. In: Mathy P, ed. *Air pollution and ecosystems*. Reidel D, Publishing Company, 616-619.
- Adams MB, Edwards NT, Taylor GE, Skaggs BL. 1990.

- Whole-plants  $^{14}\text{C}$ -photosynthate allocation in *Pinus taeda*: seasonal patterns at ambient and elevated ozone levels. *Canadian Journal of Forest Research*, 20: 152-158.
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32: 85-100.
- Darrall NM. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 12: 1-30.
- Dobson MC, Taylor G, Freer-Smith PH. 1990. The control of ozone uptake by *Picea abies* (L.) Karst, and *P. sitchensis* (Bong.) Carr. during drought and interacting effects on shoot water relations. *New Phytologist* 116: 465-474.
- Eamus D, Barnes JD, Mortensen L, Ro-Poulsen H, Davison AW. 1990. Persistent stimulation of  $\text{CO}_2$  assimilation and stomatal conductance by summer ozone fumigation in Norway spruce. *Environmental Pollution* 63: 365-379.
- Freer-Smith PH. 1993. The interacting effects of drought and pollution on whole-plant physiology. In: Jäger HJ, Unsworth M, De Temmerman L, Mathy P, eds. *Effects of air pollution on agricultural crops in Europe. Results of the European open-top chambers project*. *Air Pollution Research Report* 46. 307-320.
- Harkov R, Brennan E. 1980. The influence of soil fertility and water stress on the ozone response of hybrid poplar trees. *Phytopathology* 70: 991-994.
- Heagle AS, Flager RB, Patterson RP, Lesser VM, Shafer SR, Heck WW. 1987. Injury and yield response of soybean to chronic doses of ozone and soil moisture deficit. *Crop Science* 27: 1016-1024.
- Heggestad HE, Gosh TJ, Lee EH, Bennett JH, Douglas LW. 1985. Interaction of soil moisture stress and ambient ozone and growth and yields of soybeans. *Phytopathology* 75: 472-477.
- Heggestad HE, Lesser VM. 1990. Effects of ozone, sulfur dioxide, soil water deficit, and cultivar on yields of Soybean. *Journal of Environmental Quality*. 19: 488-495.
- Impens R. 1992. *Ecophysiologie des ligneux soumis aux changements climatiques*. Rapport d'activité no 1. Ministère de l'environnement, des ressources naturelles et de l'agriculture. Faculté des Sciences agronomiques de l'Etat, Gembloux, Belgium.
- Küppers K, Klumpp G. 1988. Effects of ozone, sulfur dioxide, and nitrogen dioxide on gas exchange and starch economy in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karsten). *GeoJournal* 17.2: 271-275.
- Pearson M, Mansfield TA. 1993. Interacting effects of ozone and water stress on the stomatal resistance of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytologist* 123: 351-358.
- Prinz B, Krause GHM, Jung KD. 1987. Development of novel forest decline in Germany. In: Hutchinson C, Meerna KM, eds. *Effects of atmospheric pollutants on forests, wetlands and agricultural ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, 1-24.
- Reich PB, Schoettle AW, Amundson RG. 1985. Effects of low concentrations of  $\text{O}_3$ , leaf age and water stress on leaf diffusive conductance and water use efficiency in soybean. *Physiologia Plantarum* 63: 58-64.
- Roberts BR, Cannon WN. 1992. Growth and water relationships of red spruce seedlings exposed to atmospheric deposition and drought. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 193-197.
- SAS Institute Inc. 1985. *SAS user's guide, version 5 edition*. Cary NC: SAS Institute Inc.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap measure in plants. *Science* 148: 339-346.
- Taylor G, Dobson MC. 1989. Photosynthetic characteristics, stomatal responses and water relations of *Fagus sylvatica*: impact of air quality at a site in southern Britain. *New Phytologist* 113: 265-273.
- Temple PJ, Riechers GH, Miller PR, Lennox RW. 1992. Growth responses of ponderosa pine to long-term exposure to ozone, wet and dry acidic deposition, and drought. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 59-66.
- Tingey DT, Hogsett WE. 1985. Water stress reduces ozone injury via stomatal mechanism. *Plant Physiology* 77: 944-947.
- Tsong EC, Seiler JR, Chevone BI. 1988. Effects of ozone and water stress on greenhouse-grown Fraser fir seedling growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany* 28(1): 37-41.
- Ulrich E. 1990. *Que peut-on conclure des mesures de polluants gazeux réalisées à la tour du Donon? (massif forestier des Vosges)*. Rapport DEFORPA. Ecole nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France.
- Wieser G, Havranek WM. 1993. Ozone uptake in the sun and shade crown of spruce: quantifying the physiological effects of ozone exposure. *Trees* 7: 227-232.

### **Annexe 3**

Distribution and variations of potassium and calcium in different cross-sections of  
*Picea abies* (L.) Karst needles and *Fagus sylvatica* (L.) leaves  
exposed to ozone and mild water stress.

Le Thiec D, Dixon M, Garrec JP (1995)

Annales des Sciences Forestières, accepté le 01 décembre 1994.

**Distribution and variations of potassium and calcium in different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst. needles and *Fagus sylvatica* (L.) leaves exposed to ozone and mild water stress.**

D Le Thiec, M Dixon, JP Garrec

*INRA - Centre de Recherches Forestières de Nancy - Unité Ecophysiologie Forestière - Equipe Pollution Atmosphérique - 54 280 Champenoux - France.*

Running title : Ozone and drought effects on plant nutrients

Correspondence to D. Le Thiec,

Laboratoire de Pollution Atmosphérique - INRA

F - 54280 Champenoux France

Fax number: (33) 83 39 40 69

**Résumé** — Deux clones d'épicéas âgés de huit ans et des hêtres ont été plantés directement dans un sol dans des chambres à ciel ouvert; ils ont été soumis à des concentrations élevées d'ozone et à un stress hydrique modéré. Les variations et la répartition des éléments minéraux a été étudiées. Les teneurs en potassium et calcium chez les deux clones augmentent dans les traitements de fumigation, par contre chez le hêtre les teneurs en potassium diminuent. La sécheresse appliquée fait diminuer ces teneurs pour tous les arbres. L'application combinée de ces deux stress est plus complexe et les observations faites auparavant ne se retrouvent pas dans tous les compartiments foliaires et sont différentes entre clones et espèces. L'hypothèse que l'ozone affecte la nutrition minérale racinaire et la perméabilité membranaire des cellules est discutée.

**Summary** — Two clones of eight-year old Norway spruce trees, and beech trees, planted directly into the soil and in open-top chambers, were exposed to elevated ozone concentrations and subjected to a mild soil drought stress. The nutrient partitioning and inter-treatment differences in nutrient levels were studied. In elevated ozone both clones had increased potassium and calcium levels, whereas in beech ozone treated trees had decreased potassium levels. Drought caused decreases in these nutrients for all species. The effect of combining the two stresses was more complex however and the previously observed effects were not obtained in all cell tissues. Furthermore, they showed both inter-specific and inter-clonal differences. The hypothesis that ozone effects the root nutrition and cell membrane permeability is discussed.

**Key words** —

ozone / sécheresse / potassium / calcium / compartiment cellulaire

ozone / water stress / potassium / calcium / cell tissues

## INTRODUCTION

Atmospheric pollution (especially ozone) has often been cited as a possible contributory factor in forest decline. Furthermore, there is evidence to suggest that current levels of tropospheric ozone can cause damage to trees (Dobson *et al*, 1990) and ozone levels in Europe and N. America are predicted to rise as emissions of their precursors increase in association with increased motor traffic. Much work has thus been carried out to assess the biochemical and physiological response of trees to this pollutant, but the results have often been contradictory. This may be due to inter-specific differences, but is also the result of differences in the experimental conditions used (Darrall 1989). Ozone concentrations were often unrealistically high and there has been little work looking at the interaction of ozone with environmental constraints, especially away from the laboratory.

Prinz *et al* (1987) showed that forest decline was less severe in wetter years, so studies on the effect of both drought and ozone on trees would seem to be a priority, but they are still rather rare.

A demonstration of the complexity of interactions between ozone and drought was made by Davidson *et al* (1992), working with *Fagus sylvatica*. Also, ozone has been shown to affect both growth and morphology of tree root systems (Taylor *et al*, 1989). Changes to the root system or in water availability can both have serious implications for nutrient uptake by plants and changes in the total foliar nutrient concentration of trees in response to ozone fumigation has been observed. Care should be taken in interpreting these results however, as potted plants were used and McConnaughay *et al* (1993) have shown that nutrient changes in such trees can be artefacts of the experimental conditions.

To better study the interactive effects of ozone and drought stress an experiment was conducted on two tree species (*Picea abies* and *Fagus sylvatica*) planted directly into the soil, enclosed in open-top chambers and exposed to a soil drying. Studies on nutrient distribution at the cellular level are rare and have never been performed on trees exposed to both realistic ozone concentrations and drought, although some work has been done on declining spruce trees (Fink, 1991a, b, Garrec *et al*, 1991, Stelzer *et al*, 1990 and Godde *et al*, 1991). The aim of our study was thus to determine foliar nutrient changes in response to ozone and drought stress and to then identify at what cell level these changes occurred. The physiological consequences of these changes could then be assessed.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental site and plant material*

The experiment was carried out at Col du Donon (Vosges, France: 48° 29' N; 7° 05' E) in a mixed spruce beech forest. This region has relatively high levels of tropospheric ozone (38 ppb yearly average). It is 727 m above sea level.

Five-year-old Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) trees were planted into the soil on 19 April 1990. The Norway spruce were two different clones : clone 780371 from a Polish provenance, Istebna (IST) and clone 781351 from a French provenance, Gerardmer (GER). The beech trees were not clonal. The trees were supplied by AFOCEL (Association Forêt Cellulose; Charrey-sur-Saone; France). The soil was classified as "typic dystrochrept".

Shortly after the trees were planted, eight open-top-chambers (see Impens, 1992 for details) were erected enclosing nine trees in each chamber - three beech and three individuals from each of the two Norway spruce clones. Four plots of nine trees without open top chamber served as controls.

### *Treatments*

An electric discharge generator (Trailgaz "LABO 76") supplied with pure oxygen produced the ozone. 25 ppb ozone was continuously added to two of the chambers and 50 ppb to another two from 17 July 1992 to 29 October 1992. Two chambers were ventilated with non-filtered air, whilst the remaining two were fitted with activated charcoal filters which considerably reduced the ozone levels (by 75% ± 12%). From 30 October 1992 to 30 March 1993 the added concentrations were reduced by 25 ppb. From 31 March 1993, the experimental treatments were repeated and continued until 31 October 1993. The ozone concentration in any one chamber was recorded for two five minute periods every hour, using an "Environment S.A." analyser. Photosynthetically active radiation, air temperature and air and soil humidity were also recorded (unpublished data).

In the spring of 1993 work was begun to prepare the drought stress. Wooden structures of between 4.3 and 4.5 m high were built to support sloping roofs of clear plastic (89 % light transmission) that prevented rain from entering. The four chambers with roofs then had 70 cm deep trenches dug around them to prevent the incursion of soil water into the chambers. The drought stress was begun 01 July 1993 and there were then the following treatments :

1. Filtered air : FA
2. Non-filtered air : NFA
3. Ambient air, outside chambers : AA
4. Non-filtered air with 25 ppb ozone added : NFA + 25
5. Non-filtered air with 50 ppb ozone added : NFA + 50

Each of these treatments, excepting AA, had a drought stressed chamber (DS) and an unstressed (well-watered) chamber (NS).

### *Sampling*

The material for microanalysis was sampled on 08 July and 21 August 1993 for beech leaves and 08 July, 21 August and 21 September 1993 for Norway spruce needles, always between 08:00 and 10:00 GMT. Each sample was composed of two beech leaves and five current-year spruce needles. The beech leaves were taken from first flush growth and the needles came from the first three whorls. The plant material was immediately plunged into liquid nitrogen to prevent movement of nutrients after sampling had occurred.

During the sampling period the following values of micro-climatic parameters were obtained :

Air temperature :  $17 \pm 4$  °C

Leaf-air vapour pressure difference (VPD) :  $1.3 \pm 0.1$  kPa

Relative humidity of the chamber air :  $55 \pm 12$  %

Photon flux density of photosynthetically active radiation :  $897 \pm 254$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

The differences between chambers with roofs and unroofed chambers were only statistically significant for light and temperature. Even so, the temperature difference was less than 1°C for the 24 hour average.

### *Pre-dawn leaf water potential*

The pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{\text{wp}}$ ) was measured using a Skye pressure chamber according to the method in Scholander *et al* (1965). Measurements were made throughout the drought stress period.



### *X-ray microanalysis*

The material to be analysed was prepared according to the method used in Le Thiec *et al* (1994). Sections of plant material were examined under a scanning electron microscope (Stereoscan 90B, Cambridge) at 15 kV, equipped with a dispersive energy microanalysis system (EDX, diode Si-Li; Analyser AN10000 10/25). To ensure that the beam of primary electrons did not penetrate other cells, one layer of cells on a sheet of aluminium were analysed. All measurements were made using an X-ray take-off angle of 45°, a measuring time of 100 s, a magnification of 6000 for all examined tissues (stomata, epidermis, mesophyll, parenchyma and endodermis) and of 400 for the vascular bundle. A ZAF4 program, FLS, connected to the microanalyser gave us apparent concentrations of the different elements analysed. This program takes into account any variations in volume. In order to convert the microanalysis data into real concentrations (% dry mass), powdered spruce needles and beech leaves were used as standards (CRM 100 and CRM 101 given by Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities).

### *Chemical analysis*

Sampling was carried out on 20 August 1993 for beech leaves and 21 September 1993 for current-year spruce needles. The samples were cleaned (by rapid submersion in demineralised, distilled water) and then dried. Phosphorus, sulphur and cations (Mg, K, Ca, Mn) levels were mineralised (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HClO<sub>4</sub>; Clément 1977) and measured by ICP (Jobin Yvon JY438 Plus). The levels of soil nutrients were also determined using these techniques (drying at 450°C and mineralisation with a HF/HClO<sub>4</sub> mixture and then placed in 2% HCl).

### *Statistical analyses*

The statistical treatment employed was the analysis of variance ( $\alpha = 0.05$ ) by the GLM procedure (SAS Institute Inc. 1985). Test of equality of averages using Student-Newman-Keuls was applied equally (the same letters indicate that averages are not significantly different, and the alphabetic order corresponds to decreasing values). Significance was as follows: ns = not significant; \* = significant ( $p < 0.05$ ); \*\* highly significant ( $p < 0.01$ ); \*\*\* extremely significant ( $p < 0.001$ );  $\alpha = 0.05$ .

## RESULTS

### *Pollution climate and environmental factors*

Figure 1 shows rainfall totals during the vegetation period and the ozone levels (monthly averages) since the trees were planted. Ozone showed the often reported fluctuations during the year; the maximum levels occurring in spring and summer. The Col du Donon is a site where summer ozone levels often exceed the maximum exposure recommended by the World Health Organisation and the EEC.

The pre-dawn leaf water potentials showed an initial decrease at the beginning of the drought period and then remained relatively constant ( $-0.82 \pm -0.11$  MPa;  $n=104$ ). There were no significant differences between species, or between ozone treatments. Because the trees were planted in the soil, there must have been incursion of soil water from outside the chambers, despite the trenches that were dug to reduce this, or the rooting system of trees was deep enough to obtain water. The relatively high rainfall during this period probably kept the water table at high levels. The  $\Psi_{wp}$  of the non-stressed trees remained between  $-0.05$  and  $-0.2$  MPa.

### *Chamber effects*

The control trees outside chambers and the trees in the NFA NS chambers were not significantly different for any measured parameter. There was a 3 % difference in humidity between the chamber and outside controls and the increased temperature was never more than 2°C. Furthermore, before the drought stress was imposed there was in effect a replication of four treatments (FA, NFA, NFA + 25, NFA + 50); we ensured that there were no *a priori* differences between the same chambers of any one treatment.

### *Chemical analyses*

The soil analysis gave the following results:

- horizon 0 - 10 cm:  $P_2O_5$  (‰):  $0.195 \pm 0.05$ ; Ca ( $cmol^+ kg^{-1}$ ):  $1.16 \pm 0.39$ ; Mg ( $cmol^+ kg^{-1}$ ):  $0.54 \pm 0.21$ ; K ( $cmol^+ kg^{-1}$ ):  $0.34 \pm 0.10$ ; Mn (‰):  $14.25 \pm 5.93$

- horizon 20 - 30 cm:  $P_2O_5$  (‰):  $0.055 \pm 0.02$ ; Ca ( $cmol^+ kg^{-1}$ ):  $0.23 \pm 0.11$ ; Mg ( $cmol^+ kg^{-1}$ ):  $0.13 \pm 0.03$ ; K ( $cmol^+ kg^{-1}$ ):  $0.34 \pm 0.10$ ; Mn (‰):  $8.01 \pm 4.81$ .

The foliar analyses results are shown in Table I. Ozone had a significant effect on calcium and potassium levels in both species. Drought stress significantly affected phosphorus, manganese, calcium and potassium in both spruce clones and calcium

and potassium in beech only. The interaction of drought and ozone had a significant effect on calcium levels in the Istebna clone and potassium levels in Gerardmer and beech.

As the ozone dose increased there was a tendency for a corresponding increase in calcium. This trend was also observed for potassium in both spruce clones, but the opposite effect occurred in beech. In filtered air treatments the drought provoked a considerable decrease in both calcium and potassium. The effect of ozone changes upon imposition of the drought stress. In Istebna there is no longer an increase in Ca, but a decrease in response to increasing ozone. The potassium levels in Gerardmer are again increased by exposure to ozone, but in beech there is no observable effect on Ca or K levels.

### *Microanalysis*

The microanalysis results for K and Ca are shown in Table II for the two spruce clones and in Table III for beech. After analysing the different cell tissues it was found that calcium was most abundant in the epidermis and potassium was most abundant in the beech epidermis, but in the endodermis of Norway spruce.

### *Ozone effects*

The Gerardmer clone showed increasing concentrations of potassium in all tissues, as ozone increased. Such an increase was also observed in the epidermis and guard cells and to a lesser extent the mesophyll and endodermis of Istebna. However the vascular bundle of ozone-treated Istebna needles had a decreased K level. In ozone-treated beech, potassium was decreased in all tissues excepting the lower epidermis. Calcium increases in all tissues, except the epidermis, in both clones raised in elevated ozone. Beech shows a similar increase apart from in the vascular bundle where no trend was observed.

### *Drought effects*

The direct effects of drought can be seen from the FA treatments. In spruce, potassium showed decreases in the vascular bundle, endodermis and guard cells, but was increased in the mesophyll. Beech had reduced potassium levels in the vascular bundle, parenchyma, guard cells and lower epidermis. Calcium levels showed large decreases in the epidermis of both clones. In the mesophyll however, Istebna had increased levels, whereas Gerardmer's calcium levels were reduced. Calcium decreased in all tissues of beech in response to drought.

### *Ozone-drought interactions*

The combined effects of the two stresses are quite complicated. Ozone alone provoked an increase in potassium in the epidermis of the Gerardmer clone, but in conjunction with drought there is no longer such an increase in NFA + 50. This is also seen in the endodermis where the ozone-associated increase is restricted to the NFA and NFA + 25 treatments. Potassium levels in Istebna decrease in the mesophyll of NFA + 50, but increase in the endodermis of NFA + 25 and in the vascular bundle of all three ozone-drought treatments.

Calcium, which had previously shown a decrease in the epidermis in response to ozone, was increased when the two stresses were applied in conjunction in Gerardmer. Istebna on the other hand had a similar trend between ozone treatments, but the decrease in FA was less severe. The other tissues also showed less pronounced changes when ozone was applied in conjunction with a drought stress, but the direction of the effects was nevertheless the same i.e. increasing ozone concentration was associated with increasing calcium.

In beech, the previous ozone-associated potassium decrease in the lower epidermis was no longer apparent in the drought stressed trees. The guard cells had increased K for all three ozone treatments, but ozone effects were no longer apparent in the parenchyma and even reversed in the vascular bundle. The effects of ozone on calcium were no longer apparent in the epidermis and were diminished in the other tissues apart from the vascular bundle where there is now a decrease.

## DISCUSSION

The soil analysis showed that there was a good nutrient supply at the site, with no deficiencies according to the recommended levels of Bonneau (1988). Although not deficient, magnesium was rather low in the 20-30 cm horizon.

Changes in guard cell K concentrations are important in regulating stomatal aperture (Le Thiec *et al*, 1994), which in turn can limit ozone uptake. This experiment has shown increased K concentrations in spruce needles exposed to the ozone treatments, compared to FA needles. Associated with this K increase is an increased stomatal opening. In beech, the reverse pattern was observed, so a stomatal closing in association with ozone would be expected in beech. These expectations were confirmed from stomatal conductance measurements performed on the trees on measurement days. Freer-Smith (1993) reports that other work on beech showed a similar reduction in stomatal conductance, as did Taylor and Dobson (1989) on beech exposed to ambient ozone levels.

The drought stress provoked significant decreases in guard cell K levels of Norway spruce in all treatments (this decrease was associated with a reduced stomatal conductance). In beech however, there was no inter-treatment difference in K levels and the levels even showed a relative increase compared to the well-watered treatments. These results can be explained by reference to the diurnal time course of conductance measurements. It appears that drought stressed ozone-treated plants close their stomata earlier in the day and thus receive a lower dose over a period of time as ozone levels are greater in the afternoon. In this way the trees are relatively protected from ozone damage and photosynthesise more than the well watered trees in the morning, when vapour pressure deficits are lower. Thus, because sampling occurred in the morning, a relatively greater stomatal conductance is found in drought stressed beech trees.

The foliar nutrient content is often used to determine the nutritional status of plants and/or to assess if latent damage has already occurred (Cape *et al*, 1990). In general, the same absolute values were not found when these analyses were compared to the microanalysis results, because the global chemical analysis encompasses several regions of the foliage (cuticle, cell wall, cellular contents, hypodermis and the resin canals), whereas the X-ray microanalysis only includes the cellular contents (vacuole and cytoplasm) and a portion of the cell wall.

There are several possibilities that could give rise to a change in foliar nutrient levels. These include soil nutrient availability, root development, foliar leaching, or redistribution of nutrients to other parts of the plant. The good nutritional quality of the soil allows us to discount the first of these hypotheses. Several other studies

however (reviewed by Kasana and Mansfield 1986) have shown that ozone can affect the distribution of dry matter between the shoots and roots, leading to a relative reduction in root growth.

The potassium and calcium contents were increased in the two spruce clones and these changes could well lead to changes in the cell membrane permeability (Chevone *et al*, 1990; Heath and Castillo, 1988; Fink, 1991b). It seems that the intercellular derivatives of ozone are capable of inhibiting the function of membrane pumps and membrane transport mechanisms.  $\text{Ca}^{2+}$  ions which are usually expelled from the cell by an ATP-dependent membrane transport mechanism, are now accumulated inside the cell. This can in turn interfere with the functioning of the numerous enzymes which use this ion as an activator or inhibitor (Heath and Castillo 1988).

This potassium and calcium increase could also result from a perturbation of the mineral nutrition at root level. Barnes and Pfirrmann (1992) and Lucas *et al* (1993) explained the increase of K and Ca levels in ozone-treated trees by an increasing ion uptake at root level. Furthermore the increase in K which is a mobile cation and which is used as a regulator of numerous physiological processes could be the result of an increased demand from the tree which is using it to counteract oxidative stress. An increasing metabolism needed to repair ozone damage could also cause increasing K concentrations (Schier, 1990) and Cape *et al* (1990) found that increasing K was due to a mechanism to maintain cationic balance.

In contrast to Norway spruce, beech showed decreasing K concentrations as ozone exposure increased and Ca levels were only slightly increased in NFA + 50. This could result from more K being leached by acid rain ; ozone is thought to predispose foliage to such an effect (McLaughlin 1985, Westmann and Temple 1989; Pfirrmann *et al*, 1990). It could also just result from an ozone-associated efflux of K. Murphy and Huerta (1990) found an increase in  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in UV-treated plants which led to a K efflux. This could be significant as  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a product of ozone reactions which occur inside the plant (Runeckles and Chevone, 1992). According to Barnes *et al* (1990) and Taylor *et al* (1989) ozone can decrease beech root biomass and thus nutrient uptake, and this could also produce such a result.

As previously discussed, ozone is capable of altering cell membrane permeability and this can cause perturbations in nutrient compartmentalisation (Heath and Castillo, 1988). These become apparent from the microanalysis results. Fink (1991b) concluded that there was an increase in Ca influx into the cytoplasm of mesophyll cells where normally conifers are able to export this ion out of the cell.

Because, in Norway spruce, the increase in potassium was found in all tissues and ozone attacks the mesophyll first, it would seem that this increase is due to changes

in nutritional supply at the root level rather than a modification of the membrane permeability of all tissues. Furthermore, the new growth has been subjected to ozone only recently, whereas the root system has developed in an ozone environment over several growing seasons giving more time for ozone to exert its effects. In beech the situation is different. There is perhaps a modification comparable to spruce, but as there is no apparent difference in Ca levels in the vascular bundle it seems that the effects of membrane changes are more important.

Drought acted to decrease K and Ca concentrations in the most internal tissues. The vascular bundle, by way of the xylem, supplies nutrients in solution to the various tissues and this is regulated by the endodermis (Stelzer, 1990). The drought has, by reducing water supply, also reduced nutrient supply to the plant. There was a difference between clones as regards the response of the mesophyll as only *Istebna* had an increasing Ca concentration. Fink (1991b) has proposed that the ion cannot be evacuated from the cell because of pollution damage, but its accumulation could also be a mechanism (linked to ABA production) to protect against the effects of drought. The drought-ozone interaction is difficult to interpret as the results are not a simple summation of the two stresses in isolation. In Gerardmer the effects of this interaction are essentially in the epidermis of NFA + 50 and in the endodermis. The main changes in *Istebna* occurred in the endodermis, mesophyll and vascular bundle and in beech they were in the parenchyma and vascular bundle and the epidermis for Ca only. All these interactions were essentially in the NFA + 50 treatment.

To conclude, the effects of ozone and drought are antagonistic and show inter-specific differences. Both stresses were seen to effect nutrition supply from the roots, especially in Norway spruce. Membrane permeability was probably affected which led to different nutritional levels between different tissues-an effect that total foliar nutritional analyses cannot reveal.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Ministère de l'Agriculture, Ministère de l' Environnement and Région Lorraine. We thank Mr Christophe ROSE for his technical assistance. Also the ONF, Dave PARKER and Ben SIMPERINGHAM for help with the drought stress installation, Gilbert FIEGEL of ASPA for supplying us with pollutant concentrations, Pascal LOOSVELDT for help with the statistical tests and Claude BRECHET for chemical analyses.



## REFERENCES

- Barnes JD, Pfirrmann Y (1992) The influence of CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>, singly and in combination, on gas exchange, growth and nutrient status of radish (*Raphanus sativus* L.). *New Phytol* 121, 403-412
- Barnes JD, Reiling D, Davison AW, Renner C (1990) Interactions between pollutants and winter stress. *Environ Poll* 53, 235-254
- Bonneau M (1988) Le diagnostic foliaire. *Rev For Fr* XL, 19-28
- Cape JN, Freer-Smith PH, Paterson IS, Parkinson JA, Wolfenden J (1990) The nutritional status of *Picea abies* (L.) Karst. across Europe, and implications for 'forest decline'. *Trees* 4, 211-224
- Chevone BI, Seiler JR, Melkonian J, Amundson RG (1990) Ozone - water stress interactions. In : *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms* (RG Alscher, JR Cumming, eds) *Plant Biol* 12, 311-328
- Clément A (1977) Point 77 sur certaines analyses foliaires. Internal publication: pp 25
- Darrall NM (1989) The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant Cell Environ* 12, 1-30
- Davidson SR, Ashmore MR, Garrety C (1992) Effects of ozone and water deficit on the growth and gas exchange of *Fagus sylvatica*. *For Ecol Management* 51, 187-193
- Dobson MC, Taylor G, Freer-Smith PH (1990) The control of ozone uptake by *Picea abies* (L.) Karst. and *P. sitchensis* (Bong.) Carr. during drought and interacting effects on shoot water relations. *New Phytol* 116, 465-474
- Fink S (1991a) The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *New Phytol* 119, 33-40
- Fink S (1991b) Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. *New Phytol* 119, 41-51
- Freer-Smith PH (1993) The interactive effects of drought and pollution on whole-plant physiology. In : *Effects of air pollution on agricultural crops in Europe. Results of the European open-top chambers project. Air Pollution Research Report 46*. (HJ Jäger, M Unsworth, L De Temmerman, P Mathy, eds) 307-320
- Garrec JP, Laitat E, Richardin I, Rose C (1991) Dépérissement forestier et perturbations minérales aux niveaux histologique et cellulaire dans les aiguilles de *Picea abies* L. Etude par microanalyse X. *Ann Sci For* 48, 321-332

- Godde D, Divoux S, Höfert M, Gonsior B (1991) Quantitative and localized element analysis in cross-sections of spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] needles with different degrees of damage. *Trees* 5, 95-100
- Heath RL, Castillo FJ (1988) Membrane disturbance in response to air pollutants. *In : Air pollution and plant metabolism* (S Schulte-Hostede, NM Darrall, LW Blank, AR Wellburn eds). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London. 55-75
- Impens R (1992) *Ecophysiologie des ligneux soumis aux changements climatiques*. Rapport d'activité n°1. Ministère de l'environnement, des ressources naturelles et de l'agriculture. Faculté des Sciences agronomiques de l'Etat, Gembloux, Belgium
- Kasana MS, Mansfield TA (1986) Effects of air pollutants on the growth and functioning of roots. Proceedings of the Indian Academy of Science. *Plant Science* 96, 429-441
- Le Thiec D, Rose C, Garrec JP, Laffray D, Louguet P, Galaup S, Loosveldt P (1994) Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Can J Bot* 72, 86-92
- Lucas PW, Rantanen L, Mehlorn H (1993) Needle chlorosis in Sitka spruce following a three-year exposure to low concentrations of ozone: changes in mineral content, pigmentation and ascorbic acid. *New Phytol* 124, 265-275
- McConnaughay KDM, Berntson GM, Bazzaz FA (1993) Limitations to CO<sub>2</sub>-induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia* 94, 550-557
- McLaughlin SB (1985) Effects of air pollution on forests: a critical review. *J Air Poll Control Ass* 35, 512-534
- Murphy TM, Huerta AJ (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol Plant* 78, 247-253
- Pfiffmann T, Runkel K-H, Schramel P, Eisenmann T (1990) Mineral and nutrient supply, content and leaching in Norway spruce exposed for 14 months to ozone and acid mist. *Environ Poll* 64, 229-253
- Prinz B, Krause GHM, Jung KD (1987) Development of novel forest decline in Germany. *In : Effects of atmospheric pollutants on forests, wetlands and agricultural ecosystems* (C Hutchinson, KM Meema, eds) Berlin : Springer - Verlag, 1-24
- Runeckles VC, Chevone BI (1992) Crop responses to ozone. *In : Surface level ozone exposures and their effects on vegetation* (AS Lefohn, ed) Lewis Publishers, Inc. Chelsea, 189-270

- SAS Institute Inc. (1985) SAS user's guide, version 5 edition. SAS Institute Inc., Cary NC
- Schier GA (1990) Response of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) seedlings to simulated acid rain and ozone-2. Effect on throughfall chemistry and nutrients in the leaves. *Environ Exp Bot* 30, 325-331
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap measure in plants. *Science* 148, 339-346
- Stelzer R, Lehmann H, Kramer D, Lüttge U (1990) X-ray microprobe analyses of vacuoles of spruce needle mesophyll, endodermis and transfusion parenchyma cells at different seasons of the year. *Bot Acta* 103, 415-423
- Taylor G, Dobson MC (1989) Photosynthetic characteristics, stomatal responses and water relations of *Fagus sylvatica* : impact of air quality at a site in southern Britain. *New Phytologist* 113, 265-273
- Taylor G, Dobson MC, Freer-Smith PH (1989) Changes in partitioning and increase root lengths of spruce and beech exposed to ambient pollutant concentrations in southern Britain. *Ann Sci For* 46, 573-576
- Westman WE, Temple PJ (1989) Acid mist and ozone effects on the leaf chemistry of the two western conifer species. *Environ Poll* 57, 9-26

## LEGENDS

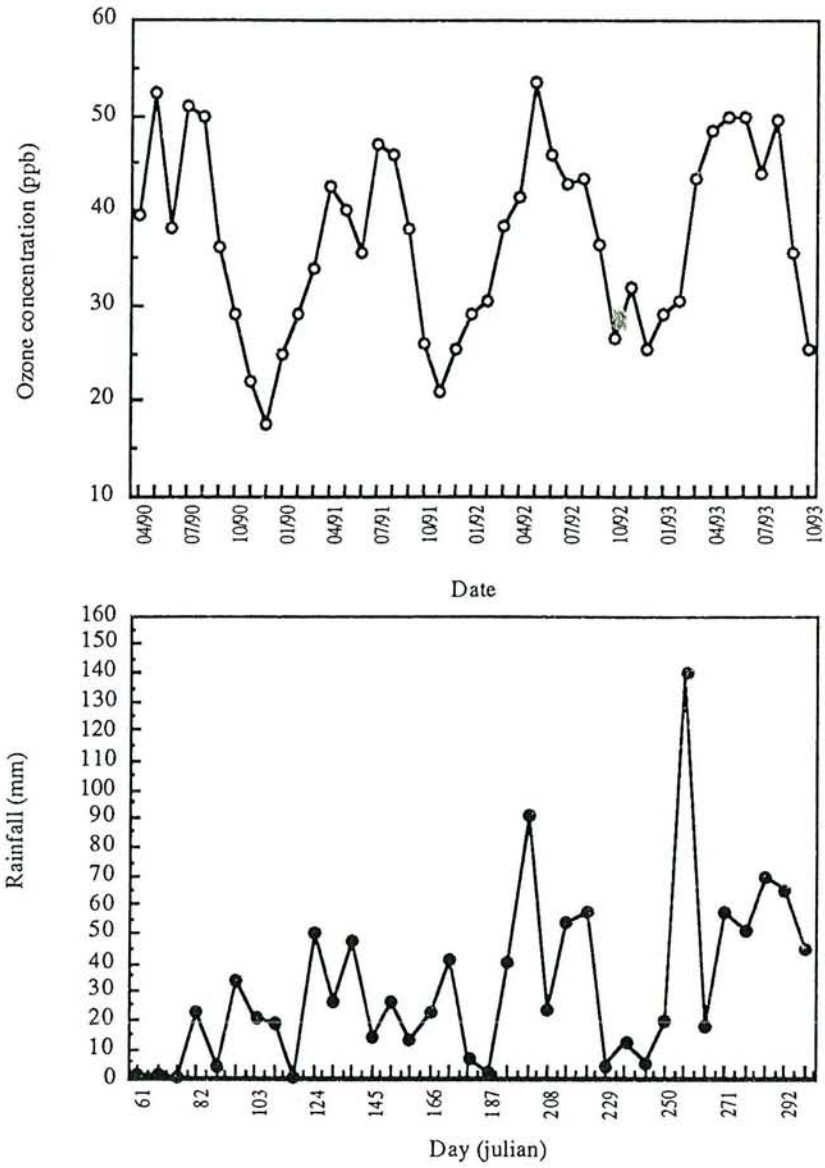
Figure 1 : Mean monthly ozone concentrations at Col du Donon, since the planting of the trees and mean weekly rainfall totals for the vegetation period covered by the experiment.

Table I : The total concentration of elements ( $\pm$  SD) (% dry weight) in beech leaves and Norway spruce needles (Gerardmer and Istebna clone) (n = 6). Significance of Anova was as follows: ns = not significant; \* = significant ( $p < 0.05$ ); \*\* highly significant ( $p < 0.01$ ); \*\*\* extremely significant ( $p < 0.001$ );  $\alpha = 0.05$ .

Table II : The evolution of the elements K and Ca ( $\pm$  SD) (% dry weight) with ozone and water stress treatments for Norway spruce clones (n = 145). Test of equality of averages of Student-Newman and Keuls has been applied : same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values.  $\alpha = 0.05$ .

Table III : The evolution of the elements K and Ca ( $\pm$  SD) (% dry weight) with ozone and water stress treatments for beech leaves. (n = 72). Test of equality of averages of Student-Newman and Keuls has been applied : same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values.  $\alpha = 0.05$ .

Figure 1



Element Treatment	Istebna						Gerardmer						Beech					
	S	P	Mn	Mg	Ca	K	S	P	Mn	Mg	Ca	K	S	P	Mn	Mg	Ca	K
NS AA	0.15 (0.05)	0.20 (0.03)	0.15 (0.04)	0.09 (0.01)	0.38 (0.02)	0.70 (0.02)	0.14 (0.04)	0.22 (0.03)	0.26 (0.03)	0.08 (0.02)	0.47 (0.02)	0.62 (0.02)	0.16 (0.03)	0.17 (0.04)	0.46 (0.03)	0.04 (0.02)	0.70 (0.03)	0.65 (0.02)
NS FA	0.13 (0.06)	0.19 (0.03)	0.17 (0.03)	0.09 (0.02)	0.39 (0.02)	0.69 (0.02)	0.11 (0.02)	0.15 (0.03)	0.23 (0.05)	0.08 (0.01)	0.41 (0.02)	0.58 (0.01)	0.15 (0.03)	0.15 (0.04)	0.45 (0.06)	0.03 (0.01)	0.72 (0.05)	0.82 (0.03)
NS NFA	0.13 (0.05)	0.18 (0.02)	0.15 (0.03)	0.09 (0.03)	0.38 (0.03)	0.67 (0.02)	0.10 (0.03)	0.19 (0.02)	0.26 (0.06)	0.07 (0.01)	0.49 (0.03)	0.61 (0.02)	0.12 (0.03)	0.17 (0.05)	0.41 (0.06)	0.03 (0.01)	0.72 (0.04)	0.63 (0.02)
NS NFA+25	0.14 (0.03)	0.21 (0.03)	0.17 (0.02)	0.12 (0.03)	0.47 (0.02)	0.73 (0.02)	0.12 (0.02)	0.19 (0.03)	0.26 (0.02)	0.09 (0.02)	0.47 (0.03)	0.61 (0.02)	0.14 (0.04)	0.16 (0.03)	0.42 (0.04)	0.05 (0.02)	0.75 (0.04)	0.65 (0.02)
NS NFA+50	0.12 (0.05)	0.24 (0.05)	0.15 (0.04)	0.11 (0.02)	0.57 (0.03)	0.92 (0.04)	0.14 (0.03)	0.20 (0.03)	0.24 (0.03)	0.08 (0.02)	0.52 (0.03)	0.78 (0.01)	0.14 (0.04)	0.14 (0.02)	0.40 (0.04)	0.06 (0.02)	0.82 (0.05)	0.62 (0.04)
DS FA	0.09 (0.03)	0.15 (0.02)	0.08 (0.02)	0.09 (0.01)	0.30 (0.02)	0.57 (0.02)	0.08 (0.02)	0.11 (0.02)	0.11 (0.02)	0.08 (0.01)	0.21 (0.02)	0.46 (0.04)	0.12 (0.02)	0.14 (0.03)	0.32 (0.02)	0.05 (0.02)	0.36 (0.03)	0.59 (0.02)
DS NFA	0.12 (0.03)	0.13 (0.04)	0.09 (0.02)	0.08 (0.03)	0.26 (0.02)	0.71 (0.03)	0.10 (0.01)	0.12 (0.02)	0.13 (0.04)	0.09 (0.01)	0.39 (0.01)	0.71 (0.01)	0.16 (0.04)	0.12 (0.02)	0.40 (0.03)	0.04 (0.03)	0.33 (0.04)	0.68 (0.03)
DS NFA+25	0.12 (0.03)	0.13 (0.03)	0.10 (0.01)	0.09 (0.02)	0.21 (0.03)	0.77 (0.03)	0.10 (0.02)	0.11 (0.02)	0.14 (0.02)	0.09 (0.01)	0.41 (0.03)	0.72 (0.01)	0.15 (0.03)	0.12 (0.03)	0.38 (0.04)	0.07 (0.02)	0.32 (0.04)	0.64 (0.04)
DS NFA+50	0.12 (0.04)	0.16 (0.03)	0.08 (0.02)	0.06 (0.02)	0.22 (0.02)	0.83 (0.04)	0.11 (0.02)	0.12 (0.02)	0.13 (0.03)	0.07 (0.01)	0.41 (0.03)	0.86 (0.03)	0.15 (0.03)	0.12 (0.03)	0.43 (0.04)	0.07 (0.01)	0.33 (0.03)	0.69 (0.04)
O <sub>3</sub>	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	*	***
drought	ns	*	***	ns	***	*	ns	***	***	ns	***	**	ns	ns	ns	ns	***	**
O <sub>3</sub> x drought	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*

Table I

Element	K					Ca				
	epidermis	guard cell	mesophyll	endodermis	vascular bundle	epidermis	guard cell	mesophyll	endodermis	vascular bundle
GERARDMER										
NS AA	0.49 ± 0.06	0.77 ± 0.06	0.85 ± 0.09	1.47 ± 0.14	0.74 ± 0.08	1.08 ± 0.10	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.03
NS FA	0.35 ± 0.03 d	0.63 ± 0.04 b	0.66 ± 0.05 d	1.32 ± 0.16 c	0.78 ± 0.07 b	1.05 ± 0.09 a	0.12 ± 0.02 b	0.11 ± 0.01 c	0.14 ± 0.02 c	0.12 ± 0.01 c
NS NFA	0.45 ± 0.04 c	0.81 ± 0.07 a	0.75 ± 0.06 c	1.48 ± 0.12 b	0.76 ± 0.08 b	1.02 ± 0.09 a	0.14 ± 0.02 b	0.16 ± 0.02 b	0.12 ± 0.02 c	0.16 ± 0.02 b
NS NFA + 25	0.51 ± 0.04 b	0.72 ± 0.06 ab	0.88 ± 0.07 b	2.16 ± 0.15 a	0.93 ± 0.08 a	0.87 ± 0.08 b	0.15 ± 0.02 b	0.16 ± 0.02 b	0.21 ± 0.03 b	0.19 ± 0.02 a b
NS NFA + 50	0.76 ± 0.06 a	0.80 ± 0.07 a	1.11 ± 0.09 a	2.05 ± 0.14 a	0.90 ± 0.08 a	0.83 ± 0.08 b	0.20 ± 0.03 a	0.26 ± 0.03 a	0.29 ± 0.03 a	0.22 ± 0.03 a
DS FA	0.40 ± 0.04 c	0.56 ± 0.04 b	0.73 ± 0.06 c	0.97 ± 0.09 c	0.44 ± 0.04 c	0.56 ± 0.04 d	0.10 ± 0.01 a	0.07 ± 0.01 c	0.12 ± 0.02 b	0.14 ± 0.02 b
DS NFA	0.59 ± 0.05 a	0.68 ± 0.07 a	0.93 ± 0.08 b	2.38 ± 0.17 a	0.67 ± 0.09 b	0.79 ± 0.07 c	0.12 ± 0.02 a	0.11 ± 0.01 b	0.11 ± 0.01 b	0.16 ± 0.02 b
DS NFA + 25	0.49 ± 0.05 b	0.67 ± 0.07 a	1.06 ± 0.09 a	2.36 ± 0.16 a	0.82 ± 0.07 a	0.92 ± 0.08 b	0.10 ± 0.01 a	0.15 ± 0.02 a	0.15 ± 0.02 a	0.17 ± 0.02 b
DS NFA + 50	0.41 ± 0.04 c	0.67 ± 0.06 a	1.07 ± 0.09 a	1.57 ± 0.12 b	0.75 ± 0.07 a	1.23 ± 0.11 a	0.11 ± 0.01 a	0.16 ± 0.02 a	0.17 ± 0.02 a	0.21 ± 0.02 a
ISTEBNA										
NS AA	0.68 ± 0.06	1.11 ± 0.10	0.98 ± 0.11	1.70 ± 0.20	0.90 ± 0.09	1.54 ± 0.11	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.03
NS FA	0.50 ± 0.05 c	0.84 ± 0.08 b	0.93 ± 0.09 c	1.60 ± 0.12 b	1.07 ± 0.09 a	1.60 ± 0.12 a	0.11 ± 0.01 c	0.11 ± 0.01 c	0.12 ± 0.01 c	0.18 ± 0.02 b
NS NFA	0.70 ± 0.06 b	1.07 ± 0.09 a	0.95 ± 0.10 c	1.67 ± 0.13 b	0.86 ± 0.07 b	1.53 ± 0.12 a	0.11 ± 0.01 c	0.15 ± 0.02 ab	0.17 ± 0.02 b	0.17 ± 0.02 b
NS NFA + 25	0.84 ± 0.07 a	1.08 ± 0.09 a	1.08 ± 0.10 b	1.73 ± 0.13 b	0.81 ± 0.07 b	1.31 ± 0.11 b	0.17 ± 0.02 b	0.14 ± 0.01 b	0.16 ± 0.02 b	0.17 ± 0.02 b
NS NFA + 50	0.86 ± 0.07 a	1.15 ± 0.10 a	1.26 ± 0.11 a	2.09 ± 0.14 a	0.78 ± 0.07 b	1.28 ± 0.11 b	0.29 ± 0.03 a	0.17 ± 0.02 a	0.24 ± 0.02 a	0.21 ± 0.02 a
DS FA	0.48 ± 0.03 c	0.71 ± 0.06 c	1.20 ± 0.10 a	1.35 ± 0.11 c	0.78 ± 0.07 b	0.72 ± 0.06 d	0.11 ± 0.01 b	0.14 ± 0.01 b	0.12 ± 0.01 b	0.17 ± 0.02 a
DS NFA	0.68 ± 0.06 b	0.96 ± 0.09 a	1.15 ± 0.11 a	1.54 ± 0.12 b	0.89 ± 0.08 a	1.28 ± 0.11 a	0.10 ± 0.01 b	0.16 ± 0.02 a	0.17 ± 0.02 a	0.14 ± 0.02 a
DS NFA + 25	0.83 ± 0.05 a	0.99 ± 0.09 a	1.10 ± 0.10 ab	2.13 ± 0.15 a	0.97 ± 0.09 a	1.17 ± 0.11 b	0.11 ± 0.01 b	0.14 ± 0.01 b	0.19 ± 0.03 a	0.14 ± 0.01 a
DS NFA + 50	0.89 ± 0.08 a	0.81 ± 0.08 b	1.02 ± 0.09 b	2.20 ± 0.15 a	0.82 ± 0.08 b	1.04 ± 0.06 c	0.15 ± 0.02 a	0.16 ± 0.02 a	0.16 ± 0.01 a	0.14 ± 0.02 a

Table II

Element	K						Ca					
	lower epidermis	upper epidermis	guard cell	palisade parenchyma	spongy parenchyma	vascular bundle	lower epidermis	upper epidermis	guard cell	palisade parenchyma	spongy parenchyma	vascular bundle
NS AA	1.11 ± 0.12 a	0.86 ± 0.09	0.83 ± 0.09	0.58 ± 0.06	0.74 ± 0.06	0.60 ± 0.05	0.83 ± 0.07	0.69 ± 0.06	0.87 ± 0.08	0.48 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.40 ± 0.04
NS FA	1.09 ± 0.10 a	1.08 ± 0.10 a	0.99 ± 0.08 a	0.95 ± 0.08 a	0.91 ± 0.08 a	0.66 ± 0.06 a	0.62 ± 0.05 c	0.61 ± 0.05 b	0.61 ± 0.05 b	0.41 ± 0.03 c	0.43 ± 0.04 c	0.38 ± 0.04 a
NS NFA	1.07 ± 0.11 a	0.83 ± 0.07 b	0.81 ± 0.07 b	0.55 ± 0.05 b	0.89 ± 0.08 a	0.63 ± 0.05 a	0.72 ± 0.06 b	0.61 ± 0.05 b	0.89 ± 0.07 a	0.53 ± 0.04 b	0.57 ± 0.05 b	0.35 ± 0.04 a
NS NFA+25	1.06 ± 0.10 a	0.88 ± 0.07 b	0.82 ± 0.07 b	0.63 ± 0.05 b	0.72 ± 0.06 b	0.58 ± 0.06 b	0.79 ± 0.06 a	0.64 ± 0.05 b	0.86 ± 0.07 a	0.60 ± 0.05 a	0.73 ± 0.06 a	0.34 ± 0.03 a
NS NFA+50	1.08 ± 0.11 a	0.76 ± 0.06 c	0.85 ± 0.07 b	0.55 ± 0.05 b	0.71 ± 0.06 b	0.59 ± 0.05 b	0.81 ± 0.07 a	1.29 ± 0.10 a	0.93 ± 0.08 a	0.63 ± 0.06 a	0.77 ± 0.07 a	0.35 ± 0.03 a
DS FA	0.99 ± 0.09 a	1.05 ± 0.09 a	0.88 ± 0.07 a	0.60 ± 0.05 a	0.59 ± 0.05 a	0.34 ± 0.03 b	0.42 ± 0.04 a	0.41 ± 0.04 a	0.50 ± 0.04 b	0.30 ± 0.02 b	0.30 ± 0.03 b	0.21 ± 0.02 b
DS NFA	0.73 ± 0.07 b	0.91 ± 0.08 b	0.90 ± 0.08 a	0.62 ± 0.05 a	0.53 ± 0.05 a	0.55 ± 0.04 a	0.45 ± 0.04 a	0.43 ± 0.04 a	0.58 ± 0.05 a	0.36 ± 0.04 a	0.43 ± 0.04 a	0.25 ± 0.03 a
DS NFA+25	0.67 ± 0.05 b	0.73 ± 0.06 c	0.88 ± 0.07 a	0.65 ± 0.05 a	0.54 ± 0.05 a	0.53 ± 0.04 a	0.45 ± 0.04 a	0.46 ± 0.04 a	0.57 ± 0.05 a	0.36 ± 0.03 a	0.43 ± 0.04 a	0.25 ± 0.02 a
DS NFA+50	0.69 ± 0.05 b	0.73 ± 0.06 c	0.87 ± 0.06 a	0.61 ± 0.06 a	0.58 ± 0.05 a	0.53 ± 0.04 a	0.42 ± 0.03 a	0.41 ± 0.03 a	0.58 ± 0.05 a	0.32 ± 0.03 ab	0.43 ± 0.04 a	0.24 ± 0.02 a

Table III



#### **Annexe 4**

Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study.

Le Thiec D, Rose C, Garrec JP, Laffray D, Louguet P, Galaup S, Loosveldt P (1994)

Canadian Journal of Botany **72**: 86-92.

# Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study

D. LE THIEC,<sup>1</sup> C. ROSE, AND J.P. GARREC

Institut national de la recherche agronomique, Centre de recherches forestières de Nancy, Laboratoire d'études de la pollution atmosphérique, 54280 Champenoux, France

D. LAFFRAY AND P. LOUGUET

Laboratoire de physiologie végétale, Université Paris XII, 94010 Créteil Cédex, France

S. GALAUP

Centre départemental d'études et de recherches sur l'environnement, 64150 Lagor, France

AND

P. LOOSVELDT

Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, Département de biologie végétale, 5030 Gembloux, Belgium

Received April 6, 1993

LE THIEC, D., ROSE, C., GARREC, J.P., LAFFRAY, D., LOUGUET, P., GALAUP, S., and LOOSVELDT, P. 1994. Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Can. J. Bot.* 72: 86–92.

Two clones of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. (Gerardmer clone and Istebna clone) were subjected to an ozone-enriched atmosphere. The X-ray microanalysis of elements present in the guard cells showed a decrease in potassium for the Gerardmer clone along with a larger closing of guard cells and an increase in calcium contents; for the Istebna clone, ozone did not affect these contents. When a drought stress was applied, an increase in calcium content of guard cells of the Istebna clone was also found. However, the potassium content was smaller in this case for the two clones and could well be due to stomatal closure. When ozone and drought stress were applied together, the potassium content in the Istebna clone was not affected, but for the Gerardmer clone, ozone reduced the decrease in potassium content that occurred as drought stress developed. However, calcium (and manganese) content increased significantly when the Gerardmer clone was exposed to ozone. It seems likely that the Gerardmer clone is sensitive to ozone and when subjected to a drought stress this sensitivity is increased. For the Istebna clone, the resistance to ozone is unaffected by the drought stress treatment. The Istebna clone, however, seems sensitive to drought. These characteristic responses in the two different Norway spruce clones are probably due to genetic differences and may explain the contradictory observations in the response of the stomata during the simultaneous implementation of the complex stresses.

*Key words:* *Picea abies*, guard cells, ozone, drought stress, X-ray microanalysis, elements.

LE THIEC, D., ROSE, C., GARREC, J.P., LAFFRAY, D., LOUGUET, P., GALAUP, S., et LOOSVELDT, P. 1994. Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Can. J. Bot.* 72: 86–92.

Deux clones de *Picea abies* (L.) Karst. (Gérardmer et Istebna) ont été soumis à une atmosphère enrichie en ozone. La microanalyse X des éléments présents dans les stomates a montré une baisse des teneurs en potassium en relation avec une fermeture plus importante des stomates et une augmentation en calcium, ceci pour le clone Gérardmer; pour le clone Istebna, l'ozone n'affecte pas les teneurs de ces deux éléments. Lorsqu'un stress hydrique est appliqué, une augmentation des teneurs en calcium dans les stomates du clone Istebna est enregistrée mais les teneurs en potassium sont plus faibles pour les deux clones dans ces conditions en relation avec une fermeture des stomates. Lorsque les deux traitements, ozone et stress hydrique sont appliqués simultanément, les teneurs en potassium n'évoluent pas par rapport au traitement stress hydrique pour le clone Istebna, mais pour le clone Gérardmer, l'ozone réduit la baisse en potassium qui se produit lors du stress hydrique. Par contre les teneurs en calcium (et manganèse) augmentent considérablement pour le clone Gérardmer par rapport au traitement ozone. Le clone Gérardmer semble être plus sensible à l'ozone seul et combiné à un stress hydrique. Le clone Istebna semble plus sensible à la sécheresse et moins sensible à l'ozone. Ces réactions particulières, mise en évidence sur deux clones différents d'épicéa, vraisemblablement d'origine génétique, pourraient expliquer les observations plus ou moins contradictoires sur les réactions des stomates lors de l'application simultanée de contraintes différentes.

*Mots clés:* *Picea abies*, cellule de garde, ozone, stress hydrique, microanalyse X, teneurs minérales.

## Introduction

Atmospheric pollution is thought to be highly involved in the phenomenon of forest decline. Numerous studies show us that pollution is not the only factor in question. The decline was initiated by a recent series of droughts (triggering factor), added to which were a lack of nutrients in the soil (predisposing factor) and different forms of atmospheric pollution (aggravating factor) (Bonneau and Landmann 1988).

To analyse the mechanisms of injury by the incriminated pollutants and to evaluate the early effects on foliage, certain devices capable of approximating natural conditions on the trees were set up. Open-top chambers at Montardon (Atlantic Pyrenees) allowed us to simulate the pollution climate of Col du Donon (Vosges), which is a zone of forest decline (Bonte et al. 1986). In this decline zone, only the ozone concentrations are increased, and this happens mainly in summer during the vegetative season of trees (Arndt et al. 1982; Garrec and Rose 1988). Since ozone penetrates foliar tissues via the stomata (Otto and Dainer 1969; Smith 1984), it seemed partic-

<sup>1</sup>Author to whom all correspondence should be addressed.

ularly interesting to study the effect of ozone on stomatal response. To approximate natural conditions and to research interactions between the effects of ozone and drought stress, trees were subjected to these stresses both alone and in combination.

Many studies analysed the kinetic aspects of  $K^+$  and  $Cl^-$  accumulation in relation to stomatal function (Sawhney and Zelitch 1969; Mac Robbie 1981; Laffray et al. 1982). In a previous study we measured the ion content of guard cells in declining Norway spruce (Garrec et al. 1991), but to our knowledge, accurate studies of stomatal ionic modifications in Norway spruce subjected to treatments by ozone and (or) to controlled drought stress do not exist.

In this work, using the X-ray microanalysis technique, we attempt to link variations in stomatal conductance with modifications in concentration and chemical composition of guard cells according to age and subjected to drought and ozone treatments.

## Materials and methods

### Materials

Five-year-old *Picea abies* (L.) Karst. plants from two different sources (the Gerardmer clone from France and the Istebna clone from Poland), selected by the Association Forêt Cellulose (AFOCEL), were placed in open-top chambers at Montardon, France (latitude  $43^{\circ}21'N$ , longitude  $0^{\circ}21'W$ ), on 30 April 1986 (five individuals per chamber). Two chambers were used, one in which the air is filtered and another in which filtered air is enriched with ozone (Bonte et al. 1986).

Concentrations of ozone applied (hourly average) reproduced those that existed in the Col du Donon, France (latitude  $48^{\circ}29'N$ , longitude  $7^{\circ}5'E$ ) 8 days before. The principal evolution characteristics of these concentrations was described by Ulrich (1990). The maximum daily values were in the order of  $0.04\text{--}0.06\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in winter but could reach as much as  $0.14\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  during summer. Figure 1 shows the monthly averages since the beginning of the experiment.

In each of the two chambers, two plants of each clone were subjected to drought during 15 days. At this time, the initial water potentials, measured in a shoot pressure chamber (Portable plant moisture system, Skye Instruments Ltd., Powys, U.K.), were on average  $-1.5\text{ MPa}$  for irrigated plants and approximately  $-2.5\text{ MPa}$  for plants subjected to drought.

The samples were taken on 13 June 1989 between 17:00 and 18:00 GMT. So as not to disturb the physiology of the young plants, approximately 10 needles from three age classes (current needles, 1989; 1-year-old needles, 1988; and 2-year-old needles, 1987) were taken from the upper part of the trees.

At the time of sampling, climatic conditions in the chambers were as follows: temperature  $29^{\circ}C$ ; lighting  $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; relative humidity 50%; and atmospheric deficit of saturating vapor pressure  $+20\text{ hPa}$  in chamber.

### Measuring the conductance of the needles

Measurements of stomatal conductance were carried out simultaneously on needle samples and on neighbouring needles. Needles of Norway spruce, detached from the branch, were introduced one by one into the humidity chamber of a Delta-T devices porometer (model Mk3, Cambridge, U.K.) as described by Malka (1988). This method allows an immediate estimate of stomatal resistance, but a precise examination of the surface of the needles is still necessary. In the case of the needles used from the Norway spruce for this experiment, relationships between their surface area and length were established. For these experiments, the corrected stomatal resistance ( $R_s$  in  $s\cdot\text{cm}^{-1}$ ) was calculated using the following equation:

$$[1] R_s = (at + b)(0.465l - 0.072)$$

where  $t$  is time in seconds given by the porometer Delta-T after appli-

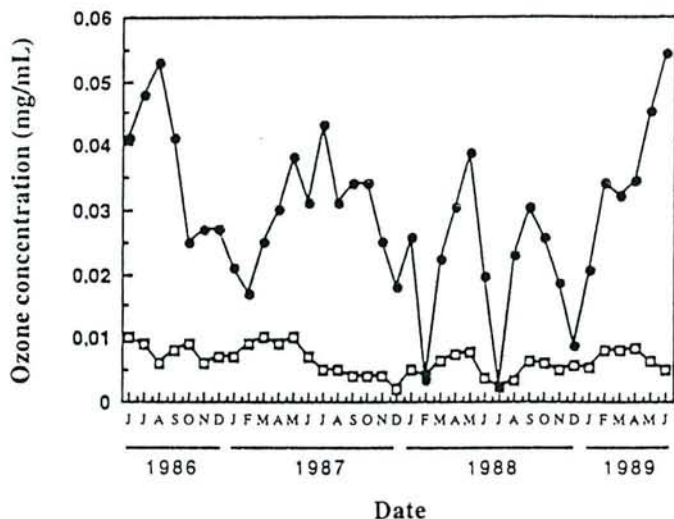


FIG. 1. Monthly averages of ozone concentrations from the beginning of the experiment in open-top chambers.  $\square$ , filtered air;  $\bullet$ , filtered air + ozone.

cation of temperature correction,  $l$  is length of the needles in centimetres, and  $a$  and  $b$  are factors determined by standardization of the apparatus. Because of time restrictions, these measurements of the stomatal conductance were mostly carried out on the Gerardmer clone. Each conductance value is the average of four measurements.

### X-ray microanalysis

Energy-dispersive X-ray (EDX) analysis allows one to investigate the elemental composition of biological samples. The preparation of biological samples for X-ray microanalysis was adapted according to the method of Garrec et al. (1983). To analyse the diffusible ions without artefacts, the samples are frozen in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}C$ ) immediately after detachment and kept in a freezer at  $-70^{\circ}C$ .

To analyse the guard cells, Norway spruce needles were placed individually in a cavity and covered with wax. We adapted a technique that allowed us to cut the needles lengthwise according to how the stomata are situated. This permitted us to analyse a large number of stomatal sections from the same needle (Fig. 2).

These lengthwise cuts were made using a cryomicrotome operating at  $-60^{\circ}C$ . They were then freeze-dried at  $-10^{\circ}C$  for 24 h, brought back to an ambient temperature, stuck to aluminium stubs with conductive glue (Leit C, Boiziau distribution, Selles sur Cher, France) that contains graphite, and then overlaid with a 10-nm conducting coat of carbon (metallizer Balzer's CED/020, Boiziau distribution, Selles sur Cher, France). The X-ray microanalyses are done with a scanning electron microscope (Stereoscan 90B, Cambridge Instruments, Cambridge, U.K.) equipped with a Si-Li diode.

A ZAF4 program, FLS, connected to the microanalyser (AN10000, 10/25, Cambridge Instruments, Cambridge, U.K.), gave us apparent concentrations (%) of the different elements analysed (Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn). To convert these results into real concentrations (% dry wt.), control samples were analysed in the same way as the plant samples. The controls were powdered spruce needles with known levels of elements (CRM 101 given by the Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities).

The analysis conditions of the microprobe for the biological samples and the check samples were as follows: accelerating voltage of primary electrons 15 kV (the beam does not penetrate other cells); X-ray take-off angle  $45^{\circ}$ ; analysis time 100 s; working distance from specimen to objective lens 20 mm; diode placed 40 mm from the sample.

### Statistical treatment

The statistical treatment employed is the analysis of variance by the GLM procedure (SAS Institute Inc. 1985). Test of equality of aver-



FIG. 2. Scanning electron micrograph (SEM) of longitudinal section of stomata. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

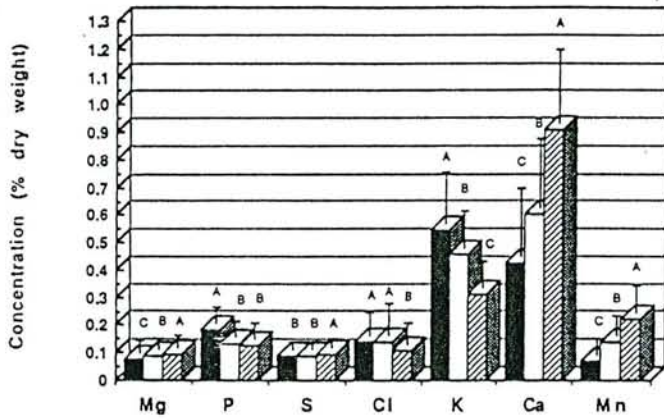


FIG. 3. Evolution of element contents in stomata by age of needles. ■, 1989 current needles ( $n = 478$ ); □, 1988 1-year-old needles ( $n = 399$ ); ▨, 1987 2-year-old needles ( $n = 323$ ). Test of equality of averages of Newman-Keuls was applied: bars with the same letter indicate that the averages are not significantly different, and alphabetic order corresponds to decreasing values. Vertical bars show standard deviation.

ages using Newman-Keuls was applied equally (the same letters indicate that averages are not significantly different, and the alphabetic order corresponds to decreasing values).

### Results

Figure 3 shows the guard cell concentrations of Mg, P, S, Cl, K, Ca, and Mn for needles of different age classes. From this it is apparent that the ageing of the needles involved a very significant decrease in K concentrations, a very significant increase in Ca, and a very highly significant increase of Mn concentration. Concentrations of Mg, P, S, and Cl were low and at the limit of probe detection (hundreds of  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). This made the interpretation of possible variations difficult. However, we noticed that ageing was associated with an

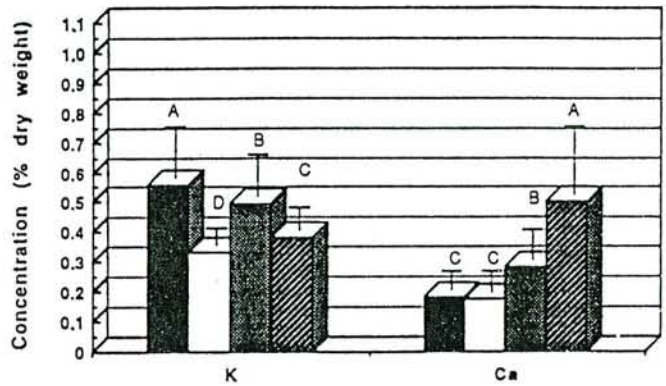


FIG. 4. Comparison of K and Ca contents in guard cells of current needles (1989) of the Gerardmer clone after different treatments: ■, filtered air ( $n = 47$ ); □, filtered air + water stress ( $n = 48$ ); ▨, filtered air + ozone ( $n = 74$ ); ▩, filtered air + water stress + ozone ( $n = 55$ ). Test of equality of averages of Newman-Keuls was applied: bars with the same letter indicate that the averages are not significantly different, and alphabetic order corresponds to decreasing values. Vertical bars show standard deviation.

increase in Mg contents (Marschner 1986) and a drop in the amount of P and Cl.

To accurately assess the consequences of each treatment on stomatal response, we considered the stomata from current needles only (1989, as they had the maximal physiological activity) and we also looked at the two clones. Furthermore, we limited the study to concentration variations of K and Ca because they are the essential elements in ionic movements that are linked to stomatal function.

Figures 4 and 5 represent the concentration variations of K and Ca in needle guard cells of the Norway spruce clones for the four treatments: filtered air, filtered air plus drought, filtered air plus ozone, and filtered air plus ozone plus water stress. Likewise, Mn variations according to the age of needles are shown in Figs. 7 and 8.

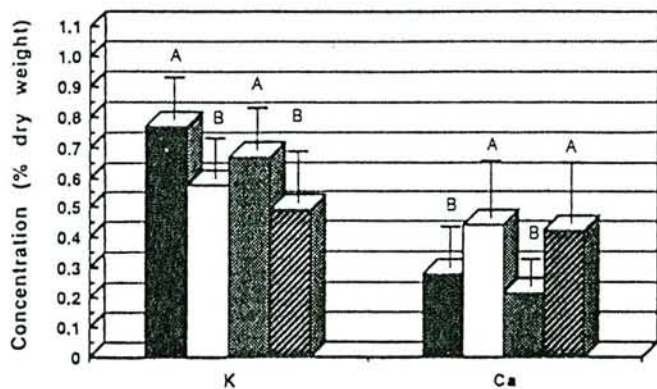


FIG. 5. Comparison of K and Ca contents in guard cells of current needles (1989) of the Itebna clone after different treatments: ■, filtered air ( $n = 76$ ); □, filtered air + water stress ( $n = 52$ ); ▨, filtered air + ozone ( $n = 52$ ); ▩, filtered air + water stress + ozone ( $n = 74$ ). Test of equality of averages of Newman-Keuls has been applied: bars with the same letter indicate that the averages are not significantly different, and alphabetic order corresponds to decreasing values. Vertical bars show standard deviation.

TABLE 1. Results of the analysis of variance on K and Ca concentrations in guard cells of the two clones Gerardmer and Itebna of *Picea abies* (L.) Karst. after applied stress

Source of variation	Filtered air + water stress		Filtered air + water stress + ozone	
	Gerardmer	Itebna	Gerardmer	Itebna
K	***	***	***	***
Ca	ns	***	***	***

NOTE: Significance was as follows: ns, not significant; \*\*\*, extremely significant ( $p < 0.001$ );  $\alpha = 0.05$ .

Table 1 summarizes the results of the analysis of variance of the effects of water stress on concentrations of K and Ca, depending on whether the clone grew in filtered air or filtered air plus ozone. Figure 6 shows the influence of each of the four treatments on stomatal conductance of Gerardmer's clone 1989 needles, but only the influence of filtered air and filtered air plus ozone on stomatal conductance of Itebna's 1989 needles (the measurements of two other treatments were not taken because light was insufficient).

In the case of the filtered-air treatment (absence of stress), the guard cells of the Gerardmer clone had an element content that was lower in potassium and calcium than that of the Itebna clone, whereas the stomatal conductance in the Gerardmer and Itebna clones was about the same.

Drought stress involved a decrease in potassium levels in the guard cells of plants in filtered air. This decrease was highly significant for the Itebna clone and reasonably significant for the two clones.

Ozone fumigation involved a decrease of potassium in the guard cells. This decrease was highly significant for the Gerardmer clone but not significant for the Itebna clone.

The combined action of the two treatments (ozone and drought stress) provoked a decrease in potassium in the guard cells of the Gerardmer clone and a strong decrease of this element in the guard cells of the Itebna clone.

It is interesting to note that for the Gerardmer clone, variations of stomatal conductance, under the influence of different

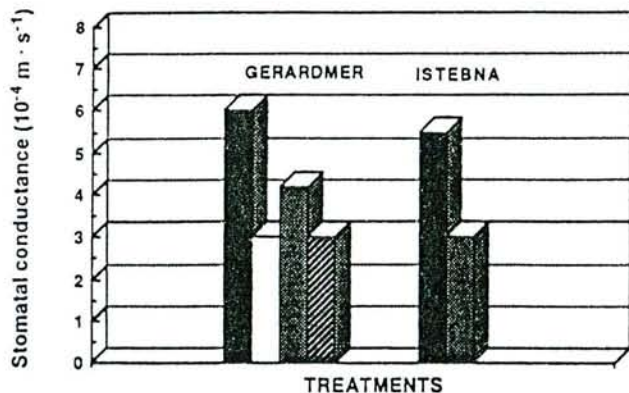


FIG. 6. Variation of stomatal conductance in the guard cells of current needles (1989) of the Gerardmer and Itebna clones after different treatments: ■, filtered air; □, filtered air + water stress; ▨, filtered air + ozone; ▩, filtered air + water stress + ozone ( $n = 4$ ).

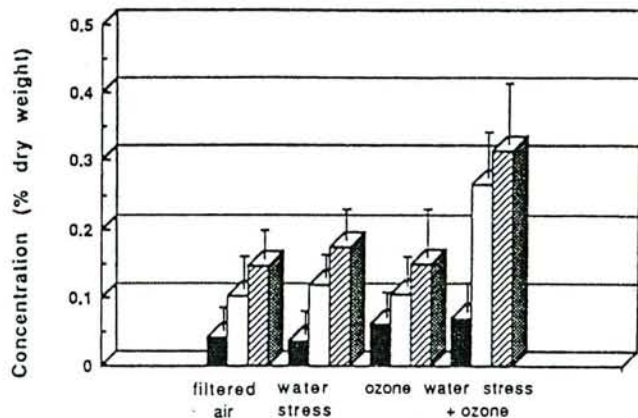


FIG. 7. Comparison of Mn contents in guard cells according to treatment and age of needles for the Gerardmer clone. ■, 1989 current needles; □, 1988 1-year-old needles; ▨, 1987 2-year-old needles.

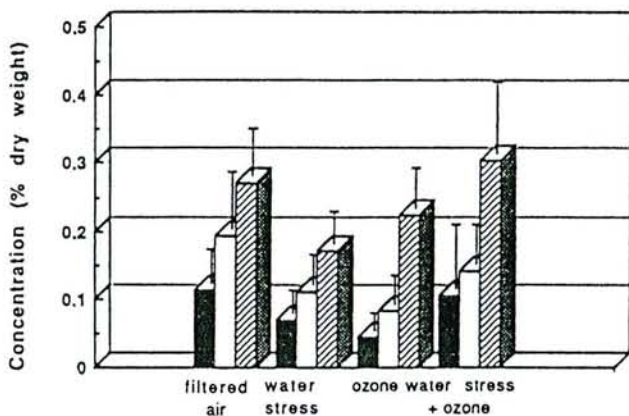


FIG. 8. Comparison of Mn contents in guard cells according to treatment and age of needles for the Itebna clone. ■, 1989 current needles; □, 1988 1-year-old needles; ▨, 1987 2-year-old needles.

treatments, were related to differences in K concentration of the guard cells. Some of the measurements of stomatal conductance from the Itebna clone showed a similar relationship between their variations and those of potassium.

TABLE 2. Variation (%) of K and Ca concentrations in guard cells of current needles (1989) and variations of stomatal conductance under the effect of different stresses

	Water stress	Ozone	Water stress + ozone
Gerardmer clone			
K concn.	-41.6	-12.3	-32.5
Stomatal conductance	-50.0	-33.5	-50.0
Ca concn.	-4.4	+55.2	+176.7
Istebna clone			
K concn.	-26.7	-13.8	-36.6
Stomatal conductance	—	-46.5	—
Ca concn.	+58.4	-23.4	+51.6

For calcium we found strong concentration increases in guard cells but only under the effects of drought stress for the Istebna clone and ozone fumigation for the Gerardmer clone. Action of the two treatments combined always provoked an increase of calcium in guard cells of the Gerardmer clone but not for the Istebna clone.

No variation in the level of manganese was found in the Istebna clone, but Gerardmer guard cells had increased levels of manganese in 1- and 2-year-old needles exposed to ozone and drought stress.

### Discussion

We found that during the ageing process of the needles, the concentrations of elements in guard cells reflect the global element variations associated with senescence. Indeed, as needle guard cells become older, we find, as in other tissues, an increase in manganese and calcium concentrations (Fink 1991a, 1991b; Garrec et al. 1991) and a reduction in potassium concentrations (Cape et al. 1990; Kinzel 1989). This decrease in potassium content is probably associated with the reduced stomatal functioning observed in older leaves. When we subjected Norway spruce to ozone stress, there was a small decrease in the potassium content of the guard cells. Other work found a decrease in stomatal conductance when plants were exposed to ozone (Unsworth and Black 1981; Barnes et al. 1990a; Chevone et al. 1990; Moldau et al. 1990). Drought was associated with a decrease of potassium in the guard cells. Other studies also found that drought stress caused the closing of stomata (Hsiao 1973; Chimiklis and Heath 1975; Turner and Jones 1980; Reich et al. 1985).

When analysing the elements in guard cells of both clones we found a decrease in potassium concentration in which our stomatal conductance measurements suggested that the stomata were closed. This is consistent with other published work (Schnabl and Raschke 1980; Laffray 1987; Mac Robbie 1988; Malka 1988; Garrec 1991).

The use of two clones showed that identical stomatal apertures can be associated with different concentrations of potassium: the Istebna clone had the higher potassium concentration inside the guard cells. The origin of this variation should be investigated, either in the different plasticity of the walls or in relation to the number and size of the different guard cells between clones or in different osmoticum K contents.

There is a correlation between stomatal aperture and K accumulation in the three Gerardmer treatments. Table 2 shows relative variations of K concentrations in guard cells for

the Gerardmer and Istebna clones under the influence of the different stresses, and also the values of the corresponding stomatal conductance. However, it appears that the stomatal responses in Norway spruce when exposed to one or other of these stresses can vary in importance according to the clone (Keller and Häslér 1987; Ebel et al. 1990; Dotzler and Schütt 1990; Führer et al. 1990; Pfirmann et al. 1990; Blanck et al. 1990). Our potassium analyses indicated the same changes as found by Pearson and Mansfield (1993) when they studied stomatal resistance in beech. These alterations of stomatal behaviour could be the result of guard cell wall delignification under the influence of ozone (Maier-Maercker 1989).

When a drought stress was imposed on the trees, both clones showed a decrease in potassium concentration, which was almost certainly associated with stomatal closure. The porometer measurements for the Gerardmer clone support this. Calcium gives an idea of the degree of stress. Fink (1991b) found that trees showing symptoms of forest decline had increased calcium levels in the form of calcium oxalate crystals. From analysis of variations in Ca concentrations we noticed that stomata of the Istebna clone seem to react to dehydration (Fig. 8). Aussenac et al. (1987) found that the Istebna clone reacts to drought stress. However, it is difficult to say whether this increased calcium concentration is a phenomenon that protects the tree from damage or whether it represents the fact that damage has been done to the tree.

When ozone alone was applied there were no significant potassium changes, but there was a large increase in calcium concentration in the Gerardmer clone. As calcium is involved in detoxification (Marschner 1986), it seems likely that ozone provoked this increase. However, it is difficult to say whether this shows that the Gerardmer clone was damaged by ozone or whether it had a better defence than the Istebna clone. The two stresses applied together caused increases in calcium concentration, but these were much greater in the Gerardmer clone.

The modifications in element concentrations recorded in the guard cells subjected to ozone fumigation or drought stress would essentially result from changes in membrane permeability under the influence of these stresses (Chevone et al. 1990). Numerous studies show the effect of ozone on the membrane permeability of ions (Evans and Ting 1973; Chimiklis and Heath 1975; Heath and Frederick 1979; Heath and Castillo 1988; Fink 1991b). In the same way, when a drought stress is applied to a plant, modification of membrane permeability is provoked. This can be shown by a leakage of ions (increase in electrical conductivity in the solute leakages) on leaves subjected to effects of drought stress or to the action of polyethylene glycol (Leopold et al. 1981; Vasquez-Tello et al. 1990; Zwiazek and Blake 1990). In these solute leakages the main ion lost is potassium (Pukacki and Pukacka 1987).

It should be noted that by this technique, different authors found contradictory results at the level of permeability modifications of membranes to electrolytes after the action of pollutants (principally ozone and SO<sub>2</sub>). The different results depend on whether pollutants act singly or in combination, and also according to the plant (differences are even found within the same species) (Elkiey and Ormrod 1979; Beckerson and Hofstra 1980; Keller 1986).

It is possible that this potassium leakage from the guard cells originated from the membrane changes induced by abscisic acid synthesized by the roots following dehydration (Van Stevenink and Van Stevenink 1983; Zhang and Davies 1989; Mansfield and Atkinson 1990; Mansfield et al. 1990).

More generally, it is shown that ozone stress or drought stress brings on early senescence in plants (Pierre 1984) and stomata (Reich and Lassoie 1985; Barnes et al. 1990b). This ageing is characterized in leaves by an increase in calcium (Fink 1991a) and a decrease in potassium (Cape et al. 1990), variations that could be passed on to the stomata despite regulation systems that seem to exist, in particular for calcium (Atkinson et al. 1989; Barnes et al. 1990a; Chevone et al. 1990). According to Schier (1990), Skeffington and Roberts (1985), and Reich et al. (1985), ozone increases the manganese concentration in leaves. This phenomenon results from a metabolic reaction that repairs the damage caused by ozone. Thus the Gerardmer clone is perhaps responding more than the Istebna clone to the increasing ozone. However, ions (particularly  $K^+$  and  $Cl^-$ ) are not the sole osmotic involved in stomatal movement, and organic solutes such as malate are equally important. More generally, a differing response of these two mechanisms (movement of ions and synthesis of organic solutes) according to species or stress differences could explain the stomatal responses with respect to single or complex stresses.

### Conclusions

Stresses like ozone fumigation or drought bring about changes in the composition of elements in the guard cells of Norway spruce needles that relate to changes in the response of the stomata observed at the same time.

The use of different Norway spruce clones allows us to show that there are some differences in the responses to these stresses, probably for genetic reasons.

### Acknowledgment

The authors are indebted to Martin Dixon for his technical review and help with translation.

Arndt, U., Seufert, G., and Nobel, W. 1982. Die Beteiligung von Ozon an der Komplexkrankheit der Tanne (*Abies alba* Mill.) eine prüfenswerte Hypothese. Staub Reinhalt. Luft, 42: 243–246.

Atkinson, C.J., Mansfield, T.A., Kean, A.M., and Davies, W.J. 1989. Control of stomatal aperture by calcium in isolated epidermal tissue and whole leaves of *Commelina communis* L. New Phytol. 111: 9–17.

Aussenac, G., Clément, C., and Guehl, J.M. 1987. Influence d'une application combinée de brouillards acides et d'une sécheresse édaphique sur la capacité photosynthétique, la régulation stomatique et le pool anionique des tissus foliaires de l'épicéa commun. In Programme DEFORPA. État des recherches à la fin de l'année 1986. Vol. 3. pp. 41–58.

Barnes, J.D., Eamus, D., and Brown, K.A. 1990a. Influence of ozone, acid mist and soil nutrient status on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). I. Plant–water relations. New Phytol. 114: 713–720.

Barnes, J.D., Eamus, D., Davison, A.W., Ro-Poulsen, H., and Mortensen, J. 1990b. Persistent effects of ozone on needle water loss wettability in Norway spruce. Environ. Pollut. 53: 345–363.

Beckerson, D.W., and Hofstra, G. 1980. Effects of sulphur dioxide and ozone, singly or in combination on membrane permeability. Can. J. Bot. 58: 451–457.

Blanck, L.W., Payer, H.D., Pfirmann, T., and Rehfuess, K.E. 1990. Effects of ozone, acid mist and soil characteristics on clonal Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.)—Overall results and conclusions of the joint 14 month tree exposure experiment in closed chambers. Environ. Pollut. 64: 385–395.

Bonneau, M., and Landmann, G. 1988. De quoi la forêt est-elle malade? Recherche, 205: 1542–1553.

Bonte, J., Cantuel, J., Dubois, C., and Malka, P. 1986. Simulation de l'action du dioxyde de soufre et de l'ozone seuls ou en mélange sur l'épicéa en chambre à ciel ouvert. In Programme DEFORPA — Comptes rendus scientifiques pour la période 1984–1986. Vol. 3. Edited by G. Landmann. École nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France. pp. 13–39.

Cape, N., Freer-Smith, P.H., Paterson, I.S., Parkinson, J.A., and Wolfenden, J. 1990. The nutritional status of *Picea abies* (L.) Karst. across Europe, and implications for "forest decline." Trees (Berlin), 4: 211–224.

Chevone, B.I., Seiler, J.R., Melkonian, J., and Amundson, R.G. 1990. Ozone – water stress interactions. In Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Edited by R.G. Alscher and J.R. Cumming. Plant Biol. 12: 311–328.

Chimiklis, P.E., and Heath, R.L. 1975. Ozone induced loss of intracellular potassium ion from *Chlorella sorokiniana*. Plant Physiol. 56: 723–727.

Dotzler, M., and Schütt, P. 1990. Long lasting effects of  $O_3$  and  $SO_2$  on the sensitivity to drought in two clones of *Picea abies* (L.) Karst. Eur. J. For. Pathol. 20: 59–63.

Ebel, B., Rosenkranz, J., Schiffgens, A., and Lütz, C. 1990. Cytological observations on spruce needles after prolonged treatment with ozone and acid mist. Environ. Pollut. 64: 323–335.

Elkley, T., and Ormrod, D.P. 1979. Ozone and/or sulphur dioxide effects on tissues permeability of *Petunia* leaves. Atmos. Environ. 13: 1165–1168.

Evans, L.S., and Ting, I.O. 1973. Ozone induced membrane permeability changes. Am. J. Bot. 60: 155–162.

Fink, S. 1991a. The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). New Phytol. 119: 33–40.

Fink, S. 1991b. Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. New Phytol. 119: 41–51.

Führer, G., Dunkl, M., Knoppik, D., Selinger, H., Blank, L.W., Payer, H.D., and Lange, O.L. 1990. Effects of low-level long-term ozone fumigation and acid mist on photosynthesis and stomata of clonal Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Environ. Pollut. 64: 279–293.

Garrec, J.P. 1991. Effects of atmospheric pollution on the above-ground part of the trees. In French research into forest decline. DEFORPA Programme 2nd report. Edited by G. Landmann. École nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France. pp. 59–86.

Garrec, J.P., and Rose, C. 1988. Utilisation d'un bio-indicateur végétal pour la mesure de l'ozone en montagne. Pollut. Atmos. 119: 271–276.

Garrec, J.P., Vavasseur, A., Michalowicz, G., and Laffray, D. 1983. Stomatal movements and repartition of the elements K, Cl, Na, P, Mg and S in the stomatal complexes of *Vicia faba* and *Commelina communis*. Electron probe studies. Z. Pflanzenphysiol. 112: 35–42.

Garrec, J.P., Laitat, E., Richardin, I., and Rose, C. 1991. Dépérissement forestier et perturbations minérales aux niveaux histologique et cellulaire dans les aiguilles de *Picea abies* L. Étude par micro-analyse X. Ann. Sci. For. (Paris), 4: 321–332.

Heath, R.L., and Castillo, F.J. 1988. Membrane disturbances in response to air pollutants. In Air pollution and plant metabolism. Edited by S. Schulte-Hostede, N.M. Darrall, L.W. Blank, and A.R. Wellburn. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London. pp. 55–75.

Heath, R.L., and Frederick, P.E. 1979. Ozone alteration of membrane permeability in *Chlorella*. I. Permeability of potassium ion as measured by  $^{86}$ rubidium tracer. Plant Physiol. 64: 455–459.

Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. Annu. Rev. Plant Physiol. 24: 519–570.

Keller, T. 1986. The electrical conductivity of Norway spruce needle diffusate as affected by certain air pollutants. Tree Physiol. 1: 85–94.

- Keller, T., and Häslner, R. 1987. Some effects of long term ozone fumigations on Norway spruce. I. Gas exchange and stomatal response. *Trees* (Berlin), 1: 129–133.
- Kinzel, H. 1989. Calcium in the vacuoles and cell walls of plant. Forms of deposition and their physiological and ecological significance. *Flora* (Jena), 182: 99–125.
- Laffray, D. 1987. Microanalyse des éléments potassium et chlore dans les cellules stomatiques. Étude comparée de leurs modalités d'action dans les mécanismes du mouvement des stomates. Thèse de doctorat d'État, Université de Paris Val de Marne, Créteil.
- Laffray, D., Louguet, P., and Garrec, J.P. 1982. Microanalytical studies of potassium and chloride fluxes and stomatal movements of two species: *Vicia faba* and *Pelargonium ×hortorum*. *J. Exp. Bot.* 33: 771–782.
- Leopold, A.C., Musgrave, M.E., and Williams, K.M. 1981. Solute leakage resulting from leaf desiccation. *Plant Physiol.* 68: 1222–1225.
- Mac Robbie, E.A.C. 1981. Ion fluxes in "isolated" guard cells of *Commelina communis* L. *J. Exp. Bot.* 32: 545–562.
- Mac Robbie, E.A.C. 1988. Control of ion fluxes on stomatal guard cells. *Bot. Acta*, 101: 140–148.
- Maier-Maercker, U. 1989. Delignification of subsidiary and guard cells walls of *Picea abies* (L.) Karst. by fumigation with ozone. *Trees* (Berlin), 3: 57–64.
- Malka, P. 1988. Étude en chambre à ciel ouvert, des effets de doses subnécrotiques d'ozone et de dioxyde de soufre sur la croissance et le fonctionnement stomatique de *Picea abies*. Thèse de doctorat, Université de Paris Val de Marne, Créteil.
- Mansfield, T.A., and Atkinson, C.J. 1990. Stomatal behaviour in water stressed plants. In *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Edited by R.G. Alscher and J.R. Cumming. *Plant Biol.* 12: 241–264.
- Mansfield, T.A., Hetherington, A.M., and Atkinson, C.J. 1990. Some current aspects of stomatal physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 55–75.
- Marschner, H. 1986. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Moldau, H., Söber, J., and Söber, A. 1990. Differential sensitivity of stomata and mesophyll to sudden exposure of bean shoots to ozone. *Photosynthetica*, 24: 446–458.
- Otto, H.W., and Dainer, R.H. 1969. Plant injury by air pollutants. Influence of humidity on stomatal apertures and plant response to ozone. *Science* (Washington, D.C.), 163: 1209–1210.
- Pearson, M., and Mansfield, T.A. 1993. Interacting effects of ozone and water stress on the stomatal resistance of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.* 123: 351–358.
- Pfaffmann, T., Runkel, K.H., Schramel, P., and Eisenmann, T. 1990. Mineral and nutrient supply, content and leaching in Norway spruce exposed for 14 months to ozone and acid mist. *Environ. Pollut.* 64: 229–253.
- Pierre, M. 1984. Effets non visibles de la pollution des végétaux par le SO<sub>2</sub>: modifications du métabolisme et coût physiologique chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*). Thèse de doctorat ès Sciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Pukacki, P., and Pukacka, S. 1987. Freezing stress and membrane injury of Norway spruce (*Picea abies*) tissues. *Physiol. Plant.* 69: 156–160.
- Reich, P.B., and Lassoie, J.P. 1985. Influence of low concentrations of ozone on growth, biomass partitioning and leaf senescence in young hybrid poplar plants. *Environ. Pollut. Ser. A Ecol. Biol.* 39: 39–51.
- Reich, P.B., Schoettle, A.W., and Amundson, R.G. 1985. Effects of low concentrations of O<sub>3</sub>, leaf age and water stress on leaf diffusive conductance and water use efficiency in soybean. *Physiol. Plant.* 63: 58–64.
- SAS Institute Inc. 1985. SAS user's guide, version 5 edition. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Sawhney, B.L., and Zelitch, I. 1969. Direct determination of potassium ion accumulation in guard cells in relation to stomatal opening in light. *Plant Physiol.* 44: 1350–1354.
- Schier, G.A. 1990. Response of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) seedlings to simulated acid rain and ozone. 2. Effect on throughfall chemistry and nutrients in the leaves. *Environ. Exp. Bot.* 30: 325–331.
- Schnabl, H., and Raschke, K. 1980. Potassium chloride as stomatal osmoticum in *Allium cepa* L., a species devoid of starch in guard cells. *Plant Physiol.* 65: 88–93.
- Skeffington, R.A., and Roberts, T.M. 1985. The effects of ozone and acid mist on Scot pine samplings. *Oecologia*, 65: 201–206.
- Smith, W.H. 1984. Pollutant uptake by plants. In *Air pollution and plant life*. Edited by M. Treshow. John Wiley & Sons, New York. pp. 417–450.
- Turner, N.C., and Jones, M.M. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Edited by N.C. Turner and P.J. Kramer. John Wiley & Sons, New York. pp. 87–103.
- Ulrich, E. 1990. Que peut on conclure des mesures de polluants gazeux réalisés à la tour du Donon? (massif forestier des Vosges). Rapport DEFORPA. École nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France.
- Unsworth, M.H., and Black, V.J. 1981. Stomatal responses to pollutants. In *Stomatal physiology*. Edited by P.G. Jarvis and T.A. Mansfield, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 187–203.
- Van Stevenink, R.F.M., and Van Stevenink, M.E. 1983. Abscisic acid and membrane transport. In *Abscisic acid*. Edited by F.T. Addicott. Praeger Publishers, New York. pp. 171–235.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A.T., and Vieira Da Silva, J.B. 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J. Exp. Bot.* 41: 827–832.
- Zhang, J., and Davies, W.J. 1989. Sequential responses of whole plant water relations to prolonged soil drying in the involvement of xylem-sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. *New Phytol.* 113: 167–174.
- Zwiazek, J.J., and Blake, T.J. 1990. Effects of preconditioning on electrolyte leakage and lipid composition in black spruce (*Picea mariana*) stressed with polyethylene glycol. *Physiol. Plant.* 79: 71–77.



## Annexe 5

The growth and gas exchange response of soil planted Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) and red oak (*Quercus rubra* L.) exposed to elevated CO<sub>2</sub> and to naturally occurring drought stress.

Dixon M, Le Thiec D, Garrec JP (1995)

New Phytologist **129** (2)

# The growth and gas exchange response of soil-planted Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) and red oak (*Quercus rubra* L.) exposed to elevated CO<sub>2</sub> and to naturally occurring drought

BY MARTIN DIXON, DIDIER LE THIEC AND  
JEAN PIERRE GARREC

*INRA-Centre de Recherches Forestières de Nancy, Unité Ecophysiologie Forestière,  
Laboratoire Pollution Atmosphérique, 54 280, Champenoux, France*

(Received 20 April 1994; accepted 11 October 1994)

## SUMMARY

Norway spruce and red oak trees were planted directly into the soil and exposed to 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub> in open-top chambers. There were large inter-specific differences in response to naturally occurring drought during the second year of exposure to elevated CO<sub>2</sub>. Both species had decreased assimilation rates. CO<sub>2</sub>-treated red oak had no loss of photosynthetic enhancement when undroughted, whereas CO<sub>2</sub>-treated Norway spruce showed a relative increase in assimilation rates only when droughted. The effect of CO<sub>2</sub> on radial growth of both species was less marked in the second growing season, but this may have been a result of different biomass partitioning as Norway spruce shoot extension had a different pattern of growth in elevated CO<sub>2</sub>. Stomatal density and chlorophyll content were largely unaffected by the CO<sub>2</sub> treatment. A precise method for measuring Norway spruce needle surface area was also developed.

**Key words:** Carbon dioxide, drought, Norway spruce, red oak, gas exchange.

## INTRODUCTION

Concentrations of atmospheric CO<sub>2</sub> have been increasing since the middle of the last century and this rise seems likely to continue until well into the next century (Harrington, 1987). It is therefore of the utmost importance that the effects on plants of this increased CO<sub>2</sub> can be predicted, so that any likely changes in species distribution or crop yields can be prepared for.

Present CO<sub>2</sub> concentrations are limiting to the enzymes of C3 photosynthesis which convert inorganic carbon to carbohydrate. Much work has been done to assess the effects of artificially increased CO<sub>2</sub> on the photosynthesis and growth of plants. Most of these experiments have doubled CO<sub>2</sub> concentrations to 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  and photosynthetic increases of C3 plants are often in the order of 50% (Wolfe, 1994). This increase results from the increased CO<sub>2</sub> concentration at the carboxylation site of Rubisco and also the reduced competitive concentration of oxygen at this same site. The photosynthetic increase has not always lasted over

long periods of time, however, and often a reduced photosynthetic capacity is observed when plants are returned to present levels of atmospheric CO<sub>2</sub> (e.g. Hollinger, 1987). Growth increases may also be short-lived, especially in perennial species where the long-term response depends upon the source-sink balance (Wolfe, 1994). Recent evidence, however, has suggested that this subsequent growth and photosynthesis reduction may be an artefact of the experimental conditions because potted plants had limited soil volumes (Gunderson, Norby & Wullschlegel, 1993), or because nutrients were limiting (McConnaughay, Bernston & Bazzaz, 1993).

Most long-term field studies of CO<sub>2</sub> enrichment have been conducted in open-top chambers, usually with non-limiting levels of water and nutrients and with weeds and pests controlled. This situation is often far from the conditions in which plants grow, where any increase in CO<sub>2</sub> will exert its effects in conjunction with other factors that may limit growth throughout, or at different times during, the season.

Just like CO<sub>2</sub>, drought can affect the growth potential, stomatal conductance and photosynthesis

of plants (Chaves & Pereira, 1992). Furthermore, as atmospheric concentrations of CO<sub>2</sub> increase, many climate models predict an increase in the frequency of droughts (Johnsen, 1993) and associated with this increased CO<sub>2</sub>, increases in water use efficiency (Guehl *et al.*, 1994) due to decreased stomatal conductance. It has been proposed that this effect of elevated CO<sub>2</sub> can alleviate the effects of drought (Morison, 1993). To investigate better the combined long-term effects of increased CO<sub>2</sub> and drought in the field, an experiment was conducted on soil-planted trees in open-top chambers exposed to elevated CO<sub>2</sub>. The effect of this elevated CO<sub>2</sub> was followed throughout the vegetation period as natural drought developed.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Plant material and experimental site*

Natural CO<sub>2</sub> was obtained for experimental purposes from Ste. Marguerite, near Clermont Ferrand in France. This CO<sub>2</sub> has been extracted from natural spring water. The site co-ordinates are 45° 39' 40" N, 3° 14' 05" E and it is at 340 m above sea level. On 3 April 1991, 5-yr-old saplings of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) and 3-yr-old saplings of red oak (*Quercus rubra* L.) were planted directly into the soil. Norway spruce was used because of its economic importance and oak is the predominant species occurring in this area. The CO<sub>2</sub> concentrations in the chambers were continually monitored, as were air temperature and humidity. In 1991 and 1992 the plants were watered to avoid drought. Two open-top chambers (see Berteigne, 1987 for details) were constructed so as to enclose four trees of each species in two different treatments – ambient air (AA) and ambient air with 350 μmol mol<sup>-1</sup> of CO<sub>2</sub> added (AA+350). A group of trees was outside the chamber and served as controls. For logistic reasons, only two chambers could be used, which led to the treatments only being pseudo-replicated. For this reason, detailed comparisons of the soil and climate of the chambers were made to investigate any differences between them. The results of these investigations revealed very little difference, either over a whole

season (Table 1), or over 1 d (Fig. 1). The nutrient contents in the plants were also monitored and there were no deficiencies.

Day one of the experiment was designated as 10 April 1993.

##### *Plant growth*

Weekly measurements of the diameter of the trees were made, just above the soil surface. The diameter was measured at two different points on the circumference so that any architectural differences did not bias the results. Norway spruce shoot extension was also measured on a weekly basis on the terminal leader and first and second whorl growths.

##### *Pre-dawn leaf water potential*

The pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{wp}$ ) of the trees was measured using a Skye pressure chamber (Scholander *et al.*, 1965) on days when the gas exchange measurements were performed.

##### *Leaf gas exchange*

The net CO<sub>2</sub> assimilation rate: A (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and leaf conductance to water vapour:  $g_w$  (mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) were measured using the LiCor model 6200 (USA) portable photosynthesis chamber. Measurements were made on sunny days and the photon flux density of photosynthetically active radiation was 956 ± 305 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Thus light was never limiting for photosynthesis. The intrinsic water use efficiency (WUE) was calculated by dividing the assimilation rate by  $g_w$ .

Leaves were destructively harvested during the period of shoot extension, when measurements were made on current-year Norway spruce needles. After this period of shoot extension, one shoot was monitored for the rest of the season, as no subsequent surface area changes occurred. Measurements were carried out between 7.00 and 9.00 GMT on two trees per species and results were expressed according to the surface area of the foliage. For red oak trees this was done using a video camera coupled to an image analyzer (Delta T, UK).

**Table 1.** The mean values of temperature and relative humidity ( $\pm$ SD) in the two chambers from day 1 until day 143 of the experiment and the respective soil analyses (me = milli-equivalents). Test of equality of averages of Student–Newman and Keuls has been applied to the humidity and temperature results: same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values

Treatment	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	C (%)	N (%)	Ca (me/100 g)	K (me/100 g)	Mg (me/100 g)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (‰)
AA	17.8 a (3.558)	67 a (7.161)	4.2	0.41	4.1	0.61	0.77	0.55
AA+350	17.8 a (3.561)	67 a (7.165)	4.4	0.41	4.2	0.60	0.75	0.56
ANOVA	ns	ns						

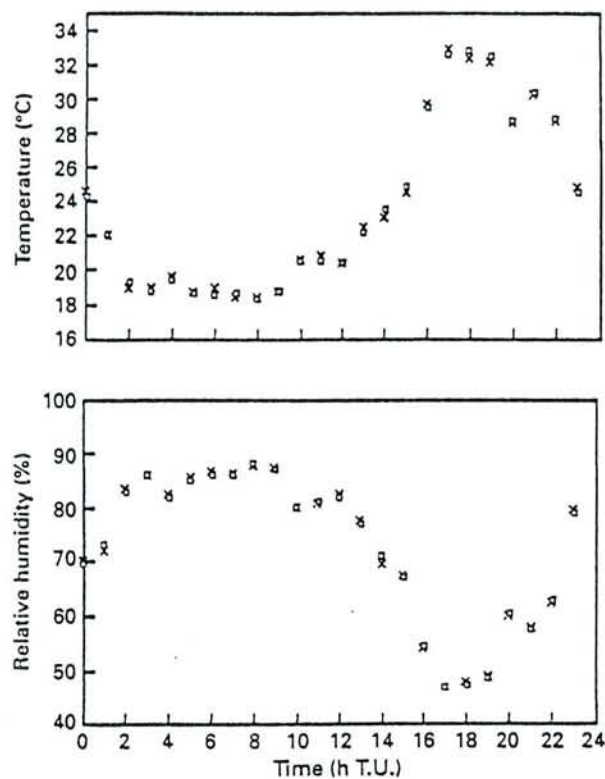


Figure 1. The diurnal changes in temperature and relative humidity in the two chambers on day 86 of the experiment. □, AA; ×, AA + 350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

Norway spruce needles cannot be approximated to two-dimensional forms as is done for oak, so a model describing their surface area is needed. To obtain such a model we made use of a scanning electron microscope (Stereoscan S90, Cambridge) to gain an empirical estimation of the surface area of a number of needles and relate this parameter to the needles' length and dry weight. The needles were cut into sections of *c.* 1 mm using a cryomicrotome, operating at  $-60^\circ\text{C}$ . The sections were then freeze-dried at  $-10^\circ\text{C}$  for 24 h, brought back to room temperature, stuck to aluminium stubs with graphite-containing conductive glue and then overlaid with a 10 nm coat of carbon using a Balzer metalizer (CED/020).

The samples were then magnified under the scanning electron microscope. The perimeter of each cut was measured and multiplied by its length to give the surface area of this particular section. This was done for all cut sections of a needle and the determined surfaces were added together to give a value for total needle surface area. Because the sections were only 1 mm thick any changes in cross-sectional area over the length of the cut section were slight. At the ends of the needles the surface was calculated using the formula for the surface of a cone. Examinations of 35 needles were carried out in this way and correlations with the needles' length were determined. Other needles were used to determine length-dry weight correlations and from these two relationships a model to determine needle surface area using dry weight was determined. This

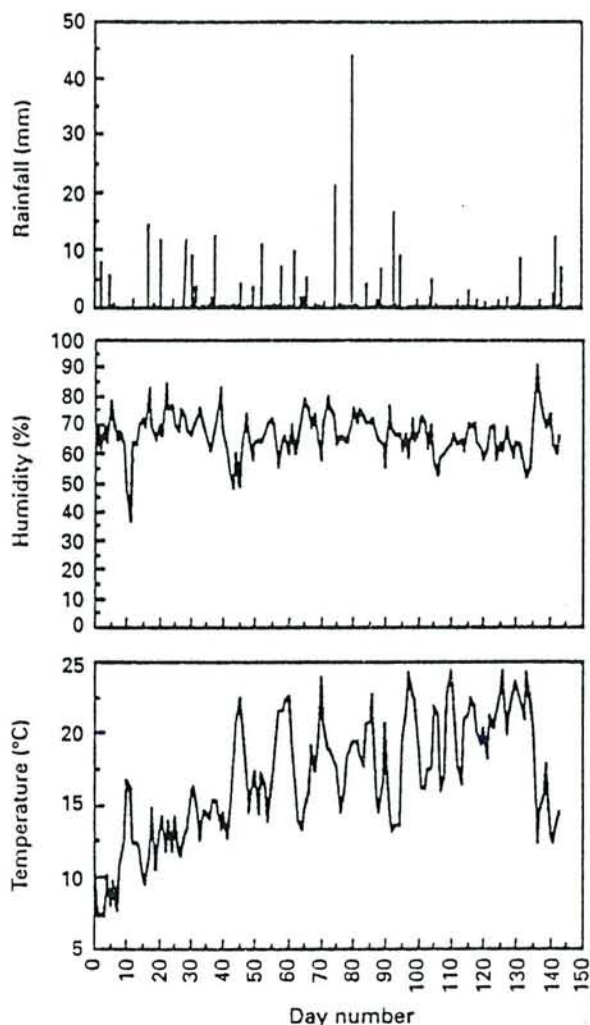


Figure 2. Temperature, humidity and rainfall during the measurement period at Ste. Marguerite. The measurements refer to the AA chamber.

was done on each treatment independently to ensure that there were no CO<sub>2</sub>-induced changes in specific leaf area. The results for the two treatments were then combined.

#### Stomatal density

Foliage was prepared for the scanning electron microscope using the method described above. The stomatal density of the trees was expressed according to the surface area of the foliage, which for Norway spruce was determined using the experimentally determined correlation between length and surface area.

#### Foliage chlorophyll content

Each month the foliage was analyzed to determine the quantities of chlorophyll *a* and *b*. Analyses were carried out on 2 cm<sup>2</sup> of first-flush red oak leaf and ten needles from the first three whorls of current-year and 1-yr-old growth of Norway spruce. Care was taken to avoid using plant material that had been excessively shaded as this may have altered the

amount of chlorophyll present. Chlorophyll contents were determined according to the method described in Barnes *et al.* (1992).

*Statistical methods*

The statistical treatment employed was the analysis of variance (ANOVA) by the GLM procedure (SAS Institute Inc., 1985). Test of equality of averages using Student Newman-Keuls was applied equally (the same letters indicate that averages are not

significantly different, and the alphabetic order corresponds to decreasing values).

Significance was as follows: ns = not significant; \* = significant ( $P = 0.05$ ); \*\* highly significant ( $P < 0.01$ ); \*\*\* extremely significant ( $P < 0.001$ );  $\alpha = 0.05$ .

RESULTS

*Environmental factors*

The daily measurements of rainfall, relative hu-

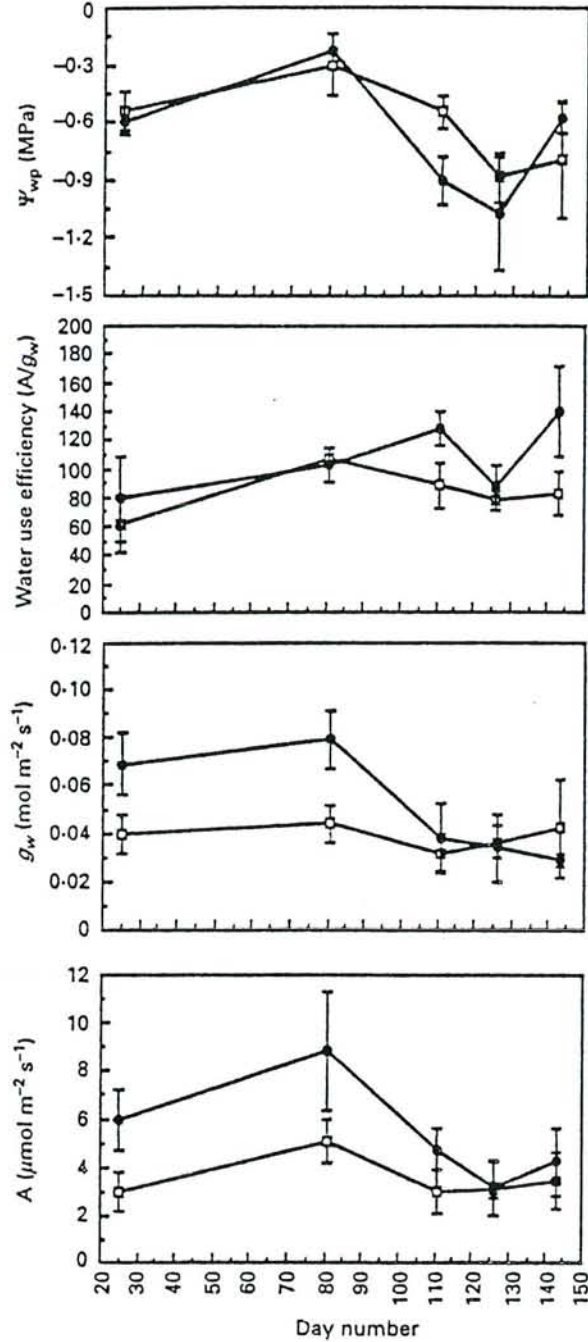


Figure 3. The progression of natural drought in red oak during 1993 and the corresponding values of instantaneous water use efficiency, stomatal conductance to water vapour and net photosynthesis rate, as influenced by an increased  $\text{CO}_2$  concentration. Error bars represent SD.  $\square$ , AA;  $\bullet$ , AA + 350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

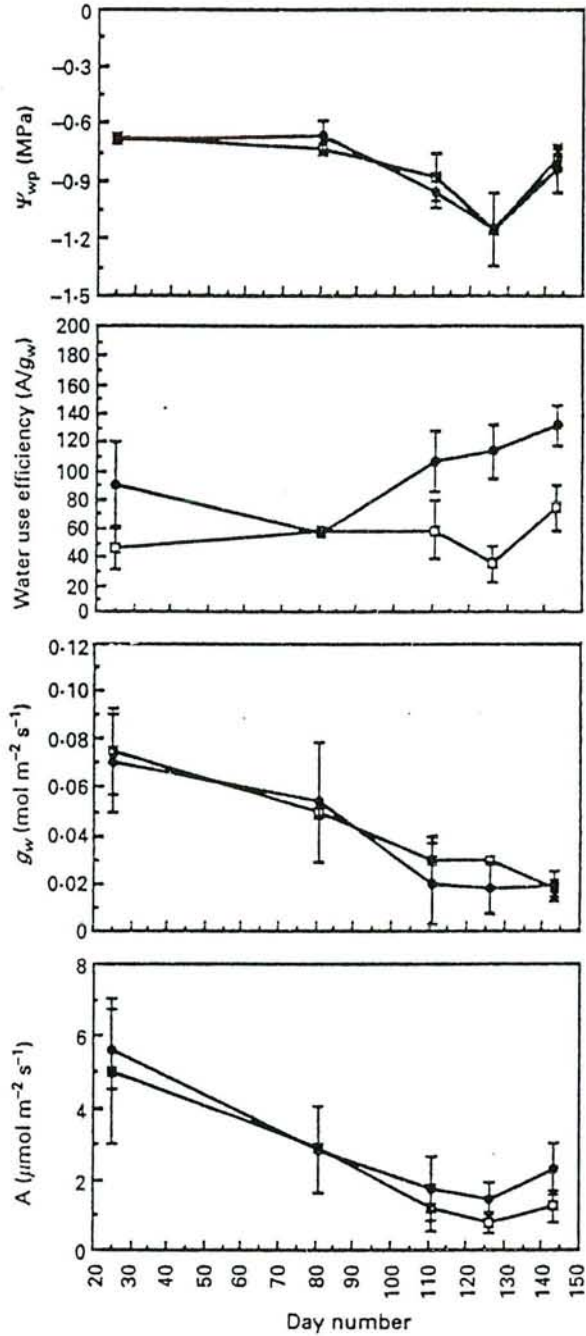


Figure 4. The progression of natural drought in Norway spruce during 1993 and the corresponding values of instantaneous water use efficiency, stomatal conductance to water vapour and net photosynthesis rate, as influenced by an increased  $\text{CO}_2$  concentration. Error bars represent SD.  $\square$ , AA;  $\bullet$ , AA + 350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

Table 2. The mean percentage ( $\pm$ SD) increase in basal trunk diameter over one season for 1992 and 1993. Test of equality of averages of Student–Newman and Keuls has been applied: same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values

Year... Treatment...	<i>Quercus rubra</i>		<i>Picea abies</i>	
	1992	1993	1992	1993
AA	41.47 $\pm$ 3.46 b	45.50 $\pm$ 5.42 a	40.19 $\pm$ 6.31 b	38.18 $\pm$ 9.13 a
AA+350	102.35 $\pm$ 9.47 a	47.12 $\pm$ 39.6 a	73.63 $\pm$ 7.54 a	42.25 $\pm$ 6.21 a

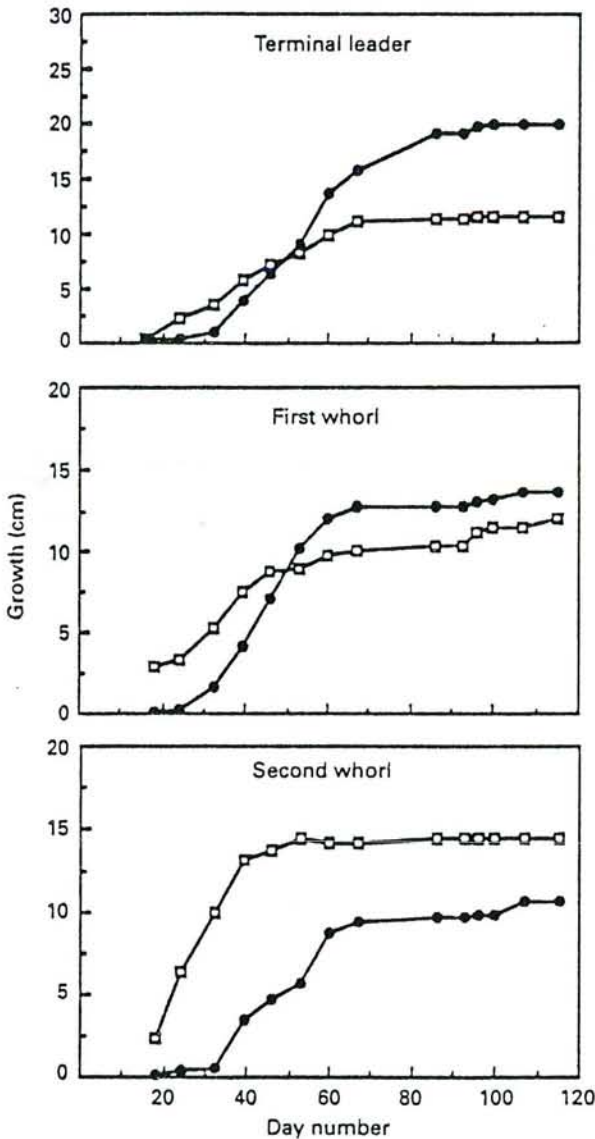


Figure 5. The influence of elevated CO<sub>2</sub> on Norway spruce shoot extension, following budburst, during the growth period of 1993. Each point is a mean of four trees and first and second whorl measurements were made on two shoots per tree. □, AA; ●, AA+350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

midity and temperature are given in Figure 2. The  $\Psi_{wp}$  values are shown in Figures 3 and 4. The decrease in  $\Psi_{wp}$  for all species corresponds to a

period of soil drying after day 190 when there was little rain for over a month. The period of soil drying saw a reduction in  $\Psi_{wp}$  to between  $-0.9$  and  $-1.5$  MPa on day 226 (14 August). There were no treatment-related differences in  $\Psi_{wp}$ .

#### Growth measurements

The percentage growth in basal diameter during two seasons is shown in Table 2. 1992 was the first growing season where the trees were exposed to elevated concentrations of CO<sub>2</sub> and regular irrigation and both species showed increased growth in association with this. In the second season, however, with no irrigation, there was no repeat of this increased growth and no inter-treatment differences were apparent.

Shoot extension of the terminal leader and first and second whorl growth of Norway spruce was monitored during 1993 (Fig. 5). Although there was no difference in basal diameter increase during this season, there appeared to be differences in the pattern of growth. Trees in elevated CO<sub>2</sub> had a greater terminal leader extension than AA trees. At the first whorl, shoot extension showed little inter-treatment difference and the second whorl growth was greater in the AA treatment.

#### Needle surface area

The relationships between Norway spruce surface area ( $S$ : mm<sup>2</sup> and needle length ( $l$ : mm) were as follows:

$$\text{Current-year needles } S = 3.4527 \times l - 8.8434$$

$$r = 0.971$$

$$1\text{-yr-old needles } S = 2.8508 \times l - 7.1282$$

$$r = 0.952$$

Relationships between dry weight (DW: mg) and length ( $l$ : mm) were also determined:

$$\text{Current-year needles } DW = 0.23021 \times l - 0.46697$$

$$r = 0.926$$

$$1\text{-yr-old needles } DW = 0.31729 \times l - 1.0511$$

$$r = 0.921$$

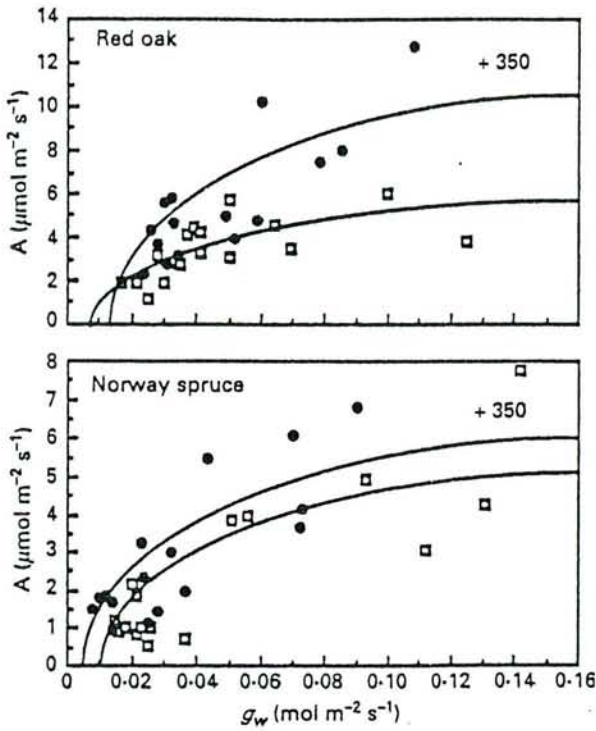


Figure 6. The relationship between net assimilation rate and stomatal conductance to water vapour in red oak and Norway spruce as a natural drought develops. Fitted curves are logarithmic. Correlation coefficients are as follows: red oak AA = 0.495, red oak AA + 350 = 0.635, Norway spruce AA = 0.717, Norway spruce AA + 350 = 0.629. □, AA; ●, AA + 350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

From these equations the relationship between dry weight and surface area of each needle age class was obtained.

Gas exchange measurements

Figures 3 and 4 present the variation of A, g<sub>w</sub> and WUE with the development of Ψ<sub>wp</sub> through the season. WUE fluctuates as the Ψ<sub>wp</sub> changes, but the trees in AA + 350 have, barring one occasion, the higher values. As the drought develops there is a relatively greater decrease in g<sub>w</sub> for Norway spruce in AA + 350, but this level of conductance allows relatively higher rates of photosynthesis than the AA trees. Because of this, the droughted AA + 350 trees

Table 4. The stomatal densities per mm<sup>2</sup> (±SD) of surface area for red oak and Norway spruce (current year needles 1993; 1-yr-old needles: 1992) exposed to elevated CO<sub>2</sub>. Test of equality of averages of Student, Newman and Keuls has been applied: same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values

Species ...	Oak	Spruce 1993	Spruce 1992
AA	972 b (182)	49 a (9)	61 a (12)
AA + 350	1050 a (171)	53 a (12)	67 a (18)
ANOVA	*	ns	ns

have greater WUE values compared to droughted AA trees. The variation of A with g<sub>w</sub> is presented in Figure 6. All trees had increased rates of photosynthesis as stomatal conductance increased. Also, in the CO<sub>2</sub>-treated red oak trees at higher Ψ<sub>wp</sub> values, the enhancement of photosynthesis was increased. This leads to an increase in intrinsic water use efficiency (WUE) of the trees in AA + 350.

No typical (e.g. Hollinger, 1987) relationships were observed between photosynthesis and inter-cellular CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>i</sub>).

Chlorophyll contents

The chlorophyll contents expressed according to both dry weight and surface area of foliage are presented in Table 3. Current-year needles of Norway spruce under CO<sub>2</sub> enrichment (AA + 350) had significantly lower levels of chlorophyll (P = 0.05) than the AA trees when expressed in relation to dry weight of foliage. The relative quantities of chlorophyll a and b showed no differences between treatments.

Stomatal density

The stomatal density results are presented in Table 4. The only significant difference was an increase

Table 3. Chlorophyll contents (±SD) expressed according to dry weight (d. wt) and surface area of foliage. The ratio of chlorophyll a to chlorophyll b is also shown. Test of equality of averages of Student, Newman and Keuls has been applied: same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values

Treatment	Chl a+b (mg g <sup>-1</sup> d. wt)			Chl a+b (g m <sup>-2</sup> )			Chl a/b		
	Oak	Spruce 93	Spruce 92	Oak	Spruce 93	Spruce 92	Oak	Spruce 93	Spruce 92
AA	6.05 a (1.23)	5.49 a (1.53)	3.73 a (1.21)	0.28 a (0.07)	0.15 a (0.03)	0.16 a (0.03)	4.16 a (1.28)	5.50 a (0.63)	3.84 a (0.26)
AA + 350	5.83 a (1.08)	4.15 b (1.12)	3.44 a (1.57)	0.33 a (0.07)	0.13 a (0.04)	0.17 a (0.04)	4.59 a (1.51)	5.86 a (0.97)	3.72 a (0.47)
ANOVA	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

( $P = 0.05$ ) in the number of stomata in red oak exposed to elevated CO<sub>2</sub>.

#### Chamber effects

There were no statistically significant differences in plant responses between the AA treatment and the control trees outside chambers. The  $\Psi_{wp}$  of the control plants was slower to decrease (perhaps because the chambers received less rain, or because of their increased temperature of  $\leq 2$  °C), but by the fourth measurement day, they had descended to a value slightly lower than the trees in chambers. The difference in humidity between the chamber and outside controls was 3.2%. To make the presented data easier to follow we have not shown results from these controls.

#### DISCUSSION

The method used to estimate needle surface area is the most empirical attempt that we have been able to find from comparison with other published work. Riederer *et al.* (1988) have analyzed projected areas of needles stuck onto paper, using a photocopy machine and a computer-aided image analysis system. However, although this is a more empirical method than the attempts made to model the shapes of needles (e.g. Malka, 1988) the surface area can only be inferred indirectly. Hornqvist (1988) calculated the surface area from needle cross-sectional area, but it appears that this parameter was measured at one point on the needle only. Our measurements were made on millimetre sections so the errors associated with changes in the form of the needle over its length are likely to be small. The equations we obtained were close to those obtained in the three afore-mentioned papers, so these results give more confidence to previous estimates of needle surface area and also the area-related expressions of the physiological measurements presented here.

Changes in stomatal density are important as they can effect both the uptake of CO<sub>2</sub> and the rate of water loss. Woodward (1987) studied herbarium samples and found a decrease of 40% in the stomatal density of various species collected over the last 200 years. This period saw a rise of 60  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  in the ambient CO<sub>2</sub> concentration. Körner (1988), however, found no general trend in a number of plant species collected over the last 120 years. Our results showed no differences in stomatal density between treatments for both species apart from a 7% increase in first-flush CO<sub>2</sub>-related red oak. This change is in the other direction to all published work, but was significant at the 5% level only.

If changes in stomatal density occur, they may only reflect differences in epidermal cell expansion. For example, drought may reduce the size of individual cells and lead to an increased stomatal

density (Peñuelas & Matamala, 1990). The results shown here do, however, allow us to state that the role of any stomatal density effects influencing the gas exchange measurements are minimal. This was also the case for chlorophyll concentration. Although current year CO<sub>2</sub>-treated needles did have lower chlorophyll levels, this was only when expressed according to dry weight. This could reflect differences in specific leaf area between the treatments. Upon examination of the plant material under a scanning electron microscope, however, there was no increase in the number of layers of palisade cells, nor any differences in cell size.

During the second year of growth in elevated CO<sub>2</sub>, red oak and droughted Norway spruce had statistically significant increases in photosynthesis, but the first year enhancement of diameter growth was no longer apparent (Table 2). This apparently contradictory response can perhaps be explained by different biomass partitioning of the trees during the second year of growth. It should be remembered that the first year's growth in elevated CO<sub>2</sub> was laid down under ambient CO<sub>2</sub> levels. Drought may also reduce diameter growth (Aussenac & Granier, 1988). Figure 5 shows how the AA + 350 spruce trees devoted more growth to height increase whereas the trees in AA had greater lateral extension. Such changes in growth pattern show how non-destructive growth measurements should be interpreted with care as they may reflect differences in assimilate allocation rather than real differences in biomass accumulation. The implications of growth pattern changes could be important and Samuelson & Seiler (1993), for example, discuss how terminal leader growth can determine seedling survival and potential volume growth.

A short-term doubling of CO<sub>2</sub> has sometimes been found to reduce stomatal conductance by 30–40% (Townend, 1993; Knapp, Fahnestock & Owensby, 1994). The trees in our experiment, however, did not show reductions in  $g_w$  in elevated CO<sub>2</sub> atmospheres before drought. Norway spruce had no inter-treatment differences until the third measurement day when  $g_w$  was slightly lower in AA + 350. Red oak even had a tendency for a CO<sub>2</sub>-associated stomatal conductance increase at higher values of  $\Psi_{wp}$  (Fig. 3). Both Beadle, Jarvis & Neilson (1979) and Barton, Lee & Jarvis (1993) found increased stomatal conductance in the presence of CO<sub>2</sub> for Sitka spruce. Mansfield, Hetherington & Atkinson (1990) in a review of stomatal responses to CO<sub>2</sub> describe how a lack of response or opening in the presence of CO<sub>2</sub> was considered exceptional, but that this view was established from experiments where plants were grown with very little variation in growth conditions.

The net photosynthesis results showed statistically significant (Student Newman-Keuls test) increases in CO<sub>2</sub>-treated red oak before drought developed. Considering that this was the second year of growth



in elevated CO<sub>2</sub>, the red oak trees appear to have kept the enhanced levels of photosynthesis, that have often been regarded as transitory (e.g. Stitt, 1991; Ryle, Powell & Tewson, 1992; Johnsen, 1993). Wolfe (1994) has discussed how when plants are grown in the field with unrestricted rooting volume, the increased photosynthetic capacity is more likely to be maintained. Gunderson *et al.* (1993) found no downward trend in photosynthesis throughout three field seasons in soil-planted white oak and yellow poplar, and Idso & Kimball (1991) working on soil-rooted sour orange trees found no evidence of downward regulation of photosynthesis and growth after 3 yr exposure to elevated CO<sub>2</sub>. In our experiment, the relative photosynthesis increase was gradually lost as drought developed (Fig. 3).

In contrast to red oak, there is no apparent photosynthetic enhancement in undroughted Norway spruce. However, as drought developed and caused reductions in photosynthesis, the trees grown at elevated CO<sub>2</sub> levels had relatively higher net photosynthetic rates. These were statistically significant when days 211 and 226 results were grouped together (i.e. the two most droughted days). From these different results it appears that the presence of a continued photosynthetic enhancement was dependent upon plant water relations.

The natural drought reduced the  $\Psi_{wp}$  values of both treatments to below  $-0.9$  MPa by day 226 (14 August). There was little or no difference between trees or treatments for the observed values. Although water use efficiency of both species had no discernible trend in relation to  $\Psi_{wp}$ , trees of AA+350 had higher values of WUE for every measurement day except one. This trend is shown in Figures 3 and 4 where a given stomatal conductance is associated with a higher value of photosynthesis in AA+350 trees. The values represented here are of the instantaneous WUE, however. Obviously these are merely snapshots in time taken on single leaves or shoots, rather than measurements on whole plants over the entire growth period. Norby & O'Neill (1989) have compared instantaneous measurements of WUE with more integrated data for plants at different CO<sub>2</sub> concentrations and found a good correlation over the season. Thus the WUE results presented here may give a good idea of the long-term whole plant situation.

Drought caused photosynthetic reductions and stomatal closure in both species. The  $\Psi_{wp}$  values measured in this experiment are not very severe compared with much other work. For example Epron, Dreyer & Aussenac (1993), also working on red oak, observed a  $\Psi_{wp}$  of  $-2.0$  MPa before obtaining similar photosynthetic reductions to those found here. This apparent discrepancy may result from other work on drought using plants in pots. This means that drought is established more quickly than would occur in the field because the soil volume

is much smaller. Tolley & Strain (1985) reduced the  $\Psi_{wp}$  to  $-2.5$  MPa in less than 14 d. Such speed in reducing water availability may not allow time for plants to regulate their physiological processes and any established responses may not reflect the situation in the field. This may be particularly important in older leaves (Chaves & Pereira, 1992) where there is evidence of a decreased photosynthetic capacity when dehydration is applied slowly.

This experiment has shown clear interspecific differences in trees' 2-yr response to elevated CO<sub>2</sub>. The previously reported loss of photosynthetic enhancement may not only be the result of different soil volumes available to the plants, but may also result from genotypic differences or interactions between CO<sub>2</sub> and the water status of the plant. Subtle changes in biomass partitioning, such as those found in Norway spruce, may also have important implications for seedling survival under CO<sub>2</sub> enrichment.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Ste. Marguerite water bottling factory for supplying the CO<sub>2</sub>. Thanks also to Mr Christophe Rose for his technical assistance and Dr J.-M. Guehl for comments and suggestions on the text.

#### REFERENCES

- Aussenac G, Granier A. 1988. Effects of thinning on water stress and growth in Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 18: 100-105.
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32: 85-100.
- Barton CVM, Lee HSJ, Jarvis PG. 1993. A branch bag and CO<sub>2</sub> control system for long-term CO<sub>2</sub> enrichment of mature Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Plant, Cell and Environment* 16: 1139-1148.
- Beadle CL, Jarvis PG, Neilson RE. 1979. Leaf conductance as related to xylem water potential and carbon dioxide concentration in Sitka spruce. *Physiologia Plantarum* 45: 158-166.
- Berteigne M. 1987. European open-top chambers programme. Specifications of open-top chambers. In: *Microclimate and plant growth in open-top chambers. Proceedings of 2<sup>nd</sup> European open-top chamber workshop, 17-19 September 1986, Freiburg. Air Pollution Research Report* 5: 170-172.
- Chaves MM, Pereira JS. 1992. Water stress, CO<sub>2</sub> and climate change. *Journal of Experimental Botany* 43: 1131-1139.
- Epron D, Dreyer E, Aussenac G. 1993. A comparison of photosynthetic responses to water stress in seedlings from 3 oak species: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl, *Q. rubra* L. and *Q. cerris* L. *Annales des Sciences Forestières* 50: 48-60.
- Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P. 1994. Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiology* 14: 707-724.
- Gunderson CA, Norby RJ, Wullschlegel SD. 1993. Foliar gas exchange responses of two deciduous hardwoods during 3 years of growth in elevated CO<sub>2</sub>: no loss of photosynthetic enhancement. *Plant, Cell and Environment* 16: 797-807.
- Harrington JB. 1987. Climatic change: a review of the causes. *Canadian Journal of Forest Research* 17: 1313-1339.
- Hollinger DY. 1987. Gas exchange and dry matter allocation responses to elevation of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration in seedlings of three species. *Tree Physiology* 3: 193-208.
- Hornqvist R. 1988. The effect of acid precipitation on epi-

- cuticular wax in Norway spruce and lodgepole pine. *Meddelelser fra Norsk Institutt for Skogforskning* 40: 1-13.
- Idso SB, Kimball BA. 1991. Downward regulation of photosynthesis and growth at high CO<sub>2</sub> levels. No evidence for either phenomenon in three-year study of sour orange trees. *Plant Physiology* 96: 990-992.
- Johnsen KH. 1993. Growth and ecophysiological responses of black spruce seedlings to elevated CO<sub>2</sub> under varied water and nutrient additions. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 1033-1042.
- Knapp AK, Fahnestock JT, Owensby CE. 1994. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> alters stomatal responses to variable sunlight in a C<sub>4</sub> grass. *Plant, Cell and Environment* 17: 189-195.
- Körner C. 1988. Does global increase of CO<sub>2</sub> alter stomatal density? *Flora* 181: 253-257.
- Malka P. 1988. *Etude en chambres à ciel ouvert, des effets de doses subnécroscopiques d'ozone et de dioxyde de soufre sur la croissance et le fonctionnement stomatique de Picea abies*. Ph.D. thesis, University of Paris val de Marne, France.
- Mansfield TA, Hetherington AM, Atkinson CJ. 1990. Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 55-75.
- McConnaughay KDM, Berntson GM, Bazzaz FA. 1993. Limitations to CO<sub>2</sub>-induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia* 94: 550-557.
- Morison JIL. 1993. Response of plants to CO<sub>2</sub> under water limited conditions. *Vegetatio* 104/105: 193-209.
- Norby RJ, O'Neill EG. 1989. Growth dynamics and water use of seedlings of *Quercus alba* L. in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *New Phytologist* 111: 491-500.
- Peñuelas J, Matamala R. 1990. Changes in N and S leaf content, stomatal density and specific leaf area of 14 plant species during the last three centuries of CO<sub>2</sub> increase. *Journal of Experimental Botany* 41: 1119-1124.
- Riederer M, Kurbasik K, Steinbrecher R, Voss A. 1988. Surface areas, lengths and volumes of *Picea abies* (L.) Karst. needles: determination, biological variability and effect of environmental factors. *Trees* 2: 165-172.
- Ryle GJA, Powell CE, Tewson V. 1992. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on the photosynthesis, respiration and growth of perennial ryegrass. *Journal of Experimental Botany* 43: 811-818.
- Samuelson LJ, Seiler JR. 1993. Interactive role of elevated CO<sub>2</sub>, nutrient limitations, and water stress in the growth responses of red spruce seedlings. *Forest Science* 39: 348-358.
- SAS Institute Inc. 1985. *SAS user's guide, version 5 edition*. Cary NC: SAS Institute Inc.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingen EA. 1965. Sap measure in plants. *Science* 148: 339-346.
- Stitt M. 1991. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741-762.
- Tolley LC, Strain BD. 1985. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and water stress on gas exchange of *Liquidambar styraciflua* and *Pinus taeda* seedlings grown under different irradiance levels. *Oecologia* 65: 166-172.
- Townsend J. 1993. Effects of elevated carbon dioxide and drought on the growth and physiology of clonal Sitka spruce plants (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Tree Physiology* 13: 389-399.
- Wolfe DW. 1994. Physiological and growth responses to atmospheric carbon dioxide concentration. In: Pessaraki M, ed. *Handbook of plant and crop physiology*. New York: Marcel Dekker (in the press.)
- Woodward FI. 1987. Stomatal number are sensitive to increase in CO<sub>2</sub> from pre-industrial levels. *Nature* 327: 617-618.

## Annexe 6

Seasonal and annual variations of phosphorus, calcium, potassium and manganese contents in different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst. needles and *Quercus rubra* (L.) leaves exposed to elevated CO<sub>2</sub>.

Le Thiec D, Dixon M, Loosveldt P; Garrec JP (1995)

Trees, accepté le 11 janvier 1995.

Seasonal and annual variations of phosphorus, calcium, potassium and manganese contents in different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst needles and *Quercus rubra* (L.) leaves exposed to elevated CO<sub>2</sub>.

Didier LE THIEC<sup>1</sup> , Martin DIXON<sup>1</sup>, Pascal LOOSVELDT<sup>2</sup> and Jean Pierre GARREC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA - Centre de Recherches Forestières de Nancy - Unité Ecophysiologie Forestière - Equipe Pollution Atmosphérique - 54 280 Champenoux - France.

<sup>2</sup> Present address: Université Catholique de Louvain. IRES, 3 Place Montesquieu - 1348 Louvain-la-Neuve - Belgique.

Correspondence to D. Le Thiec, Laboratoire de Pollution Atmosphérique - INRA - CRF

F - 54280 Champenoux France

Fax number: (00 33) 83 39 40 69

## Summary.

Norway spruce and red oak trees were planted directly into the soil and enclosed in open-top chambers. For two years the trees were exposed to both ambient and elevated CO<sub>2</sub> concentrations (700 μmol mol<sup>-1</sup>) and during this time variations in nutrient concentrations were studied. CO<sub>2</sub> treated plants had decreases in global concentrations of nitrogen, potassium, calcium and manganese for both species. When different areas of the foliage were analysed however, the response showed much variability between the respective sites and between species. Furthermore the nutrient concentrations changed differently as the plant material aged and this change showed inter-treatment differences. These results show the importance of analysing plant material of different ages and at different cell sites when studying nutrient levels.

**Key words:** *Picea abies* - *Quercus rubra* - nutrients - carbon dioxide - seasonal variation

## Introduction

There has been a continuing rise in the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration since the last century (Post et al. 1990) and this rise is predicted to continue. The role of trees is important as they are potential carbon sinks (Overpeck et al. 1990; Goudriaan 1993).

Much work has been done with trees to evaluate the effects of an increased CO<sub>2</sub> concentration. Photosynthesis and growth rates have often been found to increase, but the response has also been shown to depend upon other interacting factors, not least nutrient levels (Conroy 1992; Gries et al. 1993; Brown 1991). Plants need only relatively low nutrient concentrations for growth, but both nitrogen and phosphorus are often at limiting levels in soils (Acock and Allen 1985). It is possible that these low nutrient levels can become more scarce when plants increase growth rate and thus nutrient uptake (O'Neill et al. 1987). Lack of nutrients could then prevent any potentially increased growth rate. Changes in the total foliar nutrient composition have been observed upon the increased growth rate associated with elevated CO<sub>2</sub> levels (Porter and Grodzinski 1989; Wolfe 1994) and this is most often seen as a dilution of nutrients (Brown 1991).

Most of these observations were made from short-term experiments using pot plants (Kimball 1983), often with optimal conditions, but sometimes having limited water or nutrients (Gifford 1979; Townend 1993; Samuelson and Seiler 1993; Norby et al. 1986; Conroy et al. 1992; Tissue et al. 1993). Thus some of the obtained results may well be artefacts of the experimental conditions (Gunderson et al. 1993, McConnaughay et al. 1993).

To better study the long-term effects of an increase in the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration, an experiment was set up using soil-planted trees in open-top chambers exposed to natural climatic conditions (notably a summer drought).

Studies on nutrient distribution at a cellular level are rare and have never been done on trees exposed to increased CO<sub>2</sub>. The effect of such an increase upon the foliar nutrient composition of different cellular compartments was thus followed during the vegetation period. One tree species studied had perennial foliage (Norway spruce) and another was deciduous (red oak).

## Materials and methods

*Experimental site and plant material.* The experimental site is at Ste Marguerite (Massif Central, France) where natural CO<sub>2</sub> is extracted from a mineral water source. The site coordinates are 45° 39' 40" N, 3° 14' 05" E and it is at an altitude of 340m. The soil is composed of 7.22% organic matter, 21.4% clay, 25.4 % fine silt, 9.2 % coarse silt, 13.3 % fine sand and 30.7 % coarse sand.

On 3 April 1991 five-year-old Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) and three-year-old red oak (*Quercus rubra* L.) were planted directly into the soil. On 30 October 1991 two open-top chambers (see Berteigne 1987 for details) were constructed to enclose four individuals of each species and give two different treatments: ambient air (AA) and ambient air + 350 μmol mol<sup>-1</sup> of CO<sub>2</sub> (AA + 350). Eight trees were planted outside the chambers and served as controls.

The CO<sub>2</sub> was continuously added from 22 April 1992. In 1991 and 1992 the trees were watered to prevent drought stress developing. The CO<sub>2</sub> concentration, temperature and relative humidity, both inside and outside the chambers, were monitored during the experimental period.

*Sampling.* The material to be microanalysed was sampled between 10.00 and 11.00 G.M.T on 18 May, 30 June, 30 July, 31 August, 24 September and 27 October 1993 for red oak leaves and 30 June, 31 August and 27 October 1993 for Norway spruce needles. Each sample consisted of two oak leaves and five spruce needles were taken from three age classes (current needles: 1993, one-year-old: 1992, two-year-old: 1991). First flush oak leaves and third whorl spruce needles were used.

*Pre-dawn leaf water potential:* The pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{wp}$ ) of the trees was measured throughout the vegetation season using a Skye pressure chamber. For the methodology see Scholander et al. (1965).

*X-ray microanalysis:* The material to be analysed was prepared according to the method used in Le Thiec et al. (1994). Sections of plant material were examined under a scanning electron microscope (Stereoscan 90B, Cambridge) at 15 kV, equipped with a dispersive energy microanalysis system (EDX, diode Si-Li; Analyser AN10000 10/25). It was checked that the beam of primary electrons did not penetrate other cells by analysing one layer of cells on a sheet of aluminium. All measurements were made using an X-ray take-off angle of 45°, a measuring time of 100s, a magnification of 6000 for all examined tissues (stomata, epidermis, mesophyll, parenchyma and endodermis) and of 400 for the vascular bundle. In order to convert the microanalysis data into real concentrations (% dry mass), powdered spruce needles and beech leaves were used as standards (CRM 100 and CRM 101 given by Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities).

*Chemical analyses:* Red oak leaves were sampled on 31 August 1993 and Norway spruce needles on 27 October 1993. These dates were at the point in the season that Bonneau (1988) advised that samples be taken. The samples were rapidly washed and dried. Total P and the cations (Mg, K, Ca, Mn, S) were mineralised ( $H_2O_2$  and  $HClO_4$ ; Clément 1977) and measured by ICP (Jobin Yvon JY438 Plus). The total N content was determined using the Kjeldahl method and a Technicon II Autoanalyser, total C by the Anstett method. Using these same techniques the nutrient levels in the soil were also analysed.

*Statistical analyses:* The statistical treatment employed was the analysis of variance ( $\alpha = 0.05$ ) by the GLM procedure (SAS Institute Inc. 1985). Test of equality of averages using Student-Newman-Keuls was applied equally (the same letters indicate that averages are not significantly different, and the alphabetic order corresponds to decreasing values).



## Results

### *Environmental factors*

The diurnal rainfall, temperature and relative humidity data are shown in Figure 1. Temperature, relative humidity, photosynthetically active radiation (PAR), vapour pressure deficit and pre-dawn leaf water potential for each measurement day are shown in Table 1. On 14 August (day 226) the pre-dawn leaf water potential was between - 0.9 and - 1.5 MPa. This low water availability resulted from a period of drought after day 190.

### *Chamber effects*

There were no statistically significant differences between the AA treatment and the control trees outside chambers. The difference in humidity between the chamber and outside controls was 3.2% and increased temperature of never more than 2°C. To make the presented data easier to follow we have not shown results from these controls.

### *Chemical analyses*

The soil analysis gave the following results: pH: 5.3, C: 4.20 % (dry weight), N: 0.41 %, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 0.55 ‰, K: 0.61 c mol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>, Ca: 4.10 c mol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>, and Mg: 0.77 c mol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>.

The foliar chemical analysis results are shown in Table 2. There was no significant effect of the CO<sub>2</sub> increase on P, S and C levels. However, CO<sub>2</sub> significantly reduced N, K, Mn and Ca in both species and Mg was significantly lower in CO<sub>2</sub> treated Norway spruce needles.

### *Norway spruce X-ray Microanalysis*

Table 3 shows the different concentrations of P, K, Ca and Mn in the different tissues (epidermis, guard cell, mesophyll, endodermis and the vascular bundle) in relation to CO<sub>2</sub> treatment and foliage age. Each value represents the average of three sample days. The seasonal evolution followed already known annual variations and the drought had no significant effect on nutrient variations (data not shown).

The effect of ageing was a significant increase in Ca and Mn and a significant decrease in P and K. This trend was unaffected by the increase in CO<sub>2</sub>.

*Phosphorus:* Phosphorus was significantly increased in the epidermis and the stomata (i.e. the two most peripheral tissues) of AA + 350 current-year needles. This increase was no longer observable in one-year-old foliage and was even reversed in two-year-old stomata. Two-year-old AA + 350 needles had significant phosphorus increases in the mesophyll, endodermis and vascular bundle (the most internal tissues).

*Potassium.* Current-year AA + 350 needles had a significant increase in the epidermis and stomata and a decrease in the mesophyll and endodermis. These trends were no longer apparent in one-year old epidermis and mesophyll tissue and two-year old endodermis and stomata.

*Calcium.* Current-year AA + 350 needles had a significant increase in their stomata, whereas one-year-old and two-year-old CO<sub>2</sub> treated needles had increases in the mesophyll, endodermis and vascular bundle.

*Manganese.* There was a significant decrease in one and two-year-old AA + 350 endodermis tissue.

#### *Red oak X-ray Microanalysis*

Figures 2, 3, 4 and 5 show the respective seasonal variations of P, K, Ca and Mn in the different tissues for both treatments.

*Phosphorus :* Phosphorus had a tendency to decrease in all tissues with age, except in the vascular bundle where the decrease was reversed during the drought period, before stabilising. This drought period is where the P content is significantly decreased in AA + 350.

*Potassium.* Potassium had decreased at the beginning of the season in all tissues apart from the upper epidermis. A later increase was followed by a decrease corresponding to the beginning of abscission. AA + 350 increased K concentration in all tissues apart from the upper epidermis and the period of drought had no apparent effect on the seasonal evolution.

*Calcium.* Calcium in the vascular bundle increased throughout the season. In the other tissues an initial increase at the beginning of the season was followed by a later decrease. In the

parenchyma tissue there was another increase at the end of the season. The AA + 350 trees had significantly decreased Ca levels in the parenchyma, upper epidermis and stomata.

*Manganese.* The seasonal evolution of manganese is much more variable than for the other elements. There is a continual increase in the epidermal tissues throughout the season, whereas the increase in the stomata is reversed at the end of the season. In the vascular bundle and parenchyma there is an increase, then a decrease after the drought, before the concentration once again increases.

The elements are found in different concentrations in different tissues. Norway spruce has the highest phosphorus and potassium levels in the endodermis and mesophyll, calcium is highest in the epidermis and manganese most abundant in the mesophyll. Red oak has the greatest phosphorus levels in the parenchyma, potassium is most abundant in the palisade parenchyma and upper epidermis, whereas calcium and manganese are most concentrated in the epidermal tissue.

## Discussion

The soil analysis showed that the plants grew with sufficient organic material and nutrients; no element being deficient according to the levels described by Bonneau (1988). The soil was particularly rich in calcium and magnesium.

Foliage mineral content is often used in order to assess the nutritional status of plants and/or to explain already apparent symptoms (Wytténbach and Tobler 1988; Cape et al. 1990). In the same way differences in nutrient concentrations between foliage of different ages can be important in diagnosing nutritional disorders (Cape et al. 1990)

The chemical foliar analysis revealed a decrease in calcium, potassium, manganese and nitrogen in both species growing in enriched CO<sub>2</sub> and magnesium was decreased in AA + 350 Norway spruce. These decreases have often been found in other studies (Gries et al. 1993; Mousseau and Enoch 1989, Johnsen 1993; Tissue et al. 1993).

Increasing CO<sub>2</sub> is often accompanied by an increase in the C/N ratio because of a decrease in the nitrogen concentration. This change is not a result of increased growth diluting the N pool, but represents a change in the relative nutrition quantities of the two elements (Guehl et al. 1994; Rouhier et al. 1994). Eamus and Jarvis (1989) proposed four models to explain how plants use nutritional elements and how changes in their respective concentrations can arise with increased CO<sub>2</sub>.

Our results confirm the often reported C/N increase (15.74/16.35 for red oak and 21.79/23.13 for Norway spruce). Field and Mooney (1986) suggested that plants act to maximise their use of nitrogen efficiency and partition it to maintain a balance between photosynthetic and non-photosynthetic processes. It could be redistributed to the fine root system (El Kohen et al. 1992; Norby et al. 1992), or to the interior of the chloroplasts (Tissue et al. 1993). A suppression of the photorespiratory cycle by increased CO<sub>2</sub> could also have an effect on nitrogen assimilation (Conroy 1992; Grodzinski 1992).

The decrease in K, Ca and Mn concentrations found when the foliage was chemically analysed was not reproduced in all the tissues exposed to X-ray microanalysis. This stems from the fact that the global analysis includes other plant structures (cuticle, cell walls, cellular contents, hypodermis and resin canals), whereas the X-ray microanalysis was

performed on the cellular contents only (vacuole and cytoplasm) and a proportion of cell walls. A tentative comparison can be made for phosphorus and potassium in the mesophyll cells because these elements are the most concentrated and the mesophyll represents about 72% of the Norway spruce needle (as measured using a scanning electron microscope). Current-year needles did indeed have significantly lower K concentrations in the AA + 350 treated mesophyll.

The X-ray microanalysis showed that during ageing spruce needles had increased concentrations of calcium and manganese (immobile elements) in all tissues. Similar results were obtained by Fink (1991a, 1991b) and Garrec et al. (1991). Phosphorus and potassium however (mobile elements) were seen to decrease, in agreement with Cape et al. (1990), Kinzel (1989) and Garrec et al. (1991).

In young needles an adequate supply of calcium is essential for cell wall synthesis during the growth and differentiation of cells and tissues. The utilisation and translocation of calcium however, are proportional to water utilisation which is controlled by the endodermis (Baker and Hall 1988). In older needles there is less demand for calcium and because it is immobile an accumulation with age is observed.

Calcium accumulation was greater in AA + 350 in all tissues except the stomata. This was especially the case in the mesophyll and could result from a perturbation of the cellular metabolism. Conifer trees are able to remove calcium from their cells in the form of calcium oxalates (Fink 1991a). Calcium is often considered as an indicator of stress. However it is difficult to say if the stress-related increase offers protection to the trees, or is a result of damage previously caused. It could also be the consequence of differences in biomass partition that were observed in the trees during the second year of growth (data not shown). AA + 350 trees had an increased height growth whereas trees in AA had more lateral extension.

The situation in red oak is different. At the beginning of the season there were no significant differences between treatments, but after the second flush, there was an increased Ca concentration in AA trees. This is probably a dilution effect of the increased growth rate in AA + 350 that has been observed elsewhere (Overdieck 1990).

The vascular bundle has a greatly decreased potassium content as the needle ages, which implies a reduction in the supply of this element to the needle. Ageing corresponds to a slowing down of physiological activities and a consequential reduction in the demand for nutrients (Laitat 1990). There may also be perturbations at the vascular bundle itself (Fink 1988, Garrec et al. 1991). The effects of CO<sub>2</sub> differ depending upon the age of the needles. The decrease in P and K during ageing in the AA + 350 treatment is greater in the epidermis and the stomata, whereas in the other tissues it is less than in the AA treatment. This may be a consequence of the stomata and epidermis being the most peripheral tissues. Perhaps the CO<sub>2</sub> could increase the elements mobilisation or even change the foliage permeability which would increase the rate of leaching from the needle surface (Laitat 1990; Cape et al. 1990).

The high concentrations of K and P in the red oak tissues at the beginning of the season result from increased enzymatic activity and the turgor pressure increase needed for cell elongation (Lüttge and Clarkson 1989). The decrease in mesophyllian and endodermal potassium in May and June are probably the result of differing water usage during cell extension (Stelzer et al. 1993).

This study of the partition and evolution of mineral elements has thus shown differences in trees' response to elevated CO<sub>2</sub> as well as inter specific differences. In addition differences in the internal cycling of elements at the tissue level that are not apparent from global chemical analyses have been shown. This can have important implication in both natural ecosystems and in the fertiliser management of forestry systems.

## Acknowledgements

The authors are indebted to the Ste Marguerite water bottling factory for supplying the CO<sub>2</sub>. We would like to thank Claude Bréchet for his assistance for chemistry analyses. Thanks also to Christophe Rose for his technical assistance for open-top chambers and Dr Maurice Bonneau for a technical review of the paper.

## References

- Acock B, Allen LH Jr (1985) Crop responses to elevated carbon dioxide concentrations. In: Strain BD, Cure JD (eds) Direct effects of increasing carbon dioxide on vegetation. Duke University, Durham, NC 27706. United States Department of Energy, Washington, DC, pp 53-97
- Baker DA, Hall JL (1988) Solute Transport in Plant Cells and Tissues. Longman Scientific, Harlow, UK
- Bonneau M (1988) Le diagnostic foliaire. Rev For Fr XL:19-28
- Brown KR (1991) Carbon dioxide enrichment accelerates the decline in nutrient status and relative growth rate of *Populus tremuloides* Michx. seedlings. Tree Physiol 8: 161-173
- Cape JN, Freer-Smith PH, Paterson IS, Parkinson JA, Wolfenden J (1990) The nutritional status of *Picea abies* (L.) Karst. across Europe, and implications for 'forest decline'. Trees 4: 211-224
- Clément A (1977) Point 77 sur certaines analyses foliaires. Internal publication: pp 25
- Conroy JP (1992) Influence of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations on plant nutrition. Aust J Bot 40: 445-456
- Conroy JP, Milham PJ, Barlow EWR (1992) Effect of nitrogen and phosphorus availability on the growth response of *Eucalyptus grandis* to high CO<sub>2</sub>. Plant Cell Environ 15: 843-847
- Eamus D, Jarvis PG (1989) The direct effects of increase in the global atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on natural and commercial temperate trees and forests. Adv Ecol Res 19: 1-55
- El Kohen A, Rouhier H, Mousseau M (1992) Changes in dry weight and nitrogen partitioning induced by elevated CO<sub>2</sub> depend on soil nutrient availability in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Ann Sci For 49: 1-8
- Field C, Mooney JA (1986) The photosynthesis - nitrogen relationships in wild plants. In Givnish TJ (ed) On the economy of plant form and function. Cambridge University Press, Cambridge pp 25-55



- Fink S (1988) Histological and cytological changes caused by air pollutants and other abiotic factors. In Schulte-Hostede S, Darral NM, Blank LW, Wellburn AR (eds) Air pollution and plant metabolism. Elsevier Applied Science, Amsterdam, pp 36-54
- Fink S (1991a) The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway spruce [*Picea abies* (L. Karst.)]. *New Phytol* 119: 33-40
- Fink S (1991b) Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. *New Phytol* 119: 41-51
- Garrec JP, Laitat E, Richardin I, Rose C (1991) dépérissement forestier et perturbations minérales aux niveaux histologique et cellulaire dans les aiguilles de *Picea abies* L. Etude par microanalyse X. *Ann Sci For* 48: 321-332
- Gifford RM (1979) Growth and yield of CO<sub>2</sub>-enriched wheat under water-limited conditions. *Aust J Plant Physiol* 6: 367-378
- Goudriaan J (1993) Carbon cycle and ecosystem productivity on a global scale. In: Van de Geijn SC, Goudriaan J, Berendse F (eds) Climate change; crops and terrestrial ecosystems. Agrobiological Themes 9. CABO-DLO, Wageningen, the Netherlands, pp 125-138
- Gries C, Kimball BA, Idso SB (1993) Nutrient uptake during the course of a year by sour orange trees growing in ambient and elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. *J Plant Nut* 16: 129-147
- Grodzinski B (1992) Plant nutrition and growth regulation by CO<sub>2</sub> enrichment. *BioSci* 42: 517-525
- Guehl JM, Picon C, Aussenac G, Gross P (1994) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil drought on growth and transpiration efficiency and its determinants in two European forest tree species. *Tree Physiol* 14: 707-724
- Gunderson CA, Norby RJ, Wullschleger SD (1993) Foliar gas exchange responses of two deciduous hardwoods during 3 years of growth in elevated CO<sub>2</sub>: no loss of photosynthetic enhancement. *Plant Cell Environ* 16: 797-807
- Johnsen KH (1993) Growth and ecophysiological responses of black spruce seedlings to elevated CO<sub>2</sub> under varied water and nutrient additions. *Can J For Res* 23: 1033-1042

- Kimball BA (1983) Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agron J* 75: 779-788
- Kinzel H (1989) Calcium in the vacuoles and cell wall of plant. Forms of deposition and their physiological and ecological significance. *Flora* 182: 99-125
- Laitat E (1990) Ecophysiologie du pluviollessivage foliaire chez *Picea abies* (L.) Karst.. Ph.D. thesis, University of Gembloux, Belgium, 237 pp
- Le Thiec D, Rose C, Garrec JP, Laffray D, Louguet P, Galaup S, Loosveldt P (1994) Alteration of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Can J Bot* 72: 86-92
- Lüttge U, Clarkson DT (1989) Mineral nutrition: Potassium. *Prog Bot* 50:51-73
- McConnaughay KDM, Berntson GM, Bazzaz FA (1993) Limitations to CO<sub>2</sub>-induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia* 94: 550-557.
- Mousseau M, Enoch HZ (1989) Carbon dioxide enrichment reduces shoot growth in sweet chestnut seedlings (*Castanea sativa* Mill.). *Plant Cell Environ* 12: 927-934.
- Norby RJ, O'Neill EG, Luxmoore RJ (1986) Effects of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the growth and mineral nutrition of *Quercus alba* seedlings in nutrient-poor soil. *Plant Physiol* 82: 83-89
- Norby RJ, Gunderson CA, Wullschlegel SD, O'Neill EG, McCracken MK (1992) Productivity and compensatory response of yellow poplar trees in elevated CO<sub>2</sub>. *Nature* 357: 322-324
- O'Neill EG, Luxmoore RJ, Norby RJ (1987) Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> effects on seedling growth, nutrient uptake, and rhizosphere bacterial populations of *Liriodendron tulipifera* L.. *Plant and Soil* 104: 3-11
- Overdieck D (1990) Effects of elevated CO<sub>2</sub>-concentration levels on nutrient contents of herbaceous and woody plants. In: Goudriaan J, Van Keulen H, Van Laar HH (eds) *The greenhouse effect and primary productivity in European agro-ecosystems*. Wageningen: Pudoc, 31-37
- Overpeck JT, Rind D, Goldberg R (1990) Climate-induced changes in forest disturbance and vegetation. *Nature* 343: 53-61

- Porter MA, Grodzinski B (1989) Growth of bean in high CO<sub>2</sub>: effects on shoot mineral composition. *J Plant Nut* 12: 129-144
- Post WM, Peng TH, Emanuel WR, King AW, Dale VH, DeAngelis DL (1990) The global carbon cycle. *Amer Scientist* 78: 310-326
- Rouhier H, Billes G, El Kohen A, Mousseau M, Bottner P (1994) Effect of elevated CO<sub>2</sub> on carbon and nitrogen distribution within a tree (*Castanea sativa* Mill.)-soil system. *Plant and Soil* (in press)
- Samuelson LJ, Seiler JR (1993) Interactive role of elevated CO<sub>2</sub>, nutrient limitations, and water stress in the growth responses of red spruce seedlings. *For Sci* 39(2): 348-358
- SAS Institute Inc. (1985) SAS user's guide, version 5 edition. SAS Institute Inc., Cary NC.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap measure in plants. *Science* 148: 339-346
- Stelzer R, Holste R, Groth M, Schmidt A (1993) X-ray microanalytical studies on mineral concentrations in vacuoles of needle tissues from *Larix decidua* (L.) Mill.. *Bot Acta* 106: 325-330
- Tissue DT, Thomas RB, Strain BR (1993) Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrients on photosynthesis and rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant Cell Environ* 16: 859-865
- Townend J (1993) Effects of elevated carbon dioxide and drought on the growth and physiology of clonal Sitka spruce plants (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Tree Physiol* 13: 389-399
- Wolfe DW (1994) Physiological and growth responses to atmospheric carbon dioxide concentration. In: Pessarakli M (ed) *Handbook of Plant and Crop Physiology*. New York: Dekker M, Inc. (in press)
- Wytenbach A, Tobler L (1988) The seasonal variation of 20 elements in 1st and 2nd year of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. *Trees* 2: 52-64

## Legends

Table 1: The temperature ( $\pm$  SD), relative humidity, photosynthetically active radiation, vapour pressure deficit and pre-dawn leaf water potential on each sampling day ( $n = 4$ ).

Table 2: The total concentration of elements ( $\pm$  SD) in red oak leaves and Norway spruce needles ( $n = 4$ ). Test of equality of averages of Student-Newman and Keuls has been applied : same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values.

Table 3: The evolution of the elements P, K, Ca and Mn ( $\pm$  SD) with age and CO<sub>2</sub> treatment ( $n = 60$ ) in needles of Norway spruce. Test of equality of averages of Student-Newman and Keuls has been applied : same letters indicate averages not significantly different and alphabetic order corresponds to decreasing values. Letters represent within year comparisons between treatments for each portion of the cell analysed.

Figure 1: Temperature, relative humidity and rainfall during the sampling period at Ste Marguerite.

Figure 2: The seasonal progression of phosphorus in different cellular regions of red oak leaves (error bars represent SD) ( $n = 16$ ).

—○— AA; —■— AA + 350.

Figure 3: The seasonal progression of potassium in different cellular regions of red oak leaves (error bars represent SD) ( $n = 16$ ).

—○— AA; —■— AA + 350.

Figure 4: The seasonal progression of calcium in different cellular regions of red oak leaves (error bars represent SD) ( $n = 16$ ).

—○— AA; —■— AA + 350.

Figure 5: The seasonal progression of manganese in different cellular regions of red oak leaves (error bars represent SD) ( $n = 16$ ).

—○— AA; —■— AA + 350.

Date	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	Photosynthetically activity radiation ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Vapor pression deficit (kPa)	$\Psi_{\text{wp}}$ (MPa)
18 May	$20.9 \pm 0.3$	$49.1 \pm 0.2$	$877 \pm 91$	$1.28 \pm 0.02$	$-0.57 \pm 0.10$ (oak) $-0.65 \pm 0.04$ (spruce)
30 June	$26.2 \pm 0.4$	$54.4 \pm 0.4$	$920 \pm 75$	$1.56 \pm 0.02$	$-0.26 \pm 0.16$ (oak) $-0.66 \pm 0.11$ (spruce)
30 July	$31.3 \pm 0.2$	$39.1 \pm 0.3$	$912 \pm 54$	$2.03 \pm 0.03$	$-0.71 \pm 0.32$ (oak) $-0.89 \pm 0.15$ (spruce)
31 August	$24.7 \pm 0.3$	$38.5 \pm 0.1$	$825 \pm 66$	$1.95 \pm 0.02$	$-0.69 \pm 0.30$ (oak) $-0.78 \pm 0.13$ (spruce)
24 September	$18.4 \pm 0.5$	$53.7 \pm 0.3$	$801 \pm 58$	$1.24 \pm 0.01$	$-0.14 \pm 0.02$ (oak) $-0.20 \pm 0.03$ (spruce)
27 October	$14.1 \pm 0.5$	$52.5 \pm 0.3$	$854 \pm 61$	$1.42 \pm 0.02$	$-0.08 \pm 0.01$ (oak) $-0.12 \pm 0.02$ (spruce)

Table 1

Table 2

	<i>Quercus rubra</i>		<i>Picea abies</i>	
Treatment	AA	AA + 350	AA	AA + 350
Element (% dry weight)				
P	0.12 ± 0.03 <i>a</i>	0.13 ± 0.03 <i>a</i>	0.14 ± 0.02 <i>a</i>	0.17 ± 0.05 <i>a</i>
K	0.59 ± 0.02 <i>a</i>	0.50 ± 0.02 <i>b</i>	0.48 ± 0.03 <i>a</i>	0.45 ± 0.01 <i>b</i>
Ca	1.52 ± 0.02 <i>a</i>	1.47 ± 0.01 <i>b</i>	1.19 ± 0.03 <i>a</i>	0.86 ± 0.01 <i>b</i>
Mn	0.51 ± 0.02 <i>a</i>	0.38 ± 0.01 <i>b</i>	0.33 ± 0.01 <i>a</i>	0.23 ± 0.02 <i>b</i>
Mg	0.16 ± 0.06 <i>a</i>	0.18 ± 0.03 <i>a</i>	0.11 ± 0.02 <i>a</i>	0.07 ± 0.02 <i>b</i>
S	0.18 ± 0.06 <i>a</i>	0.19 ± 0.01 <i>a</i>	0.13 ± 0.02 <i>a</i>	0.14 ± 0.02 <i>a</i>
C	45.34 ± 0.8 <i>a</i>	45.80 ± 0.73 <i>a</i>	54.05 ± 0.78 <i>a</i>	55.29 ± 0.82 <i>a</i>
N	2.85 ± 0.07 <i>a</i>	2.74 ± 0.06 <i>b</i>	2.48 ± 0.08 <i>a</i>	2.39 ± 0.07 <i>b</i>

Element (% dw)	Treatment Year	epidermis		guard cell		mesophyll		endodermis		vascular bundle	
		AA	AA + 350	AA	AA + 350	AA	AA + 350	AA	AA + 350	AA	AA + 350
P	1993	0.19 ± 0.03 <i>b</i>	0.28 ± 0.04 <i>a</i>	0.27 ± 0.04 <i>b</i>	0.37 ± 0.05 <i>a</i>	0.35 ± 0.05 <i>a</i>	0.33 ± 0.05 <i>a</i>	0.32 ± 0.05 <i>a</i>	0.36 ± 0.05 <i>a</i>	0.28 ± 0.04 <i>a</i>	0.29 ± 0.04 <i>a</i>
	1992	0.13 ± 0.02 <i>b</i>	0.17 ± 0.03 <i>a</i>	0.28 ± 0.03 <i>a</i>	0.30 ± 0.03 <i>a</i>	0.17 ± 0.03 <i>b</i>	0.32 ± 0.05 <i>a</i>	0.19 ± 0.03 <i>a</i>	0.22 ± 0.04 <i>a</i>	0.20 ± 0.03 <i>a</i>	0.24 ± 0.04 <i>a</i>
	1991	0.11 ± 0.02 <i>a</i>	0.11 ± 0.02 <i>a</i>	0.25 ± 0.04 <i>a</i>	0.13 ± 0.03 <i>b</i>	0.07 ± 0.02 <i>b</i>	0.22 ± 0.04 <i>a</i>	0.14 ± 0.03 <i>b</i>	0.19 ± 0.03 <i>a</i>	0.18 ± 0.03 <i>b</i>	0.22 ± 0.03 <i>a</i>
K	1993	0.40 ± 0.04 <i>b</i>	0.50 ± 0.05 <i>a</i>	0.50 ± 0.07 <i>b</i>	0.69 ± 0.08 <i>a</i>	0.77 ± 0.07 <i>a</i>	0.65 ± 0.06 <i>b</i>	0.77 ± 0.05 <i>a</i>	0.67 ± 0.05 <i>b</i>	0.51 ± 0.06 <i>a</i>	0.47 ± 0.05 <i>a</i>
	1992	0.18 ± 0.03 <i>a</i>	0.19 ± 0.03 <i>a</i>	0.45 ± 0.06 <i>b</i>	0.52 ± 0.06 <i>a</i>	0.36 ± 0.05 <i>a</i>	0.41 ± 0.05 <i>a</i>	0.72 ± 0.06 <i>a</i>	0.48 ± 0.06 <i>b</i>	0.33 ± 0.04 <i>a</i>	0.29 ± 0.04 <i>a</i>
	1991	0.17 ± 0.03 <i>a</i>	0.18 ± 0.03 <i>a</i>	0.43 ± 0.07 <i>a</i>	0.39 ± 0.04 <i>a</i>	0.33 ± 0.04 <i>a</i>	0.32 ± 0.04 <i>a</i>	0.45 ± 0.05 <i>a</i>	0.48 ± 0.06 <i>a</i>	0.29 ± 0.04 <i>a</i>	0.22 ± 0.03 <i>b</i>
Ca	1993	1.10 ± 0.22 <i>a</i>	1.24 ± 0.21 <i>a</i>	0.14 ± 0.02 <i>a</i>	0.16 ± 0.02 <i>a</i>	0.20 ± 0.02 <i>a</i>	0.20 ± 0.02 <i>a</i>	0.15 ± 0.02 <i>a</i>	0.17 ± 0.02 <i>a</i>	0.22 ± 0.03 <i>a</i>	0.22 ± 0.03 <i>a</i>
	1992	1.30 ± 0.24 <i>a</i>	1.31 ± 0.26 <i>a</i>	0.21 ± 0.03 <i>a</i>	0.24 ± 0.03 <i>a</i>	0.36 ± 0.04 <i>b</i>	0.68 ± 0.08 <i>a</i>	0.21 ± 0.03 <i>b</i>	0.30 ± 0.04 <i>a</i>	0.32 ± 0.04 <i>b</i>	0.37 ± 0.04 <i>a</i>
	1991	2.58 ± 0.43 <i>a</i>	3.02 ± 0.46 <i>a</i>	0.31 ± 0.04 <i>a</i>	0.28 ± 0.03 <i>a</i>	0.42 ± 0.05 <i>b</i>	0.93 ± 0.11 <i>a</i>	0.22 ± 0.03 <i>b</i>	0.31 ± 0.04 <i>a</i>	0.32 ± 0.04 <i>b</i>	0.41 ± 0.05 <i>a</i>
Mn	1993	0.16 ± 0.03 <i>a</i>	0.14 ± 0.03 <i>a</i>	0.09 ± 0.02 <i>a</i>	0.12 ± 0.03 <i>a</i>	0.25 ± 0.05 <i>a</i>	0.30 ± 0.05 <i>a</i>	0.13 ± 0.02 <i>a</i>	0.10 ± 0.02 <i>a</i>	0.11 ± 0.02 <i>a</i>	0.09 ± 0.02 <i>a</i>
	1992	0.20 ± 0.03 <i>a</i>	0.26 ± 0.04 <i>a</i>	0.25 ± 0.05 <i>a</i>	0.27 ± 0.05 <i>a</i>	0.48 ± 0.07 <i>a</i>	0.49 ± 0.06 <i>a</i>	0.27 ± 0.04 <i>a</i>	0.21 ± 0.04 <i>b</i>	0.21 ± 0.04 <i>a</i>	0.19 ± 0.03 <i>a</i>
	1991	0.31 ± 0.05 <i>a</i>	0.31 ± 0.06 <i>a</i>	0.26 ± 0.05 <i>a</i>	0.28 ± 0.05 <i>a</i>	0.51 ± 0.07 <i>a</i>	0.53 ± 0.07 <i>a</i>	0.28 ± 0.04 <i>a</i>	0.24 ± 0.04 <i>b</i>	0.24 ± 0.04 <i>a</i>	0.22 ± 0.04 <i>a</i>

Table 3

Figure 1

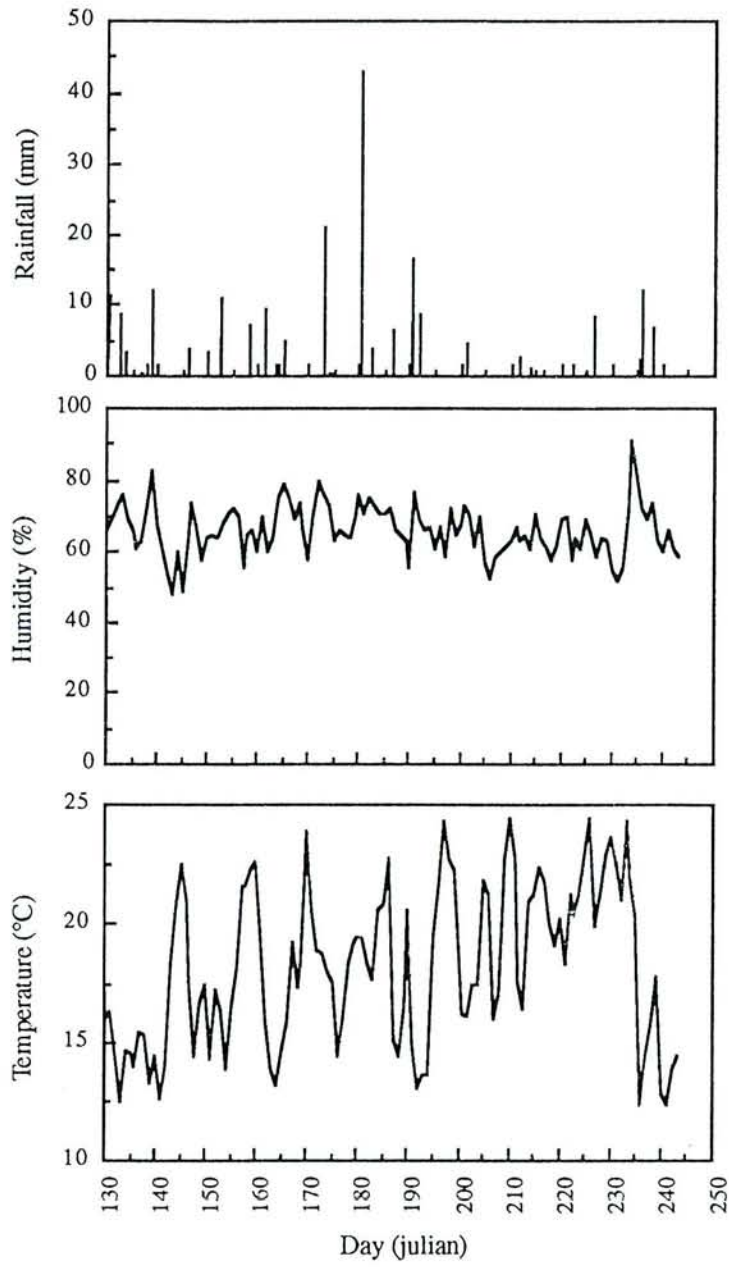




Figure 2

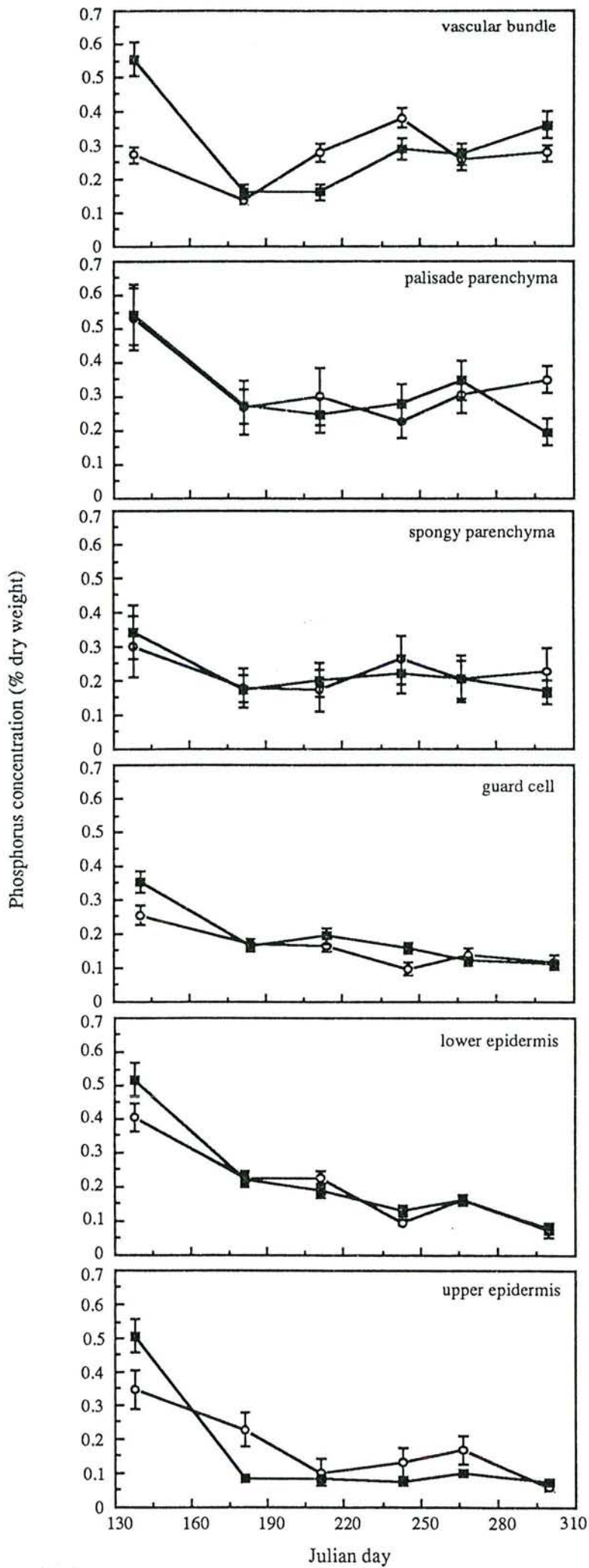


Figure 3

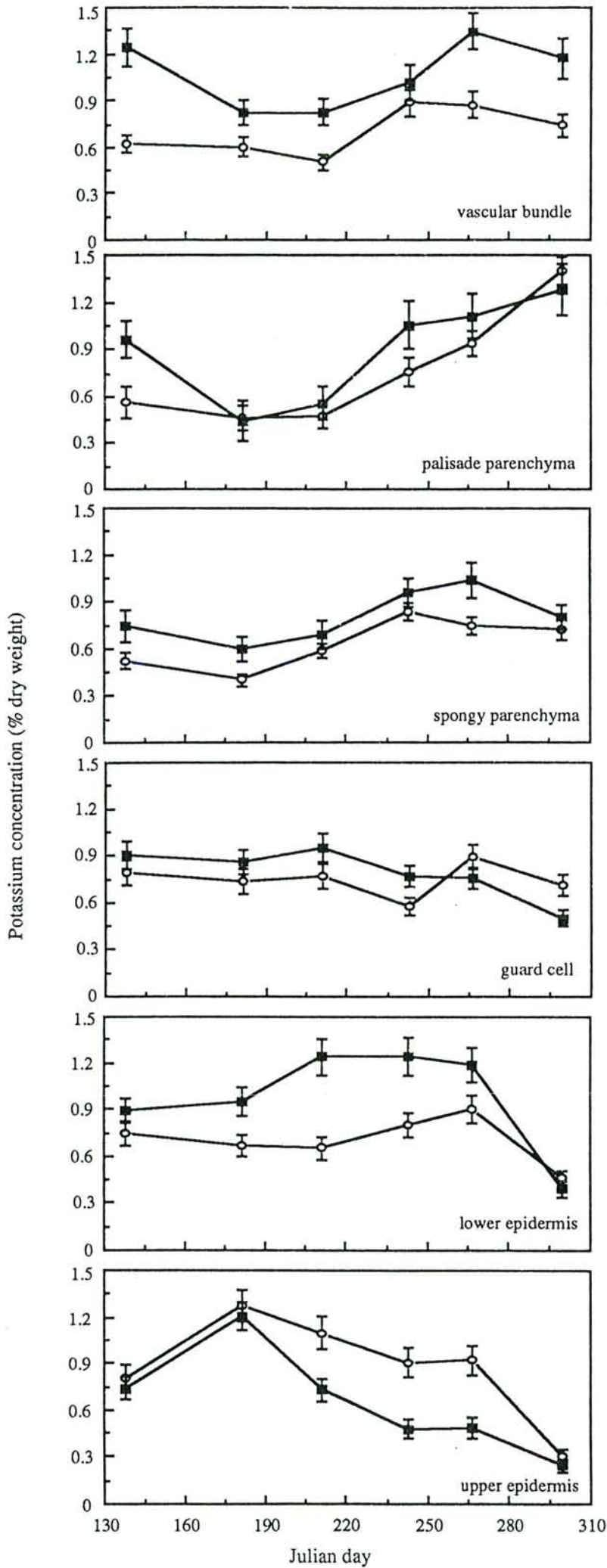


Figure 4

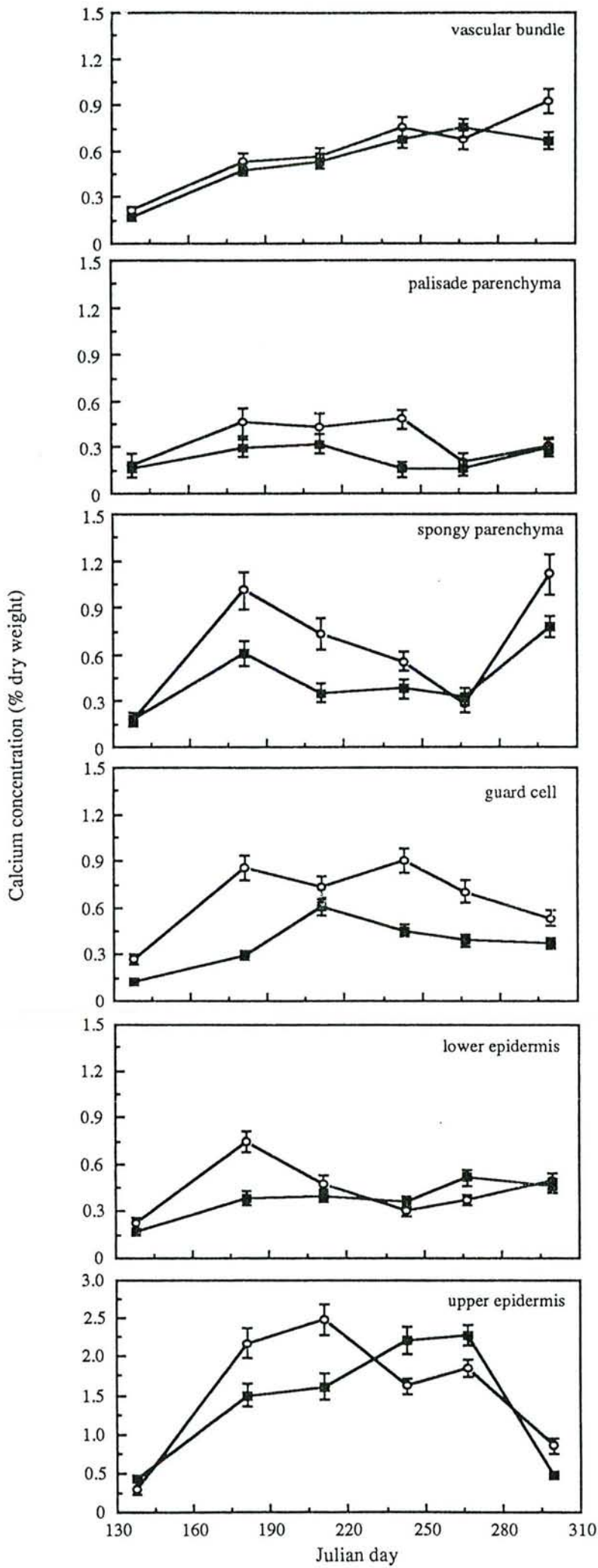
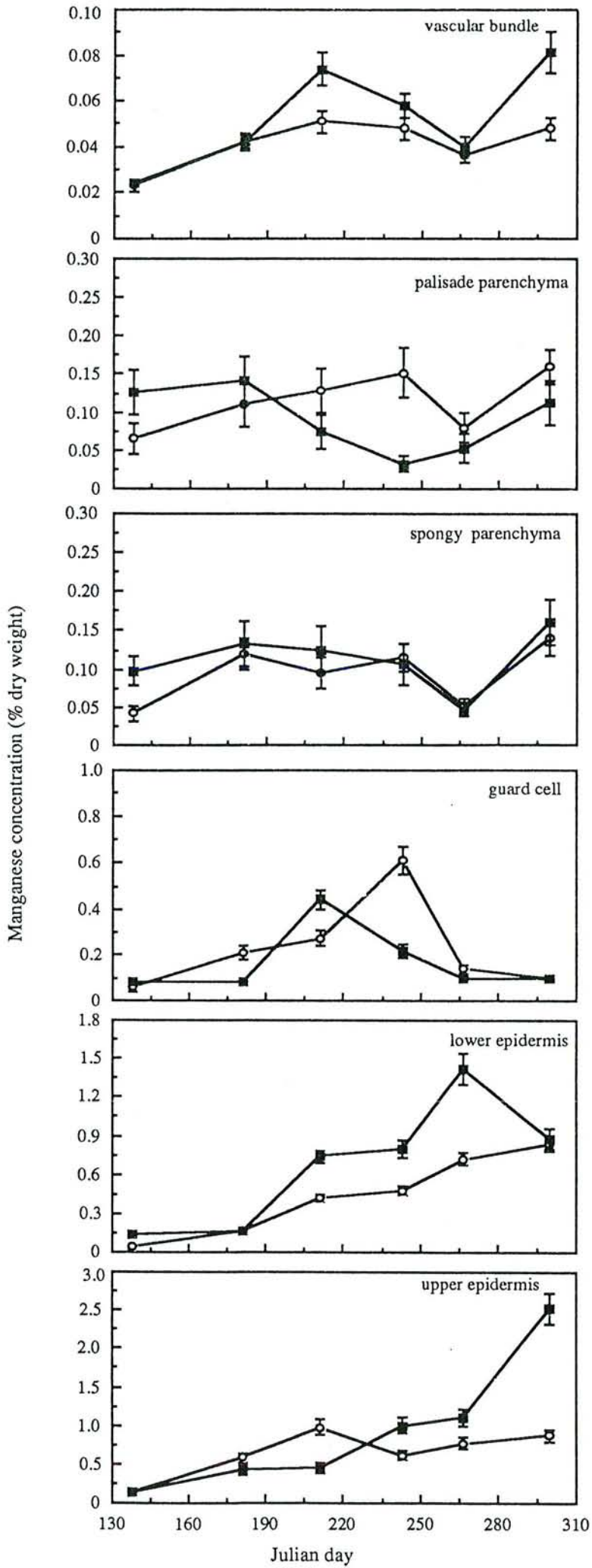


Figure 5



## **Annexe 7**

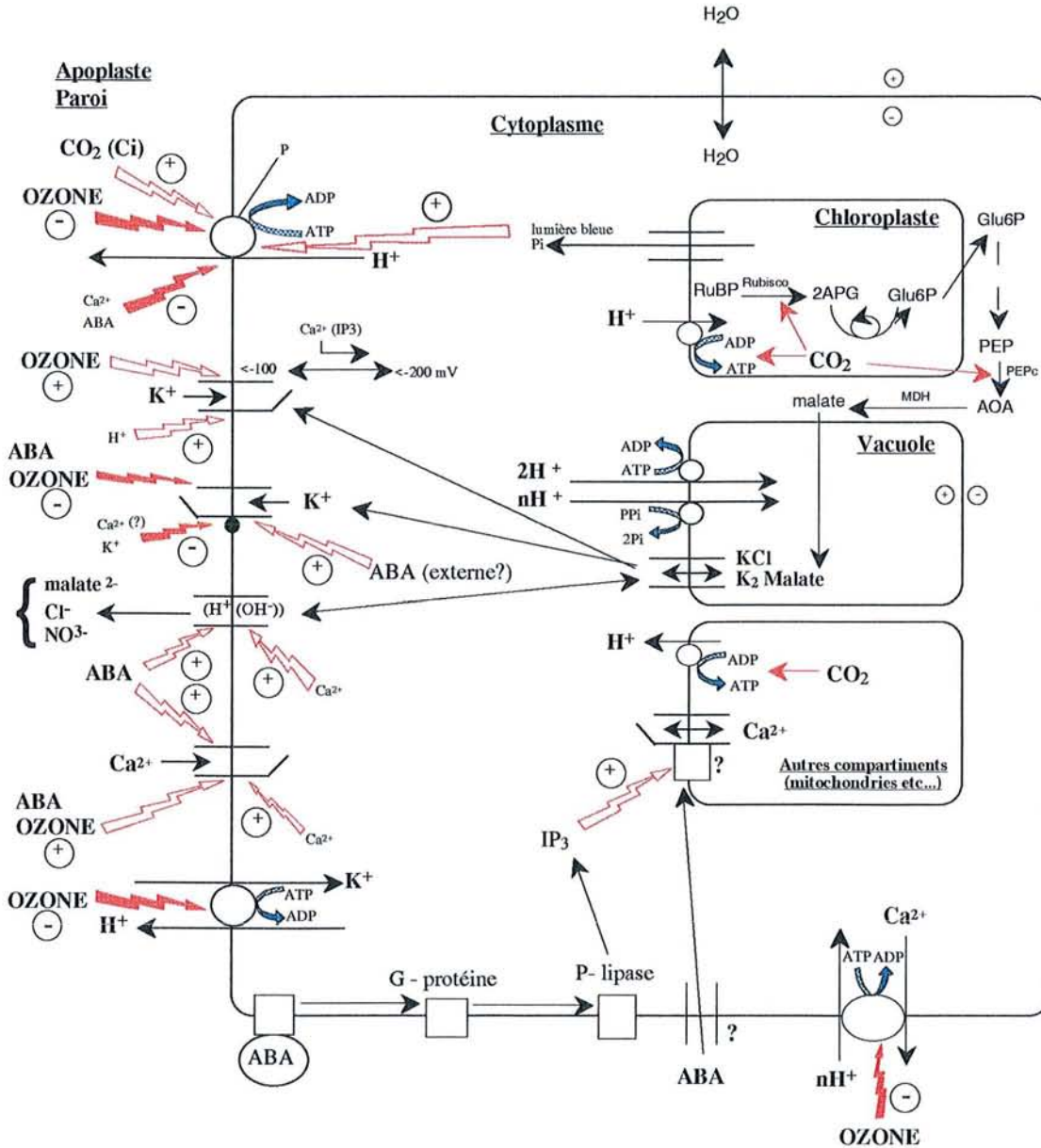
Modèle résumant les différentes actions de l'ozone, du dioxyde de carbone, du calcium et de l'acide abscissique sur les mouvements stomatiques.

Action de l'ozone, du dioxyde de carbone, du calcium et de l'acide abscissique affectant les mouvements stomatiques. Ce modèle est réalisé à partir d'autres synthèses (Heller, 1977; Laffray, 1987; Castillo & Heath, 1990; Mansfield *et al.*, 1990; Heath, 1994; Hinckley & Braatne, 1994; Hite & Outlaw, 1994).

⊕ : activation; ⊖ : inhibition; ○, — : pompes et canaux

Abréviations:

CO<sub>2</sub> (Ci): dioxyde de carbone interne; Ca: calcium; K: potassium; Cl: chlore; OH<sup>-</sup>: hydroxyl; ABA: acide abscissique; H<sup>+</sup>: proton; Pi: phosphate inorganique; RuBP: ribulose 1-5 bisphosphate; APG: acide phosphoglycérique; Glu6P: glucose 6 phosphate; PEP: phosphoénolpyruvate; PEPc: phosphoénolpyruvate carboxylase; AOA: acide oxaloacétique; MDH: malate déshydrogénase; IP3: inositol triphosphate; ADP: adénosine diphosphate; ATP: adénosine triphosphate.



## **Annexe 8**

Protocole expérimental de préparation des échantillons (feuilles et aiguilles)  
pour une étude ultrastructurale

**ETUDE ULTRASTRUCTURALE  
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION**

Matériels

- agitateur
- boite pour grilles
- couteaux de verre et de diamant
- freeze-pack
- gants
- glacière (avec polystyrène)
- grilles en cuivre
- lames de rasoir
- mandrain, cil
- micropipette avec poire
- moules
- pinces courbe et droite
- plaque
- portoirs
- tubes à hémolyse numérotés, bouchons en caoutchouc

Réactifs

- acétone
- MgCl<sub>2</sub>
- cacodylate de sodium
- eau distillée
- glutaraldéhyde EM 25%
- HCl
- OsO<sub>4</sub> 4% en ampoule
- paraformaldéhyde
- résine épon 812 en kit (5x100g Taab812, 3x100g DDSA, 3x100g MNA, 50g DMP-30)
- saccharose

Méthodes

Préparation du tampon

- tampon cacodylate 0,1 M durant l'hiver  
0,05 M durant la période de croissance  
0,07 M en automne

Préparation de la solution stock de tampon cacodylate: solution

A à 0,1M (200mOsM)

- 5,35g de poudre de cacodylate
- 250 ml d'H<sub>2</sub>O distillée

ajuster le pH à 7-7,2 avec HCl 1N avant de mettre toute l'eau

125 ml de solution A

125 ml d'H<sub>2</sub>O distillée

250 ml de tampon cacodylate 0,05 M = **solution B**  
(100mOsM)

Préparation de la solution fixative

250 ml de solution B

1,3655 g de saccharose (pour ajuster l'osmolarité)

0,1081 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O pour avoir une [Mg] de 2 mM

250 ml tampon cacodylate 0,05M = **solution C**  
(100 mOsM)

0,015 M saccharose (15mOsM)

2mM MgCl<sub>2</sub> (6mOsM)

88 ml de solution C

12 ml de glutaraldéhyde 25 % (se conserve à +4°C)

100 ml solution de glutaraldéhyde à 3 % = **solution D**  
(300mOsM)

tampon cacodylate 0,044M (88mOsM)

0,014M saccharose (14mOsM)

1,76mM MgCl<sub>2</sub> (5mOsM)



100 ml de solution C tiède  
 3 g de paraformaldéhyde  
 recouvrir d'aluminium, chauffer et agiter sur une platine  
 chauffante à +70°C (ajouter quelques gouttes de NaOH 0,2M  
 si nécessaire), sous hôte jusqu'à ce que cela devienne clair  
 (2h)

laisser refroidir

100 ml solution de paraformaldéhyde à 3 % = **solution E**  
 (600mOsM) tampon cacodylate 0,05M (100mOsM)  
 0,015M saccharose (15mOsM)  
 2mM MgCl<sub>2</sub> (6mOsM)

(se conserve 1 mois à +4°C)

-mélanger 100 ml de solution D + 100 ml de solution E = 200 ml  
**solution fixative F (565mOsM) à :**

1,5% glutaraldéhyde (150mOsM)  
 1,5% paraformaldéhyde (300mOsM)  
 pH=7 (doit être vérifié avant utilisation)  
 saccharose 0,015M (15mOsM)  
 MgCl<sub>2</sub> 2mM (6mOsM)  
 0,047M tampon cacodylate (94mOsM)

#### Préparation de la résine

-mélanger

36,4 ml d'Epon ou	9,1
24,8 de DDSA	6,2
18,8 de MNA	4,7
1,4 de DMP30	0,35

-mélanger doucement la solution 20-30 min sans faire de bulle  
 d'air.

Laver l'éprouvette à l'acétone et à l'eau chaude

#### Echantillonnage et fixation

##### **1er jour**

-couper les aiguilles immédiatement dans une goutte (pas à l'air)  
 de solution F avec une lame de rasoir. Les coupes feront 1 mm de  
 long et se feront dans le tiers supérieur de l'aiguille. Fermer les  
 tubes

-mettre les coupes dans les tubes avec la solution F, faire attention  
 que les coupes aillent bien au fond du tube (sinon utiliser la  
 trompe à vide) 1-4h à +4°C/ou toute la nuit à +4°C

-lavage dans la solution C + saccharose 3x 2h dans de la glace pilée  
 rmq: le premier rejet se fait dans une bouteille avec de l'eau, sous  
 hotte

-laisser toute la nuit au réfrigérateur à +4°C dans la solution F

##### **2ème jour**

-laver les échantillons dans la solution C + 7,9515g de saccharose  
 (496mOsM) 3x 10 min dans de la glace pilée./ ou 3x 2h

-postfixer les échantillons dans du OsO<sub>4</sub> 2% 2h au réfrigérateur  
 (5ml à 4% + 5 ml de solution A )(280mOsM)(à conserver dans une  
 double enceinte hermétique)

-laver les échantillons 3x pendant 10 min à l'eau distillée

-déshydrater les échantillons dans l'acétone froid: 25min: acétone  
 10%(6+54), 20%(12+48), 40%(24+36), 60%(36+24), 80%(48+12),  
 95%(57+3)(diluer avec de l'eau distillée)(préparer les  
 différentes solutions dans des flacons compte-gouttes)

à partir de maintenant tout se passe à température de la chambre

-laisser toute la nuit dans l'acétone à 80%

**3ème jour**

-déshydrater 2x à 95%  
3x à 100%

-mettre les échantillons dans un mélange résine-acétone  
1/3 (7ml de résine + 14ml d'acétone) 24h  
1/2(10ml de résine + 10ml d'acétone)  
2/3(14ml de résine + 7ml d'acétone), débouché les  
tubes  
pure

-mettre 2 à 3 gouttes d'épon dans les moules sans faire de bulle  
avec une seringue ou une pipette

-mettre un échantillon dans chaque moule  
-positionner les échantillons droit dans le moule avec un cure dent  
pour avoir une coupe transversale ou longitudinale  
-remplir les moules sans faire déborder

**5ème jour**

-laisser pendant 2 jours à +60°C à l'étuve

Nom : LE THIEC

Prénom : Didier

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I  
en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 19 DEC. 1994 - n° 240

Le Président de l'Université



**Résumé:** Ce travail synthétise les résultats obtenus lors de mesures écophysiological réalisées sur différentes espèces d'arbres dans le cadre de recherches des impacts des changements globaux sur les forêts. L'étude s'est plus particulièrement portée sur la recherche des impacts d'une augmentation de la concentration d'ozone troposphérique (étudiée sur deux clones de *Picea abies* et *Fagus sylvatica*) et d'une augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> (étudiée sur *Picea abies* et *Quercus rubra*). La croissance, les échanges gazeux foliaires, les concentrations en éléments minéraux (approche globale et histologique) ont fait l'objet d'un suivi. Parallèlement, les interactions du CO<sub>2</sub> et de l'ozone avec une contrainte hydrique édaphique ont été analysées.

La croissance des arbres soumis à l'air ambiant +50 ppb d'ozone est réduite significativement. Les effets de l'ozone sur les échanges gazeux et la composition minérale des aiguilles de l'année et de un an varient selon les clones chez les épicéas. De même la réponse des hêtres est différente de celle des épicéas. La sécheresse aggrave l'effet de l'ozone sur les aiguilles de un an du clone Istebna, elle montre un effet protecteur chez le hêtre.

L'augmentation de concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique provoque une stimulation de la conductance stomatique et de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> chez le chêne; en conditions hydriques défavorables, chêne et épicéa montrent une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau dans le traitement à forte concentration de CO<sub>2</sub>. L'augmentation de concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique tend à diminuer la concentration totale foliaire des éléments minéraux; ce phénomène n'affecte pas tous les compartiments foliaires.

**Mots clés:** ozone; dioxyde de carbone, sécheresse, conductance stomatique, photosynthèse, croissance, potassium, calcium, histologie.

**Abstract:** This thesis presents ecophysiological measurements that were performed on different tree species to assess the impact of global pollutant changes on forests. The work has concentrated on the effects of an increase in tropospheric ozone (on two *Picea abies* clones and on *Fagus sylvatica*) and on a doubling of CO<sub>2</sub> (on *Picea abies* and *Quercus rubra*). Growth, foliage gas exchange and the concentrations of nutrients at both the whole leaf and at the tissue level were studied. Furthermore the effects of combining each pollutant with drought were assessed.

The growth of *Picea abies* at ambient + 50 ppb ozone was significantly reduced. The effect of ozone on gas exchange and nutrient levels of needles of *Picea abies* varied between clones. The response of beech was different to that of Norway spruce. Drought accentuated the effects of ozone on one-year-old needles of the Istebna clone, but it served to reduce the impact of ozone on beech leaves.

Increasing the CO<sub>2</sub> concentration led to stomatal opening and larger net assimilation rates in red oak, but as the drought developed both oak and spruce had greater water use efficiencies in CO<sub>2</sub> enhanced air. 700 ppm CO<sub>2</sub> had a tendency to decrease the total foliage concentration of nutrients, but this phenomenon was not consistent between different foliage tissues.

**Key words:** ozone, carbon dioxide, drought, stomatal conductance, photosynthesis, growth, potassium, calcium, tissue.